

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 971**

51 Int. Cl.:

A23L 19/20 (2006.01)

A23B 7/155 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2014 E 14197402 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2901867**

54 Título: **Método para la producción de aceitunas de mesa fermentadas**

30 Prioridad:

11.12.2013 IT MI20132063

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.02.2018

73 Titular/es:

**CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
(100.0%)
Piazzale Aldo Moro, 7
00185 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**BLEVE, GIANLUCA;
TUFARIELLO, MARIA;
DURANTE, MIRIANA;
PERBELLINI, EZIO;
MITA, GIOVANNI;
RAMIRES, FRANCESCA ANNA;
GRIECO, FRANCESO y
LOGRIECO, ANTONIO FRANCESO**

74 Agente/Representante:

RUO , Alessandro

ES 2 653 971 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la producción de aceitunas de mesa fermentadas

5 **Campo de la invención**

[0001] La invención se refiere a un proceso para la fermentación de aceitunas de mesa que tiene la ventaja de permitir estandarizar y reducir el tiempo para todo el proceso de fermentación, y evaluar el proceso independientemente de los criterios subjetivos y empíricos utilizados actualmente por los fabricantes, aumentando de este modo los niveles de calidad y de seguridad del producto final, en comparación con los métodos tradicionales. Además, también se describen cultivos iniciales y su uso en la fermentación de dos variedades de aceitunas de mesa.

15 **Estado de la técnica**

[0002] La producción de aceituna es una práctica agrícola importante en países mediterráneos tales como Italia, Grecia y España. Las aceitunas de mesa son uno de los productos vegetales fermentados tradicionales más importantes de las naciones del sur de Europa y su producción y consumo aumentan constantemente. La producción mundial de aceitunas consiste en 2 millones de toneladas por año, el 38 % de los cuales se produce en España, Italia y Grecia. La producción italiana de aceitunas de mesa es de aproximadamente 70000 toneladas, y representa aproximadamente el 10 % de la producción mundial y el 20 % de la producción en la Unión Europea. Las aceitunas negras naturales, producidas por el método griego, son uno de los productos más importantes del mercado internacional, junto con las aceitunas verdes producidas por el método español y las aceitunas negras oxidadas, conocidas como aceitunas producidas por el método californiano.

[0003] De acuerdo con el método griego, las aceitunas se sumergen en una solución de salmuera que contiene una concentración de sal comprendida entre el 6-10 % (peso/volumen). En estas condiciones, tiene lugar la fermentación natural, que requiere 8-12 meses para completarse, y es operada por un consorcio microbiano epifítico que consiste en levaduras y bacterias de ácido láctico (LAB).

[0004] Con la tecnología actual, la fermentación láctica por parte de las bacterias del ácido láctico se considera la etapa más importante en el proceso de producción de aceitunas de mesa, ya que es responsable de: i) el desamargado de las aceitunas; ii) la disminución del pH de la salmuera, con un riesgo reducido de posible crecimiento de microorganismos responsables de la descomposición o patógenos, ii) la formación de características organolépticas y de una consistencia óptima del producto terminado.

[0005] Recientemente se ha considerado también un posible papel de las levaduras en la preparación y el almacenamiento de las aceitunas de mesa. De hecho, dichos microorganismos pueden influir positivamente en la fermentación a través de su producción de moléculas volátiles y metabolitos capaces de mejorar las características organolépticas del producto final, a través de la liberación de nutrientes que favorecen el crecimiento de bacterias del ácido láctico (LAB) y debido a su capacidad para operar la bio-reducción de compuestos fenólicos no deseados. Sin embargo, las levaduras también pueden causar problemas durante el proceso de producción, ya que pueden ser responsables de la formación de bolsas de gas, ablandamiento de la aceituna, hinchamiento del envase, opacidad de la salmuera o producción de sabores y olores indeseables.

[0006] Las levaduras asociadas con las aceitunas de mesa pertenecen a géneros tales como *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Wickerhamomyces* y *Zygorhizula*, y en particular las especies *S. cerevisiae*, *VV. anomalus*, *P. membranifaciens*, *P. galeiformis*, *C. boidinii*, *C. diddensiae* y *K. lactis*.

[0007] Actualmente, el control del proceso y la producción de aceitunas fermentadas depende únicamente de la experiencia empírica de los productores que, de acuerdo con criterios subjetivos, evalúan cuándo las aceitunas están listas para el consumo y establecen los niveles de calidad y seguridad del producto final. Los procesos actuales de fermentación son espontáneos, impredecibles y están fuertemente influenciados por las condiciones físico-químicas, la disponibilidad de sustratos fermentables y el contenido de sal, así como por los microorganismos presentes como contaminantes de drupas.

[0008] Bevilacqua A., et al (J Food Sci. 2013 May; 78(5): M742-51) se refiere a la fermentación de aceitunas de mesa, y describe la selección de cepas de levadura, aisladas de las aceitunas de mesa Bella di Cerignola, en relación con diferentes rasgos enzimáticos y con la capacidad de crecer en diferentes condiciones. En particular, la selección de levadura se describe sobre la base de la capacidad de la cepa para crecer a 15 °C y con una alta concentración de NaCl, así como a pH alcalinos y que posee una interesante actividad de β -glucosidasa. Las aisladas son *Kluyveromyces lactis*, *Wickerhamomyces anomalus* y *Candida norvegica*.

[0009] Se han descrito diferentes levaduras y cepas bacterianas:

- La entrada de la base de datos FSTA FS-1996-09-J-0096 se refiere a los inóculos de salmuera microbiana para mejorar la calidad sensorial de las aceitunas de mesa verdes;
- la entrada de la base de datos FSTA FS-1977-07-J-0992 se refiere a la detección de cepas de levadura en varias salmueras en las que se fermentaron aceitunas verdes. Se estudiaron diferentes levaduras para determinar su capacidad para crecer a los diferentes porcentajes de NaCl, usado en remojo de salmuera;
- la entrada de la base de datos FSTA FS-2009-12-Jg5589 se refiere a la selección de bacterias de ácido láctico.

[0010] Durante muchos años, la búsqueda de iniciadores para la fermentación de aceitunas de mesa se ha centrado en la actividad de LAB. Basándose en esta actividad de investigación, se ha propuesto el uso de cultivos iniciadores de bacterias de ácido láctico, incluyendo *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* en un único cultivo o mezcla para controlar la fermentación y producir productos de alta calidad. La importancia y las posibles aplicaciones de las levaduras en el proceso de producción de aceitunas de mesa han comenzado a considerarse solamente en los últimos años.

[0011] La dificultad particular para determinar el rendimiento y la finalización del proceso de fermentación, junto con la falta actual de controles químico-físicos o microbiológicos para determinar cuándo las aceitunas están listas para ser comercializadas y consumidas, son los factores detrás de la ausencia sustancial de enfoques positivos para determinar el momento óptimo para lograr el producto terminado.

[0012] La presente invención permite seguir todo el proceso de fermentación y propone parámetros químicos específicos para determinar, respectivamente, la levadura y la actividad de LAB a usar como indicadores y descriptores del buen o mal rendimiento de la fermentación y para determinar inequívocamente la finalización de todo el proceso de fermentación.

[0013] Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es permitir realizar el proceso de fermentación para la producción de aceitunas fermentadas de una manera controlada y con un tiempo reducido independientemente de los criterios subjetivos establecidos empíricamente por un productor individual.

Resumen de la invención

[0014] El objetivo anteriormente indicado se ha logrado mediante el desarrollo de un método para la producción de aceitunas de mesa fermentadas en el que la muestra de aceituna se inocula secuencialmente con una cepa de levadura y, después de un tiempo apropiado, con una bacteria de ácido láctico.

[0015] Los inventores, de hecho, han identificado por primera vez un proceso para la fermentación de aceitunas de mesa que implica el uso secuencial de levadura y posteriormente de bacterias de ácido láctico.

[0016] Por lo tanto, la invención se refiere a un método para la producción de aceitunas de mesa fermentadas que comprende las etapas de:

- a. remojar las aceitunas en salmuera;
- b. inocular el producto obtenido de la etapa a. con un cultivo de levadura;
- c. incubar el producto obtenido de la etapa b. para permitir la fermentación alcohólica;
- d. inocular el producto fermentado obtenido de la etapa c. con un cultivo de Bacteria de ácido láctico;
- e. incubar el producto obtenido de la etapa d. para permitir la fermentación láctica.

[0017] En otro aspecto más, en una forma preferida de realización, la invención se refiere a un cultivo iniciador que comprende al menos una levadura de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* (cod. DSMZ 27800) y al menos una bacteria de ácido láctico de la cepa *Lactobacillus plantarum* (cod. DSMZ 27925), y su uso para la fermentación de una muestra de aceituna de la variedad italiana Leccino.

Descripción de las figuras

[0018] La invención se describirá ahora en detalle y en referencia a las Figuras adjuntas, en las que:

- La Figura 1 muestra el diagrama de flujo de las etapas a realizar para seleccionar los cultivos de levadura/LAB iniciadores utilizados como iniciadores autóctonos.

- La Figura 2 muestra el perfil de crecimiento de (A) cultivos iniciadores de levadura (DSMZ 27800) y LAB (DSMZ 27925) inoculados para fermentar la variedad de aceituna Leccino y (B) cultivos iniciadores de levadura (DSMZ 27801) y LAB (DSMZ 27926) inoculados para fermentar la variedad de aceituna Kalamata.
- La Figura 3 muestra el análisis de dominancia de (A) cultivos iniciadores de levadura (DSMZ 27800) y (B) LAB (DSMZ 27925) al final de la fermentación de aceitunas de la variedad Leccino y (C) cultivos iniciadores de levadura (DSMZ 27801) y (D) LAB (DSMZ 27926) al final de la fermentación de las aceitunas de la variedad Kalamata. Línea 1: Muestra en blanco, Línea 2: Marcador de ADN, Línea 3-12: Perfiles de RAPD de 10 aislados microbianos diferentes, Línea 13: perfil de iniciador de levadura o LAB inoculado.
- La Figura 4 muestra las variaciones en la concentración de azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes en la pulpa y en la salmuera de aceitunas Leccino (A) fermentadas con iniciadores de levadura (DSMZ 27800) y LAB (DSMZ 27925) y (B) fermentadas por fermentación espontánea.
- La Figura 5 muestra las variaciones en la concentración de azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes en la pulpa y en la salmuera de aceitunas Kalamata (A) fermentadas con iniciadores de levadura (DSMZ 27801) y LAB (DSMZ 27926) y (B) fermentadas por fermentación espontánea.
- La Figura 6 describe variaciones en la concentración de monofenoles y polifenoles presentes en la pulpa y en la salmuera de aceitunas Leccino (A) fermentadas por iniciadores de levadura (DSMZ 27800) y LAB (DSMZ 27925) y (B) fermentadas por fermentación espontánea.
- La Figura 7 muestra variaciones en la concentración de monofenoles y polifenoles presentes en la pulpa y en la salmuera de aceitunas Kalamata (A) fermentadas por iniciadores de levadura (DSMZ 27801) y LAB (DSMZ 27926) y (B) fermentadas por fermentación espontánea.
- La Figura 8 muestra variaciones en la concentración de carotenoides en la pulpa de (A) aceitunas Leccino fermentadas por iniciador de levadura (DSMZ 27800) y LAB (DSMZ 27925), (B) aceitunas Leccino fermentadas por fermentación espontánea, (C) aceitunas Kalamata fermentadas por iniciadores de levadura (DSMZ 27801) y LAB (DSMZ 27926) y (D) aceitunas Kalamata fermentadas por fermentación espontánea.
- La Figura 9 muestra variaciones en la concentración de vitamina E en la pulpa de (A) aceitunas Leccino fermentadas por iniciadores de levadura (DSMZ 27800) y LAB (DSMZ 27925), (B) aceitunas Leccino fermentadas por fermentación espontánea, (C) aceitunas Kalamata fermentadas por iniciadores de levadura (DSMZ 27801) y LAB (DSMZ 27926) y (D) aceitunas Kalamata fermentadas por fermentación espontánea.
- Figura 10. Análisis de componentes principales (PCA) de compuestos volátiles asociados con aceitunas de mesa fermentadas de la variedad (A) Leccino y (B) Kalamata. El análisis PCA se realizó utilizando como variables los datos obtenidos del análisis de concentraciones y presencia de compuestos volátiles durante tres momentos de fermentación diferentes. La figura es un gráfico bi-plot, que muestra los valores de las muestras y variables en el formato plano PC1-PC2. La figura también muestra las principales clases de moléculas representativas de la primera parte de la fermentación (30 g), la fermentación por levadura (60 g) y la fermentación por LAB (90 g).
- La Figura 11 muestra variaciones en la concentración de las principales clases de compuestos volátiles asociados con aceitunas Leccino fermentadas (A) mediante inoculación secuencial de cultivos iniciadores de levadura (DSMZ 27800) y LAB (DSMZ 27925) y (B) por fermentación natural. Representación del diagrama de radar de los atributos sensoriales asociados con las clases de moléculas volátiles identificadas en aceitunas fermentadas mediante (C) inoculación secuencial de cultivos iniciadores de levadura (DSMZ 27800) y LAB (DSMZ 27925) y (D) fermentación natural.
- La Figura 12 describe variaciones en la concentración de las principales clases de compuestos volátiles asociados con aceitunas Kalamata fermentadas mediante (A) inoculación secuencial de cultivos iniciadores de levadura (DSMZ 27801) y LAB (DSMZ 27926) y (B) fermentación natural. Representación del diagrama de radar de los atributos sensoriales asociados con las clases de moléculas volátiles identificadas en aceitunas fermentadas mediante (C) inoculación secuencial de cultivos iniciadores de levadura (DSMZ 27801) y LAB (DSMZ 27926) y (D) fermentación natural.

