

## Pickling process of capers (*Capparis spp.*) flower buds

By Musa Özcan \* and Attila Akgül

\* Department of Food Engineering, Faculty of Agriculture,  
Selçuk University, 42031 Konya, Turkey.

### RESUMEN

#### Proceso de encurtido de botones florales de alcaparras (*Capparis spp.*)

Se encurtieron durante dos meses botones florales de tamaño medio ( $8 < x \leq 13$  mm) de *Capparis spinosa* var. *spinosa* y *C. ovata* var. *canescens*, los recolectados en Junio en salmueras conteniendo 5, 10, 15 y 20% de sal, y los de Agosto en salmueras de 15% de sal; y tres tamaños diferentes ( $x \leq 8$  mm,  $8 < x \leq 13$  mm,  $x > 13$  mm) de *C. ovata* var. *canescens* de Junio en salmueras de 15% de sal. Se realizaron algunos análisis químicos y microbiológicos durante la fermentación. Las concentraciones de sal más adecuadas para la actividad de las bacterias del ácido láctico (LAB) fueron 5% y parcialmente 10%. Acidez, actividad de LAB, sedimentación y firmeza (hardness) se redujeron al incrementar el tamaño de las alcaparras de *C. ovata*. Los tamaños pequeños de *C. ovata* presentaron en el producto encurtido ventajas en color y sabor, pero desventajas por más sedimento y ablandamiento parcial. El tiempo de encurtido para ambas especies se determinó en 40 a 50 días con respecto a sabor y olor del producto final, acidez y pH de las salmueras y actividad de LAB.

PALABRAS-CLAVE: Alcaparra - Botón floral - Encurtido.

### SUMMARY

#### Pickling process of capers (*Capparis spp.*) flower buds

Middle sized ( $8 < x \leq 13$  mm) buds of *Capparis spinosa* var. *spinosa* and *C. ovata* var. *canescens* from June in brines containing 5, 10, 15 and 20% salt and from August in brines of 15% salt, and three different size ( $x \leq 8$  mm,  $8 < x \leq 13$  mm,  $x > 13$  mm) buds of *C. ovata* var. *canescens* from June in brines of 15% salt were pickled for two months fermentation. Some chemical and microbiological analyses were done in brines during fermentation. Most suitable salt concentration for lactic acid bacteria (LAB) activity were 5% and partly 10%. Acidity, LAB activity, sedimentation and hardness were reduced by increasing bud size in *C. ovata*. Small buds of *C. ovata* for pickling product had advantage for colour and flavour, however, more sediment and partly softening showed disadvantage. For both species, pickling time was determined as 40 to 50 days in regard of end-product flavour and odour, brine acidity and pH, and LAB activity.

KEY-WORDS: *Caper* - Flower bud - Pickling.

## 1. INTRODUCTION

Capers in Capparaceae family is a plant having medicinal and aromatic properties, shrub and perannual. Pickled flower buds used as an important seasoning

of Mediterranean kitchen are known in nearly all world. Fermented products are greatly appreciated for their flavour, appetite and digestive properties (1, 2). Pungent flavour is due to several sulphur containing compounds made by the fermentation of glucosids (3). If finished product is used in conjunction with other foods, it supports flavour or is used as garniture (4, 5).

Capers has very important role in food industry with brined flower buds in world commercial as a cost product during recent years. Although changed according to years in world production of capers with approximately 10 000 tons, mainly producer and/or manufacturer-exporter countries are Spain, Morocco and Italy, respectively. Turkey had been an important export country in the last decades and had began to deal 3-5 thousand tons of fermented and packed product from wild plants. Interest against caper plants and fermented product had increased, however, it was cultivated only in a few localities in Turkey.

Although increase of interesting to capers, pickling product studies had begun in recently. Generally previous works were on composition (1, 6, 7). But the researches concerned with technology are limited (8-10).

The purposes of this study were to determine the brining of capers in various salt concentrations and most suitable conditions, using raw materials of different plant species, bud sizes and harvest times.

## 2. MATERIALS AND METHODS

Flower buds of *Capparis spinosa* L. var. *spinosa* and *Capparis ovata* Desf. var. *canescens* (Coss.) Heywood respectively were picked from wild plants in Içel (Büyükeceli-Gülнар) and Konya (Selçuklu) two month intervals from June and August. Three different sizes ( $x \leq 8$  mm,  $8 < x \leq 13$  mm and  $x > 13$  mm) of *C. ovata* buds and middle size ( $8 < x \leq 13$  mm) of *C. spinosa* buds were fermented. Middle size buds were put 3 L jars and brined at a pack-out ratio of 2/1 (brine / buds), and for each jars the following salt concentrations were prepared: 5%, 10%, 15% and 20%. On the other hand, the concentration for three different sizes of *C. ovata* buds was prepared as 15%. For the middle size buds of both species from

August only one concentration (15%) was prepared. After seven days, the salt concentration for each one was increased regularly in accordance with the previous level. So the last concentration level of each brine was reached certain intervals on 21 days.

All the samples were subjected to the fermentation at room temperature for two months. Brine analysis in order to follow the pickling were done once every ten days. Findings of the research were analysed for statistical significance by analysis of variance, and differences among groups were established according to Düzgünes *et al.*, (11) by the

test of multiply comparison. Acidity, pH and salt analysis were done according to AOAC (12). Lactic acid bacteria, Total bacteria, Coliform bacteria and Yeasts-Moulds were made according to Etchells and Bell (13). Experiments and analysis were replicated and duplicated.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

Results of brine analysis of *C. spinosa* and *C. ovata* were given in Table I.

Table I  
Brine analyses during fermentation of capers buds ( $8 < x \leq 13$  mm)

