



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
AGRÓNOMOS Y DE MONTES

**ESTUDIO COMPARATIVO, CONSTRUCTIVO Y
MICROBIOLÓGICO, DE LOS SISTEMAS DE
FERMENTACIÓN INDUSTRIAL DE ACEITUNAS DE
MESA EN LA PROVINCIA DE CÓRDOBA**

TESIS DOCTORAL

Salvador L. Rodríguez Ortiz

CÓRDOBA, 2012

TÍTULO: Estudio comparativo, constructivo y microbiológico, de los sistemas de fermentación industrial de aceitunas de mesa en la provincia de Córdoba

AUTOR: Salvador Luís Rodríguez Ortiz

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012
Campus de Rabanales Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

Esta memoria ha sido escrita y presentada para optar al
Grado de Doctor por la Universidad de Córdoba

El Doctorando

Salvador L. Rodríguez Ortiz

Córdoba, a 30 de marzo de 2012

Directores:

D. Francisco Montes Tubío
Catedrático de Ing. Gráfica y Geomática

D. Enrique Sancho Puebla
Prof. Titular de Microbiología

A mi padre

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar, quiero agradecer a D. Francisco Montes y D. Enrique Sancho todo el apoyo y ayuda que siempre me han dado, sin ellos, no hubiese sido posible la realización de esta tesis doctoral.

Agradecer a todo el Departamento de Microbiología el hacerme sentir en un ambiente cómodo donde he pasado tantas horas de trabajo. Quiero mencionar especialmente a Pepe Ramos y M^o Carmen Millán por su buen trato en el día a día por los pasillos del laboratorio. Agradecer la amistad de los Dres. Stefan Ivanov Shilev y Cristóbal Verdugo, con quienes tan buenos ratos pasé. Igualmente para el personal del departamento de Ingeniería Gráfica y Geomática, que siempre atendieron con agrado mi presencia.

Quisiera agradecer a los integrantes del grupo de Mejora Genética Vegetal del Instituto de Agricultura Sostenible el darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación y de donde, entre otras cosas, guardo buenos recuerdos y mejores amistades, como la de J. Ballesteros, Santiago y Pistón.

A mi familia, quien siempre, incondicionalmente, ha estado junto a mí. A todos mis hermanos, especialmente a Carlos, mi *alter ego*. A mis abuelos Sebastián y Teresa, que me lo dieron todo, auténticos partícipes de cualquiera de mis logros.

A mi mujer y a mis hijos, Salvador, Ana e Iván, tres flechas hacia el futuro y partes de mi tiempo irreversible.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del trabajo	1
1.1.1 Situación actual	1
1.2 Cronograma	3
1.3 Antecedentes	3
1.3.1 El Olivo	4
1.3.1.1 El olivo en Europa	4
1.3.1.2 El olivar en la Península Ibérica	5
1.3.2 El olivar en Andalucía	7
1.3.2.1 Datos del sector industrial de aderezo en Andalucía	7
1.3.3 La aceituna de mesa	12
1.3.3.1 Componentes de la aceituna	13
1.3.3.2 El aderezo de las aceitunas verdes	14
1.3.3.3 Tipos de aceituna de mesa	15
1.3.3.4 Recolección, transporte y valoración del fruto	16
1.3.3.5 Cocido, lavado y colocación en salmuera	17
1.3.3.6 Preparaciones comerciales	20
1.3.3.7 Principales variedades de aceituna que se cultivan en España	23
1.3.4 Norma Comercial Aplicable a las aceitunas de mesa	27
1.3.4.1 Factores esenciales de composición	30
1.3.4.2 Factores esenciales de calidad	32
1.3.4.3 Aditivos alimentarios y coadyuvantes tecnológicos	36
1.3.4.4 Contaminantes	37
1.3.4.5 Higiene	37
1.3.5 El sector agroalimentario español	38
1.3.5.1 Modelo alimentario español	39
1.3.5.2 Búsqueda de la calidad alimentaria	40
1.3.5.3 Denominaciones de Origen como mejora de la competitividad	41
1.3.5.4 Denominaciones de Calidad en la Unión Europea	43
1.3.5.5 Otras figuras de calidad	44
1.3.5.6 Futuro de la industria agroalimentaria	45
1.3.6 Instalaciones Industriales	46
1.3.6.1 Fermentadores	46
1.3.6.2 Sistema tradicional de elaboración: fermentadores enterrados	48

1.3.6.3 Alternativas al sistema tradicional: bodegas de fermentación	53
1.3.6.4 Evolución de la temperatura de fermentación	57
1.3.7 Microbiología del proceso	59
1.3.7.1 Principales características de las BAL	61
1.3.7.2 Posición taxonómica de las BAL	62
1.3.7.3 Fermentación de la aceituna de mesa	65
1.3.8 Objetivos	69

II. MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 1

2.1 Identificación de las bacterias del ácido láctico	71
2.1.1 Material biológico	71
2.1.2 Medios de cultivo	71
2.1.3 Toma de muestras	72
2.1.4 Aislamiento y purificación de las bacterias lácticas	73
2.1.5 Conservación de las cepas	73
2.1.6 Tiempo de generación	74
2.1.7 Identificación de las cepas	74
2.1.7.1 Observación de las cepas	74
2.1.7.2 Movilidad	74
2.1.7.3 Tinción de Gram	74
2.1.7.4 Reacción de la catalasa	75
2.1.7.5 Crecimiento a diferentes temperaturas	75
2.1.7.6 Tipo de metabolismo fermentativo	75
2.1.7.8 Fermentación de azúcares	78
2.1.8 Selección de cepas de BAL	78
2.1.8.1 Fermentación ácido láctica	78
2.1.8.2 Evolución del pH	78
2.1.8.3 Viabilidad de los cultivos iniciadores	79

CAPÍTULO 2

2.2.1 Análisis Físico-Químicos	80
2.2.1.1 Medidas del ácido láctico	80
2.2.1.2 Acidez combinada	82
2.2.1.3 Acidez libre	82

2.2.1.4	Cloruro sódico	83
2.2.1.5	Temperatura	84
	2.2.2 Diseño experimental	84

CAPÍTULO 3

	Bodega de fermentación	85
	2.3.1 Evaluación presupuestaria	85
2.3.1.1	Bodega de fermentación.	85
2.3.1.2	Fermentadores enterrados.	86
	2.3.2 Características constructivas y de diseño	87

III. RESULTADOS

CAPÍTULO 1

	3.1 Identificación de las bacterias del ácido láctico	88
3.1.1	Aislamiento de bacterias del ácido láctico	88
3.1.2	Identificación de las cepas	88
3.1.3	Evolución poblacional de bacterias del ácido láctico	101
3.1.4	Selección de cepas de bacterias del láctico	104
3.1.5	Evolución del pH en presencia de tampón	104
3.1.6	Fermentación ácido-láctica	106
3.1.7	Tiempo de generación	107

CAPÍTULO 2

	3.2.1 Análisis Físico-Químicos	109
	3.2.2 Diseño experimental	119
3.2.2.1	Fermentadores en bodega	119
3.2.2.2	Fermentadores enterrados	126

CAPÍTULO 3

	3.3.1 Evaluación presupuestaria	133
3.3.1.1	Bodega de fermentación	133
3.3.1.2	Fermentadores enterrados	138
	3.3.2 Características constructivas y de diseño	142
3.3.2.1	Características generales del sótano	142
3.3.2.2	Materiales de construcción	142
3.3.2.3	Estructura del sótano	144

IV. DISCUSIÓN	146
V. CONCLUSIONES	155
BIBLIOGRAFÍA	156

ABREVIATURAS EMPLEADAS MÁS FRECUENTEMENTE

AAO: Agencia para el Aceite de Oliva

BAL: Bacterias Ácido Lácticas

COI: Consejo Oleícola Internacional

DO: Densidad Óptica

FAL: Fermentación Ácido Láctica

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Presión

MARM: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino

MES: Ácido 4-morfolinetano sulfónico

MRS: Man, Rogosa y Sharpe

INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del trabajo

El presente trabajo de investigación tiene un carácter innovador, ya que aborda el análisis tanto ingenieril como microbiológico en el proceso de aderezo de aceitunas, estilo sevillano. Las muestras, proceden de la cooperativa de primer grado *Olivarera Jesús Nazareno, S. C. A.*, situada en Aguilar de la Frontera, Córdoba.

Mediante la comparación entre el sistema tradicional de elaboración que emplea fermentadores enterrados y una alternativa al mismo, como son las bodegas de fermentación, se analizarán las diferencias constructivas y de manejo de la instalación, así como el estudio y caracterización de la población bacteriana principalmente implicada en el proceso, las bacterias del ácido láctico (BAL).

En el epígrafe que sigue (**1.2**), y como exposición cronológica, se muestra el organigrama seguido en el desarrollo de la tesis doctoral que se presenta.

1.1.1 Situación actual

España es el primer país productor de aceitunas de mesa del mundo, seguido a mucha distancia de otros países de la cuenca mediterránea. La producción media mundial de las últimas cinco campañas asciende a 1.750.000 toneladas de las que 526.000 se produjeron en España, o sea, un 30 % del total (**Figura 1.1**). Otros países productores son Turquía, Egipto, Argentina, Siria, Grecia o Marruecos, entre otros.

