

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE  
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

Master Universitario Oficial en Técnicas Avanzadas para la  
Investigación y la Producción en Fruticultura



“FERMENTADOS VEGETALES OBTENIDOS A PARTIR  
DE PISTACHOS HIDROSOSTENIBLES”

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Autor:**

Paola Sánchez Bravo

**Tutores:**

Ángel A. Carbonell Barrachina

Esther Sendra Nadal

Julio 2017



## UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Se autoriza a la alumna **D<sup>a</sup>. Paola Sánchez Bravo** a realizar el Trabajo Fin de Master titulado: “Fermentados vegetales obtenidos a partir de pistachos hidrosostenibles”, bajo la dirección de D. Ángel A. Carbonell Barrachina y D<sup>a</sup>. Esther Sendra Nadal, debiendo cumplir las directrices marcadas para la redacción del mismo, que están a su disposición en la Normativa para la realización de Trabajos Fin de Máster que se halla en la página Web.

Orihuela, a 3 de mayo de 2017

El Director del Máster Oficial en Técnicas Avanzadas para la Investigación  
y la Producción en Fruticultura



Fdo.: Juan José Martínez Nicolás



# MÁSTER OFICIAL EN TÉCNICAS AVANZADAS PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA PRODUCCIÓN EN FRUTICULTURA

## INFORME Y VISTO BUENO DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO 2016/2017

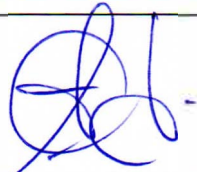
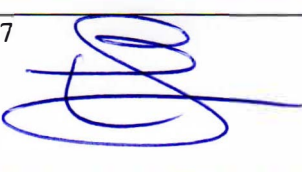
Director/es del trabajo	Área/s de Conocimiento
ÁNGEL A. CARBONELL BARRACHINA ESTHER SENDRA NADAL	TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Declara/n que el Trabajo Fin de Máster

Título del Trabajo
FERMENTADOS VEGETALES OBTENIDOS A PARTIR DE PISTACHOS HIDROSOSTENIBLES
Alumno/a
PAOLA SÁNCHEZ BRAVO

cumple los requisitos necesarios para poder ser defendido ante el tribunal correspondiente y emite/n el siguiente:

Informe
La alumna Paola Sánchez ha realizado un trabajo formidable en las actividades asociadas a su Trabajo Fin de Máster. Ha colaborado con parte de las actividades de un proyecto de investigación del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad AGL2016-75794-C4-1-R "Productos hidroSOSTenibles: Identificación de debilidades y fortalezas, optimización del procesado, creación de marca propia, y estudios de su aceptación en el mercado europeo". Su participación ha sido desarrollar un fermentado vegetal a partir de pistachos hidroSOSTenibles. Por tanto, creemos que ha sido una primera aproximación de la alumna a la investigación muy interesante y útil, pues ha tenido que aunar y coordinar conocimiento de dos áreas de conocimiento: (i) producción vegetal y (ii) tecnología de alimentos. En definitiva, estamos muy satisfechos de su trabajo y estamos convencidos de que se ha abierto una línea de trabajo interesante.

	Orihuela, a 17 de junio de 2017	
Firma/s director/es trabajo		

SR. D. JUAN JOSÉ MARTÍNEZ NICOLÁS, DIRECTOR DEL MÁSTER OFICIAL EN TÉCNICAS AVANZADAS PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA PRODUCCIÓN EN FRUTICULTURA

**Anexo V**  
**MÁSTER OFICIAL EN TÉCNICAS AVANZADAS PARA LA INVESTIGACIÓN Y**  
**LA PRODUCCIÓN EN FRUTICULTURA**  
**REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MASTER**

Identificaciones:

**Autor:** Paola Sánchez Bravo

**Título:** Fermentados vegetales obtenidos a partir de pistachos hidroSostenibles

**Title:** Fermented beverages obtained from hydroSustainable pistachios

**Director/es del TFM:** Ángel A. Carbonell Barrachina y Esther Sendra Nadal.

**Año:** 2017

**Titulación:** Máster universitario oficial en técnicas avanzadas para la investigación y la producción en fruticultura

**Tipo de Trabajo:** Experimental

**Palabras claves:** Licuado de pistacho, *Pistacia vera*, Riego deficitario controlado

**Keywords:** Pistachio milk, *Pistacia vera*, Regulated deficit irrigation

**Nº citas bibliográficas:** 28

**Nº de tablas:** 16

**Nº de figuras:** 12

**Nº de anexos:** 0

**Resumen:** En el presente trabajo se evalúa pistacho de la variedad Kerman sobre portainjerto Atlántica procedente de riego convencional y deficitario (HidroSOS) para la obtención de bebidas fermentadas. El estudio aborda tres cuestiones de gran relevancia: 1) evaluar los productos obtenidos en condiciones de riego deficitario, 2) ofrecer aplicaciones potenciales para los productos de calidad no comercial, y 3) ampliar la oferta de productos vegetales de alto valor nutricional destinados a cubrir la creciente demanda de productos aptos para veganos y vegetarianos. Hasta el momento no hay estudios en la literatura científica sobre la fermentación de bebidas a base de pistacho; además, se utilizará pistacho de cultivo nacional. Se ensayaron dos cultivos comerciales diferentes (yogur y mantequilla), con el fin de determinar las características de las bebidas fermentadas obtenidas. Los parámetros evaluados a tiempo 1, 15 y 30 días de almacenamiento en refrigeración fueron: recuentos de poblaciones microbianas, indicadores de la fermentación, perfil de ácidos grasos

totales, color y perfil de compuestos volátiles. Se observó, que el pistacho tanto de cultivo convencional como hidroSOStenible, es un excelente sustrato para la supervivencia y el crecimiento de las bacterias lácticas. Los pistachos procedentes tanto de riego convencional como de riego deficitario, que por motivos de forma o tamaño no puedan ser destinados a consumo en fresco tienen en la elaboración de licuados fermentados una posible alternativa de uso.

**Abstract:**

The present work evaluates pistachio of the variety Kerman on Atlantic rootstock from conventional irrigation and restricted irrigation (HidroSOS) to obtain fermented beverages. The study addresses three important issues: 1) evaluating products obtained under deficit irrigation conditions, 2) offering potential applications for non-commercial quality products, and 3) expanding the supply of vegetable products of high nutritional value intended to cover the growing demand for products suitable for vegans and vegetarians. To date, there are no studies in the scientific literature on the fermentation of pistachio-based beverages; In addition, national cultivated pistachio will be used. Two different commercial starter cultures (yogurt and butter) will be tested in order to determine the characteristics of the fermented beverages obtained. The parameters evaluated at time 1, 15 and 30 days of refrigerated storage were: counts of microbial populations, fermentation indicators, total fatty acid profile, color and profile of volatile compounds. It was observed that the pistachio, both conventional and hidroSOSustainable used for the study, is an excellent substrate for the survival and growth of lactic bacteria. And that pistachios from both conventional irrigation and deficient irrigation, which for reasons of shape or size cannot be destined for fresh consumption, can be successfully used for the obtention of fermented beverages

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
1.1. PISTACHO .....	9
1.1.1. HISTORIA .....	9
1.1.2. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS.....	9
1.1.3. PRODUCCIÓN E IMPORTANCIA ECONÓMICA .....	10
1.1.4. IMPORTANCIA DE LOS RECURSOS HÍDRICOS EN LA AGRICULTURA.....	11
1.1.5. COMPOSICIÓN DEL PISTACHO Y BENEFICIOS.....	12
1.2. FERMENTADOS DE LICUADOS VEGETALES.....	13
1.2.1. IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA .....	13
1.2.2. IMPORTANCIA DE LOS LICUADOS VEGETALES PARA EL CONSUMIDOR.....	14
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1. PLAN DE TRABAJO .....	19
3.1.1. MATERIAL VEGETAL.....	20
3.1.2. PREPARACIÓN DEL LICUADO DE PISTACHO Y LOS FERMENTADOS .....	22
3.1.3. CULTIVOS INICIADORES.....	22
3.1.4. COMPOSICIÓN DEL LICUADO ORIGINAL .....	23
3.1.4.1. MATERIA SECA, CENIZAS Y AZÚCARES .....	23
3.1.4.2. PROTEÍNA CRUDA (KJELDAHL) .....	24
3.1.4.3. CONTENIDO EN GRASA .....	25
3.1.5. DETERMINACIÓN DEL COLOR.....	26
3.1.6. DETERMINACIÓN DEL pH Y LA ACIDEZ .....	26
3.1.7. RECUENTO MICROBIOLÓGICO .....	27
3.1.8. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS TOTALES .....	28
3.1.9. PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES.....	30
3.1.10. ANÁLISIS SENSORIAL .....	31
3.1.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	32

<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>33</b>
4.1. COMPOSICIÓN DEL LICUADO ORIGINAL .....	34
4.2. pH Y ACIDEZ.....	35
4.3. RECIENTOS MICROBIANOS .....	37
4.4. COLOR.....	39
4.5. ÁCIDOS GRASOS TOTALES .....	40
4.6. COMPUESTOS VOLÁTILES.....	44
4.7. ANÁLISIS SENSORIAL .....	47
<b>5. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>50</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>53</b>



1

INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAS

Miguel  
Hernández



## 1.1. PISTACHO

### 1.1.1. HISTORIA

Desde finales del paleolítico, numerosos restos arqueológicos evidencian el consumo de los pistachos como parte de la dieta humana. Sin embargo, no es hasta el 711-1031 d.C. que este cultivo comienza a desarrollarse en la Península Ibérica. Durante este período de dominación árabe, el pistacho se convirtió en un cultivo agrícola y se extendió por numerosas regiones del Mediterráneo, aunque posteriormente perdió relevancia.

En la década de los 80, el pistacho se vuelve a introducir por Cataluña y en 1986 se convierte en un cultivo alternativo en las regiones de Castilla-La Mancha, Andalucía y Extremadura al amparo de un proyecto regional y de la Consejería de Agricultura.

A finales de los años 90, se comienza a difundir el cultivo por la Península Ibérica apostando por el uso del pie autóctono *Pistacia terebinthus* L. (Couceiro *et al.*, 2013).

### 1.1.2. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

El pistachero es un árbol del género *Pistacia*, de la familia de las anacardiáceas, similar al almendro, que puede llegar a alcanzar los 10 m de altura y produce un fruto llamado pistacho o alfóncigo.

El pistachero es una especie longeva aunque de crecimiento lento. En condiciones adecuadas, sus ramas son largas con ángulos de inserción de los brotes amplios, generando copas grandes y abiertas. Asimismo, son árboles de hoja caduca, alterna y trifoliadas imparipinnadas (con 3 ó 5 folíolos ovales). Sus flores (apétalas) nacen sobre las ramas laterales de un año, antes del brote de las hojas, abriéndose de forma escalonada.