	Species	Harvest date	Salt Concentrations (%) (10 Days)				Salt Concentrations (%) (20 Days)				Salt Concentrations (%) (30 Days)			
			5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20
$\bar{x}$														
Acidity (% lactic acid)	<i>C. spinosa</i>	June	0.90 D*	0.93 D	1.05 BC	0.80 E	0.86 E	0.90 D	1.00 C	0.80 F	0.820 D	0.85 D	0.87 D	0.72 E
		August			0.92 A				0.84 A				0.85 a	
	<i>C. ovata</i>	June	1.23 A	1.25 A	1.02 C	1.10 B	1.35 A	1.12 B	1.10 B	1.02 C	1.190 A	1.02 B	1.04 B	0.94 C
		August			0.74 B				0.67 B				0.68 b	
pH	<i>C. spinosa</i>	June	4.78 AB	4.71 BC	4.82 A	4.70 BC	4.62 CD	4.59 D	4.78 A	4.69 B	4.39 F	4.55 D	4.72 A	4.61 C
		August			5.12 A				4.90				4.84	
	<i>C. ovata</i>	June	4.82 A	4.75 AB	4.55 D	4.65 C	4.65 BC	4.69 B	4.54 E	4.62 CD	4.50 E	4.65 B	4.57 D	4.56 D
		August			4.96 B				4.87				4.87	
Salt (%)	<i>C. spinosa</i>	June	3.55	5.32	6.51	8.48	3.493	7.99	10.12	12.87	4.80 G	7.74 F	13.68 D	16.98 B
		August			5.70				7.57				9.77	
	<i>C. ovata</i>	June	3.63	5.11	6.21	8.42	3.465	7.78	10.32	12.88	4.47 H	8.07 E	13.9 C	17.24 A
		August			5.62				7.65				9.85	
Lactic Acid Bacteria (CFU/ml) x 10 <sup>4</sup>	<i>C. spinosa</i>	June	96.00	87.25	132.75	135.00	196.50 bc	20.25 c	1.75 c	362.50 b	559.00 A	2.50 C	1.25 C	—
		August			7.0000 a				—				—	
	<i>C. ovata</i>	June	503.50	132.50	1174.75	74.75	1183.75 a	2.75 c	0.75 c	—	225.50 B	—	—	—
		August			0.7500 b				—				—	
Total Bacteria (CFU/ml) x 10 <sup>4</sup>	<i>C. spinosa</i>	June	30.00	52.50	17.00	55.75	15.00 D	41.75 D	11.75 D	5.00 D	120.75 C	34.75 D	4.75 D	5.75 D
		August			3.7500				0.5000				1.000	
	<i>C. ovata</i>	June	575.00	450.50	847.00	800.00	1245.75 A	601.25 B	251.50 C	60.50 D	319.00 A	226.00 B	309.75 A	46.75 D
		August			3.0000				0.7500				0.7500	
Coliform Bacteria (CFU/ml) x 10 <sup>4</sup>	<i>C. spinosa</i>	June	2.5000	1.5000	1.2500	0.5000	0.7500	2.7500	0.5000	1.2500	0.2500	0.5000	—	0.2500
		August			0.7500				0.25000				—	
	<i>C. ovata</i>	June	***	0.5000	1.0000	0.7500	0.5000	3.0000	2.2500	1.0000	5.5000	1.2500	4.5000	3.000
		August			0.5000				—				—	
Yeasts-Moulds (CFU/ml) x 10 <sup>4</sup>	<i>C. spinosa</i>	June	6.500 B	3.750 BC	12.500 A	2.500 C	5.2500	5.7500	8.5000	4.5000	167.250 A	3.000 C	1.500 C	—
		August			0.7500				—				0.2500	
	<i>C. ovata</i>	June	10.250 A	4.500 BC	3.000 C	4.500 BC	7.7500	8.5000	1.7500	0.7500	23.750 B	3.250 C	5.250 C	1.500 C
		August			1.2500				—				0.2500	

Table I  
(Continued)

	Species	Harvest date	Salt Concentrations (%) (40 Days)				Salt Concentrations (%) (50 Days)				Salt Concentrations (%) (60 Days)			
			5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20
			$\bar{x}$											
Acidity (% lactic acid)	<i>C. spinosa</i>	June	0.85 E	0.86 E	0.91 D	0.69 F	0.92 D	0.75 E	0.94 D	0.58 F	1.26 B	0.90 F	0.90 F	0.65 G
		August			0.78				0.85 A				0.75 A	
	<i>C. ovata</i>	June	1.44 A	1.10 B	1.02 C	0.98 C	1.60 B	1.03 C	0.94 D	0.96 A	1.76 A	1.21 C	1.06 D	0.99 E
		August			0.73				0.61 B				0.57 B	
pH	<i>C. spinosa</i>	June	4.31	4.58	4.75	4.69	4.10	4.54	4.76	4.67	3.68 D	4.30 C	4.50 A	4.44 B
		August			4.86				4.92				4.84	
	<i>C. ovata</i>	June	4.26	4.59	4.62	4.64	4.20	4.63	4.60	4.62	3.61 E	4.43 B	4.42 B	4.43 B
		August			4.86				4.96				4.90	
Salt (%)	<i>C. spinosa</i>	June	4.425	7.85	13.73	16.86	4.52	7.99	13.62	17.19	4.64 f	8.16 e	13.92 d	17.42 b
		August			12.88				12.86 A				13.08	
	<i>C. ovata</i>	June	4.420	8.07	13.75	16.97	4.62	8.18	14.16	17.49	4.56 f	8.19 c	14.30 c	17.55 a
		August			13.16				13.28 b				13.15	
Lactic Acid Bacteria (CFU/ml) x 10 <sup>4</sup>	<i>C. spinosa</i>	June	480.50	0.75	—	—	1461.5	—	—	—	1156.5 a	—	—	—
		August			—				—				—	
	<i>C. ovata</i>	June	348.50	—	—	—	1296.0	—	—	—	2056.3 b	—	—	—
		August			—				—				—	
Total Bacteria (CFU/ml) x 10 <sup>4</sup>	<i>C. spinosa</i>	June	6.000 C	4.250 C	1.000 C	1.000 C	22.75 DE	6.00 E	10.25 E	6.50 E	25.75 CD	4.00 D	7.50 D	3.00 D
		August			2.5000				5.5000				2.2500	
	<i>C. ovata</i>	June	97.000 A	109.500 A	41.000 B	44.500 B	346.50 A	132.50 B	74.50 C	32.00 D	378.75 A	153.50 B	71.00 C	25.75 CD
		August			1.2500				2.0000				2.2500	
Coliform Bacteria (CFU/ml) x 10 <sup>4</sup>	<i>C. spinosa</i>	June	0.5000	1.0000	0.5000	0.2500	2.0000 C	1.2500 CD	0.5000 D	0.5000 D	1.2500	1.0000	1.7500	—
		August			—				—				—	
	<i>C. ovata</i>	June	3.2500	4.0000	0.5000	1.2500	7.2500 A	3.5000 B	1.5000 CD	2.0000 C	2.0000	3.5000	2.5000	—
		August			0.50000				—				—	
Yeasts-Moulds (CFU/ml) x 10 <sup>4</sup>	<i>C. spinosa</i>	June	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		August			0.5000				0.5000				0.7500	
	<i>C. ovata</i>	June	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		August			0.5000				0.7500				0.2500	

Acidity values of *C. ovata* from June buds during fermentation were higher than those of *C. spinosa*. In 10, 20, 30 and 60 days of fermentation, important changes observed among pH values, then pH values were partly decreased. In forward stage most decreasing was determined on 5% brine. Markedly decreasing of pH in 5% brine is due to increase of acidity by lactic acid bacteria (LAB). Salt content was lowered that even if LAB activity was more affected on initial of fermentation (14).