Descripción detallada de la invención

- [0019]** Por lo tanto, la invención se refiere a un método para la producción de aceitunas de mesa fermentadas en el que la muestra de aceitunas se inocula secuencialmente con un primer cultivo iniciador de levadura seguido de un cultivo de la bacteria de ácido láctico.
- [0020]** Actualmente, la producción de aceitunas fermentadas depende de la experiencia de los productores que determinan, de acuerdo con criterios subjetivos y empíricos, cuándo las aceitunas están listas para ser consumidas y los niveles de calidad y seguridad del producto final. En el presente, los procesos de fermentación son espontáneos, impredecibles y están fuertemente influenciados por las condiciones físico-químicas, la disponibilidad de sustratos fermentables y el contenido de sal, así como por los microorganismos presentes como contaminantes de drupas.
- [0021]** De acuerdo con un protocolo específico, los inventores han seleccionado aislados de levaduras y bacterias de ácido láctico, y han desarrollado a través de su uso un proceso de fabricación capaz de: i) aumentar las

propiedades organolépticas y nutricionales de las aceitunas de mesa fermentadas, ii) conducir un proceso de fermentación controlado, iii) reducir el tiempo requerido para obtener el producto terminado.

5 **[0022]** Por lo tanto, la invención se refiere a un método para la producción de aceitunas de mesa fermentadas que comprende las etapas de:

- a. remojar las aceitunas en salmuera;
- b. inocular el producto obtenido de la etapa a. con una levadura;
- 10 c. incubar el producto obtenido de la etapa b. para permitir la fermentación alcohólica;
- d. inocular el producto fermentado obtenido de la etapa c. con una bacteria de ácido láctico;
- e. incubar el producto obtenido de la etapa d. para permitir la fermentación láctica.

15 **[0023]** La salmuera se prepara disolviendo cloruro sódico en la cantidad apropiada de agua para obtener un porcentaje comprendido entre el 6 y el 12 % (peso/volumen).

[0024] Los resultados experimentales obtenidos han demostrado que el método de la invención permite reducir el tiempo de fermentación de 6-12 meses, generalmente requerido para completar el proceso de producción empírica, hasta un máximo de tres meses.

20 **[0025]** El método anterior también proporciona la ventaja de procesos de fermentación controlados para la producción de aceitunas fermentadas independientemente de los criterios subjetivos y empíricos de los productores. El control de los parámetros químicos asociados a la fermentación que sirven como indicadores de los procesos de fermentación, permite seguir el progreso de dichos procesos e intervenir con prontitud con las correcciones necesarias. En una forma preferida, el método para la producción de aceitunas de mesa fermentadas de acuerdo
25 con la presente invención comprende las etapas de:

- a. remojar las aceitunas en salmuera.
En la fase a., la relación aceituna:salmuera varía de aproximadamente 3:1, para las aceitunas con un calibre mayor (de 60/70 piezas por Kg hasta 210 piezas por Kg) a aproximadamente 2:1 para las aceitunas
30 con un calibre más pequeño (de 220 piezas por Kg a 410 piezas por kg), según lo establecido por el COI/OT/NC n.º 1 de diciembre de 2004;
- b. inocular el producto obtenido de la etapa a. con una levadura, usando una relación de 1:300 entre el volumen del inóculo de levadura y el volumen de salmuera a inocular en la fase b;
- 35 c. incubar el producto obtenido de la etapa b. para permitir la fermentación alcohólica a una temperatura variable, de aproximadamente 6 °C a 30 °C, durante un tiempo variable de aproximadamente 45 a aproximadamente 60 días;
- d. inocular el producto fermentado obtenido de la etapa c. con una bacteria de ácido láctico, usando una relación de aproximadamente 1/300 entre el iniciador de LAB y el producto fermentado, es decir, el volumen de salmuera;
- 40 e. incubar el producto obtenido de la etapa d. para permitir la fermentación láctica a una temperatura que varía de aproximadamente 6 °C a 30 °C durante un tiempo que varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 días.

45 **[0026]** La presente invención se puede aplicar en condiciones ambientales en un amplio intervalo de temperaturas correspondiente a las temperaturas normales en la cuenca mediterránea durante los meses de procesamiento de la aceituna (de octubre a mayo). Esta posibilidad hace que la presente invención sea explotable en condiciones normales de trabajo para empresas italianas y griegas que no utilicen sistemas de control de temperatura de los recipientes donde se realiza la fermentación de aceitunas de mesa, ya sea barriles o silos, y realicen todo el proceso a temperatura ambiente.
50

[0027] La inoculación se realiza de un modo secuencial: se inicia con la inoculación del inóculo de levadura capaz de producir la primera fermentación seguido de la inoculación de la bacteria de ácido láctico responsable de la fermentación láctica. Este procedimiento permite imitar el proceso natural de fermentación espontánea. De esta manera, las levaduras son capaces de realizar la primera fermentación y, a través de la liberación de nutrientes y la
55 reducción de compuestos polifenólicos antibacterianos, determinar las condiciones ideales para que las bacterias del ácido láctico realicen la fermentación alcohólica láctica en el mejor de los casos.

[0028] Preferiblemente, el método de acuerdo con la presente invención es un método que permite la producción de aceitunas de mesa fermentadas, en el que el ejemplo de dichas aceitunas se elige del grupo que consiste en
60 aceitunas italianas de la variedad Leccino y aceitunas griegas de la variedad Kalamata.

[0029] Leccino es una de las variedades de aceitunas más extendidas en el territorio italiano. La variedad Leccino tiene su origen en el centro y sur de Italia (Toscana, Lazio, Abruzzo, Molise y Puglia) y actualmente es la más

cultivada en todo el mundo y está muy extendida en Argentina, Jordania, Israel, Sudáfrica, California, Nueva Zelanda y Australia. Las drupas tienen un tamaño promedio (2-2,5 g), forma elipsoidal y son ligeramente asimétricas con el ápice redondeado y la base aplanada. La variedad se caracteriza por una maduración de la fruta temprana y simultánea, y el aceite producido a partir de esta variedad está muy extendido. En la cosecha, las aceitunas son de color negro-violeta y el rendimiento del aceite varía entre el 17-22 %. Esta variedad es resistente a las bajas temperaturas, a los cambios de temperatura, a los vientos, a la niebla, al nudo de olivo, a la pudrición seca, a la mancha de la hoja del olivo. Esta variedad se ha aprovechado para la producción de aceitunas de mesa de tipo brillante o negro. Tradicionalmente se produce por el método griego que implica la fermentación natural en salmuera a partir del 8-12 % de cloruro sódico (peso/volumen), alcanzando el desamargado completo después de aproximadamente 8-10 meses. El método descrito en el presente documento, que emplea secuencialmente los cultivos iniciadores seleccionados de levadura y bacterias de ácido láctico, permite llegar a un desamargado completo en un máximo de 3 meses y enriquecer el perfil volátil y sensorial de las aceitunas con notas afrutadas, florales, vínicas, herbáceas, maltosas, y reduce los hidrocarburos volátiles y los fenoles (Figuras 11 y 12), al tiempo que garantiza el mantenimiento de las características nutricionales representadas por los componentes fenólicos e isoprenoides (Figuras 6-9).

[0030] La aceituna griega Kalamata tiene su origen en la región de Messenia. Esta aceituna negra única se produce en el sur del Peloponeso y en el área de Agrinio. Tiene un alto peso y forma alargada asimétrica con ápice y base afilados. En temporadas normales, la recolección de aceitunas negras comienza en octubre y finaliza en febrero, el color se da solamente por una exposición más prolongada al sol.

[0031] De acuerdo con el método griego, las aceitunas se sumergen en una solución de salmuera que contiene una concentración de sal comprendida entre el 6-10 % (peso/volumen). Solamente requieren fermentación en agua y sal durante un período prolongado, de hecho, están listas para su consumo después de aproximadamente 4-6 meses desde la cosecha, y se pueden cortar verticalmente para reducir el tiempo de fermentación. Los niveles residuales de polifenoles en las aceitunas después del procesamiento son responsables del sabor ligeramente amargo del producto terminado. La preparación de aceitunas Kalamata también requiere la adición de aceite de oliva y vinagre. La fermentación se realiza por poblaciones mixtas de microorganismos que consisten en microflora epífita de levaduras y bacterias de ácido láctico. Actualmente, el proceso de fermentación se basa en la capacidad de la microflora epífita para auto-seleccionar y lograr este proceso de manera eficiente, sin ninguna posibilidad de predecir el rendimiento, la calidad y la salubridad del producto final que se obtendrá. Las fermentaciones anormales incontrolables a menudo comprometen el producto final con respecto a la calidad y la seguridad para el consumidor. Hasta la fecha, no existen sistemas para supervisar el desarrollo del proceso desde el punto de vista de la calidad y la seguridad, y no existen parámetros disponibles que permitan obtener un producto con características organolépticas reconocibles a lo largo de los años.

[0032] El método descrito en la presente invención tiene la ventaja de permitir la producción de aceitunas de mesa fermentadas, en el caso de las aceitunas italianas de la variedad Leccino, la levadura utilizada para complementar la muestra de aceituna es una cepa de levadura seleccionada de *Saccharomyces cerevisiae* (cod. DSMZ 27800) y la cepa de bacterias de ácido láctico usada para inocular la muestra de aceituna parcialmente fermentada por levadura (primer producto fermentado) es una cepa seleccionada de *Lactobacillus plantarum* (cod. DSMZ 27925).

[0033] La cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación de aceitunas de la variedad italiana Leccino se presentó el 22 de octubre de 2013 en el Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, con el número de depósito *Saccharomyces cerevisiae* Leccino-Y1 (LI-180-7) (cod. DSMZ 27800). La cepa bacteriana *Lactobacillus plantarum* para la fermentación de las aceitunas de la variedad italiana Leccino se presentó el 22 de octubre de 2013 en el Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH con el número de depósito (cod. DSMZ 27925).

[0034] El método de acuerdo con la presente invención permite ventajosamente la producción de aceitunas de mesa fermentadas, en el que, en el caso de las aceitunas de la variedad griega Kalamata, la cepa de levadura es *Saccharomyces cerevisiae* Kalamata-Y1 (KI-30-16) (cod. DSMZ 27801), y la cepa de la bacteria del ácido láctico es *Leuconostoc mesenteroides* (cod. DSMZ 27926).

[0035] La cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación de aceitunas griegas de la variedad Kalamata se presentó el 22 de octubre del 2013 en el Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH con el número de depósito *Saccharomyces cerevisiae* Kalamata-Y1 (KI-30-16) (cod. DSMZ 27801).

[0036] La cepa bacteriana *Leuconostoc mesenteroides* para la fermentación de aceitunas griegas de la variedad Kalamata se presentó el 22 de octubre del 2013 en el Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH con el número de depósito (cod. DSMZ 27926).

5 [0037] El uso de las levaduras y bacterias seleccionadas y del protocolo de producción propuesto permite: i) obtener productos finales con propiedades organolépticas y nutricionales aumentadas y mejoradas en comparación con un producto obtenido por fermentación natural; ii) realizar el proceso de fermentación en un tiempo más corto del requerido para completar el proceso en condiciones naturales; iii) realizar un proceso de fermentación más eficiente y controlable.

10 [0038] En la presente descripción, el término "iniciador" o la expresión "cultivo iniciador" se refiere a una preparación que contiene microorganismos vivos y viables para usarse con el objetivo de explotar el metabolismo microbiano para iniciar la fermentación y asegurar el resultado tecnológico del proceso de producción.

15 [0039] En una forma preferida de realización, en el método de acuerdo con la presente invención, la concentración de levaduras, requerida en la etapa b. para la inoculación del producto obtenido de la etapa a, se encuentra entre 5×10^5 y 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro (ml) de salmuera.

20 [0040] En una forma de realización preferida adicional, en el método de acuerdo con la presente invención, la concentración de bacterias de ácido láctico requerida en la etapa d para la inoculación del producto fermentado obtenido a partir de la etapa c, está entre 5×10^5 y 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro (ml) de salmuera.

25 [0041] Las cepas de levadura utilizadas para realizar la fermentación de las aceitunas de las variedades Leccino y Kalamata se preparan por crecimiento en medio definido a pH 5 en presencia de concentraciones crecientes de sal del 0 hasta el 6 % (peso/volumen) de NaCl, para adaptarlas a las condiciones de salinidad en que se inoculan.

30 [0042] Las cepas bacterianas de ácido láctico utilizadas para realizar la fermentación de aceitunas de las variedades Leccino y Kalamata se preparan por crecimiento en medio definido en presencia de concentraciones crecientes de sal, del 0 hasta el 6 % (peso/volumen) de NaCl, y pH decreciente, partiendo de pH 6 a pH 4-4,5, para adaptarlas a las condiciones de salinidad y acidez en que se inoculan.

35 [0043] Para ambas variedades, la fermentación se realiza a una temperatura que varía entre 6 y 30 °C, siguiendo los patrones de temperatura estacionales.