Su fruto es una drupa monosperma que contiene una semilla alargada, que es la porción comestible. Está cubierto por una piel carnosa fina (epicarpio y mesocarpio) que rodea una cáscara dura y blanquecina (endocarpio), en cuyo interior se encuentra

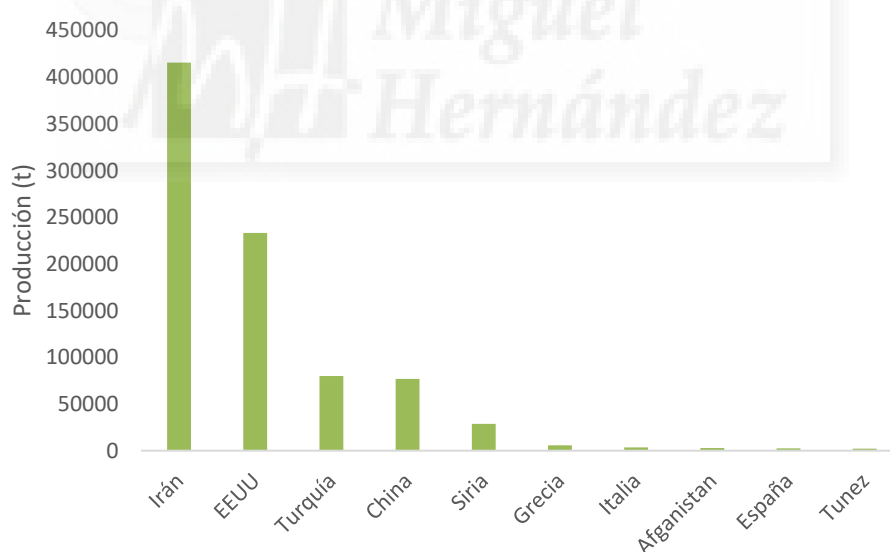
la semilla de un color verde pálido. Cuando el fruto madura su cáscara se rompe y abre parcialmente de manera abrupta (Couceiro *et al.*, 2013).

### 1.1.3. PRODUCCIÓN E IMPORTANCIA ECONÓMICA

La producción del pistachero es alterna o bienal, lo que significa que la producción es más abundante cada dos años, y la producción pico se alcanza aproximadamente a los 20 años.

Dentro de su género, el pistachero (*P. vera* L.) es la especie con mayor interés comercial y se cultiva ampliamente en países mediterráneos siendo el sexto fruto seco en superficie a nivel mundial después del almendro, nogal, anacardo, avellano y castaño (Gijón, 2013).

La producción mundial de pistacho alcanzó 8.578.78 t en 2014. El mayor productor mundial es Irán, con 415.531 t, seguido de EEUU (233.146 t), Turquía (80.000 t), China (76.943 t), Siria (28.786 t), Grecia (5.700 t), e Italia (3.555 t) (**Figura 1**) (FAOSTAT, 2014).



**Figura 1.** Principales países productores de pistacho en el año 2014 (FAOSTAT, 2014).

En la Unión Europea, la incertidumbre sobre el respaldo económico para los cultivos tradicionales de la región mediterránea como el olivar y la viña, además de la explotación de terrenos empobrecidos y no aptos para la mayoría de cultivos, han

llevado al progresivo incremento en la superficie plantada de pistachero (Gijón, 2013), llegando a alcanzarse en 2014 una producción de 11.745 t (FAOSTAT, 2014).

En España, de las 7.334 ha dedicadas al pistachero, Castilla-La Mancha es notablemente la región con la mayor superficie dedicada a este cultivo (5.266 ha), seguida de Andalucía (938 ha), Extremadura (373 ha), Cataluña (304 ha) y Castilla y León (302 ha) (MAPAMA, 2015).

En cuanto al consumo, los frutos secos se mantienen estables en volumen de ventas, situando el consumo medio per cápita en 2,95 kg por persona y año, aumentando un 1,9 % respecto a 2015, lo que representa el 1,41 % del gasto total realizado por los hogares en alimentación y bebidas para consumo doméstico (MAPAMA, 2016).

#### 1.1.4. IMPORTANCIA DE LOS RECURSOS HÍDRICOS EN LA AGRICULTURA

La tierra tiene tres cuartas partes cubiertas de agua, pero este bien es cada vez más escaso. El principal motivo es que casi toda esta agua es salada, solo un 2,5 % es de agua dulce y la mayor parte de esta se encuentra congelada en el hielo de Groenlandia y la Antártida, es subterránea o está contaminada, por lo que de toda el agua dulce solo disponemos de un 1 % para el consumo humano, la agricultura y la industria; este es un problema que se agrava con el cambio climático, el aumento de la población, el crecimiento de las ciudades, un alto nivel de consumo y una mala gestión del agua. Frente a esta situación, la agricultura debe limitar el uso del agua riego y buscar técnicas sostenibles como solución. El riego deficitario controlado (RDC) es una estrategia de riego que se basa en aplicar tan sólo una fracción de los requerimientos hídricos del cultivo durante determinados períodos del ciclo vegetativo, provocando mínimas pérdidas productivas pero incrementando la funcionalidad y calidad global de los productos. A este tipo de productos se les denomina hidroSostenibles o hidroSOS (Noguera-Artiaga *et al.*, 2016).

## 1.1.5. COMPOSICIÓN DEL PISTACHO Y BENEFICIOS

Los frutos secos se consideran una importante fuente energética, siendo los pistachos los de mayor valor nutricional, menor aporte calórico, mayor contenido en aminoácidos esenciales, tiamina, vitamina A, vitamina B6, fitosteroles, carotenoides y xantofilas (Bulló *et al.*, 2015; Couceiro *et al.*, 2013). Además, la ingesta crónica de frutos secos no promueve el aumento de peso (Ros, 2014).

Los valores nutritivos principales del pistacho se muestran en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Información nutricional de los pistachos por 100 g.

Componente	Valor	Unidad
<b>Energía total</b>	562	kcal
<b>Grasa Total</b>	45,32	g
A. G. saturados	5,907	g
A. G. monoinsaturados	23,357	g
A. G. poliinsaturados	14,380	g
<b>Hidratos de Carbono</b>	27,17	g
Azúcares	7,66	g
Fibra	10,6	g
<b>Proteínas</b>	20,16	g
<b>Agua</b>	4,37	g

Fuente: USDA (2016). A. G.: ácidos grasos

Además de los componentes mayoritarios, los pistachos tienen un contenido mineral en el que destaca la presencia de potasio (1025 mg/100 g), así como fósforo (490 mg/100 g), magnesio (121 mg/100 g) y calcio (105 mg/100 g); y un contenido vitamínico entre los que destaca la niacina (1.300 mg/100 g) y vitamina B6 (1.700 mg/100 g) (USDA, 2016).

El pistacho es una nuez nutritiva con un perfil de ácidos grasos saludables para el corazón, así como proteínas, fibra dietética, potasio, magnesio, vitamina K y  $\gamma$ -tocoferol. Su color verde y púrpura es el resultado de su contenido de luteína y

antocianina (Dreher, 2012). Estudios clínicos sugieren que los pistachos ayudan a mantener una actividad antioxidante y antiinflamatoria saludable, control glucémico y función endotelial, así como ayudar a controlar el peso corporal (Dreher, 2012).

La fibra de los frutos secos, al ser mayoritariamente insoluble, ayuda en la regulación del tránsito intestinal, favoreciendo la protección frente al cáncer de colon además de reducir el riesgo de desarrollo de diabetes (Couceiro *et al.*, 2013).

Los frutos secos no contienen colesterol al ser de origen vegetal, sin embargo, sí poseen otros esteroides que pueden reducir de forma significativa la concentración de colesterol total y del asociado a las lipoproteínas de baja densidad (LDL), además de poseer efectos positivos sobre la prevención de enfermedades cardiovasculares (Couceiro *et al.*, 2013). Holligan *et al.* (2014) encontraron que la inclusión de pistachos en una dieta saludable reduce favorablemente los niveles LDL y que esta reducción confería un beneficio adicional con respecto al riesgo de enfermedades cardiovasculares. Por el contrario, Ros (2014) expone que ensayos clínicos aleatorios demuestran que la ingesta de frutos secos sí que tiene un efecto reductor del colesterol, pero este es independiente de la dieta. Además, hay evidencias emergentes de efectos beneficiosos sobre la sensibilidad a la insulina, el estrés oxidativo, la inflamación y la reactividad vascular (Ros, 2014).

Los pistachos son una importante fuente de vitaminas, tales como la vitamina A, que ejerce una función antioxidante que actúa positivamente en la prevención de cardiopatías o la vitamina B1 (tiamina), cuya deficiencia puede provocar depresión, cansancio o pérdida de habilidades mentales. Además, participa en la absorción de glucosa por parte del sistema nervioso y ser necesaria para un óptimo sentido de la vista (Couceiro *et al.*, 2013).

## 1.2. FERMENTADOS DE LICUADOS VEGETALES

### 1.2.1. IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA

El procesado en la industria utilizado para elaborar productos vegetales fermentados a base de frutos secos y cereales se basa en cuatro pasos principales: (i) el

procedimiento para obtener el licuado vegetal; (ii) acondicionamiento del licuado hasta alcanzar la temperatura de crecimiento óptima; (iii) inoculación y fermentación; y (iv) enfriamiento a 4 °C (Bernat, 2013).

Asimismo, suelen agregarse aditivos, principalmente azúcares y prebióticos (como potenciadores del crecimiento), para favorecer el crecimiento de las bacterias y reducir el tiempo de fermentación. Mono y oligosacáridos, inulina,  $\beta$ -glucanos y fibras dietéticas han sido los potenciadores del crecimiento más comúnmente utilizados (Bernat, 2013). Sin embargo, otras veces se añaden ingredientes o aditivos para aumentar los beneficios del producto (prebióticos) o sus propiedades tecnológicas, ya que los principales problemas de estos productos están relacionados con la calidad sensorial (separación de fases, sinéresis y/o firmeza) y la resistencia de los microorganismos (Cruz *et al.*, 2009).

#### 1.2.2. IMPORTANCIA DE LOS LICUADOS VEGETALES PARA EL CONSUMIDOR

Actualmente, se observa un incremento de la demanda de alimentos saludables por parte de los consumidores. Un ejemplo de ello, es la tendencia al consumo de “bebidas vegetales” elaboradas a partir de frutos secos y cereales.

En 2016 se produjo un incremento en el consumo de este tipo de bebidas, ascendiendo de un valor en ventas de 165,9 millones de euros en 2015 a 190,1 millones de euros en 2016. Además, pese a que la leche de soja es la más conocida, el consumidor comienza a perder interés en ella sustituyéndola por otras como son la de avena, arroz o almendra, que mostraron crecimientos entorno al 30 %, 20 % y 50 %, respectivamente (ALIMARKET, 2016).

Esta pérdida de consumo se ha visto incrementada debido a los crecientes problemas ocasionados por las alergias a la soja. Sin embargo, pese a la amplia gama de formulaciones disponibles, las alternativas en el mercado a productos no lácteos siguen siendo ínfimas, excluyendo el mercado asiático. Pese a ello, el incremento de las alergias e intolerancias (lactosa), así como la demanda de productos más saludables (sin colesterol, bajo en calorías, etc.) están generando un acrecentamiento de la compra de este tipo de productos (Stone, 2011).

Además, las “bebidas vegetales” son una buena base para el crecimiento de microorganismos con propiedades probióticas, debido a la presencia de componentes no digeribles, poseedores de propiedades prebióticas, como la inulina, los  $\beta$ -glucanos o la fibra. De esta manera, el almidón y la fibra dietética mejoran la estabilidad física y promueven la supervivencia de los cultivos iniciadores en el tracto gastrointestinal. Asimismo, las relaciones entre estos productos y la prevención del cáncer, la aterosclerosis o las enfermedades inflamatorias se están comenzando a estudiar, dado que son una excelente fuente de antioxidantes (Bernat, 2013).



2

OBJETIVOS





El principal objetivo del presente trabajo fue evaluar la aptitud de pistachos de la variedad Kerman sobre portainjerto *P. atlántica* procedentes de riego convencional y deficitario (hidroSOS) para la obtención de bebidas fermentadas. Para ello, se ensayaron dos cultivos iniciadores comerciales (yogur y mantequilla) sobre licuado de pistacho y se evaluaron en las bebidas fermentadas los siguientes parámetros:

- Poblaciones microbianas e indicadores de la fermentación.
- Propiedades organolépticas.
- Perfil de ácidos grasos totales.
- Perfil de compuestos volátiles.