Due to the increase in salt concentration, microorganism counts [LAB, Total Bacteria (TB) and Yeast-Mold (YM)] significantly were decreased. However LAB counts decreased as from 20 days of brining. Also, growth of LAB was not observed at the 10, 15 and 20% concentration after from 40 days of fermentation. But LAB growth had been observed in sample containing only 5% salt during fermentation. TB counts in *C. ovata* brine were usually more found

than those of *C. spinosa*. TB values were reduced by increasing of salt concentration. No YM growth had been observed after 30 days of fermentation, except for June buds in 15% of salt.

Brine acidity in June buds is higher for *C. ovata* than that of *C. spinosa* through fermentation (except for 10 and 50 days). pH, because of increasing of acidity through the end of brining, decreased in 5% brine. Most of LAB and other microorganisms in high salt concentrations could not grown.

Acidity at 15% brine (except for 10 and 50 days) of *C. ovata* from June buds was higher than that of *C. spinosa*. But the acidities of both species brines in August buds were generally low. LAB in 5% brine of *C. ovata* from 20 days was higher growth than that of *C. spinosa*. Minor differences between LAB counts of *C. ovata* and *C. spinosa* brines at the same concentrations in 30, 40 and 50 days of pickling were determined. Growth of LAB in *C. ovata*, however,

was higher with respect to that of *C. spinosa* during fermentation. It was more suitable for pickled product of *C. ovata* buds according to *C. spinosa* of june period. According to objective observation during fermentation, colour of *C. ovata* buds with respect to *C. spinosa* shifted from bright green to a more yellowish, in consequence of brining treatment. This yellowish colour had advantage for fermented product of *C. ovata*. But more sediment and softening can be disadvantage for *C. ovata* in comparison to *C. spinosa*. Besides the surface of capers was covered by tiny grayish spots formed probably by osmotic effect from the brine on certain components of the capers.

Decreasing of TB through the end of pickling and less growth, even no growth, of coliform bacteria (CB) through fermentation were desirable. CB determined in brines were formed probably via contaminations.

Growth of YM was inhibited by salt and acidity. It can cause softening, the changes at colour on product and the forming a tiny film on brine surface and further spoilage. Although the inhibition of harmful microorganism growth and the product hardness by high salt concentrations were desired,

they had some negative effect on LAB growth. Therefore, the aim of low salt content is to provide rapidly LAB growth, and inhibit or diminish the harmful microorganisms. So salt addition must be added in order to reach final concentration by certain intervals.

Most suitable salt concentration for LAB growth was established as 5%. The growth was partly in 10% brine. Undesirable microorganisms can growth in sample of 5% brine however, the fermentation must be continuously controlled.

According to these results, the main purpose of the fermentation as result observation during fermentation is colour flavour quality in related with enduring product as constructive. Most suitable brining period to flavour of final product changed between 40 to 50 days. The determination of this time was determined according to LAB growth, pH, acidity and growth of spoilage microorganism like YM and TB. It was established that further fermentation period will probably result in decreasing of final product quality.

Analysis results of three different size buds of *C. ovata* in 15% salt concentration from june were given in Table II.

Table II  
Brine analyses during fermentation in 15% brine of three different size buds of *C. ovata* in june

Days	Bud Size (mm)	Acidity (% lactic acid)	pH	Salt (%)	Lactic Acid Bacteria (CFU/ml) x 10 <sup>4</sup>	Total Bacteria (CFU/ml) x 10 <sup>4</sup>	Coliform Bacteria (CFU/ml) x 10 <sup>4</sup>	Yeast-Moulds (CFU/ml) x 10 <sup>4</sup>
		x						
10	x ≤ 8	1.47 A*	4.83 A	6.29 B	589.50 a**	522.50 A	4.000	6.2500 A
	8 < x ≤ 13	1.02 B	4.55 C	6.21 B	474.75 a	847.00 A	1.0000	3.0000 B
	x > 13	0.82 C	4.65 B	7.16 A	8.00 b	6.50 b	2.7500	3.0000 B
20	x ≤ 8	1.44 A	4.72	10.39 B	58.500 A	295.00 A	0.7500	4.7500 a
	8 < x ≤ 13	1.10 B	4.54	10.32 B	1.000 B	251.50 B	2.2500	1.7500 b
	x > 13	0.95 C	4.68	11.56 A	0.250 B	5.00 C	1.7500	1.7500 b
30	x ≤ 8	1.31 A	4.58	13.50	***	219.50 B	0.5000 B	3.2500 B
	8 < x ≤ 13	1.04 B	4.57	13.92	—	309.75 A	4.5000 A	5.2500 A
	x > 13	0.83 C	4.63	13.75	—	3.75 C	0.5000 B	0.7500 C
40	x ≤ 8	1.43 A	4.66	13.72	—	70.000 A	2.0000	—
	8 < x ≤ 13	1.02 B	4.62	13.75	—	41.000 B	0.5000	—
	x > 13	0.89 C	4.68	13.56	—	2.000 C	1.5000	—
50	x ≤ 8	1.42 A	4.60	13.65	—	37.250 B	2.0000	—
	8 < x ≤ 13	0.94 B	4.60	14.16	—	74.500 A	1.5000	—
	x > 13	0.79 C	4.63	14.21	—	3.750 C	0.7500	—
60	x ≤ 8	1.41 A	4.56 A	14.11	—	29.000 B	1.0000 b	—
	8 < x ≤ 13	1.06 B	4.42 B	14.30	—	71.000 A	2.5000 a	—
	x > 13	0.98 B	4.53 A	14.34	—	4.500 C	0.7500 b	—

\* Differences among means indicated with majuscules are significant in  $p < 0.01$ .

\*\* Differences among means indicated with minuscules are significant in  $p < 0.05$ .

\*\*\* No growth.

Growth of LAB were significantly reduced after 20 days, because of the salt addition. As well TB and YM counts in conjunction with LAB decreased in brine with large buds through pickling. No YM growth was observed after from 40 days. Acidity and LAB values in parallel with bud size decreased during fermentation.

As this result, the decreasing of brine acidity by bud size had consist of slow down of LAB activity. Although the salt concentrations for three different size of buds were constant, reducing of LAB activity with bud size was probably due to increase of inhibitory substances having disadvantage for LAB activity. Therefore, it was thought that small buds were more suitable to pickled product. The acidity, pH, LAB, TB and YM values were affected by bud size.

From increasing of salt concentration, acidity decreased and inhibited the LAB activity. Moreover, environmental conditions and LAB counts in microbial flora resulted in reducing of brine acidity (8, 15-17).

According to Anderson *et al.* (18), brine of 10% inhibited LAB activity. Capers contain glucosides (glucocapparin and glucocleomin) which might be responsible for inhibitory effect (9).