40 [0044] La fermentación a escala piloto, realizada para las variedades de aceitunas Leccino y Kalamata, se inoculó con iniciadores de acuerdo con el procedimiento descrito en la presente invención, usando como control una fermentación a escala piloto que se permite que tenga lugar espontáneamente.

45 [0045] Los azúcares solubles tales como glucosa, fructosa y sacarosa, representan el sustrato para la fermentación microbiana durante la cual se producen metabolitos secundarios que son responsables de las propiedades organolépticas y el sabor característico de la drupa. Como se muestra en las Figuras 4 y 5, la glucosa es el azúcar predominante en la pulpa de ambas variedades de aceituna, seguido de fructosa y sacarosa. El contenido total de azúcar en la pulpa de las aceitunas Leccino sometidas a fermentación controlada por iniciadores o a fermentación espontánea varía de un contenido inicial de 71,1 mg/g (peso seco), a 10,8 y 16,7 mg/g (peso seco), respectivamente (Figura 4). De manera diferente, en el caso de la variedad Kalamata, el contenido de azúcar total inicial (65,5 mg/g de peso seco) se metaboliza completamente después del proceso de fermentación controlada o espontánea (Figura 5). En la salmuera de la variedad Leccino, después de la fermentación controlada por un iniciador o espontánea, hay casi una cantidad similar de fructosa y sacarosa indetectable, mientras que el contenido de glucosa muestra diferencias cuantitativas significativas que consisten en un consumo total al final de la fermentación controlada por un iniciador y un contenido de glucosa residual de 0,69 g/l después de la fermentación espontánea. La presencia de una cantidad baja de azúcar confirma el buen rendimiento del proceso de fermentación.

50 [0046] Dependiendo de la variedad y la fase de madurez, el contenido de ácido orgánico muestra variaciones cuantitativas. Los siguientes ácidos orgánicos se han identificado en la pulpa y en la salmuera de ambas variedades: ácido cítrico, tartárico, málico, succínico y acético, que disminuyen en la pulpa durante el proceso de fermentación, mientras aumentan en la salmuera. En particular, el ácido succínico predomina en la salmuera de la variedad Leccino, mientras que el ácido acético es predominante en la variedad Kalamata (Figuras 4 y 5). En la muestra de la variedad Leccino, el ácido láctico se midió en pulpa y salmuera después de la fermentación controlada por iniciador (12,2 mg/g de peso seco en pulpa y 2,8 mg/g de peso seco en salmuera) en comparación con la fermentación espontánea (7,4 mg/g de peso seco en pulpa y 0,6 mg/g de peso seco en salmuera). En cambio, está presente una concentración más alta de ácido láctico en la salmuera de la variedad Kalamata al final de la fermentación espontánea (16,5 mg/g de peso seco en pulpa y 3,9 mg/g de peso seco en salmuera) en comparación con la fermentación controlada (16,0 mg/g de peso seco en pulpa y 2,4 mg/g de peso seco en salmuera). Se han identificado etanol y glicerol en la fermentación controlada por iniciador y espontánea de la salmuera de la variedad Leccino y ambos aumentan durante el proceso de fermentación (Figura 4). En la salmuera de la variedad Kalamata,

la variación de la concentración de etanol muestra la misma tendencia tanto en la fermentación espontánea como en la controlada por iniciador, mientras que la producción de glicerol solamente se observó en la fermentación controlada por iniciador (Figura 5).

5 **[0047]** Con fines ilustrativos, a continuación se proporcionan ejemplos de realizaciones de la presente invención.

Ejemplos

10 Ejemplo 1: Selección de levaduras y bacterias de ácido láctico para su uso como iniciador para la fermentación de aceitunas de mesa

[0048] Los autores han desarrollado un innovador protocolo de selección de levaduras y LAB para obtener microorganismos capaces de sobrevivir en condiciones de bajo pH, altas concentraciones de sal y en presencia de compuestos antimicrobianos tales como mono y polifenoles contenidos en las aceitunas y salmuera, y en presencia de un bajo contenido de nutrientes (azúcares, ácidos orgánicos, etc.) (Figura 1).

[0049] Aislamiento de microorganismos en medios adecuados:

20 - Primera etapa: selección de microorganismos obtenidos en salmueras sintéticas que contienen cantidades específicas de sal, de especies mono y polifenólicas encontradas especialmente en salmueras fermentadas, a pH ácido y baja temperatura. Para la selección de levaduras, la formulación de salmueras modelo consiste en: 100 mg/l de tirosol, 30 mg/l de ácido cafeico, 1000 mg/l de oleuropeína, 500 mg/l de verbascósido, NaCl al 8-10 %, 3 g/l de glucosa, 0,5 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de agar, pH 4-4,5, crecimiento a 14 °C.

25 - Para la selección de bacterias de ácido láctico, la formulación de salmueras modelo consiste en: 100 mg/l de tirosol, 15 mg/l de ácido cafeico, 300 mg/l de oleuropeína, 100 mg/l de verbascósido, NaCl al 8 %, 3 g/l de glucosa, 0,5 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de agar, pH 4,2, crecimiento a 12 °C

30 - Segunda etapa: selección de microorganismos mediante la evaluación de la presencia de caracteres positivos tales como i) presencia de actividad beta-glucosidasa y consiguiente capacidad para degradar oleuropeína (que es la razón principal del sabor amargo), ii) presencia de actividad lipasa, iii) ausencia de producción de aminas biogénicas, iv) ausencia de actividad proteasa.

35 - Tercera etapa: identificación de los microorganismos seleccionados a nivel de género y especie usando métodos moleculares para aislamiento de ADN, amplificación por PCR de regiones de ADN ITS para levaduras y de la región de ADNr 16S para bacterias de ácido láctico, secuenciación y comparación de secuencias con bases de datos existentes para identificar las levaduras y bacterias GRAS (generalmente reconocidas como seguras).

40 - Cuarta etapa. Uso de levaduras y LAB seleccionadas de este modo, identificadas y dotadas de las mejores características tecnológicas para la realización de pruebas de fermentación a escala piloto de 180 kg de aceitunas.

[0050] Para cada variedad de aceituna en consideración, se seleccionó una cepa de levadura autóctona y una cepa de bacteria láctica para su uso en la fermentación.

45 **[0051]** Se prepararon inóculos adecuados de levaduras y LAB, aproximadamente 10^6 UFC/ml de salmuera, para realizar estas pruebas. Durante el crecimiento de los organismos, los valores de salinidad aumentaron y los valores de pH se redujeron simultáneamente para asegurar una mejor adaptabilidad de los iniciadores seleccionados al microsistema salmuera/aceituna.

Ejemplo 2: Protocolo de fermentación

50 **[0052]** El protocolo de fermentación que se ha desarrollado consiste en las siguientes fases operativas:

55 1. Preparación de la muestra de aceitunas y salmuera
2. Inoculación con el cultivo de levadura. El rendimiento del proceso se supervisa cada 7 días mediante la evaluación de: a) recuento total de levaduras, b) parámetros químicos y físicos, tales como temperatura, pH y salinidad. Al final de la primera fermentación (alcohólica), se evalúa el predominio de la cepa iniciadora de levadura inoculada en comparación con la población total.

60 3. Análisis de: a) variación de la concentración de azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, mono y polifenoles y compuestos isoprenoides presentes en las salmueras y en las aceitunas, mediante análisis por HPLC, b) perfil volátil y sensorial de aceitunas y salmueras, mediante análisis GC-MS, c) presencia de enterococos y otras bacterias patógenas.

4. La inoculación con el cultivo bacteriano de ácido láctico se produce al final de la fermentación por levadura.

5. Supervisión de: a) recuento total de levadura y bacterias, b) parámetros físico-químicos tales como temperatura, pH y salinidad. Al final de la segunda fermentación (láctica), se evalúa el predominio de la cepa iniciadora de la bacteria láctica inoculada en comparación con la población total.

6. Análisis de: a) variación de la concentración de azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, mono y polifenoles y compuestos isoprenoides presentes en las salmueras y en las aceitunas, mediante análisis por HPLC, b) perfil volátil y sensorial de aceitunas y salmueras, mediante análisis GC-MS, c) presencia de enterococos y otras bacterias patógenas.

7. Además, se puede seguir el correcto rendimiento del proceso mediante el análisis de los descriptores químicos asociados con las drupas y con el metabolismo específico de las levaduras y las bacterias de ácido láctico (Figura 8A, B):

- Aldehídos: indicadores de la fase temprana de la fermentación
- Alcoholes superiores y terpenos: indicadores de la primera fermentación por levadura;
- Ácidos grasos libres, ésteres y alcoholes: indicadores de la segunda fermentación por bacterias de ácido láctico.

Ejemplo 3: Levaduras autóctonas y bacterias de ácido láctico usadas

[0053] Las levaduras autóctonas y las bacterias de ácido láctico usadas en este invención se depositaron en DSMZ, Alemania, en el Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, el 22 de octubre de 2013, y con los números de referencia a continuación.

[0054] Las combinaciones de iniciadores son:

Saccharomyces cerevisiae (cod. DSMZ 27800) y *Lactobacillus plantarum* (cod. DSMZ 27925) para la fermentación de aceitunas italianas de la variedad Leccino; *Saccharomyces cerevisiae* (cod. DSMZ 27801) y *Leuconostoc mesenteroides* (cod. DSMZ 27926) para la fermentación de aceitunas griegas de la variedad Kalamata. El uso de estas asociaciones de microorganismos hizo posible realizar eficazmente la primera fermentación por levadura en un tiempo de aproximadamente 2 meses y la segunda fermentación por bacterias de ácido láctico en 1 mes. Las aceitunas de mesa resultantes mostraron mejores características organolépticas y nutricionales que las obtenidas por un proceso de fermentación natural.

Ejemplo 4

[0055] Para la fermentación a escala piloto de 180 kg de aceitunas de la variedad Leccino italiana, el cultivo iniciador de *Saccharomyces cerevisiae* (cod. DSMZ 27800) se cultivó en medio YPD (extracto de levadura al 1 % (peso/volumen), peptona al 2 %, glucosa al 2 %) a 28 °C en agitación, usando una concentración de sal para la adaptación del 6 % de NaCl (peso/volumen), y se inoculó a una concentración de 10^6 UFC/ml en la muestra de aceitunas y salmuera. En 60 días, la concentración de células de levadura se mantuvo casi constante y posteriormente disminuyó durante los últimos 30 días hasta aproximadamente 10^4 UFC/ml (Figura 2). La inoculación del cultivo iniciador de *Lactobacillus plantarum* (cod. DSMZ 27925) se hizo el día 60 de la fermentación cuando el análisis por GC-MS detectó el final de la fermentación por levadura (Figura 11). La LAB se cultivó en MRS líquido a 28 °C y pH 4-4,5, a una concentración de sal del 6 % de NaCl (peso/volumen), y se inoculó a una concentración de 10^6 UFC/ml en la muestra de aceitunas y salmuera. Se registró un aumento de la población de hasta aproximadamente 2×10^7 UFC/ml durante 30 días de fermentación láctica (Figura 2).

[0056] Al final de la fermentación alcohólica, la población de levadura presente en salmuera se ha caracterizado genéticamente. Para esto, después de aplicar la salmuera a un medio de agar, se aislaron 40 colonias, se cultivaron en medio líquido y se extrajo el ADN genómico. Los diferentes aislados se analizaron por RAPD-PCR usando oligonucleótido (ATG)⁵. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, y una comparación con el perfil de la cepa de control inoculada mostró que la cepa *Saccharomyces cerevisiae* (cod. DSMZ 27800) dominó el proceso de fermentación con un 60 % de capacidad en comparación con otras levaduras presentes (Figura 3A). Asimismo, el análisis de predominio realizado como anteriormente [mediante el uso de oligonucleótido (GTG)₅] reveló que la cepa iniciadora (*Lactobacillus plantarum* cod. DSMZ 27925) dominó la fermentación con un 60 % de capacidad en comparación con otras LAB presentes (Figura 3 B).

[0057] Para la fermentación a escala piloto de 180 kg de aceitunas griegas de la variedad Kalamata, el cultivo iniciador de *Saccharomyces cerevisiae* (cod. DSMZ 27801) se cultivó en medio YPD (extracto de levadura al 1 % (peso/volumen), peptona al 2 %, glucosa al 2 %) a 28 °C en agitación, usando una concentración de sal para la adaptación del 6 % de NaCl (peso/volumen), y se inoculó a una concentración de 10^6 UFC/ml en la muestra de aceitunas y salmuera. En 60 días, la concentración de la levadura se mantuvo casi constante, y luego disminuyó en los últimos 30 días hasta aproximadamente 8×10^4 UFC/ml (Figura 2). La inoculación del cultivo iniciador de *Leuconostoc mesenteroides* (cod. DSMZ 27926) se hizo el día 60 de la fermentación, cuando el análisis por GC-MS

detectó el final de la fermentación por la levadura (Figura 12). La LAB se cultivó en MRS líquido a 28 °C y pH 4-4,5, a una concentración de sal del 6 % de NaCl (peso/volumen) y se inoculó a una concentración de 10^6 UFC/ml en la muestra de aceitunas y salmuera. Se registró un aumento de la población de hasta aproximadamente $1,3 \times 10^7$ UFC/ml durante 30 días de fermentación láctica (Figura 2).

