

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

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
6 de octubre de 2011 (06.10.2011)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/121164 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A23L 1/218 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2011/070220

(22) Fecha de presentación internacional:
31 de marzo de 2011 (31.03.2011)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201030491 31 de marzo de 2010 (31.03.2010) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **BAUTISTA GALLEGO, Joaquín** [ES/ES]; Instituto de la Grasa, Avenida Padre García Tejero, 4, E-41012 Sevilla (ES). **ARROYO LÓPEZ, Francisco Noé** [ES/ES]; Instituto de la Grasa, Avenida Padre García Tejero, 4, E-41012 Sevilla (ES). **GARRIDO**

FERNÁNDEZ, Antonio [ES/ES]; Instituto de la Grasa, Avenida Padre García Tejero, 4, E-41012 Sevilla (ES). **GARCÍA GARCÍA, Pedro** [ES/ES]; Instituto de la Grasa, Avenida Padre García Tejero, 4, E-41012 Sevilla (ES). **LÓPEZ LÓPEZ, Antonio** [ES/ES]; Instituto de la Grasa, Avenida Padre García Tejero, 4, E-41012 Sevilla (ES). **RODRÍGUEZ GÓMEZ, Francisco** [ES/ES]; Instituto de la Grasa, Avenida Padre García Tejero, 4, E-41012 Sevilla (ES).

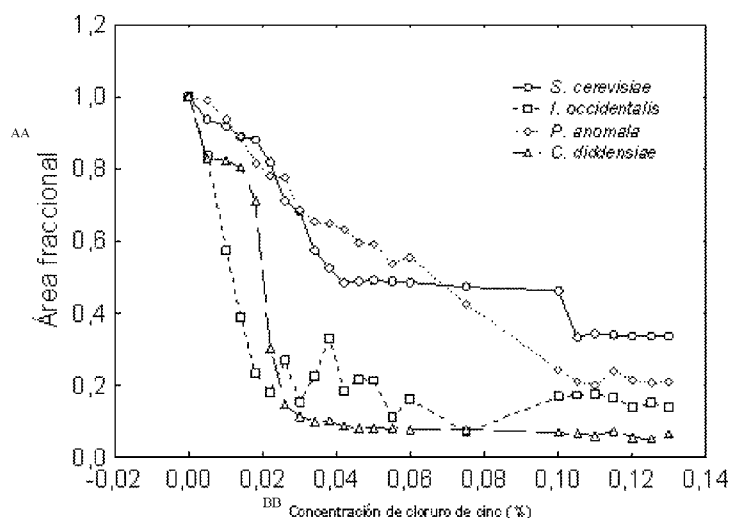
(74) Mandatario: **UNGRIA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

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

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: OLIVE PRESERVING COMPOSITIONS WITH ANTIFUNGAL ACTIVITY

(54) Título : COMPOSICIONES CONSERVANTES DE ACEITUNAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA



AA Fractional area
BB Concentration of zinc chloride (%)

FIG. 2

(57) Abstract: The invention relates to novel olive preserving compositions having an antifungal activity, comprising: (a) sodium chloride, (b) at least one acid with preserving properties, and (c) at least one zinc salt. In addition, the invention relates to the method for preserving foods using the aforementioned compositions and to the use of the composition for preserving olives against fungal microorganisms.

(57) Resumen:

[Continúa en la página siguiente]

WO 2011/121164 A1

**(84) Estados designados** *(a menos que se indique otra cosa,**para toda clase de protección regional admisible):*

ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*
- *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*

La presente invención se refiere a nuevas composiciones conservantes de aceitunas con actividad antifúngica que comprenden: a. cloruro sódico; b. al menos un ácido con propiedades conservantes; y c. al menos una sal de cinc. Además la presente invención se refiere al procedimiento para la conservación de alimentos mediante dichas composiciones con actividad antifúngica y al uso de la composición para la conservación de aceitunas frente a microorganismos del reino fungi.

Composiciones conservantes de aceitunas con actividad antifúngica

La presente invención se refiere a nuevas composiciones conservantes de aceitunas con actividad antifúngica que comprenden al menos sales de cinc
5 Además la presente invención se refiere al procedimiento para la conservación de aceitunas mediante dichas composiciones con actividad antifúngica y al uso de la composición para la conservación de las aceitunas frente a microorganismos del reino fungi.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Los frutos del olivo poseen una elevada concentración de un compuesto fenólico denominado oleuropeina, formada por hidroxitirosol, glucosa y ácido elenólico. Dicho compuesto así como su aglucona (hidroxitirosol unido a ácido elenólico) son compuestos amargos *Walter, W.M., Fleming, H.P., Etchells, J.L.*
15 *1973 Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives. Appl. Microbiol. 26, 773-776*, que hacen que no sea posible tomar las aceitunas directamente tal como se recolectan del árbol como puede hacerse con la mayoría de los frutos. Para hacer comestibles las aceitunas se
20 han desarrollado diversas técnicas, primero de manera artesanal y, posteriormente, a escala industrial, dando lugar diferentes presentaciones de aceitunas de mesa *Fernández Díez, M.J.; Castro Ramos, R.; Garrido Fernández, A.; González Pellissó, F.; González Cancho, F.; Nosti Vega, M.; Heredia Moreno, A.; Mínguez Mosquera, M.I.; Rejano Navarro, L.; Durán Quintana, M.C.; Sánchez Roldán, F.; García García, P.; Castro Gómez-Millán, A.*
25 *(1985). Biotecnología de la Aceituna de Mesa. CSIC. Madrid.*

Existen procesos en los cuales el endulzamiento se produce mediante procedimientos químicos (normalmente tratamiento con hidróxido sódico), que
30 dan lugar a las denominas aceitunas verdes en salmuera o a las tipo negras, mientras que en otros casos la pérdida del principio amargo se produce solo mediante dilución y la consiguiente transformación de los compuestos amargos

hasta alcanzar niveles aceptables para el consumidor. En todos los casos, existen determinadas etapas en las que las aceitunas permanecen en salmuera y se produce una fermentación más o menos intensa en las que la flora principal está compuesta por bacterias lácticas y levaduras, predominando
5 unas sobre otras según el tipo de proceso *Garrido Fernández, A.; Fernández Díez, M.J.; Adams, M.R. (1997). Table olives. Production and Processing. Chapman & Hall. London.*

Cuando los frutos de cualquiera de esas presentaciones, excepto las tipo
10 negras que requieren obligatoriamente esterilización por sus características físico-químicas, se comercializan, los productos finales tienen habitualmente un pH<4.6 y una concentración en sal variable (normalmente 5%-10% p/v, en la salmuera). La estabilización de los correspondientes envasados se puede entonces realizar mediante el uso de conservantes o pasteurización.