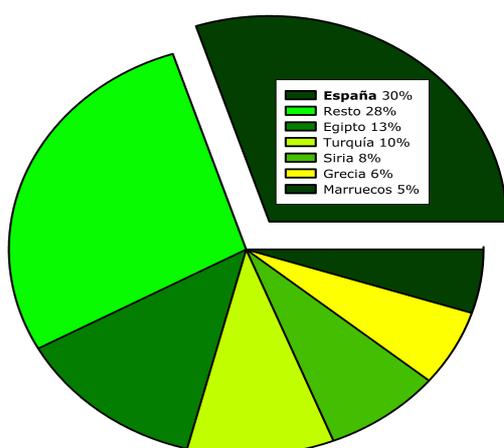


Figura 1.1 Producción mundial de aceitunas de mesa. Media campañas 2005/2010 (COI)

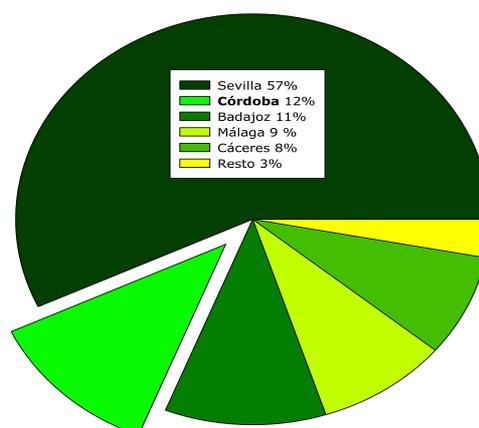


Figura 1.2 Producción nacional de aceitunas de mesa. Campaña 2009/2010 (AAO)

A nivel nacional, y según los datos de la Agencia para el Aceite de Oliva (AAO), la producción de la campaña 2009/2010 en Andalucía alcanzó un total de 481.124 toneladas, lo que supone el 80,5 % de la producción nacional. Así, Sevilla, Córdoba y Badajoz son las provincias con una mayor producción (**Figura 1.2**).

El panorama en la producción científica en el área de la aceituna de mesa ha tenido un incremento cuantitativo notable principalmente en los últimos treinta años (**Figura 1.3**), (**De la Viesca *et al.*, 2007**). El ranking de productividad por países es liderado por España, seguido de Italia y Grecia, y está directamente relacionado con los principales países productores de aceituna de mesa.