3

## MATERIALES Y MÉTODOS

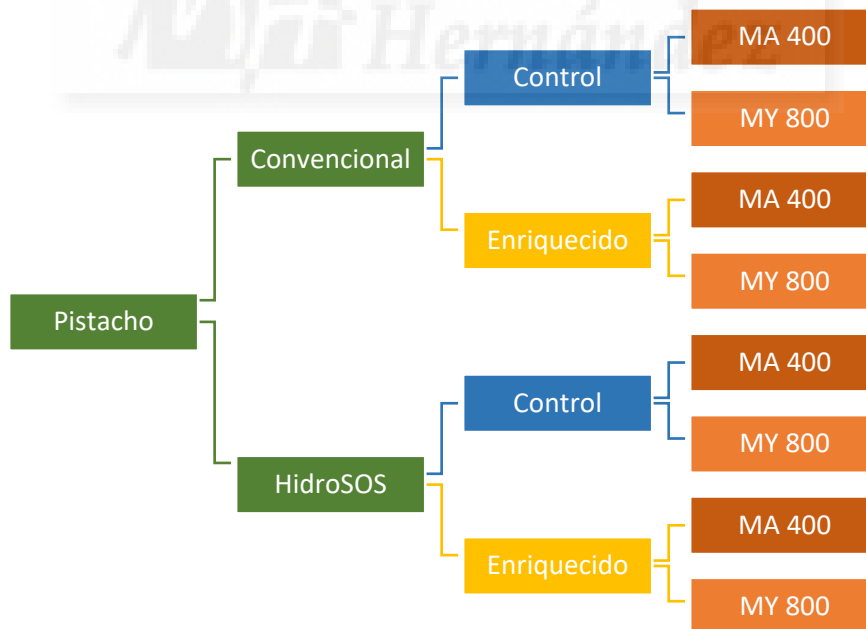
UNIVERSITAS

Miguel  
Hernández

### 3.1. PLAN DE TRABAJO

En el presente Trabajo Fin de Máster se elaboró licuado de pistacho, que posteriormente fue fermentado mediante los cultivos iniciadores comerciales de leches fermentadas (MY800) y un cultivo artesanal de mesófilos comúnmente utilizado para la elaboración de mantequilla (MA400).

Para la elaboración del licuado de pistacho se utilizó la variedad de pistacho Kerman sobre *P. atlantica*, obtenida de fincas en riego convencional y otras obtenidas en condiciones de riego deficitario (hidroSOS). Una vez obtenido el licuado de pistacho se llevaron a cabo dos ensayos: a) control: no adición de glucosa y fructosa, y b) enriquecido: adición de glucosa y fructosa al 0,75 %, siguiendo el método descrito por Bernat *et al.* (2015a). Los licuados fermentados se analizaron a tiempo 1, 15 y 30 días de almacenamiento en refrigeración. Se consideró como fin del almacenamiento los 30 días por su proximidad a los 28 establecidos para la vida útil comercial de las leches fermentadas comerciales.



**Figura 2.** Plan de trabajo con variables: tipo de pistacho (función del riego), formulación del licuado y cultivo iniciador.

Los códigos empleados durante el desarrollo del estudio, y, por lo tanto, los tipos de licuados fermentados fueron:

- CNMA400: Riego convencional fermentado con MA400 sin adición de glucosa y fructosa.
- CNMY800: Riego convencional fermentado con MY800 sin adición de glucosa y fructosa.
- CEMA400: Riego convencional fermentado con MA400 con adición de glucosa y fructosa al 0,75 %.
- CEMY800: Riego convencional fermentado con MY800 con adición de glucosa y fructosa al 0,75 %.
- HNMA400: Riego deficitario controlado fermentado con MA400 sin adición de glucosa y fructosa.
- HNMY800: Riego deficitario controlado fermentado con MY800 sin adición de glucosa y fructosa.
- HEMA400: Riego deficitario controlado fermentado con MA400 con adición de glucosa y fructosa al 0,75 %.
- HEMY800: Riego deficitario controlado fermentado con MY800 con adición de glucosa y fructosa al 0,75 %.

Se analizó la composición de los licuados originales sin fermentar (materia seca, grasa, proteína, cenizas y azúcares). Se realizaron determinaciones de pH, acidez y recuentos microbianos durante su almacenamiento en refrigeración (4 °C) a tiempo 1, 15 y 30 días. Se analizaron perfil de compuestos volátiles y ácidos grasos totales a las 48 horas post-fermentación y a los 30 días de almacenamiento.

### 3.1.1. MATERIAL VEGETAL

Los pistachos empleados para la realización de este estudio son de la variedad Kerman sobre el portainjertos *P. atlántica*, cosechados en 2016 en la finca experimental “La Entresierra”, Ciudad Real (España), (3°56' W, 39° N; altitud sobre el nivel del mar de 640 m). Esta zona tiene un clima tipo mediterráneo, con una precipitación media anual de 397 mm, y su suelo tiene un horizonte petrocálcico discontinuo localizado a 0,50 m

(*Petrocalcic Palexeralf*), con un pH alcalino ( $\text{pH} = 8,1$ ), baja conductividad eléctrica ( $0,2 \text{ dS/m}$ ), un  $1,05 \%$  de materia orgánica,  $0,12 \%$  de nitrógeno y una capacidad de intercambio catiónico de  $0,186 \text{ mol/kg}$ .

Se realizó el experimento mediante un diseño factorial, con dos repeticiones para cada uno de los tratamientos, en las que se evaluó un tratamiento de riego deficitario controlado (muestras hidroSOS) y una muestra control (riego convencional). Los árboles de la muestra control se regaron hasta asegurar unas condiciones hídricas no limitantes en el suelo ( $100 \%$  ETC de la semana anterior). Este valor se obtuvo según el coeficiente de evapotranspiración de referencia (ET<sub>o</sub>), calculado mediante la ecuación de Penman-Monteith (Allen *et al.*, 1998) y un factor corrector en base a la época del año (Goldhamer, 1995). Además se obtuvo el valor del potencial hídrico del tallo a medio día ( $\Psi_{\text{tallo}}$ ) y el balance hídrico del suelo para modificar el valor de ETC, a fin de asegurar que no se producía estrés hídrico. En el caso de los árboles con tratamiento de riego deficitario controlado se suprimió el riego durante la fase II de su cultivo hasta que los árboles alcanzaron, y mantuvieron, un  $\Psi_{\text{tallo}}$  por debajo de  $-1,5 \text{ MPa}$ .

Tras la recolección de los pistachos, se envasaron y fueron enviados a Orihuela, donde se conservaron en refrigeración. Previamente a su utilización, los pistachos fueron pelados y envasados al vacío durante un período no superior a una semana (**Figura 3**).



**Figura 3.** Envasado al vacío de los pistachos pelados.

### 3.1.2. PREPARACIÓN DEL LICUADO DE PISTACHO Y LOS FERMENTADOS

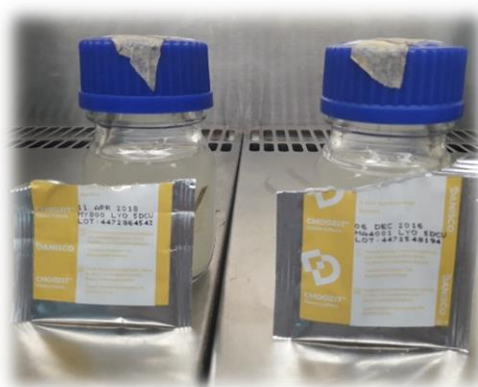
El licuado de pistacho se elaboró siguiendo el método descrito por Shakerardekani *et al.* (2013) con algunas modificaciones: en primer lugar, 400 g de pistachos pelados se remojaron en agua destilada a temperatura ambiente ( $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 4 horas. Los granos se molieron en una pasta que se mezcló con agua caliente ( $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) en una proporción de 1:5 (pasta:agua) utilizando un mezclador (Thermomix™) durante 30 min para producir el licuado de pistacho. El licuado de pistacho fue filtrado en gasa y posteriormente, se pasteurizó a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 min y se almacenó a temperatura de refrigeración ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) hasta su análisis. En el caso de los licuados fermentados, la adición de la glucosa y la fructosa al 0,75 % se realizó previamente a la pasterización.

Finalmente, fue analizada su composición: proteína cruda y contenido en grasa mediante Kjeldahl y extracción con disolventes según Romeu-Nadal *et al.* (2004), respectivamente, así como materia seca, cenizas y sólidos solubles totales ( $^{\circ}\text{Brix}$ ).

Una vez pasterizado el licuado, se inoculó siguiendo las instrucciones del fabricante del cultivo, se distribuyó en duquesitas estériles de capacidad de 60 mL debidamente etiquetadas y se llevaron a incubación en estufa a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  para MA400 y  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  para MY800 hasta pH 4,8.

### 3.1.3. CULTIVOS INICIADORES

Los cultivos iniciadores empleados para el estudio fueron: MA400 y MY800, ambos de Danisco (Sassenage, Francia). Estos cultivos se encontraban liofilizados y en refrigeración ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante un período inferior a 18 meses desde la fecha de producción. Para dosificarlos, según indicaciones del fabricante, se suspendió cada sobre en agua de peptona estéril al 0,1 % que se dosificó a los licuados (**Figura 4**).



**Figura 4.** Suspensión de los cultivos iniciadores liofilizados sobre agua de peptona estéril.

El cultivo MA400 está compuesto por: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diaceylactis*, *Streptococcus thermophilus*.

El cultivo MY800 está compuesto por: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

#### 3.1.4. COMPOSICIÓN DEL LICUADO ORIGINAL

##### 3.1.4.1. MATERIA SECA, CENIZAS Y AZÚCARES

La determinación de materia seca se llevó a cabo empleando un crisol, previamente pesado ( $P_0$ ). Al crisol, se le añadieron 3 mL de muestra ( $P_1$ ) que fueron sometidos a 100 °C para su evaporación hasta alcanzar un peso constante ( $P_2$ ). La materia seca se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Materia Seca} = \frac{(P_2 - P_0)}{(P_1 - P_0)} \times 100$$

Una vez obtenida la materia seca, los crisoles se llevaron a una mufla y mediante rampas de temperatura, se alcanzaron 550 °C. Una vez conseguida la temperatura, se mantuvieron en el interior de la mufla los crisoles durante 4 h. Se dejó enfriar la mufla hasta 200 °C antes de su apertura y se colocaron los crisoles en la estufa a 100 °C durante 1 h. Finalmente, se llevaron a un desecador hasta que alcanzaron temperatura ambiente y se pesaron ( $P_3$ ) (**Figuras 5 y 6**). Las cenizas se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(P_3 - P_0)}{(P_1 - P_0)} \times 100$$



Figura 5. Mufla



Figura 6. Desecador

Los sólidos solubles presentes en la muestra se midieron utilizando un refractómetro Hanna Instruments HI 96811 (Figura 7). Para realizar la medida fue necesario diluir la muestra con agua destilada (1:6).



Figura 7. Refractómetro modelo HI 96811.

#### 3.1.4.2. PROTEÍNA CRUDA (KJELDAHL)

Para determinar la proteína de los licuados de pistacho se empleó el método Kjeldahl. Antes de realizar los análisis se hizo una digestión de la muestras. Para ello, se pesó 1 g de muestra en tubos de digestión y seguidamente se le adicionaron 2 pastillas catalizadoras y 20 mL de ácido sulfúrico. Tras una hora de digestión se analizaron las muestras mediante un analizador Kjeltec™ 8400 (Figura 8) y los resultados se expresaron en tanto por ciento.