15 El uso de tratamiento térmico es un procedimiento que se ha mostrado eficaz, pero existen numerosos casos en los que su aplicación no es posible debido a los efectos negativos que puede tener sobre el color, las características físico-químicas del producto o sus salmueras así como sobre el sabor *Garrido
20 Fernández, A.; Fernández Díez, M.J.; Adams, M.R. (1997). Table olives. Production and Processing. Chapman & Hall. London.* En el caso de las aceitunas verdes completamente fermentadas, la estabilización se puede conseguir también mediante determinadas condiciones de pH y sal *Borbolla y Alcalá, JMR de la, González Pellissó, F. 1972 Estudios sobre aceitunas
25 envasadas. XI. Inhibición del sedimento. Grasas y Aceites 23, 107-117,* aunque, cuando estas aceitunas, o cualquier otra no sometida a tratamiento térmico, deben estabilizarse se suele recurrir al empleo de conservantes. En muchos de estos casos, la alteración se debe a la presencia de levaduras *Arroyo López, F.N., Bautista Gallego, J., Segovia Bravo, K.A., García García,
30 P., Durán Quintana, M.C., Romero, C., Rodríguez Gómez, F., Garrido Fernández, A. 2009 Instability profile of fresh packed "seasoned" Manzanilla-Aloreña table olives. LWT-Food Science and Technology 42, 1629-1639. Los*

métodos de conservación no difieren de los de otros alimentos y consisten en el empleo simple o combinado de ácidos débiles tales láctico, acético, cítrico, sórbico o benzoico *Cubero, N., Monferrer, A., Villalta, J. 2002 Aditivos alimentarios. A Madrid Vicente-Mundi-Prensa. Madrid. España.* Por otra parte, el uso del ácido sórbico *Borbolla y Alcalá, JMR de la, Fernández Díez, M.J. 1961. Empleo del ácido sórbico o sus sales en aceitunas aderezadas. Grasas y Aceites 12,10-15.* ó del benzoico *Marsilio, V., Chichelli, A. 1992 Influencia del sorbato potásico y del benzoato sódico sobre la estabilidad de las aceitunas de mesa en salmuera. Grasas y Aceites 43, 66-74* en la conservación de aceitunas de mesa es una práctica ampliamente extendida *Garrido Fernández, A.; Fernández Díez, M.J.; Adams, M.R. (1997). Table olives. Production and Processing. Chapman & Hall. London.* Por ello, el uso de ambos conservantes está actualmente autorizado en las aceitunas de mesa *Consejo Oleícola Internacional 2004 Norma comercial aplicable a las aceitunas de mesa Madrid. España.*

Una revisión de los agentes conservantes en los alimentos y de sus modos de acción puede encontrarse en *Brul, S. Coote, P. 1999 Preservative agents: Mode of action and microbiol resistance mechanisms. Int. J. Food Microbiol. 50, 1-17* y en *Brul, S., Coote, P. Oomes, S., Mensonides, F., Hellingwrf, K. 2002 Physiological actions of preservative agents: prospective of use of modern microbiological techniques in assessing microbial behaviour in food preservation. Int. J. Food Microbiol. 79, 55-64.* Los efectos del sorbato y benzoato en el crecimiento de levaduras que producen alteraciones en los alimentos han sido estudiados por *Praphailong y Fleet (1997).*

Por otra parte, en el caso de las aceitunas de mesa, la proporción de grasa en las mismas suele oscilar entre el 15 y 30%. Asimismo, el coeficiente de reparto de los ácidos benzoico y sórbico entre las soluciones acuosas y grasas es muy favorable a estas lo que provoca la acumulación de dichos conservantes en ella *Brenes, M., Romero, C., García, P., Garrido, A. 2004 Absorption of sorbic and benzoic acids in the flesh of table olives. European Food Research and*

Technology **219**, 75-79. Además de este efecto, se ha observado un descenso progresivo de dichos compuestos a medida que pasa el tiempo de almacenamiento del producto final Arroyo López, F.N., Bautista Gallego, J., Segovia Bravo, K.A., García García, P., Durán Quintana, M.C., Romero, C.,
5 *Rodríguez Gómez, F., Garrido Fernández, A. 2009 Instability profile of fresh packed "seasoned" Manzanilla-Aloreña table olives. LWT-Food Science and Technology* 42, 1629-1639, lo que hace que la eficacia de los conservantes disminuya a medida que transcurre la vida de mercado. Por tanto, los productos así estabilizados suelen tener una vida de mercado relativamente
10 corta. Por otra parte, los conservantes habituales tienen otros inconvenientes derivados de la tendencia a producir oscurecimiento tanto en las salmueras como en las aceitunas. Estos inconvenientes no son exclusivos de las aceitunas sino que se dan igualmente en otros frutos así como en cualquier tipo de alimento. Finalmente, otra desventaja de estos conservantes es la
15 comunicación de un sabor característico a los productos a los que se adicionan, cosa que se agrava más, si cabe, en las aceitunas debido a su ya mencionada acumulación en la grasa de las mismas.

El cinc es un elemento ampliamente distribuido en los alimentos. Es un mineral
20 nutriente y la ingesta diaria recomendada es de 15 mg y la ingesta máxima tolerable de 0.3 a 1.0 mg/kg de peso. También se utiliza en farmacología. El uso de diversas sales de cinc (sulfato de cinc, óxido de cinc, cloruro de cinc, gluconato de cinc y estearato de cinc) está autorizado para la fortificación de alimentos y está autorizado tanto en la Unión Europea como en USA. Se ha
25 encontrado que, en determinadas proporciones (>0.12 mM) ejercía efecto inhibidor de diversos patógenos.