Until the use of brine with high salt concentration in pickling inhibits to the LAB growth, low concentration brines led to microorganism growth and high acidity (14, 19-22). In studies with 5%, 7.5%, 10% and 20% brines, most rapid fermentation was determined with 5% salt content. LAB activity and increasing of brine acidity have not been inhibited by high salt concentration (9, 10, 20, 23). Some differences from results can be because of process parameters and raw materials.

#### 4. CONCLUSIONS

Subjective differences like product colour, flavour, hardness, spots on surface of buds, sediment and brine colour established in middle size buds of species on both periods were observed. Sedimentation and hardness at three different size buds of *C. ovata* during fermentation decreased by bud size. The sediment development and reducing of hardness were not desired on fermented products.

Salt concentrations at initial of fermentation were diminished, like especially in 5% and 10%. Since LAB activity was rapid with this concentrations, especially in 5% brine. While increasing of salt is disadvantage for LAB activity, growth of spoilage microorganisms as TB, CB and YM might be inhibited. For increased acidity and pH, furthermore inhibition of growth of these microorganisms, it was suggested that salt concentration had to increase progressively.

Firm and small buds are not led to the opening and softening, having an advantage for pickling product. It has been suggested that bud colour in brined capers was bright yellowish green, therefore, *C. ovata* buds were superior to *C. spinosa*. But the samples of *C. ovata* had defect from more sediment, causing microbial growth. Also the buds through fermentation must be immersed into brine, otherwise the product quality will be decreased by contact the air and surface microbial growth.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by Selçuk University, Graduate School of Natural and Applied Sciences (Project N.º: FBE-93/039).

#### REFERENCES

1. Barbera, G. (ed.).—Le Câprier (*Capparis spp.*).—Commission des Communautés Européennes, Luxembourg, 62 p, (1991).
2. Akgül, A.—Food **21**, (1996) 119-128. (in Turkish).
3. Brevard, H., Brambilla, M., Chaintreau, A., Marion, J.-P.—Flavour Fragr. J. **7** (1992). 313-321.
4. Gerhardt, U.—Gordian **79** (1979) 72-74.
5. Akgül, A.—Turkish Association of Food Technologists Publ. N.º **15**, (1993) Ankara, Turkey. (in Turkish).
6. Nosti Vega, M. y Castro Ramos de, R. (1987).—«Los constituyentes de las alcaparras y su variación con el aderezo».—Grasas y Aceites **38** (3) 173-175.
7. Rodrigo, M., Lázaro, M.J., Alvarruiz, A. and Giner, V. (1992).—«Composition of capers (*Capparis spinosa*): Influence of cultivar, size and harvest date».—Journal of Food Science **57**, 1152-1154.
8. Aktan, N., Bilgir, B., Elgin, E.—Ege Univ. Agric. Fac. J. **18** (1981) 259-273. (in Turkish).
9. Alvarruiz, A., Rodrigo, M., Miquel, J., Giner, V., Feria, A. and Vila, R. (1990).—«Influence of brining and packing conditions on product quality of capers».—Journal of Food Science **55**, 196-198, 227.
10. Özcan, M., Akgül, A.—Capers (*Capparis spp.*): Composition and pickling product. Workshop-Medicinal and Aromatic Plants, 25-26 May, Ege Univ. Agric. Fac., Bornova-Izmir, Turkey, (1995) (in Turkish).
11. Düzgünes, O., Kesici, T., Kavuncu, O., Gürbüz, F.—Methods of Research and Experiment. (The Statistical Methods-II). Ankara Univ. Agric. Fac. Publ. N.º 1021, Ankara, Turkey, (1987) (in Turkish).
12. AOAC, Official Methods of Analysis, 14 th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, (1984).
13. Etchells, J.L., Bell, T.A.—Pickle products. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Speck, M. (ed.).—Amer. Public Health Assoc., Washington, D.C., pp. 574-593 (1976).
14. Sahin, I.—Pickles. Foundation for Support and Growth Agriculture Researches Publ. N.º **11**, Yalova, Turkey (1985) (in Turkish).
15. Fleming, H.P.—J. Chem. Technol. Biotechnol. **34** (1984) 241-252.

16. Fleming, H.P., McFeeters, R.F., Etchells, J.L., Bell, T.A.—Pickled vegetables. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Speck, M.L. (ed.).—Amer. Public Health Assoc., Washington, DC, pp. 663-681 (1984).
17. Daeschel, M.A., Fleming, H.P.—Achieving pure culture cucumber fermentations: A review. In: *Developments in Industrial Microbiology*, Vol. 28. Pierce, G. (ed.), Soc. For Indust. Microbiol., Arlington, VA, pp. 141-148 (1987).
18. Andersson, R.E., Daeschel, M.A., Ericksson, C.E.—Controlled lactic acid fermentation of vegetables. In: 8th International Biotechnology Symposium Proceedings, Vol. II. Durand, G., Bobichon, L., Florent, J. (eds).—Société Francaise de Microbiologie, Paris, pp. 855-868, (1988).
19. Fleming, H.P.—Mixed cultures in vegetable fermentations. In: *Mixed Cultures in Biotechnology*. Zeikus, J.G., Johnson, E.A. (eds.), McGraw-Hill, New York, pp. 69-103 (1991).
20. Çağış, S., Akbulut, N.—*Food* **3** (1993) 207-213. (in Turkish).
21. İç, E., Özçelik, F.—*Food* **20** (1995) 173-178. (in Turkish).
22. Özçelik, F., İç, E.—*Food* **21** (1996) 49-53. (in Turkish).
23. Dalgıç, T., Akbulut, N.—*Food* **13** (1988) 175-182. (in Turkish).

Recibido: Enero 1998  
Aceptado: Junio 1998

capacidad media de procesamiento de las almazaras de Andalucía suele ser de 150 t aceitunas/día, cada instalación de las aproximadamente 800 existentes, produce entre 7.500-13.500 l de aguas de lavado/día. La carga contaminante de estas aguas residuales, de grado bajo-medio, no hace aconsejable su vertido a los cauces públicos y determina la necesidad de un tratamiento previo de depuración, utilizando alguno de los sistemas y tecnologías existentes.

Estudios preliminares pusieron de manifiesto la viabilidad de la utilización de procesos de depuración biológica para el tratamiento de estos efluentes. En este sentido, procesos clásicos aerobios de fangos activados sin recirculación de lodos permitieron la degradación del 67% de la demanda química de oxígeno (DQO) de este residuo operando con 6 horas de tiempo de retención hidráulico (TRH) a la temperatura de 14° C, incrementándose considerablemente la velocidad de utilización de sustrato cuando se trabaja a 28° C (Borja *et al.*, 1995a). Sin embargo, aunque los procesos clásicos aerobios han demostrado su aplicabilidad práctica para el tratamiento biológico de estas aguas residuales, los procesos anaerobios presentan claras ventajas en relación a los anteriores, entre las que se pueden destacar las siguientes (Olthof and Oleszkiewick, 1982):

- Las necesidades energéticas son del orden de la décima parte de los aerobios, ya que se suprime el consumo correspondiente a la aireación.
- Las bacterias anaerobias transforman la sustancia orgánica en gas metano.
- Los problemas en la eliminación de lodos se reducen en un 80-85%.
- Escaso requerimiento de nutrientes.
- Se evitan malos olores al desarrollarse en sistemas cerrados.