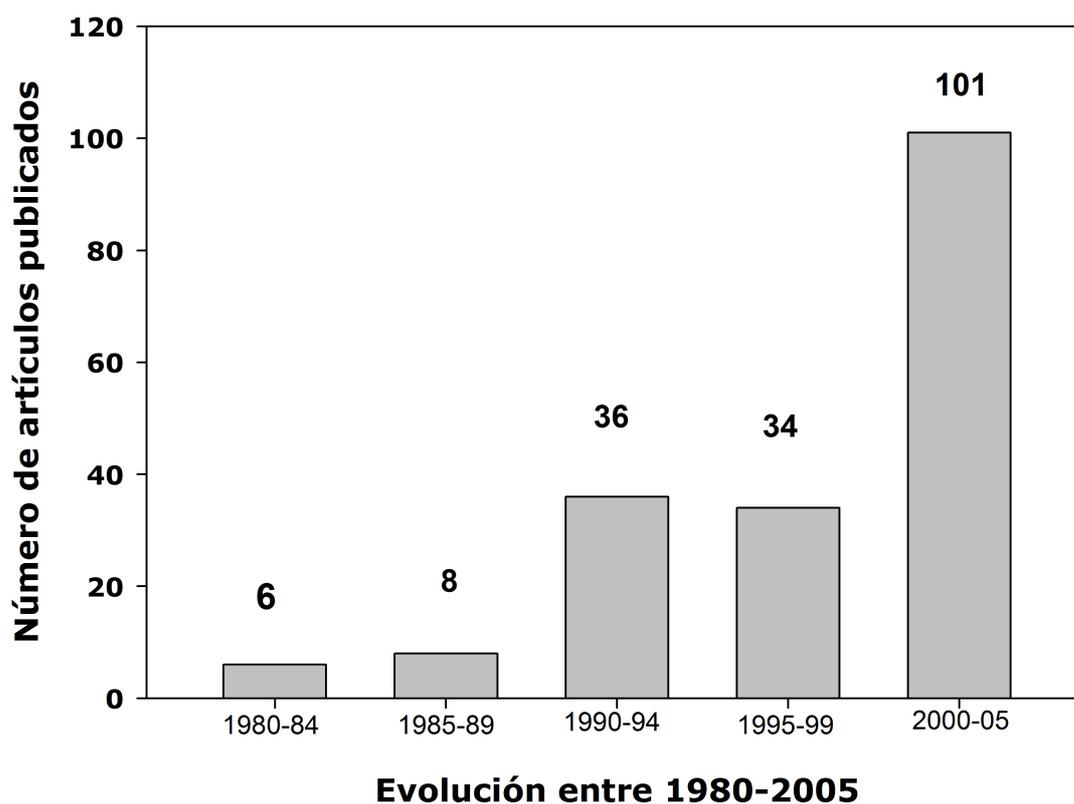


Figura 1.3 Evolución a través de los años del número de artículos sobre la aceituna de mesa en el SciSearch: 1980-2005

1.2 Cronograma

Se comienza con la toma de muestras de aceitunas en el último trimestre del año 2006 para cubrir la campaña 2006/2007, repitiendo por tres campañas el procedimiento hasta 2008/2009. Realizando la parte experimental y el desarrollo del trabajo hasta el diseño y redacción de la tesis a finales del 2011, (**Tabla 1.1**).

Tabla 1.1. Organigrama del trabajo realizado

	2007	2008	2009	2010	2011
Cálculos estructurales bodega	■				
Toma de muestras	■	■	■		
Aislamiento y selección	■	■	■		
Identificación y caracterización bacterias ácido lácticas		■	■	■	
Eval. presupuestaria bodega			■		
Análisis y diseño experimental				■	
Diseño y redacción de la tesis					■

1.3 Antecedentes

La biotecnología, como rama de la tecnología y de la ciencia biológica aplicada, está lejos de ser un concepto moderno. Hace ocho mil años, sin duda también nuestros antepasados estaban convencidos, a su manera, de haber hallado la esencia de la vida al fabricar el primer pan y las primeras cervezas. A pesar de ignorar el porqué, fueron los habitantes del mediterráneo oriental los primeros en usar microorganismos vivos en procesos fermentativos, ellos fueron los primeros biotecnólogos.

Las primeras fermentaciones de aceituna ya eran por si mismas en su procedimiento un medio de preservación del valor nutritivo del fruto. Gracias a la fermentación se reducían los nutrientes que los organismos contaminantes necesitan para vivir, y se creaban unas condiciones desfavorables, como la disminución del pH, que impedían su desarrollo.

En los últimos años, se han construido plantas de aderezo de aceituna con instalaciones para la fermentación diferentes al sistema tradicional de fermentadores enterrados. Las nuevas instalaciones disponen los fermentadores en un sótano acondicionado o bodega que, puede ser visitado al mismo tiempo. En ella se

consiguen unas condiciones higiénico-sanitarias y térmicas óptimas. El nuevo sistema presenta numerosas ventajas, aunque su coste es más elevado que el sistema tradicional.

1.3.1 El Olivo

El olivo, *Olea europaea sativa*, es la única especie de la familia *Oleaceae* que presenta un fruto comestible. Su cultivo comenzó hace más de seis mil años en zonas del mediterráneo en Oriente medio. Su introducción en Andalucía es debida a los fenicios, mucho más tarde pasó al continente Americano hasta la actualidad, donde se promueve su cultivo en Asia, Australia y Sudáfrica.

En el libro primero de Moisés (Génesis, 8:11), se hace la primera referencia histórica escrita a la planta del olivo. Los cetos de reyes se hacían con su madera, sus ramas coronaban a hombres y utilizaban su zumo para numerosas actividades y acontecimientos como la alimentación, la medicina y la unción de sacerdotes y reyes.

En la mitología, el olivo aparece en narraciones como la disputa entre Palas Atenea y Poseidón por el patronazgo de la incipiente Atenas, Poseidón, con un golpe de su tridente, crea el caballo, bello, rápido, fuerte y ágil mientras, Atenea con su lanza hace brotar el olivo “del que no solamente sus frutos serían buenos para comer sino que de ellos se obtendría un líquido extraordinario que serviría para alimento de los hombres rico en sabor y en energía, para aliviar sus heridas y dar fuerzas a su organismo, y capaz de dar llama para iluminar la noche”... los dioses valoraron más el olivo y Atenea, la elegida, dio nombre a la ciudad.

De las cerca de 1.500 variedades de olivo catalogadas a nivel mundial, sólo aproximadamente 100 de ellas son las principales productoras en función del uso de sus frutos: extracción de aceite, aceituna de mesa y variedades para ambos usos.