Por otra parte, se ha encontrado sorprendentemente que posee, además, un marcado efecto inhibidor de las principales levaduras que se encuentran
30 habitualmente en la fermentación o en los productos envasados de aceitunas. Experiencias llevadas a cabo con cepas de *Saccharomyces*, *Isatchenchia* han

mostrado inhibición a concentraciones inferiores al 0.050% (expresado como cloruro de cinc).

5 Teniendo en cuenta, que algunas de las alteraciones de las aceitunas y de otros alimentos se producen por la proliferación de levaduras, parece que cualquiera de las sales anteriormente mencionadas podría emplearse en la estabilización de las aceitunas de cualquier tipo envasadas. Sin embargo con cualquiera de estas sales solo se consigue mantener las aceitunas por períodos en principio no superiores a dos meses, lo cual es un problema a
10 resolver con nuevas formulaciones que hagan que este período de tiempo sea mayor.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

15 La presente invención se refiere a nuevas composiciones conservantes de aceitunas con actividad antifúngica para la fermentación, almacenamiento en grandes masas o conservación mediante el uso de sales de cinc de grado alimentario saludable para el ser humano.

20 La invención abarca, por tanto, cualquier fase de la elaboración de aceitunas, cuando en la misma se empleen sales de cinc para controlar microorganismos del reino fungi, como por ejemplo levaduras y mohos. Particularmente, dicho procedimiento puede substituir de manera ventajosa al uso de sorbato sódico o benzoato potásico en la estabilización de conservas de aceitunas, cuyos
25 problemas de conservación sean causados por ejemplo por levaduras.

En este mismo sentido, la presente invención tiene la finalidad de ofrecer una alternativa a la estabilización de aceitunas en las que el deterioro se produce fundamentalmente debido a microorganismos del reino fungi, así como ofrecer
30 una herramienta para controlar los mismos en cualquier fase de fabricación de las aceitunas.

Además, una de las principales ventajas que ofrece la presente invención es proporcionar una composición mediante la cual el mantenimiento de las aceitunas sea mayor de lo descrito en el estado de la técnica por sales ya conocidas. En este mismo sentido, la presente invención describe nuevas composiciones conservantes de aceitunas mediante las cuales se consigue que el tiempo de conserva de las mismas se vea prácticamente duplicado frente a las composiciones que a día de hoy se vienen utilizando.

Por lo tanto un primer aspecto esencial de la presente invención se refiere a composiciones conservantes de aceitunas con actividad antifúngica para la fermentación, almacenamiento en grandes masas o conservación de las mismas, que comprende:

- cloruro sódico;
- al menos un ácido de propiedades conservantes; y
- al menos una sal de cinc.

Según una realización preferida, el ácido se selecciona del grupo formado por ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido láctico y ácido acético o cualquier combinación de los mismos.

Según una realización preferida, el cloruro sódico se encuentra en una proporción desde el 3 al 10%, preferentemente desde 4 al 7%, el ácido cítrico en una proporción desde el 0,1 al 0,6 %, preferentemente desde 0,2 al 0,4%, el ácido ascórbico en una proporción desde el 0,03 al 0,1%, preferentemente desde 0,03 a 0,07%, el ácido láctico en una proporción desde el 0,1 al 0,7%, preferentemente desde 0,1 al 0,4%, el ácido acético del 0.1 al 0.7%, preferentemente del 0.2 al 0.5% y la sal de cinc en una proporción del 0,01 al 0,1%, preferentemente desde 0,03 al 0,07%.

Según otra realización preferida, la sal de cinc, se selecciona del grupo formado por sulfato de cinc, óxido de cinc, cloruro de cinc, gluconato de cinc

estearato de cinc o cualquier combinación de las mismas, preferentemente cloruro de cinc.

Alternativamente, según otra realización preferida, se añade a la composición
5 con actividad antifúngica una mezcla de aliño que comprende ajo, pimienta
rojo y orégano o cualquier oleoresina o aceite esencial de los mismos, en una
proporción desde el 1 al 10%, preferentemente desde 2 al 7%.

Alternativamente, la mezcla de aliño contiene además zumo de limón u otro
10 cítrico al gusto o trozos de los mismos.

Un segundo aspecto esencial de la presente invención, se refiere a un
procedimiento para la conservación de aceitunas, mediante dichas
composiciones con actividad antifúngica. Dicho procedimiento de conservación
15 comprende las etapas de:

- recolección de la aceituna;
- almacenamiento en cajas metálicas que poseen paredes laterales
formadas por mallas metálicas con objeto de permitir que continúe la
20 respiración de la aceituna;
- lavado dinámico en una lavadora de inmersión;
- colocación en depósitos con salmuera;
- lavado de la aceituna;
- adición de la composición con actividad antifúngica; y
- 25 - envasado.

Según una realización preferida la salmuera esta en una proporción desde el 5 al
15% de cloruro sódico.

30 Según otra realización preferida, la composición con actividad antifúngica
comprende los siguientes elementos:
- cloruro sódico;

- al menos un ácido de propiedades conservantes; y
- al menos una sal de cinc.

Según una realización preferida, el ácido se selecciona del grupo formado por
5 ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido láctico y ácido acético o cualquier combinación de los mismos.

Según una realización preferida, el cloruro sódico se encuentra en una proporción desde el 3 al 10%, preferentemente desde 4 al 7%, el ácido cítrico
10 en una proporción desde el 0,1 al 0,6 %, preferentemente desde 0,2 al 0,4%, el ácido ascórbico en una proporción desde el 0,03 al 0,1%, preferentemente desde 0,03 a 0,07%, el ácido láctico en una proporción desde el 0,1 al 0,7%, preferentemente desde 0,1 al 0,4%, el ácido acético en una proporción del 0.1 al 0.7%, preferentemente desde 0.3 al 0.5% y la sal de cinc en una proporción
15 del 0,01 al 0,1%, preferentemente desde 0,03 al 0,07%.

Según otra realización preferida, la sal de cinc, se selecciona del grupo formado por sulfato de cinc, óxido de cinc, cloruro de cinc, gluconato de cinc estearato de cinc o cualquier combinación de las mismas, preferentemente
20 cloruro de cinc.

Alternativamente en alimentos con hueso, tras el lavado dinámico, la aceituna se parte sin romper el hueso.

25 Alternativamente en la etapa de depósito con salmuera, se va reponiendo ésta a medida que se va perdiendo debido a oscilaciones de volumen debido a las dilataciones o evaporación.