[0058] Al final de la fermentación alcohólica, la población de levadura presente en salmuera se ha caracterizado genéticamente. Para esto, después de aplicar la salmuera a un medio de agar, se aislaron 40 colonias, se cultivaron en medio líquido y se extrajo el ADN genómico. Los diferentes aislados se analizaron por RAPD-PCR usando oligonucleótido (ATG)⁵. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa, y una comparación con el perfil de la cepa de control inoculada mostró que la cepa *Saccharomyces cerevisiae* (cod. DSMZ 27801) dominó el proceso de fermentación con un 60 % de capacidad en comparación con otras levaduras presentes (Figura 3 C). Asimismo, el análisis de predominio realizado como anteriormente [mediante el uso de oligonucleótido (GTG)₅] reveló que la cepa iniciadora (*Lactobacillus Leuconostoc mesenteroides* (cod. DSMZ 27926) dominó el proceso de fermentación con un 60 % de capacidad en comparación con otras LAB presentes (Figura 3 D).

[0059] Al final de las fermentaciones impulsadas por los iniciadores, las aceitunas se desamargaron por completo en comparación con dos controles que consistían en aceitunas fermentadas espontáneamente, lo que indica una reducción del tiempo requerido para realizar el proceso de desamargado hasta un máximo de tres meses.

Ejemplo 5

[0060] Los siguientes compuestos polifenólicos se han identificado y cuantificado para ambas fermentaciones descritas en el Ejemplo 4 de aceitunas de la variedad Leccino, respectivamente, inoculadas con iniciadores o sometidas a fermentación espontánea: hidroxitirosol, pirocatecol, verbascósido, isoverbascósido, rutina, luteolin-7-O-glucósido y quercetina.

[0061] La quercetina, el hidroxitirosol y el verbascósido son los compuestos presentes en concentraciones relevantes, y en particular la quercetina aumenta tanto durante la fermentación controlada por iniciador como durante la fermentada espontánea con un contenido final de 3,4 y 4,8 mg/g de peso seco, respectivamente, al final del proceso de fermentación. El hidroxitirosol aumenta durante los procesos de fermentación, con un contenido final de 1,6 mg/g de peso seco al final de la fermentación controlada por iniciador y de 1,1 mg/g de peso seco después de la fermentación espontánea. El verbascósido tiene un contenido casi constante durante los dos procesos de fermentación (Figura 6).

[0062] Los siguientes polifenoles se identificaron y cuantificaron en la salmuera de la variedad Leccino: hidroxitirosol, pirocatecol, verbascósido, tirosol, ácido vanílico y ácido cafeico. El hidroxitirosol es el compuesto predominante con un contenido de 519,7 y 548,4 µg/ml al final de la fermentación controlada por iniciador y espontánea, respectivamente. En los dos procesos de fermentación, todos los demás compuestos fenólicos muestran la misma tendencia, excepto el pirocatecol que no se identificó en la salmuera después de la fermentación espontánea (Figura 6).

[0063] Los ácidos fenólicos identificados y cuantificados en la pulpa de la variedad Kalamata, sometidos a fermentación espontánea y controlada por iniciador, fueron: hidroxitirosol, verbascósido, isoverbascósido, quercetina, tirosol, con contenido casi similar en las dos fermentaciones. El ácido vanílico se detectó solamente en la pulpa sometida a fermentación controlada por iniciador, con un contenido de 0,4 mg/g de peso seco. Los compuestos identificados y cuantificados en salmuera de la variedad Kalamata fueron hidroxitirosol y tirosol en cantidades similares en las dos fermentaciones, mientras que el pirocatecol apareció después de 60 días de fermentación espontánea y permaneció constante al final de la fermentación (44,8 µg/ml). Sin embargo, la salmuera de la variedad Kalamata tiene un contenido más alto de hidroxitirosol que la salmuera de la variedad Leccino, que consiste en 898,1 y 884,1 µg/ml, respectivamente, al final de la fermentación controlada y espontánea (Figura 7).

Ejemplo 6

[0064] La Figura 8 muestra el contenido en carotenoides (xantofilas y carotenos) durante la fermentación controlada por iniciador y espontánea en las variedades Leccino y Kalamata. Se identificaron luteína, zeaxantina y carotenoides de beta caroteno. En particular, se detectó 9-cis beta-caroteno, un producto de degradación de beta caroteno, solamente en la variedad Leccino después de la fermentación controlada por iniciador y la fermentación espontánea. Se encontró aproximadamente un contenido total de carotenoides tres veces mayor en la variedad Leccino en comparación con la variedad Kalamata. En cuanto a las aceitunas de la variedad Leccino, la degradación de la luteína es más lenta en la fermentación controlada por iniciador que en la espontánea, mientras que el beta caroteno aumenta durante la fermentación controlada por iniciador de 2,2 a 4,8 g/g de peso seco y permanece casi constante en la fermentación espontánea. Finalmente, los contenidos de zeaxantina y de 9-cis beta-caroteno son

similares y permanecen constantes en ambos procesos de fermentación (Figura 8A, B). En la variedad Kalamata, los carotenoides muestran una tendencia similar, excepto que la zeaxantina se degrada por completo en la fermentación espontánea mientras que permanece casi constante en la fermentación controlada por iniciador (Figura 8C, D).

5 **[0065]** En cuanto al contenido total de vitamina E al final del proceso de fermentación, las aceitunas de la variedad Kalamata tienen un contenido más alto que las de la variedad Leccino. Las siguientes formas isoméricas de vitamina E se identificaron en ambas variedades: beta y gamma tocotrienol, beta y gamma tocoferol, alfa tocoferol. El alfa-tocoferol es la forma isomérica predominante en las aceitunas de la variedad Leccino, y muestra la misma tendencia a la degradación tanto en la fermentación controlada por iniciador como en la espontánea. Al final de la fermentación controlada por iniciador, el beta y gamma tocotrienol muestran un nivel inferior (19,5 µg/g de peso seco) en comparación con la fermentación espontánea (25,3 µg/g de peso seco); por el contrario, el beta y gamma tocoferol muestran un nivel más alto (13,1 µg/g de peso seco) al final de la fermentación controlada por iniciador en comparación con la fermentación espontánea (9,7 µg de peso seco) (Figura 9A, B). En las aceitunas de la variedad Kalamata, el alfa-tocoferol muestra un perfil casi constante durante ambos procesos de fermentación. Beta y gamma tocotrienol disminuyen durante la fermentación controlada por iniciador y espontánea, alcanzando valores de 79,9 y 57,6 µg/g de peso seco, respectivamente, al final de la fermentación. Finalmente, beta y gamma tocoferol aumentan durante el proceso de fermentación y, al final del proceso, muestran concentraciones más altas en la fermentación controlada por iniciador (28,2 µg de peso seco) en comparación con la fermentación espontánea (15,3 µg de peso seco) (Figura 9 C, D).

20 **[0066]** Basándose en los datos anteriores, es posible concluir que, en ambas variedades de aceitunas probadas, la fermentación controlada por iniciador permite mantener o aumentar las moléculas bioactivas pertenecientes a las clases de carotenoide y vitamina E.

25 Ejemplo 7

[0067] La extracción, identificación y cuantificación de moléculas volátiles, que representan productos de fermentación secundarios, se realizaron mediante el sistema SPME (microextracción en fase sólida) -GC-MS, que consiste en una fibra PDMS-DVB SPME de 65 µm, un cromatógrafo de gases (GC) equipado con una columna polar HP INNOWax y un espectrómetro de masas cuadrupolar (MS). La identificación del pico se realizó comparando los espectros de masas con los espectros en la base de datos NIST98 y con los de moléculas estándar puras.

35 **[0068]** Durante la fermentación, se identificaron las siguientes clases de compuestos mediante GC-MS en la pulpa de las aceitunas Leccino y Kalamata: aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres, ácidos grasos, hidrocarburos, fenoles volátiles y terpenos. En el transcurso de la fermentación inoculada con iniciador de aceitunas de la variedad Leccino, se observó que un aumento en la concentración de compuestos volátiles pertenecientes a clases de alcoholes, ésteres, ácidos grasos e hidrocarburos era significativamente mayor en comparación con la fermentación espontánea (Figura 11A, B). En particular, las concentraciones en la fermentación impulsada por el iniciador y la fermentación espontánea fueron, respectivamente:

- 40 - los aldehídos fueron aproximadamente 27 µg/kg en la fermentación inoculada con iniciador y 30 µg/kg en la fermentación natural;
- 45 - Los alcoholes fueron aproximadamente 300 µg/kg en la fermentación impulsada por iniciador y 250 µg/kg en la fermentación natural;
- 50 - Los ésteres estuvieron presentes a concentraciones superiores a 200 µg/kg en la fermentación impulsada por iniciador y superiores a 100 µg/kg en la fermentación natural;
- 55 - Los ácidos grasos estaban presentes en cantidades significativas solamente en las fermentaciones inoculadas por iniciador.

[0069] Las diferencias en la concentración de tales moléculas influyeron en la calidad sensorial del producto acabado, generando dos perfiles sensoriales significativamente diferentes. En particular, el perfil asociado con las aceitunas producidas por los iniciadores es mucho más rico en olor afrutado (asociado con ésteres), olor herbáceo, dulce, vínico (asociado a la clase de alcoholes), con notas de grasa asociadas con ácidos grasos y herbáceas generadas por aldehídos (Figura 11C, D).

[0070] Se ha observado un aumento en la concentración de compuestos volátiles pertenecientes a las clases de alcoholes, ésteres, ácidos grasos, hidrocarburos y fenoles volátiles durante la fermentación inoculada con iniciador de las aceitunas de la variedad Kalamata y fue significativamente mayor que en la fermentación espontánea (Figura 12A, B). En particular, los análisis por cromatografía de gases realizados tanto en la fermentación impulsada por iniciador como en la espontánea mostraron lo siguiente para cada clase de compuestos analizados:

- 60 - los aldehídos al final de la fermentación fueron aproximadamente 27,50 µg/kg en la fermentación inoculada con iniciador y 21,72 µg/kg en la fermentación espontánea;

- Los alcoholes fueron aproximadamente 327,32 µg/kg en la fermentación inoculada con iniciador y 228,14 µg/kg en la fermentación espontánea;
- Se encontraron ésteres en una concentración de 277,95 µg/kg en la fermentación inoculada con iniciador y de 125,13 µg/kg en la fermentación espontánea;
- los ácidos grasos se produjeron en concentraciones de aproximadamente 39 µg/kg en la fermentación impulsada por iniciador y 22 µg/kg en la fermentación espontánea;
- Los terpenos, compuestos varietales presentes tanto en forma libre como combinada, se encontraron en la cantidad de 61,45 µg/Kg en la fermentación inoculada con iniciador y 46 µg/Kg en el control fermentado espontáneamente;
- Se encontraron hidrocarburos en la cantidad de aproximadamente 51 µg/kg en la fermentación impulsada por iniciador y 20 µg/kg en la muestra fermentada en modo espontáneo.

[0071] Las diferencias en la concentración de tales moléculas influyeron en la calidad sensorial del producto acabado, generando dos perfiles sensoriales significativamente diferentes. En particular, el perfil asociado con las aceitunas producidas por los iniciadores es mucho más rico en olor afrutado (asociado con los ésteres), olores herbáceos, dulces, vinosos (asociados con la clase de alcoholes), con notas de grasa asociadas con ácidos grasos y herbáceas generadas por los aldehídos, y una nota floral generada por terpenos (Figura 12C, D).

[0072] Los resultados derivados de los ejemplos anteriores muestran las claras ventajas del método descrito de acuerdo con la presente invención sobre la práctica empírica actual para la producción de aceitunas de mesa. Dicho método ha demostrado ser sorprendente y ventajosamente adecuado para la fermentación de aceitunas de mesa, ha demostrado ser rápido y extremadamente fácil de realizar, y puede aplicarse convenientemente en cualquier tipo de planta de producción.

REIVINDICACIONES

1. Método para producir aceitunas de mesa fermentadas que comprende las etapas de:

- 5 a. remojar las aceitunas en salmuera;
b. inocular el producto obtenido en la etapa a. con un cultivo de levadura;
c. incubar el producto obtenido en la etapa b. para realizar la fermentación alcohólica;
d. inocular el producto fermentado obtenido en la etapa c. usando un cultivo de bacteria de ácido láctico (LAB);
10 e. incubar el producto obtenido en la etapa d. para realizar la fermentación láctica.

2. El método para producir aceitunas de mesa fermentadas de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

- 15 a. remojar las aceitunas en salmuera en la que la relación aceituna:salmuera de la etapa a. varía de 3:1 usando aceitunas de mayor calibre a 2:1 para aceitunas de menor calibre;
b. inocular el producto derivado de la etapa a. con un cultivo de levadura, en el que la relación de volumen entre el volumen de cultivo de levadura/salmuera en la etapa b. corresponde a 1/300;
c. incubar el producto obtenido en la etapa b. a una temperatura que puede variar de 6 °C a 30 °C y durante un período de tiempo que puede variar de 45 a 60 días para realizar la fermentación alcohólica;
20 d. inocular el producto fermentado obtenido en la etapa c. con una bacteria láctica que usa una relación de cultivo de LAB iniciador/producto fermentado de 1/300;
e. incubar el producto obtenido en la etapa d. para realizar la fermentación láctica a una temperatura que puede variar de 6 °C a 30 °C y durante un período de tiempo que puede variar de 15 a 30 días.