De esta forma, en estudios de digestión anaerobia realizados en reactores discontinuos con biomasa adherida se observaron eficiencias de eliminación de DQO superiores al 64%, con coeficientes de rendimiento en metano variables entre 0,263 y 0,298 ICH<sub>4</sub>/g DQO, dependiendo del grado de maduración de la aceituna (Borja *et al.*, 1994).

En un trabajo precedente (Borja *et al.*, 1998) se estudió el proceso de digestión anaerobia de estos efluentes en régimen continuo utilizando un reactor de lecho fluidizado con sepiolita como soporte de adhesión bacteriana a la temperatura de 35° C. El reactor operó de modo satisfactorio utilizando concentraciones de alimento de 4,5, 3,5, 2,5 y 1,5 g DQO/l en un rango de 4,5 a 1,25 días de tiempo de retención hidráulico. De esta forma, se obtuvieron eficiencias de eliminación de DQO entre el 50 y el 90% para velocidades de carga orgánica variables entre 0,46 y 2,25 g DQO/l día, utilizando la concentración de sustrato más elevada ( $S_0 = 4,5$  g DQO/l). La DQO y acidez

volátil de los efluentes se incrementaron de forma paralela al aumentar la velocidad de carga orgánica en el reactor, presentando esta última un valor máximo de 1,55 g ácido acético/l en el caso más desfavorable estudiado ( $S_0 = 4,5$  g DQO/l; TRH = 1,25 días). Sin embargo, las subidas de acidez volátil fueron contrarrestadas en todo momento por los elevados valores de alcalinidad de los efluentes del reactor lo que dio lugar a una gran estabilidad del sistema, como se demostró por los adecuados valores de pH alcanzados (6,7-7,6) y los pequeños valores de la relación acidez volátil/alcalinidad observados en todo momento, en la mayoría de los casos, muy por debajo del límite recomendado (0,3-0,4) por encima del cual el proceso anaerobio se desestabiliza.

Una vez verificada la aplicabilidad, eficiencia y estabilidad del proceso de digestión anaerobia de estas aguas residuales (Borja *et al.*, 1998), el objetivo de este trabajo, como complemento y ampliación del estudio anterior, es el de obtener las constantes cinéticas que rigen este proceso utilizando un reactor de mezcla completa con microorganismos inmovilizados. Para ello, se ha utilizado el modelo cinético de Michaelis-Menten que permite obtener la velocidad máxima de utilización de sustrato y la constante cinética del proceso de depuración anaerobia de estas aguas residuales. Paralelamente se ha determinado el coeficiente de muerte celular, así como el coeficiente de producción microbiana.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Equipo experimental

El reactor utilizado está constituido por un cilindro de vidrio de 6 cm de diámetro interno y 40 cm de altura, con un volumen efectivo de 1 litro, al que se acopla una pieza troncocónica en la parte superior para facilitar la decantación de la biomasa, con el fin de evitar su pérdida con el efluente del proceso. Todo este equipo se introduce en una cámara termostática a la temperatura de 35° C. Como soporte para la adhesión de los microorganismos responsables del proceso se utiliza sepiolita, de tamaño comprendido entre 0,4 y 0,8 mm, que permite la adhesión preferencial de bacterias metanogénicas (Maestrojuán y Fiestas, 1988; Fiestas y Borja, 1996) en relación a las hidrolíticas y acetogénicas. Ello da lugar a un buen comportamiento de este soporte desde el punto de vista cinético. Por otra parte, presenta una pequeña densidad aparente (70 g/l), lo que le hace idóneo para el desarrollo de procesos de depuración en este tipo de reactores.

La agitación y fluidización de la biomasa bacteriana se realiza con un sistema de agitación magnética (365 revoluciones por minuto). La alimentación se realiza por la parte inferior del reactor mediante una

bomba peristáltica conectada a un temporizador que permite la adición de los distintos caudales de influente en varias dosis diarias. La salida del efluente se realiza por la parte superior del decantador a través de un cierre hidráulico. Otros detalles del equipo experimental relativos al procedimiento seguido para la determinación del volumen de metano producido en función del tiempo se detallan en un trabajo precedente (Borja *et al.*, 1991).

## 2.2 Características de las aguas de lavado de aceitunas

Las aguas de lavado de aceitunas (variedad picual) utilizadas en esta serie de experimentos proceden de las instalaciones de lavado existentes en la Almazara Experimental del Instituto de la Grasa. El efluente base utilizado presentó un valor de DQO de 4,5 g/l. El pH, la acidez volátil y alcalinidad del mismo fueron 5,9, 0,62 g/l (ácido acético) y 0,48 g/l (CaCO<sub>3</sub>) respectivamente. Las características completas relativas al contenido en nitrógeno amoniacal, fenoles totales, sólidos totales y en suspensión, minerales y volátiles, del agua residual objeto de estudio se encuentran resumidas en un trabajo precedente (Borja *et al.*, 1998). Los otros tres efluentes residuales utilizados como sustrato, de concentración en DQO, 3,5, 2,5 y 1,5 g/l, se obtuvieron por dilución con agua destilada del agua residual de partida anteriormente mencionada.

Las características de las aguas de lavado así como de los efluentes resultantes del proceso de digestión anaerobia se determinaron de acuerdo con el «Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater» (American Public Health Association, 1985).

## 2.3 Procedimiento experimental

Tras las etapas de inoculación y aclimatación de la biomasa utilizada como inóculo al sustrato objeto de estudio, que quedaron expuestas en un trabajo precedente (Borja *et al.*, 1994), se efectuaron una serie de experimentos en régimen discontinuo en los que se procesaron aguas de lavado con valores de DQO variables entre 2,8 y 5,5 g/l, correspondientes a aceitunas con distinto grado de maduración pertenecientes a la campaña oleícola 1992-93.