Las principales variedades cultivadas en España para aceituna de mesa son la Gordal, Manzanilla y Hojiblanca, siendo las dos primeras las principales exportadas para producir aceituna de mesa en otros países, a destacar Argentina, Australia, Estados Unidos e Israel.

1.3.1.1 El olivo en Europa

La existencia de restos fósiles acredita la existencia de olivos en el Paleolítico, hace 30.000 años, encontrados, entre otros, en yacimientos pliocénicos de Mongardino (Italia), en las islas Cícladas (Grecia) y en el norte de África. Esto hace

que el olivo actual tenga un origen híbrido, de especies próximas como la “*Olea africana*” originaria de Arabia y Egipto, la “*Olea ferruginea*” de Asia y la “*Olea laperrini*” del sur de Marruecos, (**Barranco y Rallo, 1984**).

El olivo como cultivo se remonta a épocas paleolíticas y neolíticas, entre 5.000 y 3.500 a.C., en Creta. Existen numerosos vestigios de la importancia que tenía para la economía Cretense el aceite de oliva alrededor del 2.500 a.C., como son las representaciones artísticas halladas.

A través de Palestina la olivicultura llegó a Egipto hace unos 5.000 años, donde ya usaban el aceite de oliva en la iluminación de los templos. De hecho, fueron los egipcios los primeros en usar procedimientos mecánicos naturales para la extracción del aceite, de forma muy similar a la utilizada hasta nuestros días.

Son los fenicios los que, desde el siglo XVI a.C. difunden el olivo por las islas griegas y en siglos posteriores por la Península Helénica, donde su cultivo adquiere unas notables proporciones. Así, es de este a oeste como se propaga el olivo en el continente europeo.

1.3.1.2 El olivar en la Península Ibérica

En España, el acebuche (*Olea europaea oleaster*) pertenece a la vegetación autóctona de la zona meridional. A pesar de que el olivo ya existía en la Península Ibérica al menos desde hace unos 5.000 años (yacimientos arqueológicos en El Gardel, Almería), la olivicultura como tal la introdujeron los griegos por la actual Costa brava, en la provincia de Gerona, y los fenicios a través de Cádiz y Málaga. Desde estas zonas, a través del Valle del Guadalquivir y por la costa a través del mediterráneo, se comerció e introdujo a Íberos y Tartesios en el mundo del olivo. Así pues, el cultivo del olivo se inició en Oriente y desde allí a través del mediterráneo difundió hacia Occidente. Desde el primer momento de la olivicultura seleccionaron a través de los acebuches existentes los más notables por productividad, oleosidad, tamaño del fruto, adaptación al medio, etc., y así, por propagación vegetativa se han ido manteniendo las características deseables por los cultivadores desde las primeras variedades.

A partir de la entrada de los romanos en la Península Ibérica (212 a.C.) es cuando se impone una nueva cultura, en la que destaca el impulso definitivo que se hace al cultivo del olivo, así como el incremento del comercio de aceite de oliva. Todo ello acompañado de la creación de infraestructuras que, en Andalucía y, principalmente en el Valle del Guadalquivir, potenció la agricultura que sirvió de

proveedor a la metrópoli romana, suministrando además de aceite de oliva, vino y cereales.

En España, se han encontrado 262 variedades de olivo, como han corroborado además de la identificación morfológica, la identificación por análisis de isoenzimas en muestras de polen recogidas de los árboles introducidos en colección (**Trujillo et al., 1995**) y posteriormente mediante el uso de marcadores moleculares (**Belaj et al., 2001**). Estas variedades de olivo se mantienen desde el inicio de su cultivo en España. **Oliveros y Jordana, 1968**, ya hacen referencia a que las variedades más importantes de la actualidad ya lo eran en el s. XV. La homogeneidad genética de las variedades cultivadas es notable tanto por propagación vegetativa como a la dificultad de detección de mutaciones en el olivo.

A nivel nacional, el olivar ocupa el 5 % de la superficie total de España y sólo lo superan en extensión los cereales (9 %). Esto supone el 14 % de la superficie cultivable del país. En resumen, en el año 2006, la superficie total de olivar, si incluimos el olivar abandonado, era de casi 2,5 millones de hectáreas, de las que el 96% estaban en producción, y de éstas, el 93 % de su producción fue aceituna para almazara.

Si incluimos los olivos para aceite y aceitunas de mesa, se estima que en todo el mundo hay unos 900 millones de olivos, de ellos más de 250 millones están en España, y de éstos más de 140 millones se localizan en Andalucía.