Figura 8. Kjeltec™ 8400.

#### 3.1.4.3. CONTENIDO EN GRASA

El contenido en grasa se analizó mediante una extracción con disolventes según Romeu-Nadal *et al.* (2004). Para ello, se tomaron 3 mL de muestra, se mezclaron con 5 mL de diclorometano en metanol (2:1) y se agitaron durante 1 min. A continuación, se centrifugaron a 3500 rpm durante 8 min a 4 °C. Posteriormente, eliminamos la capa acuosa superior y añadimos 3 mL de diclorometano en metanol (2:1). Agitamos durante 1 min y centrifugamos durante 6 min a 3500 rpm. Así, obtenemos un precipitado y una fase orgánica inferior que recuperamos (grasa extraída en diclorometano). Esta fase orgánica la llevamos a evaporación con N<sub>2</sub> en un tubo previamente tarado, obteniendo de este modo el peso de la materia grasa. Además del método descrito anteriormente, se analizó la grasa mediante el método Gerber de la leche.

### 3.1.5. DETERMINACIÓN DEL COLOR

Durante la fermentación del licuado se evaluó el color CIEL\*a\*b\* mediante un colorímetro Minolta CRC200 (Minolta Camera Co. Osaka, Japan) con aplique para la medición de líquidos CR-A70 (Minolta Camera Co. Osaka, Japan), usando un iluminante D65 y un observador de 10 °. Los resultados se expresaron de acuerdo a las coordenadas L\* (luminosidad), a\*(rojo-verde), b\*(azul-amarillo), C\*(Croma,  $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ ) y Hue (tono,  $\text{Hue} = \arctg(b^*/a^*)$ ).

Para ello, se agitaron previamente los licuados fermentados, con el fin de homogeneizar la muestra, y se introdujeron en un tubo de vidrio de baja reflectancia para su medición. Las medidas se realizaron por triplicado a tiempo 1, 15 y 30 días.

### 3.1.6. DETERMINACIÓN DEL pH Y LA ACIDEZ

Para la determinación del pH se utilizó un pH-metro modelo Crison pH-Matic 23 (Figura 9). En el caso de la acidez se realizó una valoración con NaOH (0,5 N). Para ello, se diluyeron 5 mL de muestra en 25 mL de agua destilada, y los resultados se expresaron como porcentaje de ácido fumárico.

Se realizaron las medidas por triplicado a tiempo 1, 15 y 30 días.

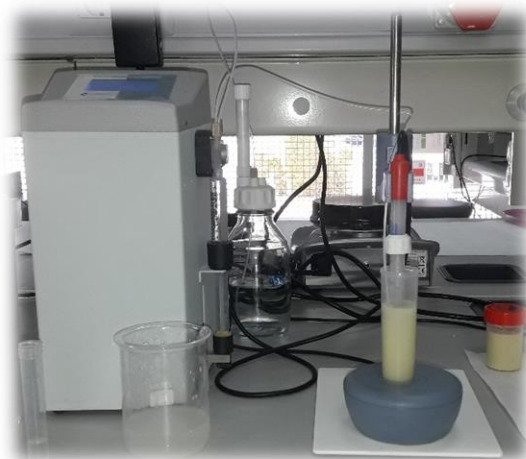


Figura 9. pH-metro modelo Crison pH-Matic 23.

### 3.1.7. RECUENTO MICROBIOLÓGICO

Con el fin de estudiar la supervivencia de las bacterias lácticas durante la fermentación del licuado se evaluó su crecimiento a tiempo 1, 15 y 30 días para cada uno de los cultivos inoculados. La prueba se realizó por duplicado.

En cada muestreo sembramos en placas Petri estériles con MRS (de Man Rogosa Sharpe caldo, Oxoid) para recuento tentativo de lactobacilos y M17 agar para el recuento de lactococcos y estreptococos.

El procedimiento del recuento microbiológico es el siguiente:

- Preparación de las diluciones: la preparación de las diluciones se realizó empleando como diluyente agua de peptona, previamente autoclavada y mantenida en refrigeración hasta la realización de las diluciones.
- Preparación de los medios de cultivo: los medios de cultivo empleados para los microorganismos seleccionados en el estudio fueron MRS y el M17 agar, que se elaboraron siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.
- Inoculación de las bacterias lácticas y recuento microbiológico:
  - o Primero, se agitó el licuado fermentado para conseguir uniformidad en el muestreo y mediante una pipeta se tomó 1 mL que se llevó a un tubo con 9 mL de agua de peptona (dilución  $10^{-1}$ ).
  - o A continuación, se agitó el tubo de la dilución  $10^{-1}$  y se pipeteó 0,1 mL del contenido del mismo, que fue pasado a otro tubo con 9,9 mL de agua de peptona, consiguiendo la dilución  $10^{-3}$ . Seguidamente, para conseguir la dilución  $10^{-5}$  se repitió el proceso llevado a cabo para la dilución  $10^{-3}$ .
  - o Después, las diluciones  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  se obtuvieron llevando 1 mL de la dilución  $10^{-5}$  a un tubo de 9 mL de agua de peptona y 1 mL de este a otro tubo similar.

- Finalmente, se sembró en placas Petri estériles 1 mL de cada dilución ( $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ ) y se añadió el medio de cultivo.

Los recuentos en M17 se realizaron tras 24 horas de incubación a 30 y 37 °C. Los recuentos en MRS se realizaron tras 48 horas de incubación a 42 y 37 °C, en función del cultivo MY800 y MA400 respectivamente (**Figura 10**).



**Figura 10.** Incubación en estufa a 37 °C.

### 3.1.8. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS TOTALES

Para la extracción de los ácidos grasos presentes en las muestras se empleó el método descrito por (Romeu-Nadal *et al.*, 2004) con ligeras modificaciones. Se tomó aproximadamente 3 mL de muestra, se mezcló con 5 mL de diclorometano en metanol (2:1), 360  $\mu$ L de un ácido graso de concentración conocida (C:17) y se agitó durante 1 min. A continuación, se centrifugó durante 8 min a 3500 rpm a 4 °C. Posteriormente, eliminamos la capa acuosa superior y añadimos 3 mL de diclorometano en metanol (2:1). Agitamos durante 1 min y centrifugamos durante 6 min a 3500 rpm. Finalmente, obtenemos un precipitado y una fase orgánica inferior que recuperamos (grasa extraída en diclorometano).

La determinación de ácidos grasos requiere la preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME) y su posterior análisis mediante cromatografía de gases. Para ello se empleó el método descrito por Trigueros and Sendra (2015) con algunas modificaciones. Se tomaron 100  $\mu$ L de la fase orgánica y se saponificaron con 1 mL de

disolución metanólica de NaOH (0,5 M) a 90 °C durante 10 min. A continuación, se dejó enfriar en hielo hasta temperatura ambiente, se añadió 1 mL de trifluoruro de boro (14 %) en metanol y se dejó a temperatura ambiente (25 °C) durante 30 min. Seguidamente, añadimos 1 mL de agua destilada, 600 µL de hexano y centrifugamos a 3000 rpm durante 5 min. Los esteres metílicos de ácidos grasos se extrajeron y se llevaron a un tubo con sodio sulfato anhidrido, donde permanecieron durante 5 min. La fase orgánica se separó y se analizó mediante GC-FID en un cromatógrafo de gases, Shimadzu GC-17A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón), acoplado con un detector FID, DB-23 de Agilent, de 30 m de longitud × 0,25 mm de diámetro interno × 0,25 mm de espesor de la película de adsorción (100 % polietilenglicol) (**Figura 11**).



**Figura 11.** Cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17A con GC-FID.

Los análisis se llevaron a cabo utilizando helio como gas portador a un caudal de 1,1 mL/min, inyección en splitless. El inyector y el detector se sometieron a unas temperaturas de 230 y 240 °C respectivamente y se siguió el siguiente programa de funcionamiento: (i) temperatura inicial de 50 °C, (ii) rampa de temperatura de 5 °C/min hasta 230 °C, (iii) mantenimiento a 230 °C durante 10 min.

### 3.1.9. PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES

Para la extracción de compuestos volátiles se utilizó una fibra SPME 50/30 mm DVB/CAR/PDMS (Supelco), cuyo tiempo de exposición fue de 50 min a una temperatura de 40 °C y con agitación constante. El tiempo de desorción en el inyector fue de 3 min a una temperatura de 230 °C.

Los compuestos volátiles se analizaron e identificaron usando un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17A acoplado a un espectrómetro de masas Shimadzu QP-5050A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) (**Figura 12**). El sistema GC-MS consistió en una columna Restek Rxi-1301 MS (fused silica) 30 m x 0,25 mm, espesor de película de 1 µm. El gas portador utilizado para realizar el análisis fue helio, a una velocidad de flujo de columna de 0,6 mL min<sup>-1</sup> y un flujo total de 4 mL min<sup>-1</sup> en una relación de división de 1:5. El programa del horno fue el siguiente: (a) 80 °C durante 0 min; (b) aumento de 3 °C min<sup>-1</sup> de 80 °C a 210 °C, y mantener durante 1 min; (c) un aumento de 25 °C min<sup>-1</sup> de 210 °C a 300 °C, y se mantiene durante 3 min. La temperatura del detector fue de 300 °C.

Se utilizaron tres protocolos para identificar los compuestos volátiles: (1) índices de retención y su correlación con los de la literatura; (2) tiempos de retención de compuestos químicos puros; (3) espectros de masas de compuestos químicos auténticos y de la biblioteca espectral de la base de datos del *National Institute of Standards and Technology*. En este estudio sólo se han descrito compuestos completamente identificados. El análisis de la composición volátil se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como concentración de cada uno de los compuestos volátiles así como de la concentración de las principales familias químicas de compuestos.



**Figura 12.** Cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17A con espectrómetro de masas Shimadzu QP-5050A.

### 3.1.10. ANÁLISIS SENSORIAL

Se realizó un estudio descriptivo en el que participaron 6 panelistas entrenados (3 mujeres y 3 hombres, de edades comprendidas entre los 20 y los 50 años) miembros del Departamento Tecnología Agroalimentaria (Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante, España). Este panel tiene más de 600 horas de experiencia en este tipo de pruebas, con diferentes tipos de alimentos.

Se sirvió a cada panelista un volumen aproximado de 30 mL de muestra en envases desechables de plástico (50 mL de volumen total) y libres de olor. Todas las muestras se sirvieron a una temperatura de 4 °C y se codificaron utilizando códigos de 3 dígitos. Entre cada una de las muestras se puso a la disposición de los panelistas agua osmotizada y galletas sin sal, para limpiar el paladar. La sala de pruebas disponía de una combinación de luz natural y luz no natural (fluorescente), y se fijó una temperatura de 24 °C.

Para la evaluación de las muestras (8 muestras en total) se realizaron tres sesiones de 1 hora cada una. Todas las muestras fueron evaluadas en cada sesión, por lo tanto, cada una de ellas se evaluó por triplicado. Previamente, se llevó a cabo una sesión extra para desarrollar el léxico a emplear en el estudio, acordando evaluar los siguientes atributos: olor a mantequilla, olor a fruto seco, olor a pistacho, dulzor, acidez, umami, sabor a mantequilla, sabor a fruto seco, sabor a pistacho y post-gusto.

El panel utilizó una escala numérica para cuantificar la intensidad de los atributos estudiados, donde 0 representa una intensidad extremadamente baja, y 10 representa extremadamente intenso, con incrementos de 0,5 unidades.

#### 3.1.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de los análisis realizados fueron procesados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey, con un intervalo de confianza del 95 %. Se utilizó el software SPSS Statistics versión 23. La diferencia significativa fue definida como  $p < 0,05$ .