Finalizadas estas etapas preliminares se efectuaron cuatro series de experimentos en régimen continuo, en los que se trataron aguas de lavado de aceitunas de 4,5 g DQO/l (agua residual original obtenida en el proceso industrial de lavado), 3,5, 2,5 y 1,5 g DQO/l, éstas tres últimas obtenidas por dilución de la primera. Para cada uno de estos cuatro influentes, el reactor operó con caudales de alimentación

variables entre 0,22 y 0,80 l/día, que se corresponden con tiempos de retención hidráulicos de 4,5, 3,5, 2,5, 2,0, 1,5 y 1,25 días. Para el cálculo de estos tiempos de retención se ha considerado únicamente el volumen efectivo del reactor (1 litro) sin tener en cuenta el volumen del decantador troncocónico, ya que la concentración de biomasa observada en este último es totalmente despreciable (Tabla I) en relación a la concentración de biomasa activa existente en el volumen mencionado de reactor (11,2, 11,4, 11,5 y 11,7 g sólidos en suspensión volátiles, SSV/l como valores medios para los experimentos con concentraciones de sustrato en el alimento de 4,5, 3,5, 2,5 y 1,5 g DQO/l, respectivamente).

Tabla I  
Concentración de sólidos en suspensión volátiles en los efluentes,  $X_e$  (g SSV/l), en función del tiempo de retención hidráulico (TRH) para las distintas concentraciones de sustrato ( $S_0$ ) utilizadas

TRH (días)	$S_0 = 4,5$ g DQO/l	$S_0 = 3,5$ g DQO/l	$S_0 = 2,5$ g DQO/l	$S_0 = 1,5$ g DQO/l
4,5	0,352	0,241	0,119	0,026
3,5	0,376	0,251	0,157	0,053
2,5	0,375	0,257	0,175	0,073
2,0	0,345	0,258	0,170	0,077
1,5	0,297	0,251	0,143	0,072
1,25	0,267	0,193	0,124	0,059

Para cada caudal de alimentación o tiempo de retención hidráulico correspondiente, se determinan tras alcanzarse condiciones de estado estacionario el volumen de metano producido diariamente, el pH, la DQO, acidez volátil y alcalinidad de los efluentes obtenidos. Las muestras de efluentes se tomaron y analizaron durante al menos 5 días consecutivos. Se consideran como valores correspondientes al estado estacionario las medias de estas determinaciones cuando las desviaciones entre los valores observados son iguales o inferiores al 3% (Borja *et al.*, 1998).

Los experimentos correspondientes a cada sustrato empleado se efectúan por orden creciente de caudal de alimentación, con objeto de evitar los posibles efectos negativos resultantes de «sobrecargas» orgánicas, por aumentos bruscos en la carga alimentada.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el trabajo precedente que se menciona en apartados anteriores (Borja *et al.*, 1998) se realizó



una discusión detallada del comportamiento operacional del reactor, así como de la evolución con el tiempo de retención hidráulico de las variables de control más destacadas del proceso de digestión anaerobia de estas aguas residuales, como son el caudal de metano producido, DQO, acidez volátil, alcalinidad y concentración de sólidos (totales y en suspensión, minerales y volátiles) de los efluentes del proceso. En este sentido, se observó que el reactor operó de modo satisfactorio para las cuatro concentraciones de sustrato estudiadas (4,5, 3,5, 2,5, 1,5 g DQO/l) en un rango de tiempos de retención hidráulicos variable entre 4,5 y 1,25 días. Así por ejemplo, para las concentraciones de sustrato de 4,5 y 3,5 g DQO/l el porcentaje de eliminación de DQO varió entre el 50-90% y el 51-89%, respectivamente. Los incrementos en la acidez volátil de los efluentes se contrarrestaron en todo momento por los elevados valores de alcalinidad observados, lo que dio lugar a que la relación acidez volátil/alcalinidad se mantuviera, a excepción del experimento correspondiente al tiempo de retención más pequeño (1,25 días) con el alimento más concentrado (4,5 g DQO/l), por debajo del rango recomendable (0,3-0,4) a partir del cual el proceso comienza a desestabilizarse (Fannin, 1987; Field *et al.*, 1988).

Por otra parte, el pH del sistema se mantuvo, prácticamente, en todos los casos dentro del intervalo óptimo (6,8-7,6) para el adecuado desarrollo de las bacterias metanogénicas (Fannin, 1987), mientras que el coeficiente medio de producción de metano fue de 0,28l metano STP/g DQO eliminada (Borja *et al.*, 1998).

Para obtener las constantes cinéticas que rigen el proceso de digestión anaerobia de aguas de lavado de aceitunas se utiliza el modelo cinético de Michaelis-Menten.

Dada la existencia de mezcla completa en el reactor anaerobio un balance de sustrato (DQO) conduce a la ecuación:

$$d(VS)/dt = qS_0 - qS - UVX \quad (1)$$

donde  $U$  es la velocidad de consumo de sustrato por unidad de masa de microorganismos presentes en el biorreactor (g DQO/g SSV día), obtenida mediante determinaciones de la DQO de los efluentes y de las distintas concentraciones de alimento;  $S_0$  y  $S$  son las concentraciones de sustrato a la entrada y salida del biorreactor (g DQO/l);  $q$  es el caudal volumétrico de la alimentación (l/día);  $V$  el volumen del biorreactor (l);  $t$  el tiempo (días) y  $X$  la concentración de biomasa evaluada a través del contenido en sólidos en suspensión volátiles, SSV (g SSV/l).

Para el estado estacionario  $d(VS)/dt = 0$ , con lo que  $U$  se puede calcular por la expresión:

$$U = (S_0 - S) / (\theta X) \quad (2)$$

donde  $\theta$  es el tiempo de retención hidráulico definido por:  $\theta = V/q$ .

Mientras la biomasa es retenida en el biorreactor, el tiempo de retención hidráulico es relativamente pequeño comparado con el tiempo de retención celular. En estas circunstancias el sistema no puede alcanzar el estado estacionario en sentido estricto desde el punto de vista de la fase sólida, pero sin embargo las condiciones de estado estacionario son aplicables tanto a la fase líquida como al sustrato soluble. Las variaciones en la concentración de biomasa durante intervalos de tiempo relativamente amplios son despreciables en relación con el contenido en biomasa del reactor, de manera que prácticamente no contribuyen a la dinámica del sistema. En tal estado «pseudostacionario» para la resolución de los balances de materia para la fase soluble y para la sólida se admite que  $dS/dt = 0$  (no hay acumulación de sustrato) y  $dX/dt \neq 0$ , suponiendo que la velocidad volumétrica de generación de biomasa puede ser constante en el intervalo «pseudostacionario» considerado (Guiot *et al.*, 1989). Por tanto, en estas condiciones, la velocidad específica de consumo de sustrato puede determinarse mediante la ecuación (2).

En la figura 1 se han representado las parejas  $U$  vs  $S$ . La forma de las curvas sugiere que el proceso obedece a una ecuación tipo Michaelis:

$$U = kS / (K_s + S) \quad (3)$$

lo que se confirma por la linealidad de la representación  $1/U$  vs  $1/S$  (representación de Lineweaver-Burk, figura 2) para las cuatro concentraciones de sustrato utilizadas como alimento:

$$1/U = 1/k + (K_s/k)(1/S) \quad (4)$$

donde  $k$  (g DQO/g SSV día) es la velocidad máxima de utilización de sustrato y  $K_s$  (g DQO/l) es la constante cinética del proceso.