El sector del olivar está constituido por dos subsectores diferenciados por su aprovechamiento: olivar de almazara y de mesa, aunque deben tratarse conjuntamente pues hay variedades de doble aptitud que dependiendo de las campañas su destino será uno u otro. El cultivo del olivo sigue siendo predominantemente de secano aunque debido a los incrementos en la producción obtenida con el riego, la superficie de olivar en regadío se ha incrementado considerablemente. Actualmente, la superficie de olivar en regadío es del 15 % en el olivar de almazara y del 28 % en olivar de mesa.

El precio del olivar de almazara consigue superiores valores al de mesa, y estas diferencias son aun mayores si comparamos el precio del olivar de regadío y secano, donde llega a duplicarse el precio debido principalmente al volumen de producción de uno y otro (**Tabla 1.2**). Como puede observarse, las principales productoras de aceituna de mesa son Andalucía y Extremadura, siendo este tipo de aceituna la estudiada en el presente trabajo.

Tabla 1.2. Producción de aceituna (kg/ha) por Comunidades Autónomas de olivares en seco y regadío para olivar de aceituna de almazara y mesa. Valores medios entre 2002/06.

Fuente: MARM.

Comunidad Autónoma	Aceituna de Almazara		Aceituna de Mesa	
	Secano	Regadío	Secano	Regadío
Andalucía	2.606	4.612	2.473	4.383
Extremadura	1.282	5.000	1.415	5.000
Castilla La Mancha	947	2.394		
Cataluña	818	2.016		

1.3.2 El olivar en Andalucía

Representa aproximadamente dos terceras partes del olivar nacional y en la última década han aumentado las nuevas plantaciones notablemente. En el año 2008 ya había unas 250.000 ha más que en el año 1963. Por tanto, es Andalucía, a nivel nacional la principal productora y de las más importantes a nivel mundial.

1.3.2.1 Datos del sector industrial de aderezo en Andalucía

(Fuente: Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía)

La superficie oleícola mundial se aproxima a 11 millones de hectáreas, de las que aproximadamente 2,45 millones se localizan en España. De esta superficie nacional 1,5 millones de hectáreas se concentran en Andalucía, mayoritariamente dedicadas a la obtención de aceituna para almazara (1,4 millones de hectáreas) frente a las destinadas a mesa (100.000 hectáreas). Atendiendo a las producciones, Andalucía produce en torno a 4 millones de toneladas de aceituna para almazara y 300.000 toneladas de aceituna para mesa.

El cultivo del olivar, aunque presente en toda la comunidad andaluza, se orienta hacia la producción de aceituna de mesa principalmente en las provincias de Sevilla y Córdoba.

Las industrias de aderezo que han tenido actividad durante la campaña 2006/2007 totalizan 238, cuya distribución provincial en el ámbito de la Comunidad

Autónoma Andaluza se resume en la **tabla 1.3**. La distribución de las industrias de aderezo está muy concentrada en la provincia de Sevilla, donde se sitúan, prácticamente, los dos tercios del total (63,9 %). Las otras provincias en las que la actividad del entamado de aceituna de mesa tiene más importancia son Córdoba, que posee el 14,3 % y Málaga con el 12,6 % de las industrias.

Atendiendo a las cifras de producción de aceituna de mesa, durante la campaña 2006/2007, se elevó a 361.597.592 kg, siendo un 8,2 % mayor que la obtenida en la campaña 2005/2006, que ascendió a 334.147.858 kg. La cantidad de aceituna cruda para transformar en esta campaña fue de 371.582.356 kg, resultando un coeficiente medio de transformación del 0,9731. El valor provincial medio más bajo de este coeficiente se ha obtenido en Córdoba con 0,9621 y el más alto, que alcanza la unidad (1,0000), en Almería, Cádiz, Granada, Huelva y Jaén, en las que las cantidades de aceituna cruda y transformada resultan iguales (**Tabla 1.4**).

Las provincias netamente productoras de aceituna de mesa son Sevilla (77,2 %), Córdoba (11,9 %) y Málaga (9,6 %), que suman el 98,7 % del total de aceituna aderezada en Andalucía.

Tabla 1.3. Industrias de aderezo, campaña 2006/2007. Fuente: AAO

Provincia	Industrias de Aderezo	
	Número	%
Almería	3	1,3
Cádiz	2	0,8
Córdoba	34	14,3
Granada	5	2,1
Huelva	2	0,8
Jaén	10	4,2
Málaga	30	12,6
Sevilla	152	63,9
ANDALUCÍA	238	100

Las variaciones del censo de entamadoras operativas que se han producido en el conjunto de Andalucía y en cada una de las ocho provincias durante la campaña 2006/2007, se traducen en una leve disminución en el cómputo global (-1) ya que se han contabilizado 7 nuevas industrias respecto a la campaña pasada, repartidas

entre Jaén (+3), Granada (+2), Cádiz (+1) y Almería (+1) y 8 industrias han desaparecido de las operativas la campaña anterior en Córdoba (-3), Sevilla (-3), Huelva (-1) y Málaga (-1).