# 4

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



#### 4.1. COMPOSICIÓN DEL LICUADO ORIGINAL

Los resultados obtenidos de la composición del licuado (materia seca, cenizas, SST, proteínas y grasa) fueron los mostrados en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Composición del licuado de pistacho original

Factor	SST (°Brix)	Proteínas (%)	Grasa Gerber (%)	Grasa Solventes (%)	Materia Seca (%)	Cenizas (%)
Test ANOVA <sup>†</sup>						
Riego	NS	NS	**	*	NS	NS
Test de rangos múltiples (Tukey) <sup>‡</sup>						
HidroSOS	1,80	1,66	1,63 b	2,50 b	5,44	0,24
Convencional	3,00	1,64	3,33 a	6,50 a	6,91	0,25

<sup>†</sup> NS, no significativo ( $p \geq 0,05$ ). \* y \*\* diferencias significativas  $p \leq 0,05$  y  $0,01$  respectivamente. <sup>‡</sup> Valores seguidos por letras distintas, dentro de la misma columna, denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Como podemos apreciar (**Tabla 2**), solamente existieron diferencias significativas entre los pistachos con riego convencional y aquellos que han sufrido un déficit hídrico (HidroSOS) con respecto al contenido en grasa, siendo el más bajo el hidroSOS. El contenido en grasa determinado por el método Gerber de leche, presentó unas diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ) mayores al método por solventes ( $p \leq 0,05$ ). Sin embargo, ninguno de los dos métodos para cuantificar la grasa de las muestras ha sido fiable y se deberían ensayar otros métodos en futuros estudios. Se utilizaron dos métodos validados para leche y productos lácteos, el método Gerber funcionó correctamente en algunas réplicas (separación limpia y definida de la capa grasa), pero debido a la presencia de partículas en suspensión en ocasiones obturaba el butirómetro y no se podía hacer la lectura o la repetibilidad era baja. Respecto al método con solventes se siguió el protocolo de leche en el que la muestra es de 3 gramos, e igual que en el caso anterior la presencia de partículas o su irregular distribución han llevado a una sobre estimación de los resultados (el contenido graso determinado en un grupo de muestras equivalía al contenido en materia seca). En el futuro se debería realizar extracción con disolventes a partir de un mayor volumen de muestra.

A diferencia de lo que ocurre con el licuado de pistacho obtenido por Shakerardekani *et al.* (2013), los valores obtenidos en las determinaciones realizadas en el caso de

proteínas, grasa y materia seca representaron el 50 %, mientras que los valores de SST concordaron con sus resultados. Por el contrario, los valores de proteínas, grasa, cenizas y SST obtenidos por Bernat *et al.* (2015b) para leche de avena fueron inferiores a nuestros resultados, a excepción de la materia seca que fue aproximadamente similar.

Estos resultados pueden deberse a que la mezcla contenía un importante número de partículas gruesas que impidieron la extracción eficiente de las proteínas y grasas (Shakerardekani *et al.*, 2013), por lo que cabe pensar que al emplear en estudios próximos otro tipo de molinos aumentará la extracción de materia seca.

#### 4.2. pH Y ACIDEZ

Tal y como se muestra en la **Tabla 3**, el pH de las muestras presentó diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en relación con el factor formulación, donde los valores más bajos de pH se observaron en los licuados enriquecidos. Esto es debido a que los *Lactococcus lactis* del cultivo MA400 crecen mejor ante la presencia de determinados azúcares como son la glucosa y la fructosa (Passerini *et al.*, 2013). El pH obtenido durante la fermentación fue ligeramente menor al pH conseguido en leches de almendra (Bernat *et al.*, 2015a), pero levemente superior al que se muestra en leches de avena o de avellana (Bernat *et al.*, 2014; Bernat *et al.*, 2015b).

**Tabla 3.** pH y acidez (% ácido fumárico) de los licuados fermentados de pistacho obtenidos mediante el cultivo iniciador MA400.

Factor	pH	Acidez (% ácido fumárico)
Test ANOVA <sup>†</sup>		
Riego	NS	NS
Formulación	*	NS
Tiempo	NS	NS
Test de rangos múltiples (Tukey) <sup>‡</sup>		
<b>Riego</b>		
HidroSOS	4,214	3,472
Convencional	4,265	3,777
<b>Formulación</b>		
Control	4,323 a	3,448
Enriquecido	4,157 b	3,801

Tiempo		
1	4,239	3,492
15	4,228	4,073
30	4,253	3,309

† NS, no significativo ( $p \geq 0,05$ ), \* diferencias significativas  $p \leq 0,05$ . ‡ Valores seguidos por letras distintas, dentro de la misma columna y el mismo factor, denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Del mismo modo que ocurrió con los licuados fermentados con MA400, aquellos que fueron fermentados con el cultivo iniciador MY800 igualmente presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ) con respecto al factor formulación, pero además, su pH también se vio influenciado por el tiempo (**Tabla 4**). Como podemos apreciar, con forme avanza el tiempo, el pH descendió por la acción de los microorganismos, obteniendo a día 30, valores muy próximos a los que presentan los licuados fermentados con MA400. Asimismo, el pH final se mostró sutilmente superior al obtenido en otro tipo de licuados vegetales como son las leches de avena o de avellana (Bernat *et al.*, 2014; Bernat *et al.*, 2015b).

**Tabla 4.** pH y acidez (% ácido fumárico) de los licuados fermentados de pistacho obtenidos mediante el cultivo iniciador MY800.

Factor	pH	Acidez (% ácido fumárico)
Test ANOVA <sup>†</sup>		
Riego	NS	NS
Formulación	**	NS
Tiempo	**	NS
Test de rangos múltiples (Tukey) <sup>‡</sup>		
<b>Riego</b>		
HidroSOS	4,434	3,387
Convencional	4,450	3,440
<b>Formulación</b>		
Control	4,503 a	3,074
Enriquecido	4,382 b	3,753
<b>Tiempo</b>		
1	4,579 a	3,140
15	4,421 b	3,695
30	4,326 b	3,406

† NS, no significativo ( $p \geq 0,05$ ), \*\* diferencias significativas  $p \leq 0,01$ . ‡ Valores seguidos por letras distintas, dentro de la misma columna y el mismo factor, denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Con respecto a la acidez, tanto en los licuados fermentados con MA400 como con MY800, los valores obtenidos fueron mucho menores a los que tiene un yogur estándar (8-10 g/L de ácido láctico), seguramente debido a que el contenido de proteínas del licuado de pistacho es menor que el de la leche de vaca y también su capacidad tamponante (Bernat *et al.*, 2014, 2015a; Bernat *et al.*, 2015b).

#### 4.3. RECUENTOS MICROBIANOS

Los recuentos microbianos para el cultivo iniciador MA400, se vieron afectados significativamente por el tiempo de fermentación y por el tipo de formulación (**Tabla 5**). Como se ha mencionado anteriormente, *L. lactis* crece mejor en presencia de glucosa y fructosa (Passerini *et al.*, 2013), de modo que cabría esperar que crecieran mejor en la formulación enriquecida. Sin embargo, en este caso, tanto para el medio de cultivo MRS como para el medio M17, los licuados enriquecidos fueron los que presentaron los recuentos microbianos menores. Los microorganismos presentes mostraron un descenso de su población conforme avanzaron los días de fermentación.

**Tabla 5.** Recuento microbiano (Log UFC/g) de los licuados fermentados de pistacho obtenidos mediante el cultivo iniciador MA400.

Factor	UFC/g M17	UFC/g MRS
Test ANOVA <sup>†</sup>		
Riego	NS	NS
Formulación	***	***
Tiempo	***	***
Test de rangos múltiples (Tukey) <sup>‡</sup>		
<b>Riego</b>		
HidroSOS	8,200	8,034
Convencional	8,199	8,023
<b>Formulación</b>		
Control	8,336 a	8,217 a
Enriquecido	8,063 b	7,841 b
<b>Tiempo</b>		
1	8,418 a	8,377 a
15	8,342 a	8,255 a
30	7,894 b	7,541 b

<sup>†</sup> NS, no significativo ( $p \geq 0,05$ ), \*\*\* diferencias significativas  $p \leq 0,001$ . <sup>‡</sup> Valores seguidos por letras distintas, dentro de la misma columna y el mismo factor, denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

A diferencia de los licuados fermentados con M400, los fermentados con MY800 solo presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al tiempo en el medio de cultivo M17 (**Tabla 6**). Los valores más altos de recuentos se observaron a tiempo 1 y 30 días, lo que podría suponer un error durante la siembra de los mismos a día 15, ya sea por un medio de cultivo deficiente o una inoculación menor a la debida.

**Tabla 6.** Recuento microbiano (Log UFC/g) de los licuados fermentados de pistacho obtenidos mediante el cultivo iniciador MY800.

Factor	UFC/g M17	UFC/g MRS
Test ANOVA <sup>†</sup>		
Riego	NS	NS
Formulación	NS	NS
Tiempo	*	NS
Test de rangos múltiples (Tukey) <sup>‡</sup>		
<b>Riego</b>		
HidroSOS	7,976	7,713
Convencional	7,899	7,589
<b>Formulación</b>		
Control	7,887	7,572
Enriquecido	7,988	7,730
<b>Tiempo</b>		
1	7,931 ab	7,687
15	7,819 b	7,646
30	8,061 a	7,629

<sup>†</sup> NS, no significativo ( $p \geq 0,05$ ), \* diferencias significativas  $p \leq 0,05$ . <sup>‡</sup> Valores seguidos por letras distintas, dentro de la misma columna y el mismo factor, denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Finalmente, cabe destacar que el licuado de pistacho fue un excelente medio para el desarrollo de bacterias lácticas, al alcanzar recuentos equiparables a los que se alcanzarían en leche. Todos los recuentos microbianos se encontraron por encima de  $10^7$  UFC/g, que es la cantidad mínima recomendada para asegurar efectos sobre la salud (Bernat *et al.*, 2014). Asimismo, Sendra *et al.* (2008) observaron que la presencia de fibra favorece el desarrollo de microorganismos, revelando que las leches fermentadas enriquecidas con fibra de cítricos son buenos vehículos para incorporar bacterias probióticas.

4.4. COLOR

En la **Tabla 7** podemos observar los resultados obtenidos tras la realización del análisis de color de las muestras de licuado de pistacho fermentadas con el cultivo iniciador MA400, para cada uno de los factores estudiados. La diferencia de formulaciones (enriquecida y normal), el riego (convencional e hidroSOS) y el tiempo, no afectaron significativamente a ninguno de los parámetros: la luminosidad ( $L^*$ ), el parámetro  $a^*$  (verde-rojo), el parámetro  $b^*$  (azul-amarillo), el croma ( $C^*$ ) y el tono (Hue).

**Tabla 7.** Estudio del color (CIELAB) de los licuados fermentados de pistacho obtenidos mediante el cultivo iniciador MA400.