25 3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que las aceitunas utilizadas se eligen del grupo que consiste en la variedad italiana Leccino y la variedad griega Kalamàta.

30 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en el que cuando las aceitunas usadas pertenecen a la variedad italiana Leccino, el cultivo de levadura es la cepa *Saccharomyces cerevisiae* (cod. DSMZ 27800) y el cultivo de LAB es la cepa *Lactobacillus plantarum* (cod. DSMZ 27925).

35 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en el que cuando las aceitunas usadas pertenecen a la variedad griega Kalamata, el cultivo de levadura es la cepa *Saccharomyces cerevisiae* (cod. DSMZ 27801) y el cultivo de LAB es la cepa *Leuconostoc mesenteroides* (cod. DSMZ 27926).

40 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la concentración de cepa de levadura es adecuada para realizar la etapa b. de inocular el producto obtenido en la etapa a., varía de 5×10^5 a 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de salmuera.

7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la concentración de bacterias lácticas adecuada para realizar la etapa d. de inocular el producto fermentado obtenido en la etapa c., varía de 5×10^5 a 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de salmuera.

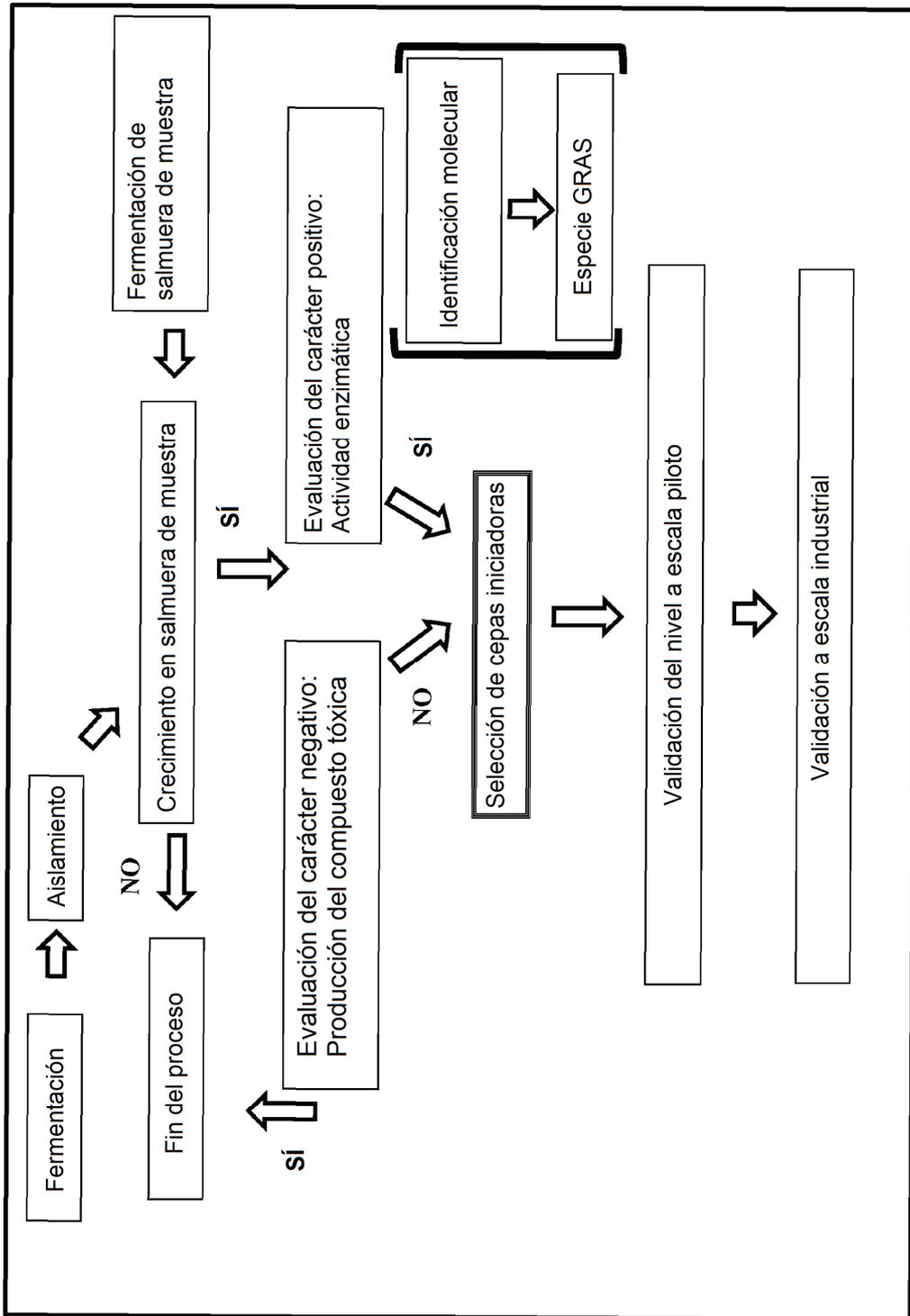


Figura 1

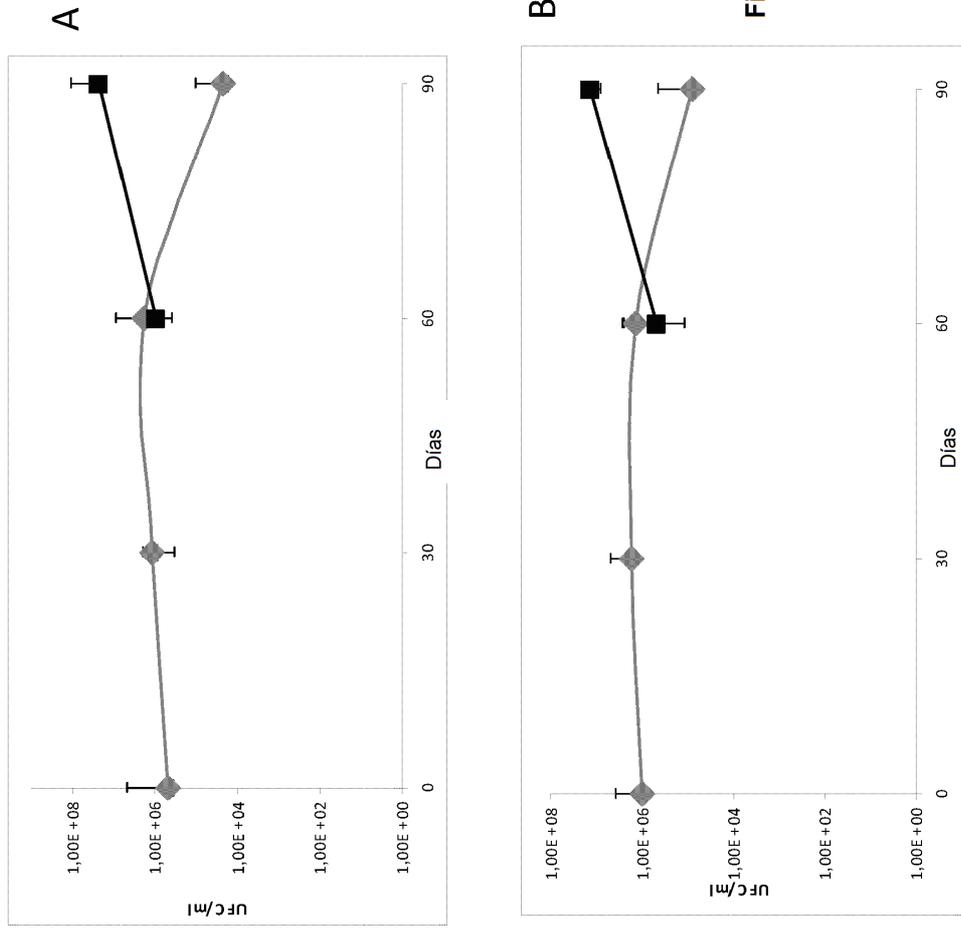


Figura 2

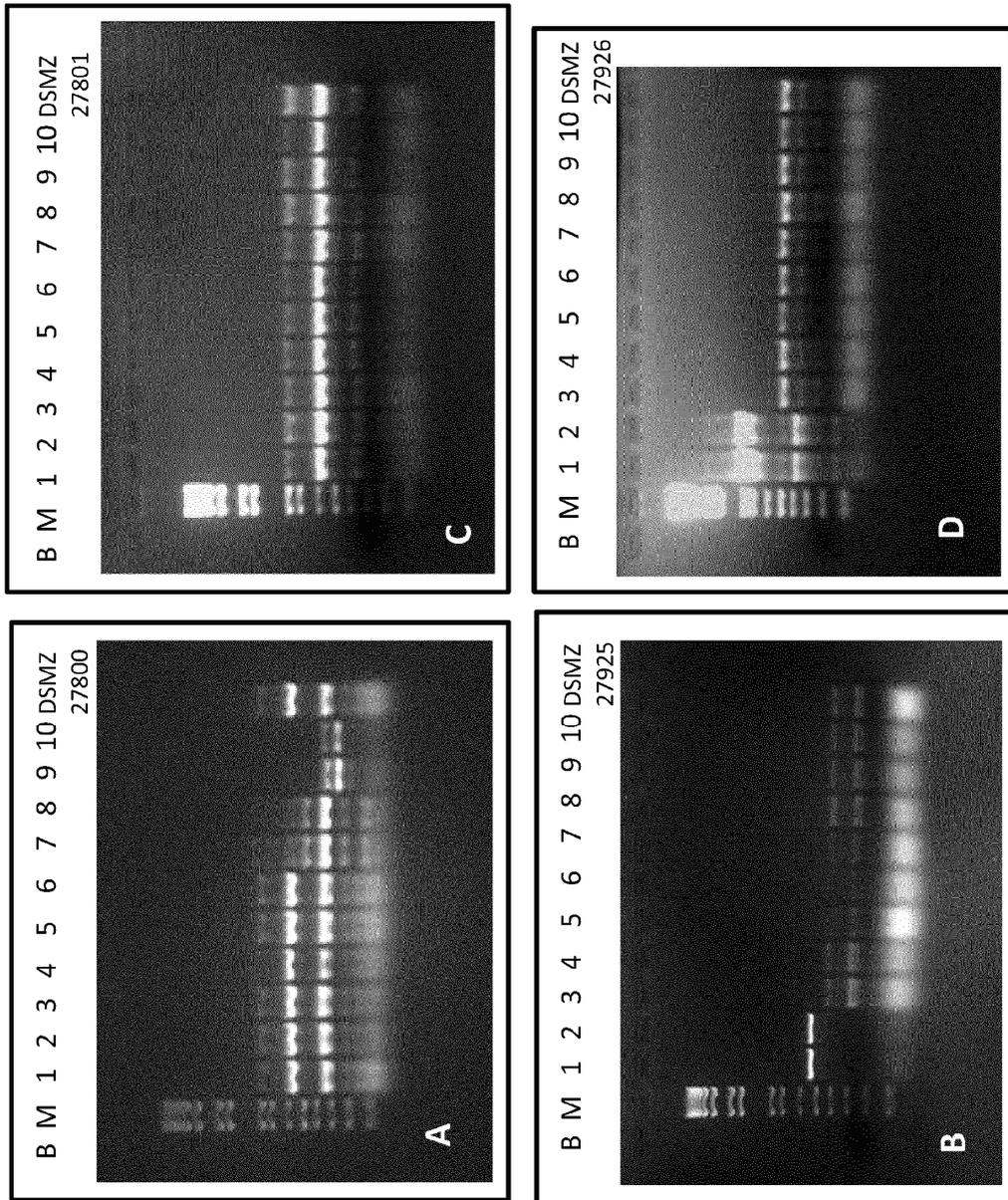


Figura 3

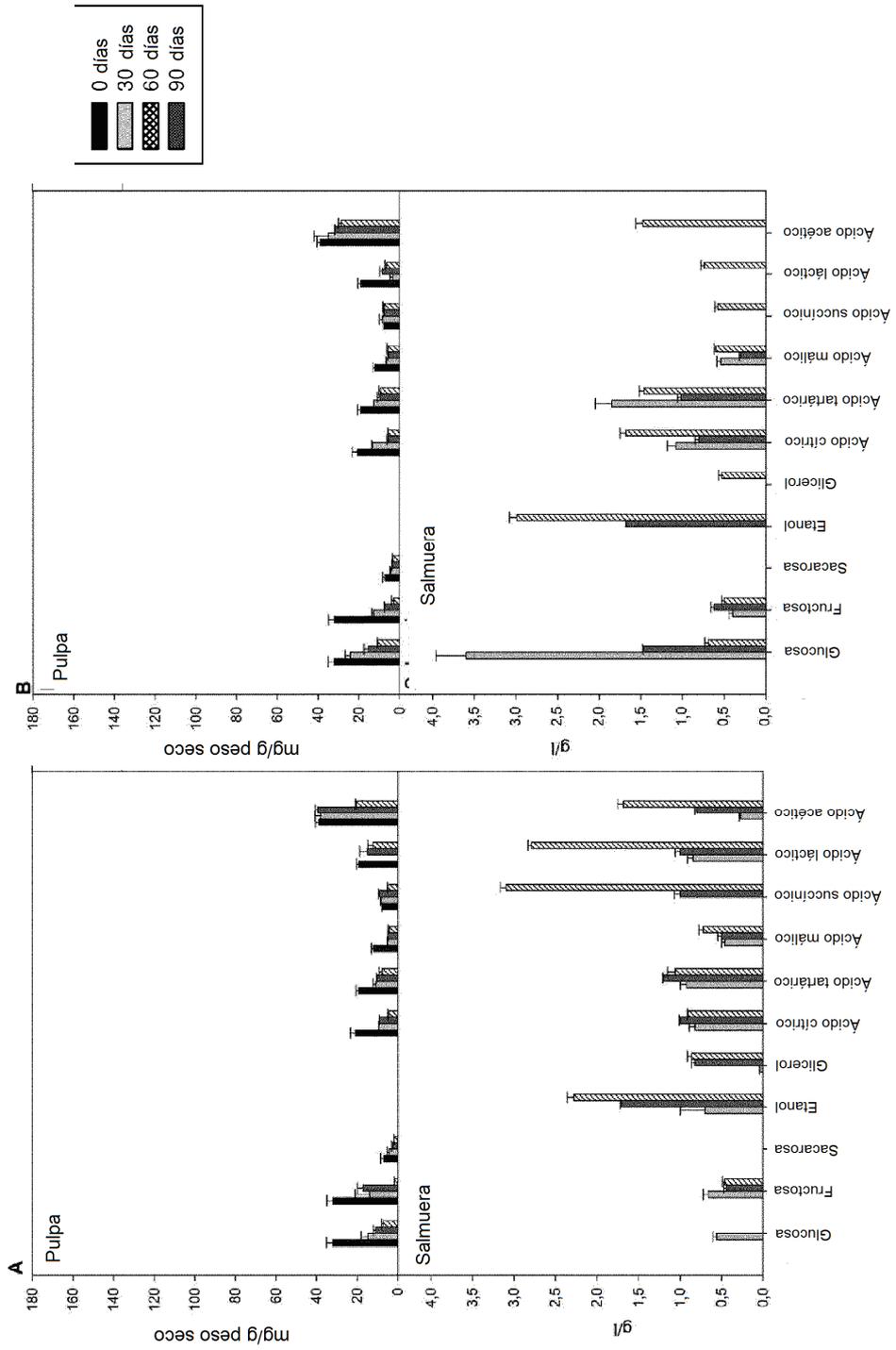


Figura 4

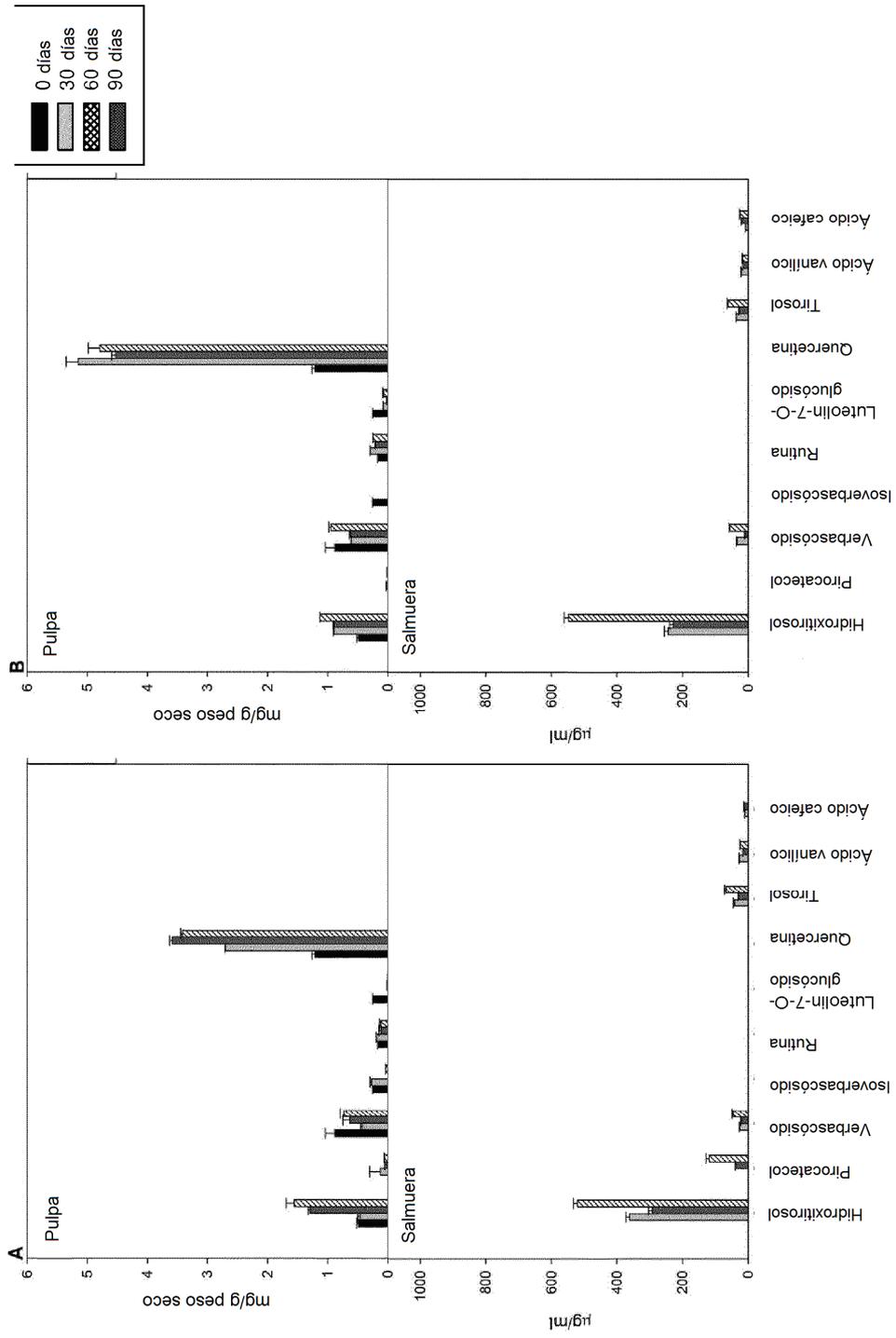


Figura 5

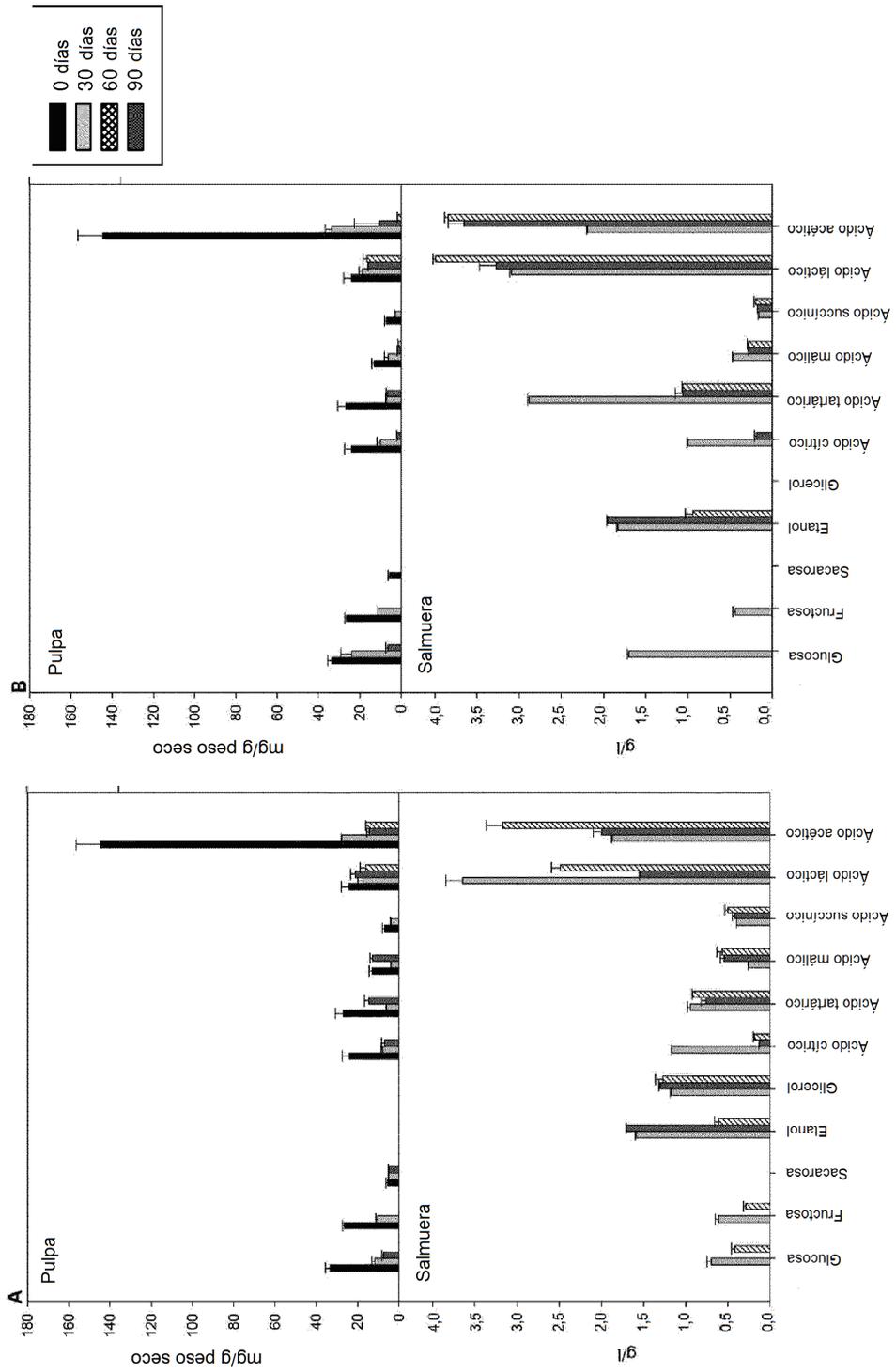


Figura 6

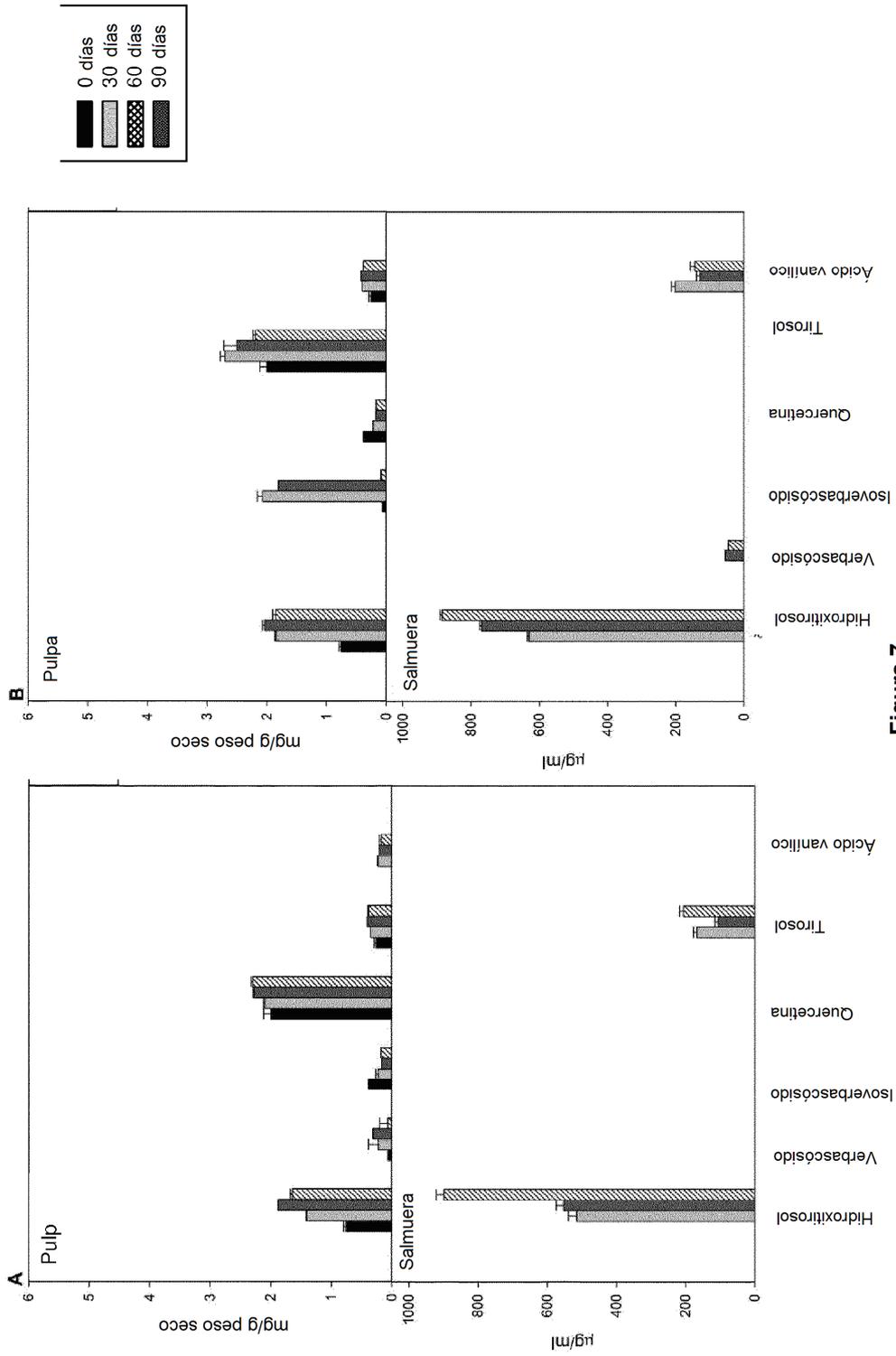


Figura 7

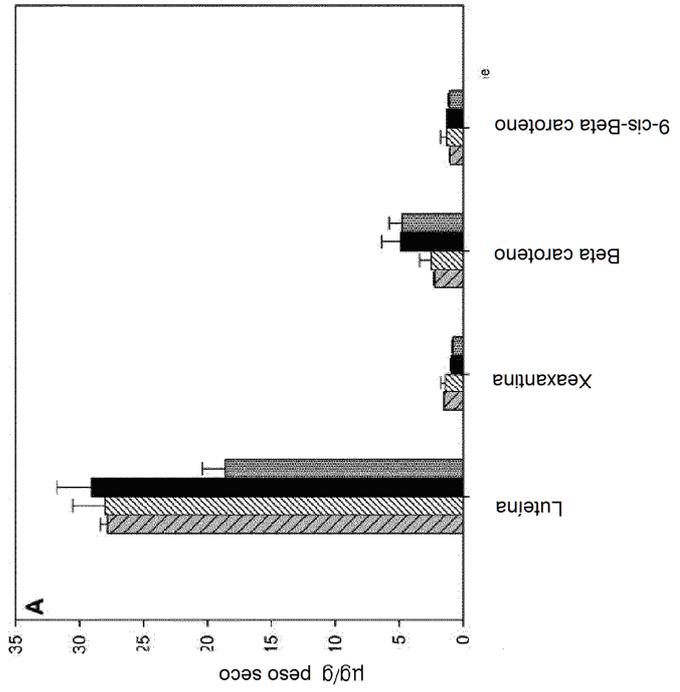
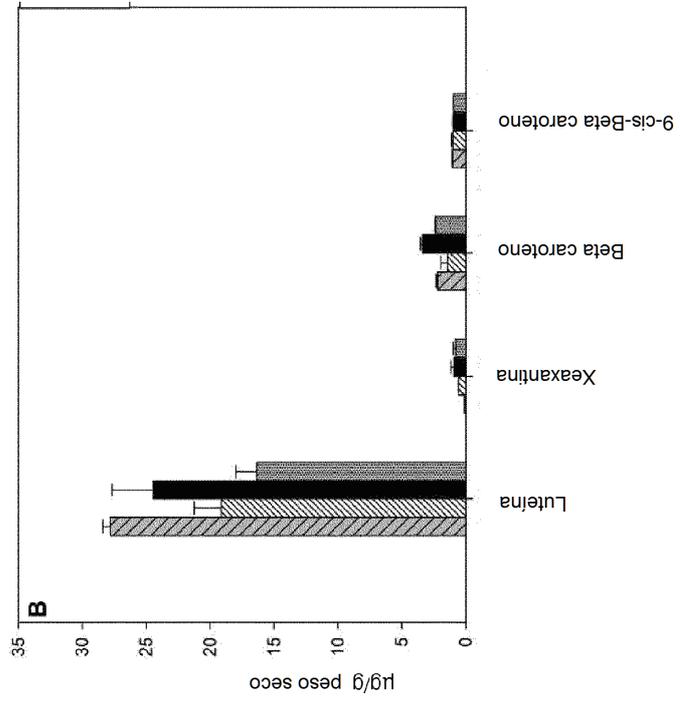
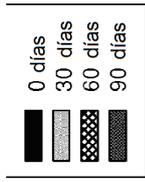