Alternativamente tras la etapa de lavado se adiciona una mezcla de aliño que
30 comprende ajo, pimiento rojo y orégano o cualquier oleoresina o aceite esencial de los mismos, en una proporción desde el 1 al 10%, preferentemente

desde 2 al 7%. Alternativamente, la mezcla de aliño contiene además zumo de limón u otro cítrico al gusto o trozos de los mismos.

5 Un tercer aspecto esencial de la presente invención, se refiere al uso de las composiciones conservantes de aceitunas con actividad antifúngica, para la fermentación, almacenamiento del producto fermentado, estabilización de aceitunas o cualquier combinación de las mismas.

10 Además la presente invención se refiere al uso de la composición conservante de aceitunas con actividad antifúngica para el control de microorganismos del reino fungi.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Efecto de la adición de cloruro de cinc sobre el crecimiento de la levadura *Issatchenkia occidentalis* en medio sintético de cultivo YM. El crecimiento se expresa en función de la densidad óptica del medio de cultivo.

FIG. 2. Efecto de la adición de cloruro de cinc sobre el crecimiento de *Issatchenkia occidentalis*, *Candida diddensiae*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia anomala*. La reducción en el crecimiento se expresa mediante la denominada área fraccional (relación entre el área bajo la curva de crecimiento en medio sintético sin y con las diversas concentraciones de cloruro de cinc).

30

FIG. 3. Efecto de la adición de diversas concentraciones de cloruro de cinc sobre la supervivencia de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (time to killing curve) frente a un control sin dicha sal.

- 5 **FIG. 4.** Efecto de la adición de diversas concentraciones de cloruro de cinc sobre la supervivencia de la bacteria láctica *L. pentosus* (time to killing curve) frente un control sin dicha sal.

- 10 **FIG. 5.** Comportamiento de la población de levaduras en envasados utilizando las diferentes concentraciones de cloruro de cinc de algunos envasados en los que se ha empleado frente a un control conservado con sorbato potásico.

EJEMPLOS

- 15 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen la actividad antifúngica de la composición desarrolla en la presente invención, así como el procedimiento de conservación de aceitunas mediante dicha composición.

20 EJEMPLO 1.

- Medio sintético de extracto de levadura, pectona y glucosa (YM) (Difco, Becton & Dickinson Company, Sparks, Md) se prepara de la manera habitual y a alícuotas del mismo se les añade proporciones crecientes de cloruro de cinc. Una vez
25 preparadas las soluciones, se depositan 0,35ml de los mismos en las celdillas de una placa conteniendo 96 de estas. A continuación se les añade a cada celdilla 0,05mL de inóculo a concentración tal que, después de la dilución, quede la población de levaduras a una concentración aproximada de $6\log_{10}\text{ufc/mL}$. Las placas se introducen entonces en un equipo Bioscreen C y se incuban durante 7
30 días a una temperatura de 30°C, tomándose medidas de la densidad óptica cada dos horas. A medida que crece la población inoculada, aumenta la lectura de la densidad óptica de las mismas. En ausencia de cloruro de cinc (Control, 0.00%) se

produce un crecimiento normal. A medida que se añade cloruro de cinc, este inhibe el desarrollo de la población, con lo que el aumento de la densidad óptica de las celdillas se incrementa más lentamente y, por tanto, se producen curvas progresivamente más aplanadas. Como puede observarse, cuando la
5 concentración es suficientemente elevada no se observa crecimiento de la levadura *S. cerevisiae* (Figura1).

Una medida de cuantificar el grado de inhibición de la población de microorganismos es calcular el área fraccional, que es el cociente entre el área de
10 una curva a cuyo medio de cultivo se le ha añadido una determinada proporción de cloruro de cinc y el área de una curva en medio sintético puro sin el conservante (Figura 2). A medida que se produce más inhibición, la curva es menos elevada y se van obteniendo valores más bajos. Cuanto más se aproxime a cero, mayor inhibición se produce. Dichas áreas se han representado en la Figura 2 para
15 algunas de las levaduras más significativas de los procesos de elaboración de aceitunas (*S. cerevisiae*, *I. occidentalis*, *P. anomala* y *C. diddensii*). Como se aprecia, todas las levaduras sufren un marcado efecto inhibitor, quedando áreas fraccionales relativamente elevadas para el *S. cerevisiae*, mientras que la levadura más sensible resultó ser *I. occidentalis*, que se inhibe de manera muy completa con
20 tan solo 0,02%. Lo mismo le ocurre a *C. diddensiae*, que a partir de esa concentración incluso resulta más afectada. Un comportamiento muy diferente a las levaduras anteriores lo experimenta *P. anomala* que experimenta una inhibición progresiva a medida que aumenta la cantidad de cloruro de cinc, formando una línea recta, lo que indica una cinética de inhibición de primer orden.

25 Otro aspecto que indica el carácter inhibitor de la sal de cloruro de cinc, se muestra en la Figura 3, para *S. cerevisiae*, utilizando el mismo medio sintético de cultivo YM al que se inocula con distintas proporciones de cloruro de cinc y se sigue la evolución de la población inoculada de la levadura con el tiempo. Tales
30 curvas, que reciben el nombre de tiempo para la destrucción (time to killing en inglés), indican igualmente el carácter inhibitor del componente en estudio. Como puede apreciarse en el control, existe un crecimiento normal mientras que en el

caso de utilizar concentraciones tan solo al 0,025% de cloruro de cinc puede apreciarse que la destrucción de la flora presente se alcanza en un tiempo entre las 30 y 40 h, dependiendo de la cantidad utilizada (Figura 3).

- 5 Sin embargo, este carácter inhibidor del cloruro de cinc, no se aprecia con la misma intensidad en las bacterias lácticas. Utilizando en este caso el medio sintético MRS líquido (Merck, Darmstadt, Alemania), para las mismas condiciones ambientales ya anteriormente comentadas, con la excepción de que el microorganismo inoculado fue *L. pentosus*. En este caso, el efecto es
- 10 prácticamente inapreciable incluso para concentraciones superiores al 0,1%. Se aprecia que el cloruro de cinc no tiene efecto inhibidor ni bactericida, puesto que se produce un crecimiento normal de la población de microorganismos, incluso, un cierto incremento en las poblaciones finales que se obtienen después del crecimiento, por lo que puede que a pequeñas concentraciones pueda tener un
- 15 efecto estimulante para el mismo. (Figura 4).