Este modelo cinético también tiene en cuenta las siguientes consideraciones (Shieh *et al.*, 1985):

- La reacción tiene lugar en el volumen efectivo del reactor ocupado por la biomasa activa adherida.
- La ecuación de Michaelis-Menten es aplicable para describir la variación de la velocidad específica de utilización de sustrato con la concentración de sustrato en el efluente.
- La alimentación no contiene los microorganismos responsables del proceso anaerobio y la

concentración de SSV en el efluente puede considerarse como la biomasa no adherida o desprendida del reactor, en este caso, totalmente despreciable en relación con el contenido en biomasa del mismo (tabla I).

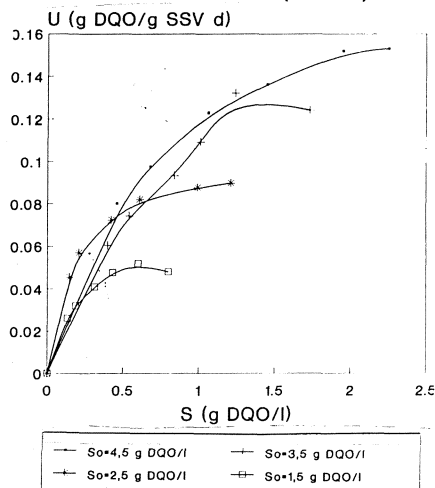


Figura 1

Variación de la velocidad específica de consumo de sustrato,  $U$  (g DQO/g SSV d) con la concentración de sustrato en el efluente,  $S$  (g DQO/l), para las cuatro concentraciones de alimento utilizadas.

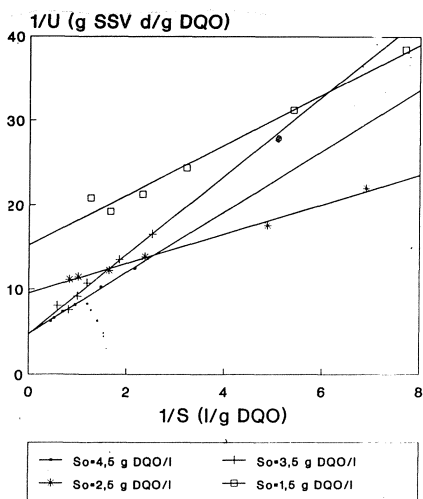


Figura 2

Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de la velocidad máxima de utilización de sustrato ( $k$ ) y de la constante cinética del proceso ( $K_s$ ) para cada concentración de influente.

Por medio de la ecuación (4), y utilizando el método de regresión lineal de mínimos cuadrados, se han determinado los valores de los parámetros cinéticos  $k$  y  $K_s$  para cada concentración de sustrato utilizada como alimento (tabla II). Los coeficientes de regresión lineal obtenidos para las cuatro concentraciones de sustrato utilizadas como influente fueron: 0,998 ( $S_0 = 4,5$  g DQO/l), 0,988 ( $S_0 = 3,5$  g DQO/l), 0,997 ( $S_0 = 2,5$  g DQO/l) y 0,990 ( $S_0 = 1,5$  g DQO/l). Los elevados valores de los coeficientes de regresión, y en consecuencia, los pequeños límites de

confianza de los parámetros cinéticos mencionados (tabla II) indican un buen grado de ajuste de los datos experimentales al modelo propuesto por Michaelis.

Tabla II

Valores de la velocidad máxima de utilización de sustrato,  $k$  (g DQO/g SSV día), y de la constante cinética del proceso,  $K_s$  (g DQO/l), con sus límites de confianza ( $P < 0,05$ ) para las distintas concentraciones de sustrato  $S_0$  (g DQO/l) utilizadas

	$S_0 = 4,5$ g DQO/l	$S_0 = 3,5$ g DQO/l	$S_0 = 2,5$ g DQO/l	$S_0 = 1,5$ g DQO/l
$k$ (g DQO/g SSV d)	$0,22 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,09$	$0,10 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$
$K_s$ (g DQO/l)	$0,76 \pm 0,12$	$0,99 \pm 0,08$	$0,18 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,10$

Como se observa en la tabla II, los parámetros cinéticos  $k$  y  $K_s$  disminuyen al disminuir la concentración de sustrato en el alimento, siendo significativamente diferentes los valores correspondientes al alimento más concentrado ( $S_0 = 4,5$  g DQO/l) y más diluido ( $S_0 = 1,5$  g DQO/l). Shieh y colaboradores (1985) obtuvieron valores similares a los observados en este trabajo para concentraciones de sustrato en el alimento alta y media, utilizando sustratos sintéticos con glucosa como única fuente de carbono y carbón activado como soporte para la inmovilización de los microorganismos anaerobios responsables del proceso. Valores algo mayores se obtuvieron en el proceso de digestión anaerobia de aguas residuales de industrias cárnicas utilizando reactores de lecho fluidizado con bentonita como medio soporte (Borja *et al.*, 1995b).

Por último, para la determinación de los coeficientes de rendimiento microbiano,  $Y_x$ , y muerte celular,  $k_d$ , se utiliza el modelo de Lawrence y McCarty (1969), que viene dado por la ecuación:

$$1/\theta_c = Y_x U - k_d \quad (5)$$

siendo  $\theta_c$  el tiempo de retención celular y  $U$  la velocidad específica de utilización de sustrato.

El tiempo de retención celular se determina mediante la ecuación:

$$\theta_c = \theta X/X_e \quad (6)$$

donde  $X$  y  $X_e$  representan las concentraciones de biomasa (g SSV/l) en el reactor y efluente respectivamente.

De acuerdo con la ecuación (5), una representación del inverso del tiempo de retención celular frente a  $U$  debe dar lugar a una línea recta de ordenada en el origen  $-k_d$  y pendiente  $Y_x$ . En la figura 3 se representan las parejas de valores ( $1/\theta_c$ ,  $U$ ) para las cuatro concentraciones de sustrato estudiadas,

observándose un buen ajuste lineal. Utilizando el procedimiento indicado y el método de regresión lineal de mínimos cuadrados se han obtenido los siguientes valores de los parámetros (coeficiente de regresión: 0,997):

$$Y_x = 0,14 \text{ g SSV/g DQO}; \quad k_d = 0,003 \text{ días}^{-1}$$

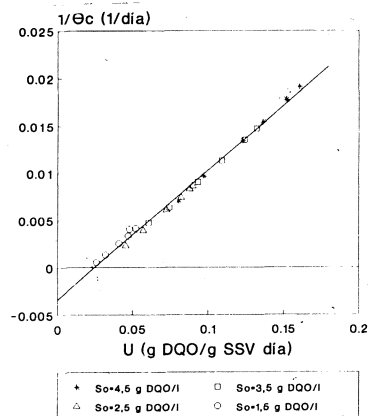


Figura 3

Variación de la velocidad específica de utilización de sustrato  $U$ , con el inverso del tiempo de retención celular ( $1/\theta_c$ ).