Figura 8

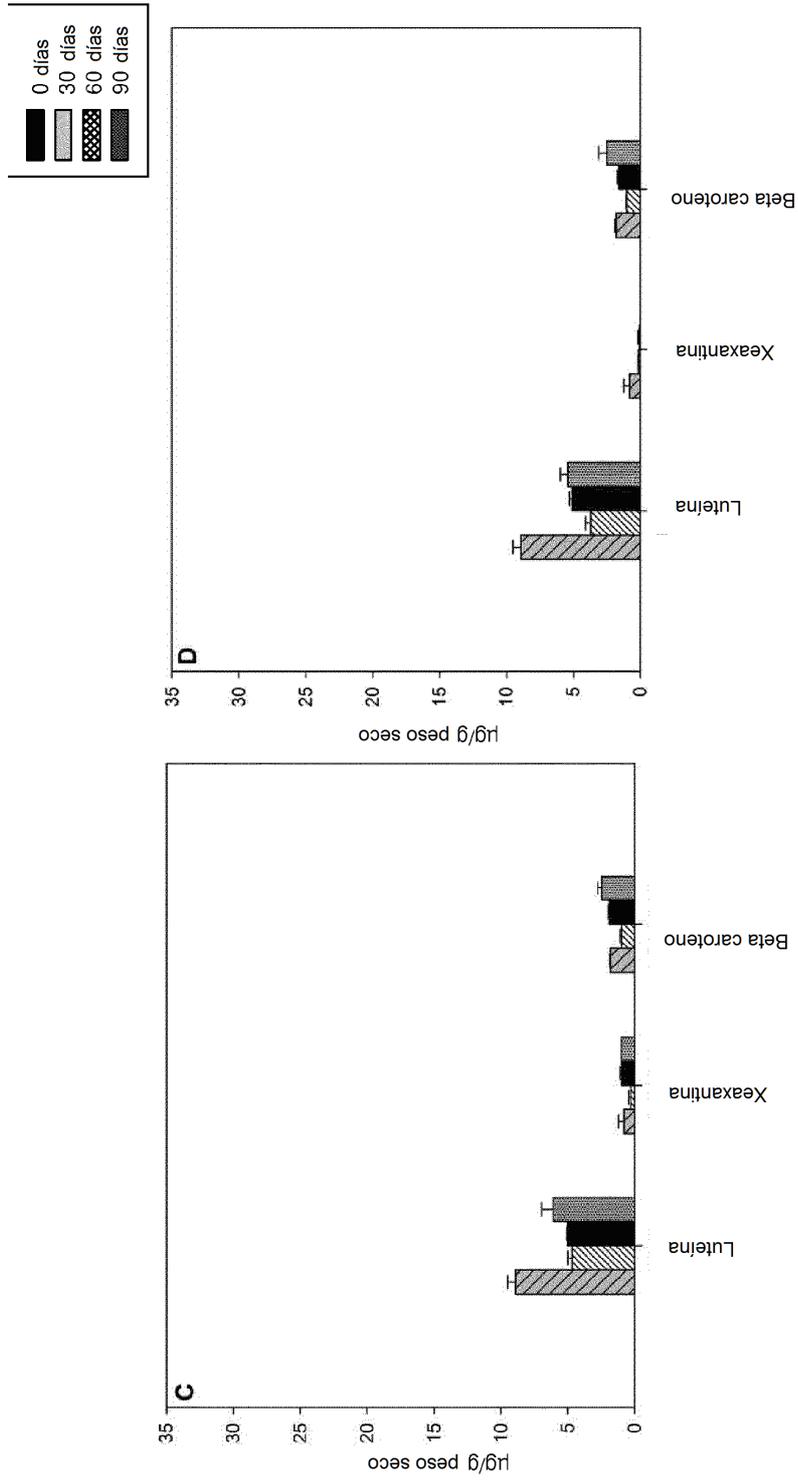


Figura 8

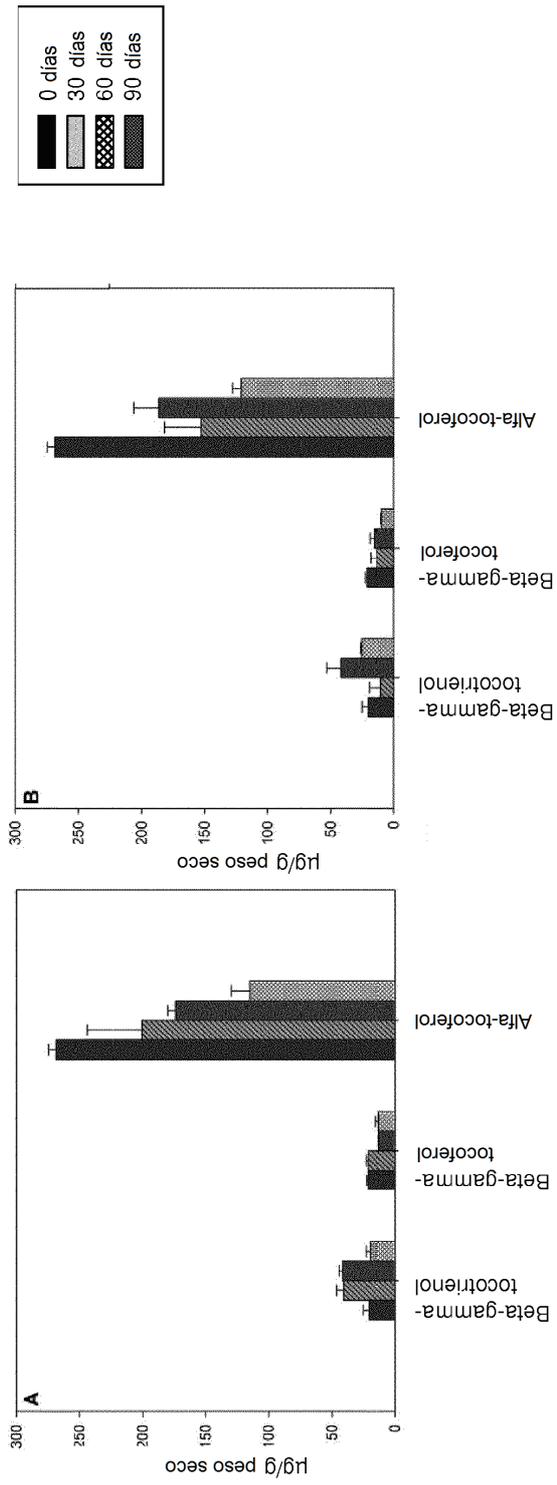


Figura 9

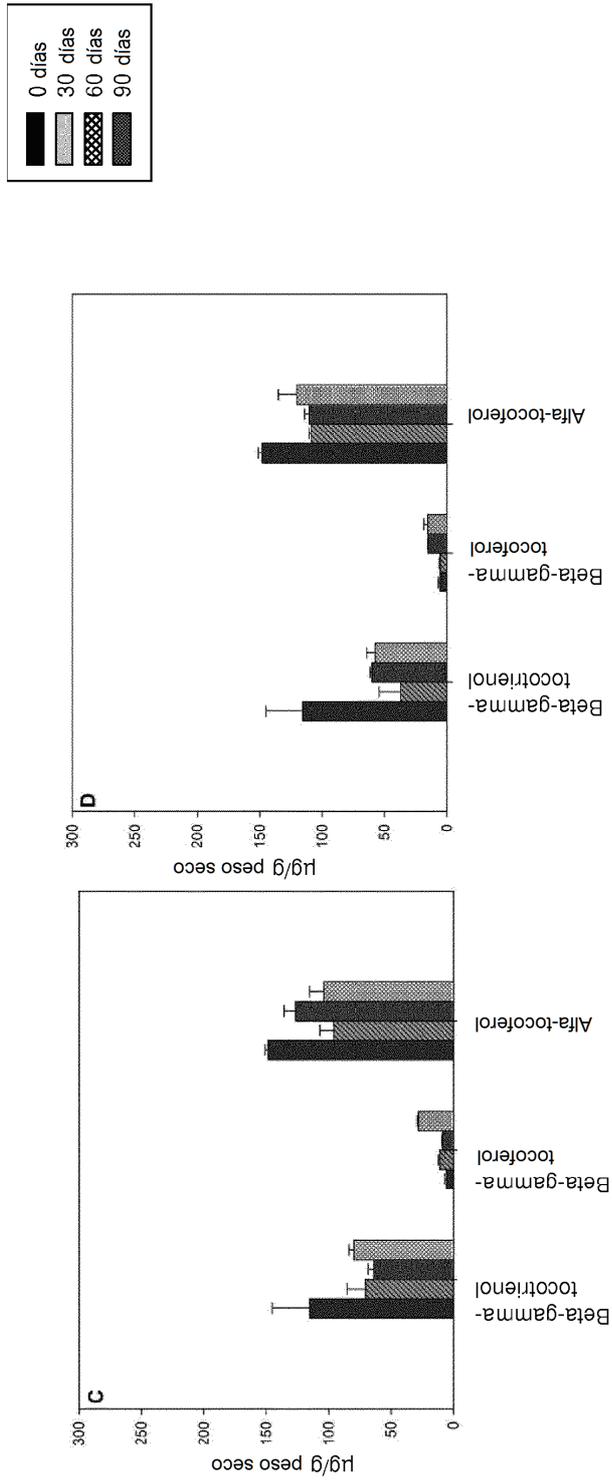


Figura 9

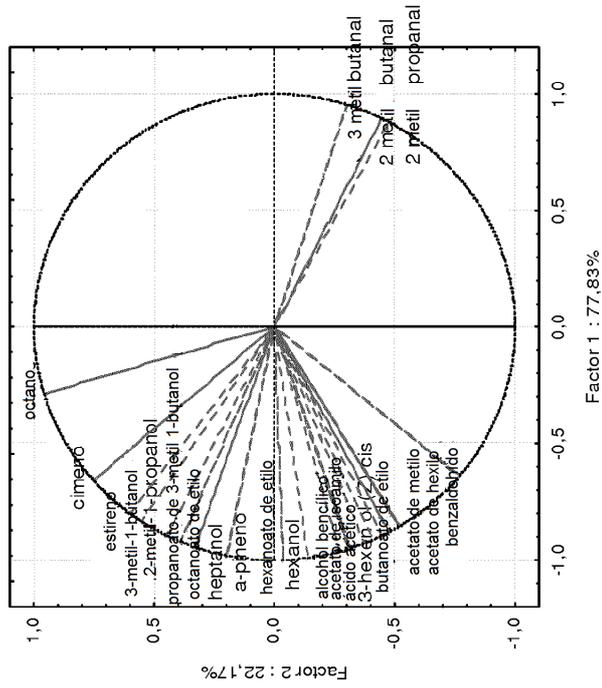
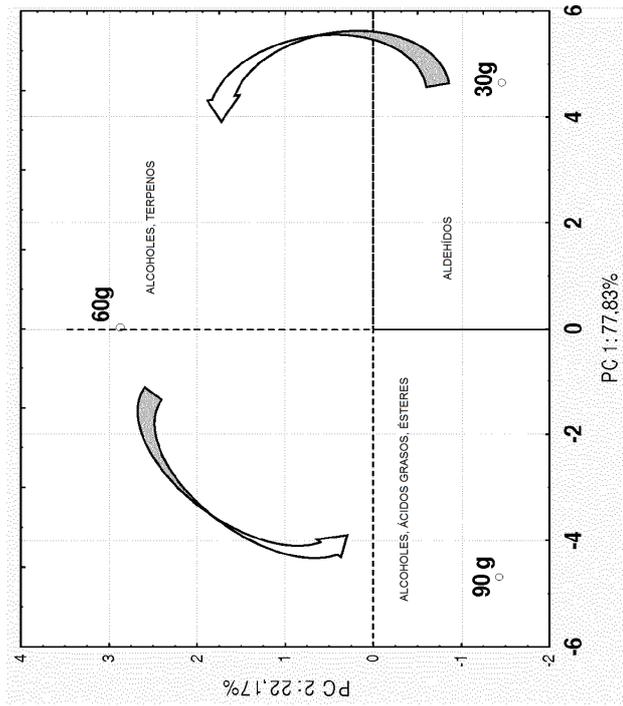