- Por otra parte, el efecto inhibidor del nuevo conservante se ha comprobado en envasados normales de aceitunas en los que se ha añadido cloruro de zinc en las proporciones que se indican en la Figura 5. Esta experiencia corresponde a una
- 20 condiciones muy poco apropiadas para facilitar crecimiento de microorganismos, empleando aceitunas de la variedad Aloreña fresca que, por tanto, mantienen en las soluciones una cantidad elevada de materia fermentable. Dichas aceitunas, contenían asimismo, los mismos aliños y las mismas condiciones de envasado. El comportamiento del nuevo conservante se aprecia en la Figura 5. En la misma, se
- 25 aprecia que los recuentos de levaduras con el tiempo en las aceitunas conteniendo sorbato han sido siempre superiores. Este efecto inhibidor es más acentuado en la primera fase de la vida de mercado. En el resto de esta, a pesar de mantenerse en todo momento por debajo, las diferencias no son tan importantes e incluso a, un plazo de tiempo mayor, las poblaciones llegan incluso a igualarse (Figura 5). Sin
- 30 embargo, dado que las primeras etapas de dicha vida de mercado, son de la mayor trascendencia para la conservación del producto, el nuevo conservante cloruro de cinc podría tener un efecto inesperado y muy favorable con respecto a

otros productos conservantes, especialmente el sorbato potásico, tal como se demostrado en estas experiencias.

Por tanto, de todas estas experiencias, en medio sintético unas y en condiciones reales de de envasado de productos aliñados, el cloruro de cinc se comporta como un producto conservante muy conveniente por las favorables ventajas que presenta frente a otros compuestos.

EJEMPLO 2. Conservación de aceitunas de la variedad Aloreña

10

Aceitunas de la variedad Aloreña se recolectan a finales de septiembre cuando el color de la piel se encuentra aún verde, pero empieza a amarillear algo. Se llevan a la fábrica y se almacenan al aire en cajas metálicas que contienen aproximadamente 1000kg y que poseen paredes laterales formadas por mallas metálicas con objeto de permitir que continúe la respiración de los frutos. Al cabo de tres días, los mismos se pasan por una lavadora de inmersión sometiendo a un lavado dinámico. A continuación los frutos se parten sin que se rompa el hueso y se depositan en bombonas con salmuera de 10% de NaCl ($\approx 11^\circ\text{Be}$). Dichas bombonas se llevan a la línea de envasado, se lavan, se mezclan con un aliño compuesto de ajo, pimiento rojo y orégano, en una proporción de aproximadamente 3-6%, se envasan en recipientes tipo PET en los que la proporción fruto salmuera es de 400g de aceitunas (peso neto escurrido) y 315ml salmuera cuya composición es: sal (5%), ácidos cítrico (0,25%), ácido ascórbico (0,04%), ácido láctico (0.2%) y 0,047% cloruro de cinc. El producto resultante queda listo para la comercialización.

15

20

25

EJEMPLO 3. Conservación de aceitunas Aloreña.

Aceitunas de la variedad Aloreña se recolectan a principios de octubre cuando el color de la piel empieza a amarillear algo. Se llevan a la fábrica y se almacenan en cámaras frigoríficas, utilizando para ello cajas metálicas que contienen aproximadamente 1000kg y que poseen paredes laterales formadas

30

por mallas metálicas con objeto de permitir que continúe la respiración de los frutos. Al cabo de tres días, los mismos se pasan por una lavadora de inmersión sometiénolos a un lavado dinámico. A continuación los frutos se parten sin que se rompa el hueso y se depositan en bombonas con salmuera de 10% de NaCl ($\approx 11^\circ\text{Be}$). Dichas bombonas se llevan a un patio cubierto y se mantienen en almacenamiento hasta que llega primeros de abril, reponiendo la salmuera que se pierde a causas de las oscilaciones de volumen debido a las dilataciones o evaporación. En el transcurso de este tiempo, los volúmenes de salmuera que se van perdiendo se reponen con salmuera de la misma graduación (requerido). A primeros de abril, la mencionada bombona se lleva a la línea de envasado, se lavan, se mezclan con un aliño compuesto de ajo, pimienta roja y orégano, en una proporción de aproximadamente 3-6%, se envasan en recipientes tipo PET en los que la proporción fruto salmuera es de 1900g de aceitunas (peso neto escurrido) y 1500ml salmuera cuya composición es: sal (6%), ácidos cítricos (0,30%), ácido ascórbico (0,06%), ácido láctico (0,3%) y 0,063% cloruro de cinc. El producto resultante queda, igualmente, listo para la comercialización.

REIVINDICACIONES

1. Composiciones conservantes de aceitunas con actividad antifúngica que comprenden:
 - 5 a. cloruro sódico;
 - b. al menos un ácido; y
 - c. al menos una sal de cinc.
- 10 2. Composiciones conservantes de aceitunas con actividad antifúngica según la reivindicación 1, donde el ácido se selecciona del grupo formado por ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido láctico y ácido acético o cualquier combinación de los mismos.
- 15 3. Composiciones conservantes de aceitunas con actividad antifúngica, según la reivindicación 2, donde el cloruro sódico se encuentra en una proporción desde el 3 al 10%, el ácido cítrico en una proporción desde el 0,1 al 0,6 %, el ácido ascórbico en una proporción desde el 0,03 al 0,1%, el ácido láctico en una proporción desde el 0,1 al 0,7%, el ácido acético en una proporción desde el 0.1 al 0.7% y la sal de cinc en una proporción del 0,01 al 0,1%.
20
- 25 4. Composiciones conservantes de aceitunas con actividad antifúngica, según la reivindicación 3, donde el cloruro sódico se encuentra en una proporción desde el 4 al 7%, el ácido cítrico en una proporción desde el 0,2 al 0,4%, el ácido ascórbico en una proporción desde el 0,03 a 0,07%, el ácido láctico en una proporción desde el 0,1 a 0,4%, el ácido acético en una proporción desde el 0.2 al 0.5% y la sal de cinc en una proporción del 0,03 al 0,07%.
- 30 5. Composiciones conservantes de aceitunas con actividad antifúngica, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la sal de cinc, se selecciona del grupo formado por sulfato de cinc, oxido de cinc, cloruro de cinc, gluconato de cinc estearato de cinc o cualquier combinación de las mismas.