Según Stronach *et al.*, (1986), los valores máximos del coeficiente de rendimiento celular de las bacterias acetogénicas y metanogénicas son, respectivamente, 0,18 y 0,03 g SSV/g DQO. Considerando que en este trabajo se ha utilizado un cultivo mixto heterogéneo, resulta difícil evaluar la cinética de estas dos poblaciones microbianas separadamente. Sin embargo, un adecuado control de la fase metanogénica es clave para el óptimo comportamiento operacional del reactor, debido fundamentalmente al pequeño valor del coeficiente de producción celular observado en este tipo de bacterias en relación a los correspondientes valores de las acetogénicas. Valores similares del coeficiente de producción microbiana a los encontrados para la digestión anaerobia de aguas de lavado de aceitunas se obtuvieron en el tratamiento anaerobio de aguas residuales del proceso de elaboración de helados y derivados lácteos azucarados utilizando reactores de lecho de lodo granular, tipo UASB (upflow anaerobic sludge blanket) (Borja y Banks, 1994).

#### 4. CONCLUSIONES

1.— Se ha comprobado que el modelo propuesto por Michaelis-Menten es aplicable al proceso continuo de digestión anaerobia de aguas de lavado de aceitunas de almazara en reactores de mezcla completa con biomasa inmovilizada en sepiolita.

2.— La velocidad máxima de utilización de sustrato ( $k$ ) y la constante cinética del proceso ( $K_s$ ) disminuyen al disminuir la concentración de sustrato en

el alimento, presentando los valores más elevados ( $k = 0,22$  g DQO/g SSV día y  $K_s = 0,76$  g DQO/l) para la concentración de alimento más alta estudiada ( $S_0 = 4,5$  g DQO/l), significativamente mayores que los obtenidos para la concentración de influente ( $S_0 = 1,5$  g DQO/l) más baja utilizada ( $k = 0,06$  g DQO/g SSV día y  $K_s = 0,17$  g DQO/l).

3.— Los coeficientes de rendimiento microbiano,  $Y_x$ , y de muerte celular,  $k_d$ , son: 0,14 g SSV/g DQO y 0,003 días<sup>-1</sup>, respectivamente.

#### AGRADECIMIENTOS

Queremos hacer constar nuestro agradecimiento a la Unión Europea (Proyecto AIR3-CT94-1355) y a la Junta de Andalucía por su ayuda para la realización de estos estudios; y a D.<sup>a</sup> Carmen Sánchez por su eficaz ayuda y colaboración en la parte experimental.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Alba, J. (1997).—«Elaboración de aceite de oliva virgen». En: «El cultivo del olivo». Ed. D. Barranco, D. Fernández y L. Rallo. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca, 509-537.
- American Public Health Association, APHA. (1985).—«Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater» (16th edn.).—APHA, Washington, D.C.
- Borja, R., Martín, A. y Fiestas, J.A. (1991).—«Influencia de la concentración de sustrato sobre la cinética del proceso de biometanización de alpechín en biorreactores de lecho fluidizado».—Grasas y Aceites **42**, 363-370.
- Borja, R., Alba, J. e Hidalgo, F. (1994).—«Digestión anaerobia de las aguas de lavado de aceitunas de almazara: influencia del período de recolección sobre la cinética del proceso».—Grasas y Aceites **45**, 126-131.
- Borja, R. and Banks, C.J. (1994).—«Kinetics of an upflow anaerobic sludge blanket reactor treating ice-cream wastewater».—Environmental Technology **15**, 219-232.
- Borja, R., Banks, C.J., Alba, J. and Escobar, J.P. (1995a).—«The temperature dependence of the kinetic parameters derived for the aerobic treatment of wastewater from the washing of olives prior to the oil production process».—J. Environ. Sci. Health **A30**, 8, 1693-1705.
- Borja, R., Banks, C.J. and Wang, Z. (1995b).—«Kinetic evaluation of an anaerobic fluidised-bed reactor treating slaughterhouse wastewater».—Bioresource Technology **52**, 163-167.
- Borja, R., Alba, J., Martín, A. y Mancha, A. (1998).—«Influencia de la velocidad de carga orgánica sobre el proceso de depuración anaerobia de aguas de lavado de aceitunas de almazara en reactores de lecho fluidizado».—Grasas y Aceites **49**, 42-49.
- Fannin, K.F. (1987).—«Start-up, operation, stability and control». En: «Anaerobic digestion of biomass».—Eds.: D.P. Chynoweth and R. Isaacson, Elsevier Applied Science, 171-196.

- Field, J., Sierra-Alvarez, R. and Lettinga, G. (1988).—«Ensayos anaerobios».—4<sup>o</sup> Seminario de Digestión Anaerobia de Aguas Residuales. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Valladolid.
- Fiestas, J.A. and Borja, R. (1996).—«Biomethanization».—International Biodeterioration and Biodegradation **38**, 3-4, 145-153.
- Guiot, S.R., Podruzny, M.F. and McLean, D.D. (1989).—«Assessment of macroenergetic parameters for an anaerobic upflow biomass bed and filter (UBF) reactor».—Biotechnol. Bioeng. **34**, 1277-1288.
- Lawrence, A.W. and Stover, E.L. (1969).—«Kinetics of methane fermentation in anaerobic treatment».—J. Water Pollut. Control Fed., **41**, R1-R16.
- Maestrojuán, G.M. and Fiestas, J.A. (1988).—«A study of behaviour of anaerobic bacteria in the presence of diverse materials usable as support».—Proceedings of V International Symposium on Anaerobic Digestion, Bologna, Italy, 129-132.
- Olthof, M. and Oleszkiewick, J. (1982).—«Anaerobic treatment of industrial wastewaters».—Chemical Engineering, **15**, 121-126.
- Shieh, W.K., Chun, T.L. and Chen, S.J. (1985).—«Performance evaluation of the anaerobic fluidized-bed system: III. Process kinetics».—J. Chem. Tech. Biotechnol., **35B**, 229-234.
- Stronach, S.M., Rudd, T. and Lester, J.N. (1986).—«Anaerobic digestion processes in industrial wastewater treatment».—Springer-Verlag, Berlin.
- Water Pollution Control Federation (W.P.C.F.). (1967).—«Anaerobic sludge digestion. Manual of practise».—n.º 16.

Recibido: Enero 1998  
Aceptado: Junio 1998