Figura 10A

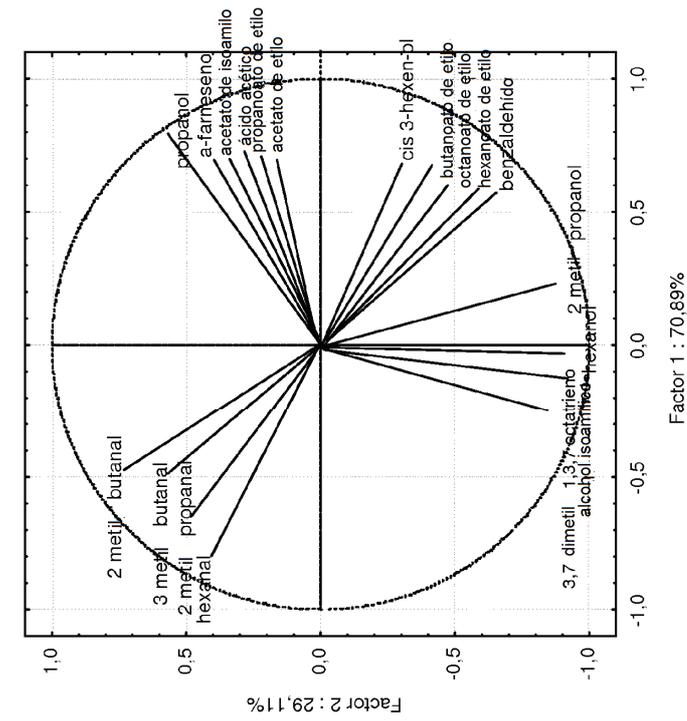
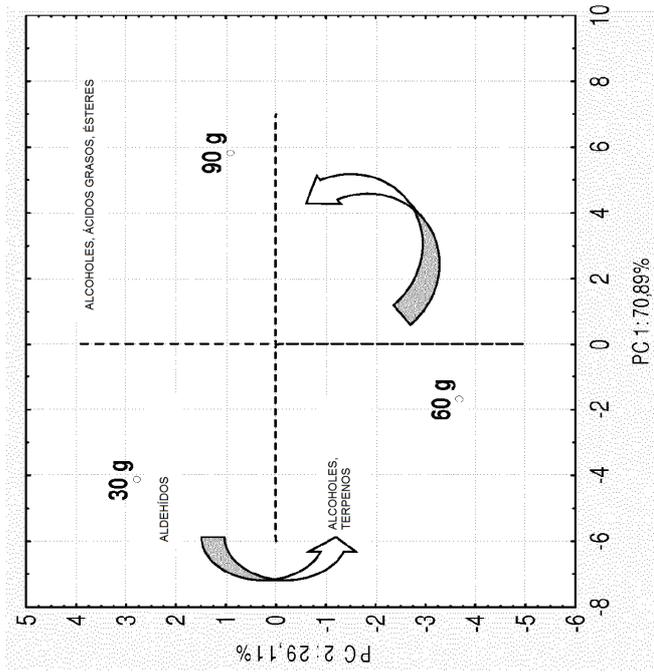


Figura 10 B

B

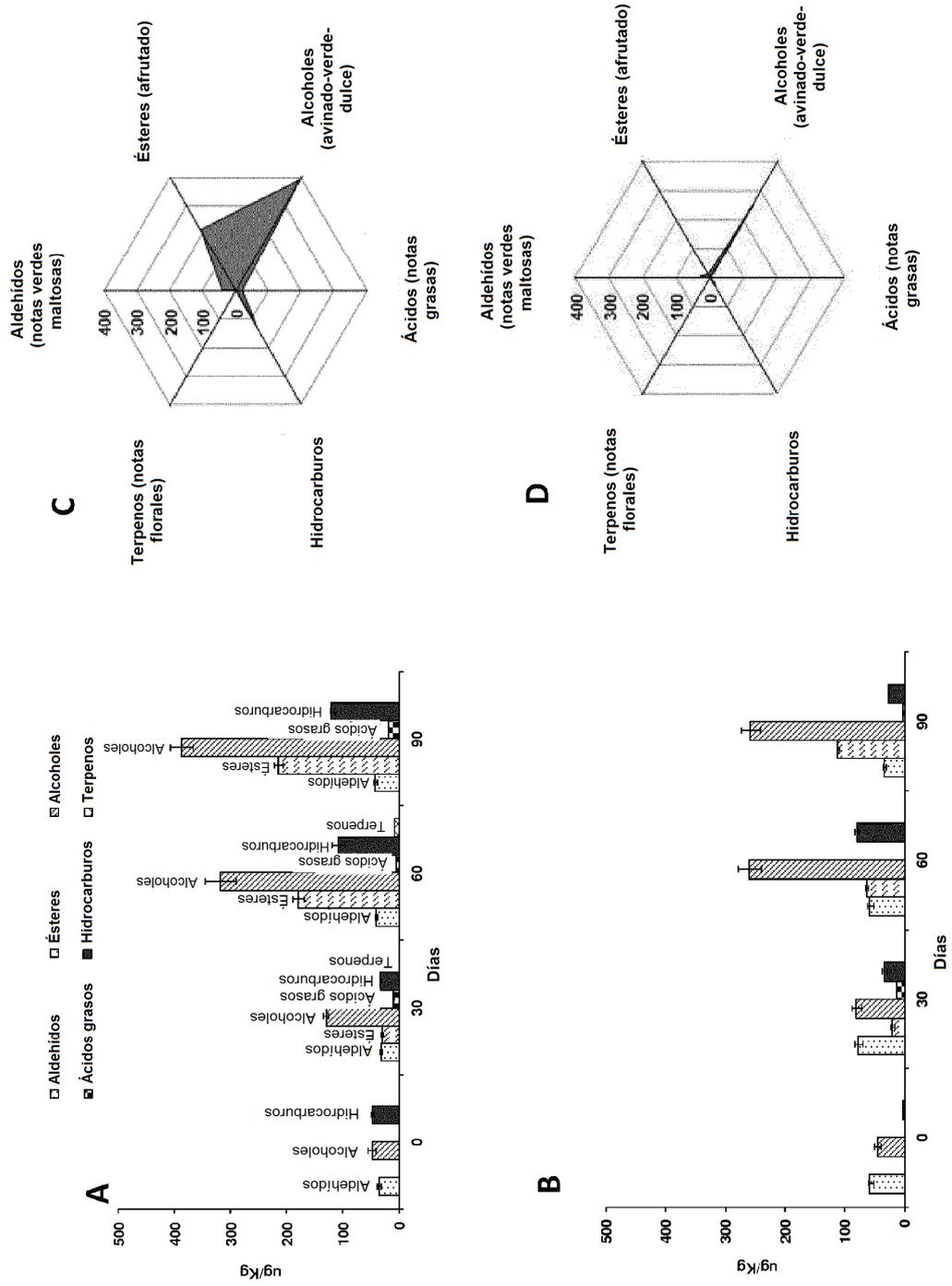


Figura 11

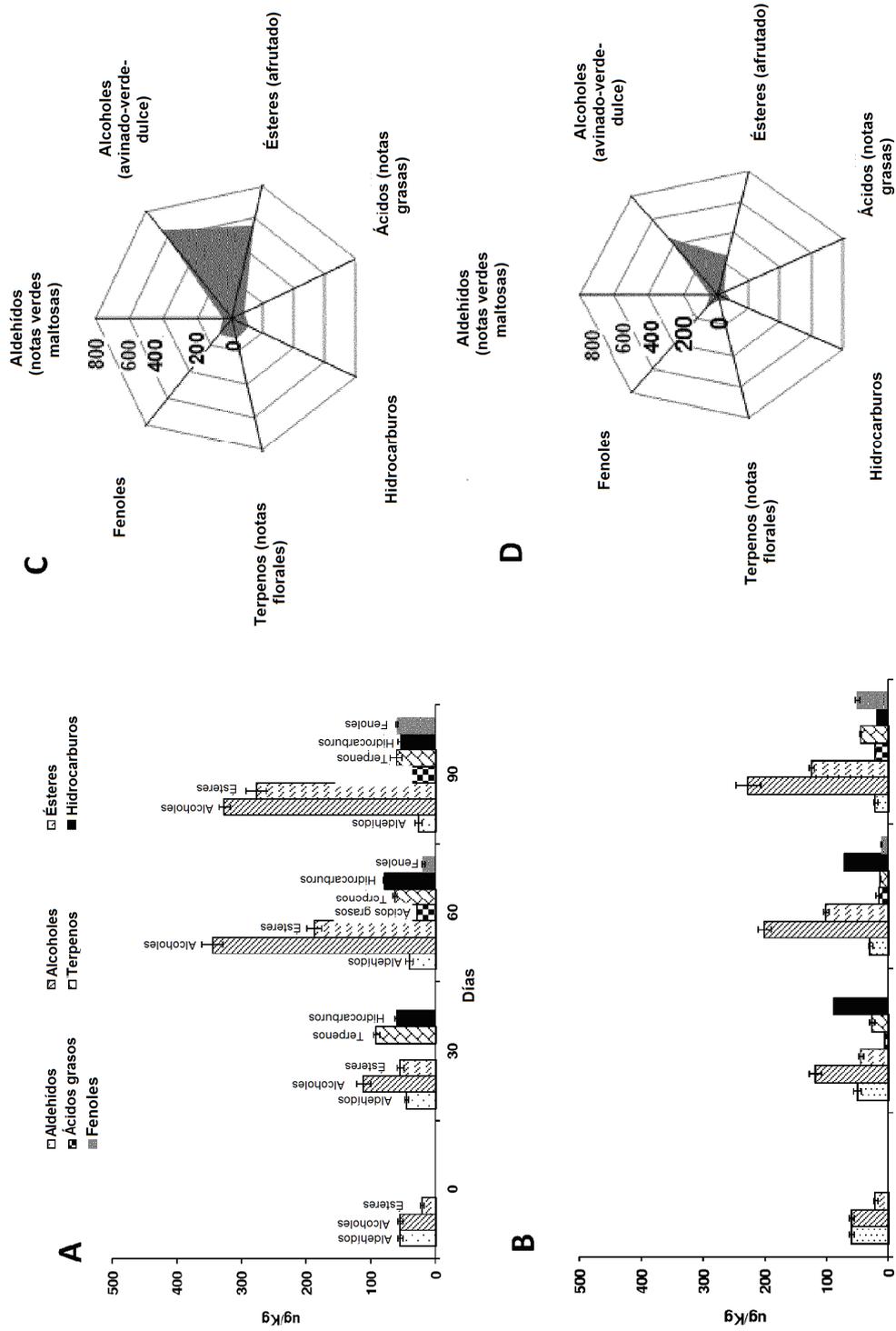


Figura 12