6. Composiciones conservantes de aceitunas con actividad antifúngica, según la reivindicación 5, donde la sal de cinc es cloruro de cinc.
- 5 7. Composiciones conservantes de aceitunas con actividad antifúngica, según la reivindicación 1, donde adicionalmente comprende una mezcla de aliño.
8. Composiciones conservantes de aceitunas con actividad antifúngica, según la reivindicación 7, donde la mezcla de aliño comprende ajo, pimienta roja y orégano o cualquier oleoresina o aceite esencial de los mismos, en una
10 proporción desde el 1 al 10%, preferentemente desde 2 al 7%.
9. Composiciones conservantes de aceitunas con actividad antifúngica, según la reivindicación 8, donde la mezcla de aliño además comprende zumo de cualquier cítrico o trozos de los mismos.
15
10. Procedimiento para la conservación de aceitunas, que comprende las etapas de:
 - a. almacenamiento de las aceitunas en salmuera;
 - b. lavado de la aceituna; y
 - 20 c. adición de la composición conservante de aceitunas con actividad antifúngica de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Procedimiento para la conservación de aceitunas según la reivindicación 10, donde adicionalmente previo a las etapas a a c, se llevan a cabo las
25 etapas de:
 - a. recolecta de la aceituna;
 - b. almacenamiento en cajas; y
 - c. lavado dinámico;y posteriormente a la etapa c, se lleva a cabo una etapa de envasado.
30
12. Procedimiento para la conservación de aceitunas, según la reivindicación 10, donde adicionalmente se adiciona previo a la etapa de almacenamiento

de las aceitunas en salmuera la composición conservante con actividad antifúngica.

5 13. Procedimiento para la conservación de aceitunas, según la reivindicación 10, donde la salmuera esta en una proporción desde el 5 al 15% de cloruro sódico.

10 14. Procedimiento para la conservación de aceitunas, según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, donde la composición conservante de aceitunas con actividad antifúngica comprende:

- a. cloruro sódico;
 - b. al menos un ácido, seleccionado del grupo formado por ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido láctico y ácido acético o cualquier combinación de los mismos; y
 - 15 c. al menos una sal de cinc;
- en las proporciones definidas según las reivindicaciones 3 y 4.

20 15. Procedimiento para la conservación de aceitunas, según la reivindicación 11, donde alternativamente tras la etapa de lavado dinámico, el alimento se parte sin romper el hueso.

25 16. Procedimiento para la conservación de aceitunas, según la reivindicación 10, donde alternativamente en la etapa de depósito con salmuera, se va reponiendo ésta a medida que se va perdiendo debido a oscilaciones de volumen debido a las dilataciones o evaporación.

30 17. Procedimiento para la conservación de aceitunas, según la reivindicación 10, donde alternativamente tras la etapa de lavado se adiciona una mezcla de aliño que comprende ajo, pimiento rojo y orégano, en una proporción desde el 1 al 10%, preferentemente desde 2 al 7%.

18. Uso de la composición conservante de aceitunas con actividad antifúngica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la fermentación de aceitunas, almacenamiento de las aceitunas fermentadas, estabilización de aceitunas, para el control de microorganismos del reino fungi o para cualquier combinación de las mismas.
- 5