Tabla 1.4. Producción total (Kg.) de aceituna de mesa en industrias de aderezo.
Campaña 2006/07. Fuente: AAO

Provincia	Aceituna cruda	Aceituna transformada	Coef. de transformación
Almería	687.391	687.391	1,0000
Cádiz	65.217	65.217	1,0000
Córdoba	44.716.721	43.019.761	0,9621
Granada	376.996	376.996	1,0000
Huelva	2.469.719	2.469.719	1,0000
Jaén	1.107.912	1.107.912	1,0000
Málaga	34.717.025	34.654.702	0,9982
Sevilla	287.441.375	279.215.894	0,9714
ANDALUCÍA	371.582.356	361.597.592	0,9731

Como ya se ha dicho, Andalucía presenta más de la mitad de la plantación del olivar español, esta importante superficie está destinada casi en su mayor parte a la aceituna de almazara (**Tabla 1.5**) frente a la aceituna de mesa (**Tabla 1.6**). De igual forma, la producción y destino de la aceituna ya sean para mesa (**Tabla 1.7**) o para almazara (**Tabla 1.8**) presentan importantes diferencias, destacando para aceituna de mesa en primer lugar y con diferencia la provincia de Sevilla, seguida de Córdoba y Málaga, y para almazara Jaén como principal productora, seguida de Córdoba y a mucha distancia el resto de provincias.

Los productos obtenidos de la aceituna, ya sea aceite, ya sea aceituna aderezada, dependen de las variedades predominantes en la provincia en cuestión, duplicándose la producción para el aceite de oliva frente a la aceituna aderezada (**Tabla 1.9**), siendo la producción de aceite de orujo inferior a las anteriores mientras que la de orujo sin desgrasar es mucho mayor.

Tabla 1.5. Superficie en plantación regular de olivar de aceituna de almazara en Andalucía (2008)

Provincia	Superficie en plantación regular (Ha)				
	Total			En producción	
	Secano	Regadío	Total	Secano	Regadío
	(Ha)	(Ha)	(Ha)	(Ha)	(Ha)
Almería	6.228	13.416	19.644	4.953	12.992
Cádiz	18.271	2.408	20.679	17.545	1.255
Córdoba	323.432	16.789	340.221	315.569	14.007
Granada	135.678	42.677	178.355	135.168	42.432
Huelva	24.167	3.459	27.626	22.584	3.209
Jaén	387.631	180.969	568.600	384.728	178.799
Málaga	109.902	9.652	119.554	106.814	8.536
Sevilla	109.250	22.723	131.973	104.178	19.476
Andalucía	1.114.559	292.093	1.406.652	1.091.539	280.706

Tabla 1.6. Superficie en plantación regular de olivar de aceituna de mesa en Andalucía (2008)

Provincia	Superficie en plantación regular (Ha)				
	Total			En producción	
	Secano	Regadío	Total	Secano	Regadío
	(Ha)	(Ha)	(Ha)	(Ha)	(Ha)
Almería	27	53	80	27	50
Cádiz	469	611	1.080	469	493
Córdoba	2.491	1.100	3.591	2.380	1.093
Granada	100	79	179	100	79
Huelva	3.882	1.591	5.473	3.882	1.591
Jaén	2	2.220	2.222	2	2.220
Málaga	4.975	566	5.541	4.925	482
Sevilla	46.647	40.222	86.869	44.383	38.596
Andalucía	58.593	46.442	105.035	56.168	44.604

Tabla 1.7. Producción y destino de aceituna de mesa en Andalucía (2008)

Provincia	Producción (Tm)	Aceituna para Aderezo (Tm)	Aceituna para Almazara (Tm)
Almería	280	280	
Cádiz	2.621	2.621	
Córdoba	12.825	12.825	
Granada	411	411	
Huelva	5.015	5.015	
Jaén	8.772	8.772	
Málaga	12.014	12.014	
Sevilla	269.241	259.817	9.423
Andalucía	311.179	301.755	9.423

Tabla 1.8. Producción y destino de aceituna de almazara en Andalucía (2008)

Provincia	Producción (Tm)	Aceituna para Aderezo (Tm)	Aceituna para Almazara (Tm)
Almería	43.001	2.174	40.828
Cádiz	34.483		34.483
Córdoba	995.521	43.802	951.719
Granada	326.547		326.547
Huelva	30.375		30.375
Jaén	1.967.423		1.967.423
Málaga	250.967	28.976	221.991
Sevilla	415.687	32.058	383.628
Andalucía	4.064.003	107.010	3.956.994