Factor	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*$	Hue
Test ANOVA <sup>†</sup>					
Riego	NS	NS	NS	NS	NS
Formulación	NS	NS	NS	NS	NS
Tiempo	NS	NS	NS	NS	NS
Test de rangos múltiples (Tukey) <sup>‡</sup>					
<b>Riego</b>					
HidroSOS	36,60	-1,06	9,94	10,01	84,23
Convencional	36,48	-1,37	10,71	10,80	82,79
<b>Formulación</b>					
Control	36,62	-1,26	10,42	10,50	83,30
Enriquecido	36,46	-1,17	10,23	10,30	83,72
<b>Tiempo</b>					
1	35,93	-0,94	9,78	9,82	84,58
15	35,74	-1,03	9,41	9,47	83,86
30	37,65	-1,54	11,51	11,62	82,63

<sup>†</sup> NS, no significativo ( $p \geq 0,05$ ). <sup>‡</sup> Valores seguidos por letras distintas, dentro de la misma columna y el mismo factor, denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Esta misma situación se observó en los licuados fermentados por MY800 (**Tabla 8**). Los resultados obtenidos se asemejaron en casi todos los parámetros a los obtenidos por Bernat *et al.* (2015b) en leche de avena fermentada, siendo estos ligeramente superiores, a excepción de la luminosidad, en la que obtuvieron aproximadamente el doble. En general, cuanto más altos son los valores de luminosidad y menor es el croma, mayor es la opacidad, que está relacionada con el nivel de agregación de las partículas (Bernat *et al.*, 2015a). Y, aunque a tiempo 30 se observaron los valores más

altos de  $L^*$ , diferencias inferiores a tres unidades son imperceptibles para el ojo humano (Galindo *et al.*, 2015). Por otro lado, valores cercanos a -6 en la coordenada verde-rojo son típicos del color verde de los pistachos, por lo que en este caso, los licuados fermentados no presentaron una tonalidad verde intensa como los pistachos pero sí conservan cierto color característico de este fruto seco.

**Tabla 8.** Estudio del color (CIELAB) de los licuados fermentados de pistacho obtenidos mediante el cultivo iniciador MY800.

Factor	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*$	Hue
Test ANOVA <sup>†</sup>					
Riego	NS	NS	NS	NS	NS
Formulación	NS	NS	NS	NS	NS
Tiempo	NS	NS	NS	NS	NS
Test de rangos múltiples (Tukey) <sup>‡</sup>					
<b>Riego</b>					
HidroSOS	36,27	-0,91	9,40	9,45	84,81
Convencional	36,11	-1,14	10,37	10,44	83,85
<b>Formulación</b>					
Control	36,25	-1,07	9,94	10,00	84,11
Enriquecido	36,12	-0,98	9,83	9,89	84,56
<b>Tiempo</b>					
1	35,44	-0,85	9,54	9,58	84,96
15	35,39	-0,76	8,76	8,79	85,14
30	37,37	-1,38	11,19	11,28	83,21

<sup>†</sup> NS, no significativo ( $p \geq 0,05$ ). <sup>‡</sup> Valores seguidos por letras distintas, dentro de la misma columna y el mismo factor, denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5. ÁCIDOS GRASOS TOTALES

Los resultados obtenidos del contenido total de ácidos grasos de los licuados de pistacho sometidos a estudio, tanto los fermentados como los originales, vienen recogidos en las **Tablas 9, 10, 11 y 12**. En ellas podemos observar los 12 ácidos grasos distintos que se identificaron para cada una de las muestras, de los que cinco de ellos eran saturados: ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido araquídico (C20:0) y ácido behénico (C22:0); cinco eran monoinsaturados: ácido palmitoleico (C16:1) *cis*- y *trans*-, ácido oleico (C18:1) *cis*- y



*trans*-, y ácido eicosenoico (C20:1); y dos de ellos eran poliinsaturados: ácido linoleico (C18:2) y ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3).

La caracterización de los ácidos grasos del licuado de pistacho sin fermentar, se observan en la **Tabla 9**.

**Tabla 9.** Estudio de los ácidos grasos totales de los licuados originales de pistacho (sin fermentar) obtenidos a tiempo 1 día.

Ácidos grasos	Contenido (% área)				Contenido (mg/100 mL)			
	CN	CE	HN	HE	CN	CE	HE	HN
<b>C14:0</b>	0,235	0,262	0,849	1,266	6,66	8,06	15,65	23,41
<b>C16:0</b>	13,629	13,514	14,336	14,708	386	415	264	272
<b>C16:1n7c</b>	0,154	0,197	0,178	0,170	4,36	6,04	3,29	3,14
<b>C16:1n9c</b>	1,693	1,651	1,712	1,652	47,98	50,75	31,56	30,55
<b>C18:0</b>	1,916	1,875	2,574	2,856	54,31	57,61	47,44	52,81
<b>C18:1n9c</b>	46,004	45,061	44,499	43,272	1304	1385	820	800
<b>C18:1n11t</b>	2,737	3,398	3,195	4,534	77,57	104	58,90	83,85
<b>C18:2</b>	30,364	29,993	28,501	28,180	861	922	525	521
<b>C18:3</b>	0,911	0,815	0,863	0,725	25,83	25,06	15,91	13,40
<b>C20:0</b>	0,202	0,212	0,216	0,174	5,74	6,52	3,98	3,21
<b>C20:1</b>	0,653	0,528	0,479	0,442	18,50	16,22	8,82	8,18
<b>C22:0</b>	0,014	0,300	0,095	0,155	0,39	9,22	1,75	2,87
<b><math>\Sigma</math> AGS</b>	15,997	16,163	18,068	19,158	453	497	333	354
<b><math>\Sigma</math> AGMI</b>	51,240	50,834	50,063	50,071	1452	1562	923	926
<b><math>\Sigma</math> AGPI</b>	31,275	30,808	29,364	28,904	886	947	541	535

N: formulación control, E: formulación enriquecida, H: cultivo HidroSOS, C: cultivo convencional; AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados.

Como podemos apreciar (**Tabla 9**), el contenido en ácidos grasos saturados fue ligeramente superior en los licuados con pistachos hidroSOS. Sin embargo, siguen aportando una importante cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, que son muy beneficiosos para la salud ya que nuestro organismo no los sintetiza y debemos ingerirlos mediante la dieta (Zamaria, 2004).

Por otro lado, podemos observar como los ácidos grasos no se vieron excesivamente modificados tras 1 día de fermentación (**Tabla 10**).

**Tabla 10.** Estudio de los ácidos grasos totales en % de área de cada ácido graso con respecto al perfil total de los licuados fermentados de pistacho obtenidos mediante el cultivo iniciador MA400 y MY800 a tiempo 1 día.

Ácidos grasos	MA400 Contenido (% área)				MY800 Contenido (% área)			
	CN	CE	HN	HE	CN	CE	HE	HN
<b>C14:0</b>	0,201	0,185	0,251	0,454	0,186	0,198	0,765	0,864
<b>C16:0</b>	13,753	13,066	13,872	13,814	13,532	13,533	14,069	14,144
<b>C16:1n7c</b>	0,163	0,193	0,165	0,174	0,165	0,173	0,187	0,201
<b>C16:1n9c</b>	1,680	1,480	1,794	1,773	1,725	1,731	1,678	1,713
<b>C18:0</b>	1,768	1,467	2,097	2,079	1,961	2,116	2,384	2,545
<b>C18:1n9c</b>	45,379	41,776	45,918	44,874	45,748	46,041	43,321	43,145
<b>C18:1n11t</b>	2,844	5,720	3,108	3,797	2,826	2,233	4,277	3,482
<b>C18:2</b>	30,882	28,898	29,842	28,903	30,347	30,175	28,330	28,198
<b>C18:3</b>	0,879	0,692	0,846	0,919	0,989	0,975	0,832	0,902
<b>C20:0</b>	0,191	0,064	0,064	0,181	0,218	0,243	0,190	0,207
<b>C20:1</b>	0,561	0,394	0,572	0,497	0,575	0,623	0,470	0,507
<b>C22:0</b>	0,135	0,111	0,167	0,129	0,121	0,193	0,123	0,149
<b>Σ AGS</b>	16,048	14,893	16,451	16,658	16,019	16,283	17,531	17,909
<b>Σ AGMI</b>	50,628	49,562	51,557	51,116	51,038	50,801	49,932	49,048
<b>Σ AGPI</b>	31,761	29,590	30,688	29,822	31,336	31,150	29,162	29,100

N: formulación control, E: formulación enriquecida, H: cultivo HidrosOS, C: cultivo convencional; AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados.

**Tabla 11.** Estudio de los ácidos grasos totales de los licuados fermentados de pistacho obtenidos mediante el cultivo iniciador MA400 a tiempo 1 y 30 días.

Ácidos grasos	Día 1 Contenido (mg/100 mL)				Día 30 Contenido (mg/100 mL)			
	CN	CE	HN	HE	CN	CE	HE	HN
<b>C14:0</b>	5,47	6,42	5,97	11,59	13,18	5,18	6,13	6,72
<b>C16:1n7c</b>	374	454	330	353	506	476	285	431
<b>C16:1n9c</b>	4,45	6,69	3,92	4,43	42,88	15,13	3,41	4,33
<b>C18:0</b>	45,73	51,38	42,62	45,24	59,84	63,41	29,30	42,88
<b>C18:1n9c</b>	48,12	50,93	49,81	53,07	46,86	45,84	42,06	53,62
<b>C18:1n11t</b>	1235	1450	1091	1145	1566	1466	935	1367
<b>C16:1n7c</b>	77,41	199	73,84	96,92	365	271	120	135
<b>C18:2</b>	841	1003	709	738	1047	950	577	911
<b>C18:3</b>	23,93	24,02	20,10	23,46	9,62	9,95	12,09	19,49
<b>C20:0</b>	5,20	2,21	1,38	4,62	8,28	2,67	3,86	4,10
<b>C20:1</b>	15,28	13,67	1,52	12,69	11,22	9,42	1,00	13,38
<b>C22:0</b>	3,67	3,84	13,58	3,30	nd	nd	1,43	5,52
<b>Σ AGS</b>	437	517	391	425	574	529	339	501
<b>Σ AGMI</b>	1378	1720	1221	1305	2044	1824	1088	1562
<b>C14:0</b>	865	1027	729	761	1057	959	589	931

N: formulación control, E: formulación enriquecida, H: cultivo HidrosOS, C: cultivo convencional; AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados; nd: no detectado.

De forma general, el contenido de ácidos grasos saturados en mg/100 mL de los licuados fermentados con MA400 aumentó con el tiempo de fermentación (Tabla 11). Sin embargo, también aumentó el contenido de ácidos grasos insaturados.

A diferencia de los licuados de MA400, el contenido de ácidos grasos saturados, mono- y poliinsaturados de los licuados de MY800 permaneció más o menos constante a lo largo del tiempo, aunque hubo algunas excepciones: en el licuado convencional control disminuyeron los monoinsaturados y en el licuado hidroSOS control aumentaron (Tabla 12).

**Tabla 12.** Estudio de los ácidos grasos totales de los licuados fermentados de pistacho obtenidos mediante el cultivo iniciador MY800 a tiempo 1 y 30 días.

Ácidos grasos	Día 1 Contenido (mg/100 mL)				Día 30 Contenido (mg/100 mL)			
	NC	EC	NH	EH	NC	EC	EH	NH
<b>C14:0</b>	6,18	5,94	14,78	17,14	10,61	5,31	13,09	4,75
<b>C16:0</b>	449	407	272	281	359	420	271	396
<b>C16:1n7c</b>	5,46	5,20	3,61	3,98	4,39	4,74	3,90	4,33
<b>C16:1n9c</b>	57,23	52,01	32,43	33,99	37,94	43,36	23,78	39,51
<b>C18:0</b>	65,07	63,59	46,06	50,51	62,71	63,52	42,90	54,69
<b>C18:1n9c</b>	1518	1384	837	856	835	1451	811	1344
<b>C18:1n11t</b>	93,76	67,11	82,64	69,11	81,02	118,08	111,97	117,68
<b>C18:2</b>	1007	907	547	560	709	898	523	830
<b>C18:3</b>	32,81	29,30	16,07	17,90	16,28	23,45	11,93	19,79
<b>C20:0</b>	7,25	7,29	3,67	4,10	2,19	3,48	4,06	6,10
<b>C20:1</b>	19,08	18,73	9,08	10,06	4,92	6,96	1,84	1,93
<b>C22:0</b>	4,01	5,81	2,37	2,95	0,81	6,08	8,31	3,95
<b>Σ AGS</b>	532	489	339	355	436	499	339	465
<b>Σ AGMI</b>	1693	1527	965	973	963	1624	953	1507
<b>Σ AGPI</b>	1040	936	563	577	725	921	535	850

N: formulación control, E: formulación enriquecida, H: cultivo HidroSOS, C: cultivo convencional; AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados.