1/5

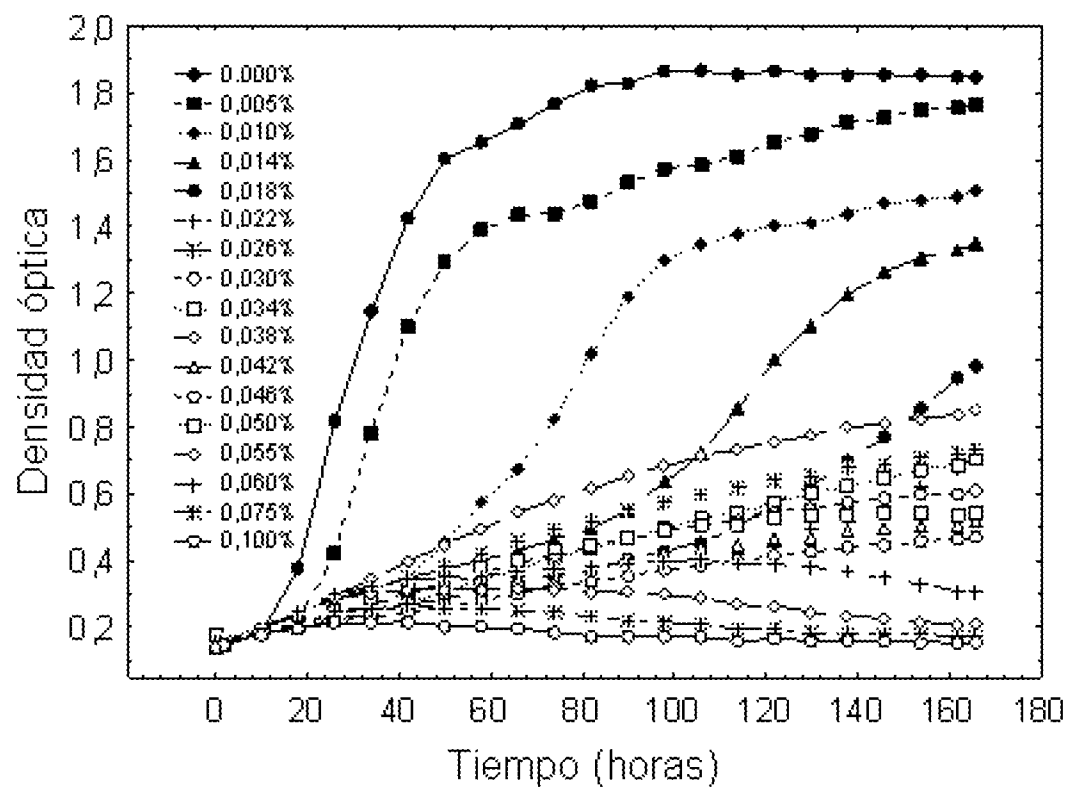


FIG. 1

2/5

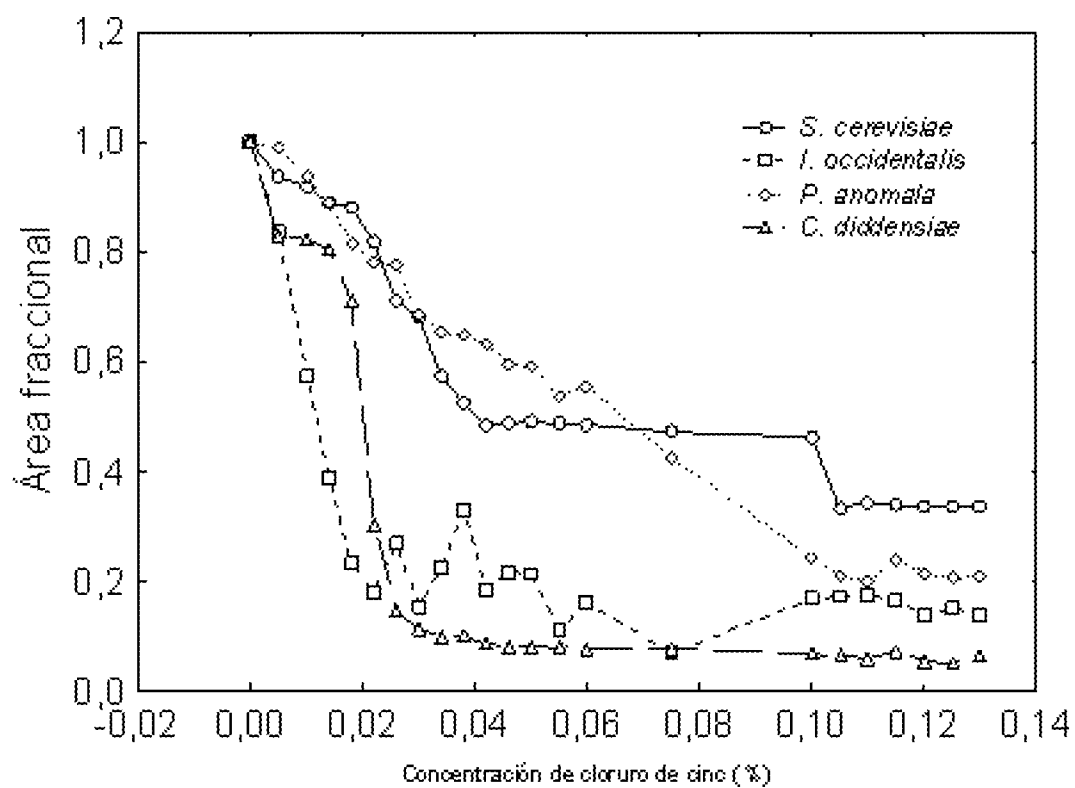


FIG. 2

3/5

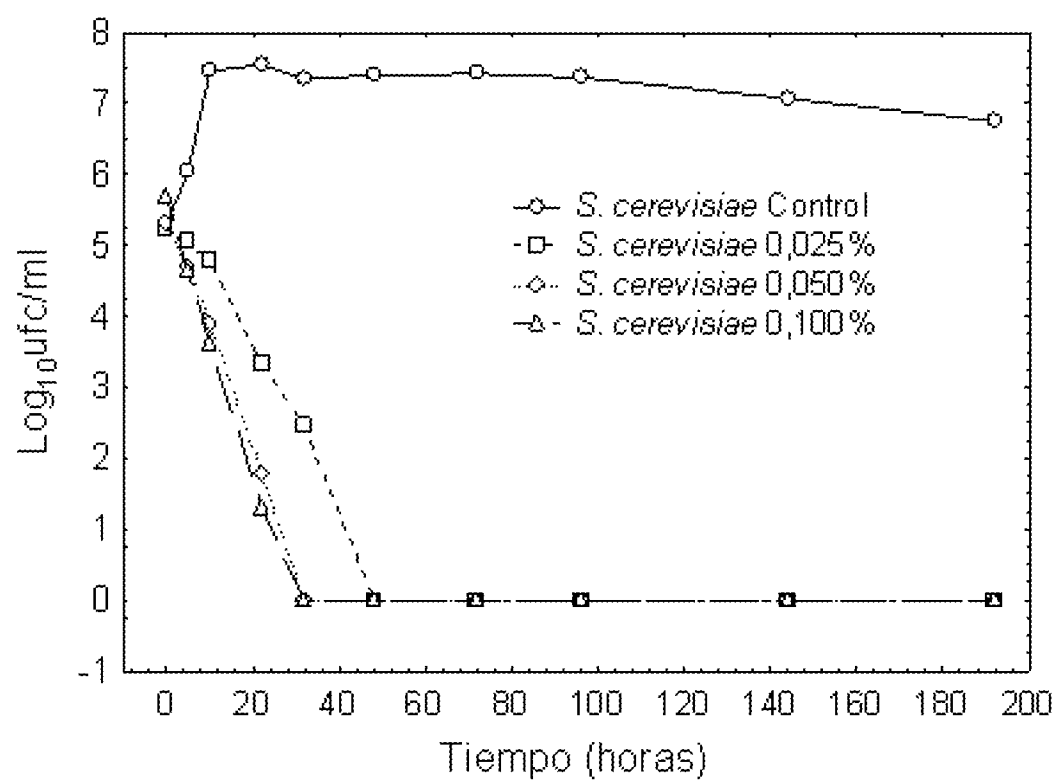


FIG. 3

4/5

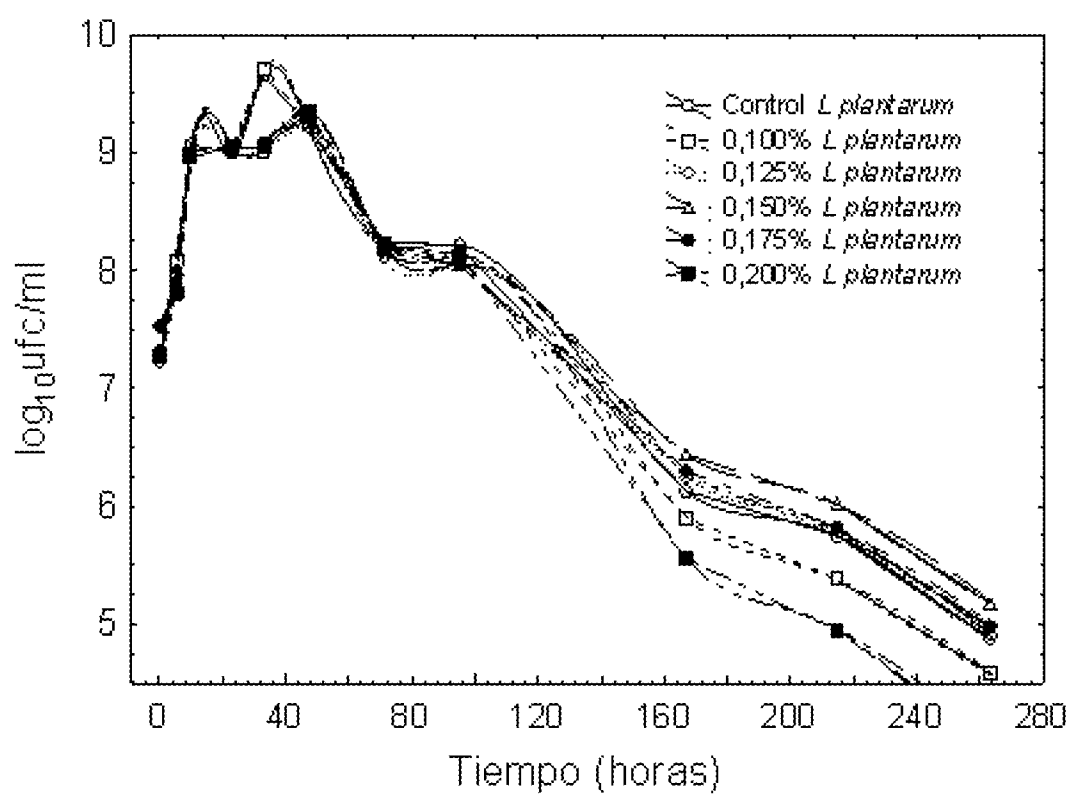


FIG. 4

5/5

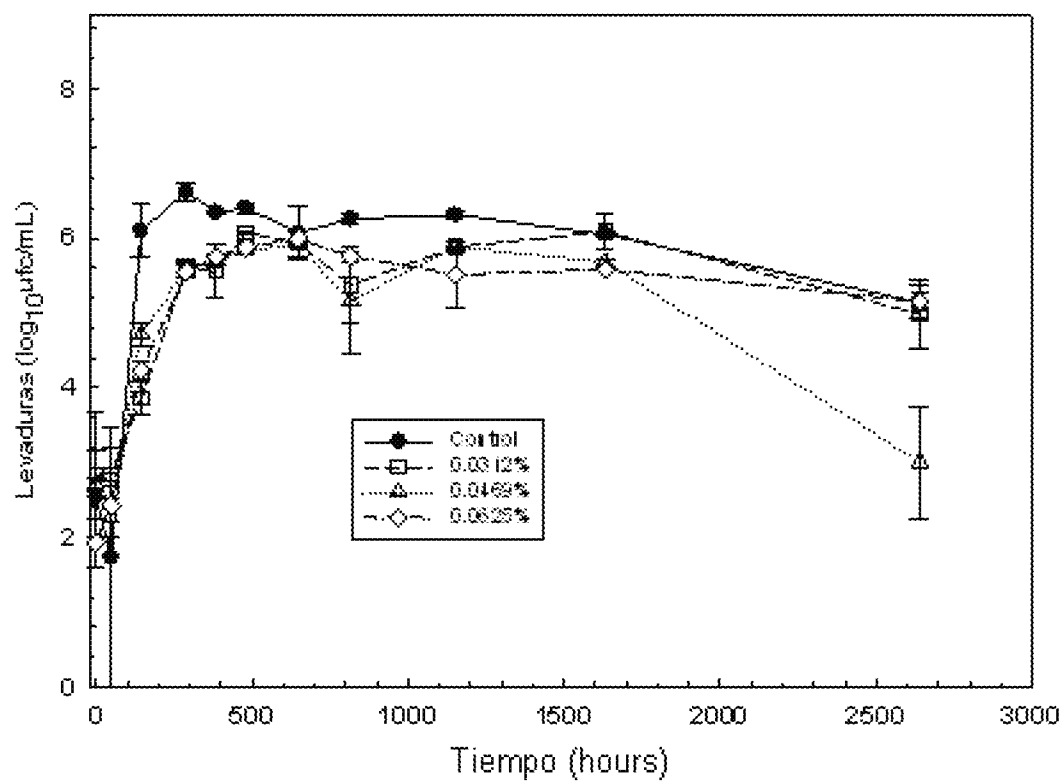


FIG. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2011/070220

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23L1/218 (2006.01)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23L

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

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

EPODOC, INVENES, WPI, SCIENCEDIRECT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Marsilio, V. Et al. Influencia del sorbato potásico y del benzoato sódico sobre the estabilidad of las aceitunas of mesa in salmuera. Grasas and Aceites. 1992. vol.43. fasc.2, pp.66-74.	1-18
A	Durán et al. Evolución del crecimiento in salmuera, bajas temperaturas and diferentes acidulantes, de levaduras aisladas de aceituna of mesa. Grasas y Aceites. 2005. vol.56, fasc.1, pp.9-15	1-18

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

☐ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search
03/08/2011

Date of mailing of the international search report
(09/08/2011)

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer
J. López Nieto

Telephone No. 91 3498426

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070220

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD A23L1/218 (2006.01)

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

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A23L

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

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

EPODOC, INVENES, WPI, SCIENCEDIRECT

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	Marsilio, V. Et al. Influencia del sorbato potásico y del benzoato sódico sobre la estabilidad de las aceitunas de mesa en salmuera. Grasas y Aceites. 1992. vol.43. fasc.2, pp.66-74.	1-18
A	Durán et al. Evolución del crecimiento en salmuera, bajas temperaturas y diferentes acidulantes, de levaduras aisladas de aceituna de mesa. Grasas y Aceites. 2005. vol.56, fasc.1, pp.9-15	1-18

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

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

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

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
03/08/2011

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
09- AGOSTO-2011 (09/08/2011)

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

Funcionario autorizado
J. López Nieto
Nº de teléfono 91 3498426