Entre los 12 ácidos grasos identificados en los licuados (Tablas 9, 10, 11 y 12), fue el ácido oleico (C18:1) el mayoritario, seguido por el ácido linoleico (C18:2) y el ácido palmítico (C16:0). Estos datos presentaron una concordancia con los obtenidos por D’Evoli *et al.* (2015) para pistachos procedentes de Italia. Los ácidos oleicos (isómeros)

y linoleicos, ambos reconocidos por sus propiedades cardiovasculares, representan más del 60 % del contenido total de grasa en pistachos (Bulló *et al.*, 2015).

Finalmente, cabría destacar que a simple vista no parecen existir diferencias significativas entre los distintos tipos de pistachos y la formulación, pero serían necesarios más datos para poder realizar un análisis estadístico de mayor alcance.

#### 4.6. COMPUESTOS VOLÁTILES

La caracterización y cuantificación de aromas es una de las propiedades organolépticas más sensibles y difíciles de evaluar, siendo un aroma agradable y característico del producto uno de los atributos que más exigen los consumidores a la hora de adquirir este tipo de productos. La caracterización objetiva del aroma se realiza mediante la determinación del perfil de compuestos volátiles.

En la determinación de los compuestos volátiles, se aislaron, identificaron y cuantificaron un total de 21 compuestos. Además, los compuestos volátiles presentes fueron agrupados de acuerdo a su familia química (**Tablas 13 y 14**).

**Tabla 13.** Estudio de la composición volátil de los licuados fermentados de pistacho obtenidos mediante el cultivo iniciador MY800 (N: formulación control, E: formulación enriquecida, H: cultivo HidroSOS, C: cultivo convencional).

Compuesto	Tr <sup>†</sup> (min)	IK	NH	NC	EH	EC
Concentración (µg/L)						
3-Hidroxi-2-butanona	5,442	777	0,51	0,22	0,56	1,60
Hexanal	6,957	837	0,70	2,42	0,88	1,11
1-Hexanol	9,124	909	2,15	1,64	2,78	0,54
Heptanal	10,384	942	0,06	0,04	0,19	0,09
α-Pineno	10,777	952	18,64	52,05	11,20	85,46
2-Heptenal	13,277	1014	5,08	10,48	5,12	18,95
1-Octen-3-ona	13,616	1021	2,73	4,04	2,77	4,22
1-Octen-3-ol	13,784	1025	2,84	12,15	2,59	12,35
Octanal	14,764	1046	0,13	0,02	0,56	0,08
Limoneno	14,938	1050	2,65	6,17	1,45	6,31
Ácido hexanoico	15,099	1053	1,00	14,29	0,28	4,41
2-Etil-1-hexanol	16,265	1079	2,38	2,30	1,45	2,45
Undecano	17,492	1105	1,15	8,94	1,31	8,74
2-Octenal	18,267	1121	0,78	0,29	0,90	1,14
1-Octanol	18,299	1122	3,83	4,44	3,43	10,61
Nonanal	19,663	1150	2,48	2,18	3,28	7,20

Dodecano	22,407	1206	0,83	3,20	0,46	3,20
1-Nonanol	23,218	1223	8,25	3,14	6,78	7,01
Decanal	24,736	1254	0,03	5,51	0,16	0,08
2-Decenal	28,271	1328	0,17	0,04	0,80	0,25
Cinamaldehído	30,006	1364	0,08	3,86	0,03	3,46

**FAMILIAS QUÍMICAS**

Aldehídos	9,52 b <sup>†</sup>	24,84 a	11,93 b	32,36 a
Alcoholes	19,46	23,67	17,04 b	32,96 a
Cetonas	3,24	4,26	3,33	5,81
Terpenos	21,28 b	58,22 a	12,65 b	91,77 a
Ácidos orgánicos	1,00 b	14,29 a	0,28	4,41
Hidrocarburos lineales	1,97 b	12,15 a	1,77 b	11,94 a
<b>Total µg/L</b>	<b>56,47 b</b>	<b>137,43 a</b>	<b>47,01 b</b>	<b>179,25 a</b>

<sup>†</sup> Tr, Tiempo de retención; IK, índice de Kovats; <sup>‡</sup> Valores seguidos por letras distintas, dentro de la misma familia química y el mismo factor, denotan diferencias significativas (p<0,05).

Tal y como se aprecia en la **Tabla 13**, los licuados elaborados mediante el cultivo iniciador MY800 y pistachos de riego convencional presentaron un contenido en compuestos volátiles significativamente superior a los hidrosOS. En cambio, no se apreciaron diferencias con respecto al tipo de formulación empleada (control y enriquecida).

Para el licuado convencional control, la familia química mayoritaria fue la de los terpenos, seguida de aldehídos, alcoholes, ácidos, hidrocarburos lineales y cetonas. El licuado convencional enriquecido también tuvo los terpenos como familia química mayoritaria, seguida de alcoholes, aldehídos, hidrocarburos lineales, cetonas y ácidos. Los licuados hidrosOS control y enriquecido, presentaron el siguiente orden de mayor a menor predominancia dentro de las familias químicas: terpenos > alcoholes > aldehídos > cetonas > hidrocarburos lineales > ácidos orgánicos.

**Tabla 14.** Estudio de la composición volátil de los licuados fermentados de pistacho obtenidos mediante el cultivo iniciador MA400 (N: formulación control, E: formulación enriquecida, H: cultivo HidrosOS, C: cultivo convencional).

Compuesto	Tr <sup>†</sup> (min)	IK	NH	NC Concentración (µg/L)	EH	EC
3-Hidroxi-2-butanona	5,442	777	1,24	6,87	15,65	8,47
Hexanal	6,957	837	1,52	4,58	3,22	1,52
1-Hexanol	9,124	909	2,10	0,16	2,38	0,04
Heptanal	10,384	942	0,69	0,77	1,04	0,33
α-Pineno	10,777	952	23,10	112,00	18,32	19,21

2-Heptenal	13,277	1014	8,06	40,75	6,46	13,50
1-Octen-3-ona	13,616	1021	3,32	6,84	0,06	1,69
1-Octen-3-ol	13,784	1025	3,76	25,16	2,61	11,06
Octanal	14,764	1046	1,13	0,17	0,60	0,37
Limoneno	14,938	1050	2,80	5,82	1,87	1,56
Ácido hexanoico	15,099	1053	0,67	2,80	0,83	0,18
2-Etil-1-hexanol	16,265	1079	1,52	6,55	1,92	1,16
Undecano	17,492	1105	0,65	2,94	0,12	2,06
2-Octenal	18,267	1121	1,25	1,44	1,45	0,71
1-Octanol	18,299	1122	5,17	13,40	2,52	4,97
Nonanal	19,663	1150	6,79	12,37	5,65	4,73
Dodecano	22,407	1206	0,41	3,42	0,16	0,59
1-Nonanol	23,218	1223	11,73	7,64	4,61	3,34
Decanal	24,736	1254	1,75	0,33	0,36	2,65
2-Decenal	28,271	1328	1,47	0,70	0,08	0,73
Cinamaldehído	30,006	1364	0,30	23,67	7,18	0,82

**FAMILIAS QUÍMICAS**

Aldehídos	22,95 b <sup>†</sup>	84,78 a	26,04	25,36
Alcoholes	24,28 b	52,92 a	14,05	20,58
Cetonas	4,56	13,72	15,71	10,16
Terpenos	25,89 b	117,82 a	20,19	20,77
Ácidos orgánicos	0,67	2,80	0,83	0,18
Hidrocarburos lineales	1,06	6,36	0,27	2,66
<b>Total µg/L</b>	<b>79,42 b</b>	<b>278,40 a</b>	<b>77,10</b>	<b>79,70</b>

<sup>†</sup> Tr, Tiempo de retención; IK, índice de Kovats. <sup>\*</sup> Valores seguidos por letras distintas, dentro de la misma familia química y el mismo factor, denotan diferencias significativas (p<0,05).

En la **Tabla 14**, observamos como los licuados elaborados mediante pistachos de riego convencional, presentaron un contenido en compuestos volátiles significativamente superior a los hidroSOS, pero al contrario que ocurría con el cultivo iniciador MY800, no hubo diferencias entre los licuados convencional e hidroSOS enriquecidos.

De mayor a menor relevancia, en el licuado convencional control, encontramos las siguientes familias químicas: terpenos > aldehídos > alcoholes > cetonas > hidrocarburos lineales > ácidos orgánicos. El licuado convencional enriquecido presentó una predominancia de los compuestos similar al control, pero a diferencia de este, no presentó los terpenos como compuestos mayoritarios sino que ocupan el segundo lugar, viéndose superados por los aldehídos. El licuado hidroSOS control, presentó el siguiente orden de mayor a menor predominancia: terpenos > alcoholes > aldehídos > cetonas > hidrocarburos lineales > ácidos. Para el licuado hidroSOS

enriquecido la familia predominante fue la de los aldehídos, seguida por terpenos, cetonas, alcoholes, ácidos e hidrocarburos lineales.

Por todo ello, podemos afirmar que el tipo de riego en los pistachos influye en la concentración de estos compuestos volátiles. En general los aldehídos se pueden relacionar con notas verdes de hierba y vegetales; los terpenos pueden estar relacionados con notas de pino y cítricos y los alcoholes se relacionan con notas dulces y frutales.

Es muy importante mencionar que, aunque ha habido diferencias estadísticamente significativas en algunos de los compuestos volátiles identificados, es difícil asegurar que esto implica que el olor o el aroma de los licuados fermentados de pistachos es significativamente diferente. El olor y aroma depende de características sinérgicas entre todos los compuestos volátiles y hay que recurrir al estudio sensorial descriptivo y/o afectivo para ver si un grupo de panelistas entrenados y/o un grupo de consumidores son capaces de detectar esas diferencias instrumentales.

#### 4.7. ANÁLISIS SENSORIAL

El análisis sensorial descriptivo se llevó a cabo mediante un panel sensorial entrenado de 6 jueces. La **Tabla 15** muestra los descriptores más significativos en las muestras de licuados de pistachos fermentados por MA400 y la **Tabla 16**, los fermentados por MY800. Estos descriptores: olor a mantequilla, olor a fruto seco, olor a pistacho, dulzor, acidez, umami, sabor a mantequilla, sabor a fruto seco, sabor a pistacho y post-gusto.

Como podemos observar en la **Tabla 15**, con respecto a la formulación, solo se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en el atributo dulzor, siendo la muestra enriquecida la que obtuvo una puntuación mayor. En relación al factor riego, se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para los atributos acidez, umami, sabor a pistacho y post-gusto. La acidez y el post-gusto obtuvieron valores mayores para los licuados a base de pistachos hidroSOS, al contrario que ocurrió con los atributos umami y sabor a pistacho, que presentaban las puntuaciones más altas en los licuados de pistachos de riego convencional.

**Tabla 15.** Análisis sensorial descriptivo de los licuados fermentados de pistacho obtenidos mediante el cultivo iniciador MA400.

Factor	Olor a mantequilla	Olor a fruto seco	Olor a pistacho	Dulzor	Acidez	Umami	Sabor a mantequilla	Sabor a fruto seco	Sabor a pistacho	Post-gusto
Test ANOVA <sup>†</sup>										
Riego	NS	NS	NS	NS	*	*	NS	NS	*	*
Formulación	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Test de rangos múltiples (Tukey) <sup>‡</sup>										
<b>Riego</b>										
HidroSOS	5,8	3,6	3,2	2,0	5,7 b	6,2 a	3,8	5,3	6,6 a	4,5 b
Convencional	6,2	3,8	2,9	1,8	6,7 a	5,3 b	4,2	5,8	6,0 b	5,5 a
<b>Formulación</b>										
Control	6,2	3,6	3,0	1,4 b	6,4	5,5	4,3	5,7	6,1	5,0
Enriquecido	5,8	3,7	3,1	2,4 a	6,0	6,0	4,3	5,4	6,5	5,0

<sup>†</sup> NS, no significativo ( $p \geq 0,05$ ), \* diferencias significativas  $p \leq 0,05$ . <sup>‡</sup> Valores seguidos por letras distintas, dentro de la misma columna y el mismo factor, denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 16.** Análisis sensorial descriptivo de los licuados fermentados de pistacho obtenidos mediante el cultivo iniciador MY800.

Factor	Olor a mantequilla	Olor a fruto seco	Olor a pistacho	Dulzor	Acidez	Umami	Sabor a mantequilla	Sabor a fruto seco	Sabor a pistacho	Post-gusto
Test ANOVA <sup>†</sup>										
Riego	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Formulación	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Test de rangos múltiples (Tukey) <sup>‡</sup>										
<b>Riego</b>										
HidroSOS	3,5	4,1	3,5 b	1,7	4,8	5,9	5,0	1,6	5,9	5,2
Convencional	3,6	4,5	4,3 a	2,0	4,9	6,1	4,6	1,3	5,8	5,3
<b>Formulación</b>										
Control	3,3	4,6	4,2	1,5 b	5,1	5,9	4,9	1,4	5,9	5,3
Enriquecido	3,8	4,0	3,7	2,6 a	4,6	6,2	4,7	1,4	5,8	5,2

<sup>†</sup> NS, no significativo ( $p \geq 0,05$ ), \* y \*\* diferencias significativas  $p \leq 0,05$  y  $0,01$  respectivamente. <sup>‡</sup> Valores seguidos por letras distintas, dentro de la misma columna y el mismo factor, denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



En la **Tabla 16**, correspondiente a los licuados fermentados con el cultivo MY800, los atributos que se vieron afectados son el olor a pistacho, en relación con el factor riego, y el atributo dulzor, en base a la formulación. Al igual que ocurría con el cultivo MA400, el dulzor mostró diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), correspondiendo los valores más elevados en la formulación enriquecida. El olor a pistacho presentó mayores valores en los licuados elaborados mediante pistachos convencionales.

El resto de atributos, para ambos cultivos iniciadores, no presentaron diferencias significativas.

Además del análisis descriptivo, se realizó un estudio afectivo preliminar, que aunque no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las muestras, sí presentaba una ligera preferencia por parte de los consumidores hacia los licuados enriquecidos, tanto convencionales como hidroSOS.



5

CONCLUSIÓN

UNIVERSITAS  
*Miguel  
Hernández*

La composición de los licuados mediante el método de extracción ensayado, revela que el licuado con pistacho hidroSOS presenta un menor contenido en grasa, sólidos solubles totales, y por tanto, en materia seca.

El pistacho utilizado para el estudio (variedad Kerman sobre el patrón *P. atlántica*), es un excelente sustrato para la supervivencia y el crecimiento de las bacterias lácticas (recuentos superiores 7 log UFC/g durante 30 días de conservación en refrigeración para todas las producciones ensayadas).

El sistema de riego aplicado a los pistachos durante su desarrollo, no afecta a las características de fermentación de los licuados (pH, acidez y recuentos), así como tampoco influye en el color, que tampoco se ve afectado por el tipo de cultivo empleado en la fermentación. Asimismo, el enriquecimiento de los licuados con glucosa y fructosa no ha afectado a la aptitud de la fermentación del licuado, que ya era excelente.

El perfil de ácidos grasos no muestra diferencias entre los factores del estudio, pero sí se observa una reducción de un 2 % en el contenido de ácidos grasos insaturados en los licuados de riego deficitario sin fermentar.

El perfil de volátiles se ve favorecido en los licuados de pistacho convencional. Asimismo, licuados de pistacho convencional fermentados con cultivo MA400 tienen un mayor contenido en volátiles, especialmente en terpenos, seguido de aldehídos y alcoholes. Las diferencias son menores al utilizar MY800, ya que los resultados son más heterogéneos.

Respecto al análisis sensorial, los licuados fermentados con cultivo MA400 presentan diferencias a causa del riego, de modo que los hidrosostenibles son menos ácidos, con mayor sabor umami y mayor sabor a pistacho. Por su parte, los licuados fermentados con MY800 muestran diferencias solamente en el atributo olor a pistacho, donde el hidroSOS presenta una menor intensidad.

Como conclusión general puede decirse que todas las formulaciones ensayadas resultan adecuadas desde el punto de vista tanto tecnológico como sensorial para la elaboración de bebidas fermentadas. Sería necesario realizar estudios de consumidores para determinar las preferencias del consumidor en este tipo de bebida, como ejemplo si los consumidores valoran positivamente como factor principal la intensidad de sabor a pistacho, el producto más adecuado sería una bebida de pistachos hidrosostenibles fermentada con cultivo MA400.



6

BIBLIOGRAFÍA

UNIVERSITAS

*Miguel*

*Hernández*

- ALIMARKET, 2016. Sector lácteo, quesos, leche de consumo, yogures y postres lácteos, ALIMARKET S.A., Nº 311.
- Allen, R., Pereira, L.S., Raes, D., Smith, M., 1998. Crop evapotranspiration-guidelines for computing crop water requirements, FAO Irrigation and Drainage Paper, Nº 56, FAO, Rome.
- Bernat, N., 2013. Desarrollo, caracterización y optimización de productos fermentados a base de licuados vegetales como alternativa a los yogures convencionales, Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Universitat Politècnica de València.
- Bernat, N., Cháfer, M., Chiralt, A., González-Martínez, C., 2014. Hazelnut milk fermentation using probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and inulin. *International Journal of Food Science and Technology* 49, 2553-2562.
- Bernat, N., Cháfer, M., Chiralt, A., González-Martínez, C., 2015a. Development of a non-dairy probiotic fermented product based on almond milk and inulin. *Food Science and Technology International* 21, 440-453.
- Bernat, N., Cháfer, M., González-Martínez, C., Rodríguez-García, J., Chiralt, A., 2015b. Optimisation of oat milk formulation to obtain fermented derivatives by using probiotic *Lactobacillus reuteri* microorganisms. *Food Science and Technology International* 21, 145-157.
- Bulló, M., Juanola-Falgarona, M., Hernández-Alonso, P., Salas-Salvadó, J., 2015. Nutrition attributes and health effects of pistachio nuts. *British Journal of Nutrition* 113, S79-S93.
- Couceiro, J.F., Guerrero, J., Gijón, M.C., Pérez-López, D., Moriana, A., Rodríguez, M., 2013. *El Cultivo del Pistacho*. Mundi-Prensa.
- Cruz, N.S., Capellas, M., Jaramillo, D.P., Trujillo, A.J., Guamis, B., Ferragut, V., 2009. Soymilk treated by ultra high-pressure homogenization: Acid coagulation properties and characteristics of a soy-yogurt product. *Food Hydrocolloids* 23, 490-496.
- D'Evoli, L., Lucarini, M., Gabrielli, P., Aguzzi, A., Lombardi-Boccia, G., 2015. Nutritional Value of Italian Pistachios from Bronte (*Pistacia vera* L.), Their Nutrients,

- Bioactive Compounds and Antioxidant Activity. Food and Nutrition Sciences 06, 1267-1276.
- Dreher, M.L., 2012. Pistachio nuts: Composition and potential health benefits. Nutrition Reviews 70, 234-240.
- FAOSTAT, 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations database, <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/S>, Consultada en: Mayo 2017.
- Galindo, A., Noguera-Artiaga, L., Cruz, Z.N., Burló, F., Hernández, F., Torrecillas, A., Carbonell-Barrachina, T.A., 2015. Sensory and physico-chemical quality attributes of jujube fruits as affected by crop load. LWT - Food Science and Technology 63, 899-905.
- Gijón, M.C., 2013. Relaciones hídricas y manejo del riego en pistachero (*Pistacia vera* L.), Departamento de Agronomía. Universidad de Córdoba.
- Goldhamer, D.A., 1995. Irrigation management, In: Ferguson, L. (Ed.), Pistachio Production Manual. Fruit and Nut Research and Information Center, University of California, Davis, California (USA), pp. 71-81.
- Holligan, S.D., West, S.G., Gebauer, S.K., Kay, C.D., Kris-Etherton, P.M., 2014. A moderate-fat diet containing pistachios improves emerging markers of cardiometabolic syndrome in healthy adults with elevated LDL levels. British Journal of Nutrition 112, 744-752.
- MAPAMA, 2015. Anuario de Estadística del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, <http://www.mapama.gob.es/estadistica-/pags/anuario/2015/AE15.pdf>, Consultada en: Abril 2017.
- MAPAMA, 2016. Informe del consumo de alimentación en España del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, [http://www.mapama.gob.es/imagenes/es/informeanualconsumo2016\\_tcm7-422016.pdf](http://www.mapama.gob.es/imagenes/es/informeanualconsumo2016_tcm7-422016.pdf), Consultada en: Abril 2017.
- Noguera-Artiaga, L., Lipan, L., Vázquez-Araújo, L., Barber, X., Pérez-López, D., Carbonell-Barrachina, Á.A., 2016. Opinion of Spanish Consumers on Hydrosustainable Pistachios. Journal of Food Science 81, S2559-S2565.

- Passerini, D., Coddeville, M., Le Bourgeois, P., Loubière, P., Ritzenthaler, P., Fontagné-Faucher, C., Daveran-Mingot, M.L., Coccagn-Bousquet, M., 2013. The carbohydrate metabolism signature of *Lactococcus lactis* strain A12 reveals its sourdough ecosystem origin. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 5844-5852.
- Romeu-Nadal, M., Morera-Pons, S., Castellote, A.I., López-Sabater, M.C., 2004. Comparison of two methods for the extraction of fat from human milk. *Analytica Chimica Acta* 513, 457-461.
- Ros, E., 2014. Contribution of Nuts to the Mediterranean Diet, *The Mediterranean Diet: An Evidence-Based Approach*, pp. 175-184.
- Sendra, E., Fayos, P., Lario, Y., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., Pérez-Alvarez, J., 2008. Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. *Food Microbiology* 25, 13-21.
- Shakerardekani, A., Karim, R., Vaseli, N., 2013. The effect of processing variables on the quality and acceptability of pistachio milk. *Journal of Food Processing and Preservation* 37, 541-545.
- Stone, D., 2011. Emerging trend of dairy-free almond milk, <http://www.foodmag.com.au/news/emerging-trend-of-dairy-free-almond-milk>  
Consultada en: Mayo 2017.
- Trigueros, L., Sendra, E., 2015. Fatty acid and conjugated linoleic acid (CLA) content in fermented milks as assessed by direct methylation. *LWT - Food Science and Technology* 60, 315-319.
- USDA, 2016. Department of Agriculture, Agricultural Research Service (USDA) National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28, <http://ndb.nal.usda.gov>,  
Consultada en: Mayo 2017.
- Zamaria, N., 2004. Alteration of polyunsaturated fatty acids status and metabolism in health and disease. *Reproduction Nutrition Development* 44, 273-282.