Tabla 1.9. Productos obtenidos (Tm) de la aceituna en la campaña 2008

Provincia	Aderezada	Aceite de oliva	Aceite de orujo	Orujo sin desgrasar
Almería	2.454	8.588		18.373
Cádiz	2.621	6.897	69	19.157
Córdoba	56.627	187.108	27.774	771.504
Granada	411	73.199	3.674	195.928
Huelva	5.015	5.771		
Jaén	8.772	431.382	30.721	1.536.041
Málaga	40.990	42.982	6.017	
Sevilla	291.875	71.286	6.314	341.277
Andalucía	408.765	827.213	74.569	2.882.280

1.3.3 La aceituna de mesa

El olivo produce un fruto oval que es una drupa carnosa verde, denominada aceituna, contiene una sola semilla que protege el pericarpio, compuesto por tres tejidos; el endocarpio (hueso), el mesocarpio (pulpa) y el exocarpio (piel).

El fruto del olivo es una drupa más o menos alargada según la variedad, de color verde, que cambia a morado o negro cuando está madura, alcanzando un peso medio comprendido entre 1,5 y 12 g. aproximadamente. De forma excepcional, pueden encontrarse frutos de 0,5 y 20 g. Sus dimensiones oscilan, entre 2 y 3 centímetros de longitud y de 1 a 2 cm. de diámetro transversal, siendo su peso específico próximo a la unidad. El porcentaje de pulpa, intensamente amarga cuando aún está verde, varía del 70 al 88 %, por tanto, el hueso representa del 12 al 30 % del peso total del fruto. La semilla en él contenida supone algo menos del 10 % del peso del hueso (**Fernández M.J. et al, 1985**).

Tanto las citadas características físicas como la composición química de la pulpa comestible dependen de otros diversos factores, a destacar la variedad y el estado de desarrollo y madurez del fruto en la época de recolección, así como las condiciones poscosecha. También de especial relevancia son, la situación geográfica, calidad del suelo y tipo de cultivo, regadío o seco.

La definición que hace el COI, según la Norma Comercial vigente (2004) de la aceituna de mesa es “el producto preparado a partir de frutos sanos de variedades de olivo cultivado (*Olea europaea L.*), elegidas por producir frutos cuyo volumen, forma, proporción de pulpa respecto al hueso, delicadeza de la pulpa, sabor, firmeza y

facilidad para separarse del hueso los hacen particularmente aptos para la elaboración; sometido a tratamientos para eliminar el amargor natural y conservado mediante fermentación natural o tratamiento térmico, con o sin conservantes, y, envasado con o sin líquido de gobierno .” Igualmente clasifica las aceitunas de mesa según el grado de madurez que presenten durante la recolección en verdes, color cambiante o negras. La reglamentación técnico sanitaria española (BOE, nº 279, 2001) conforma la norma del COI.

1.3.3.1 Componentes de la aceituna

El mesocarpio o pulpa de la aceituna está compuesta principalmente por aceite (10 - 25 %) y agua (60 - 75 %), (**Fernández M.J. et al., 1985; Rejano L. et al., 1977**). La fracción aceitosa contiene principalmente triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres, fitoesteroles, alcoholes terpénicos y fosfolípidos. El contenido en cenizas de la aceituna es relativamente bajo, entre el 0,6 y el 1 %, e incluye minerales como potasio, fósforo, calcio, sodio y magnesio. La textura del fruto es atribuida a la presencia de una fracción fibrosa (1 - 4 %) (**Guillen R. et al., 1992**) y de sustancias pécticas (0,3 - 0,6 %) (**Minguez-Mosquera MI. et al., 2002**). Azúcares y polioles representan el 20 % del peso fresco de la pulpa. Los principales azúcares libres son la glucosa, fructosa y sacarosa, entre el 3 y 4 %, y son muy importantes en la fermentación de la aceituna. Los principales ácidos orgánicos presentes en la pulpa (0,5 - 1 %) son el ácido oxálico, ácido málico y ácido cítrico. La fracción proteica es baja y varía entre el 1 y 3 %. **Hassapidou MN, et al. 1994** informaron de la presencia de vitaminas en la aceituna y su aceite. El color verde del fruto es debido a las clorofilas (1,8 - 13,5 mg/100 g de pulpa fresca) y carotenoides (0,6 - 2,4 mg/100 g de pulpa fresca) (**Minguez-Mosquera MI, et al., 1989; Roca M, et al. 2001**). Las variaciones de concentración en la mayoría de los nutrientes están influenciados por el tipo de variedad, las condiciones de cultivo y el grado de madurez del fruto. Durante la maduración, el coeficiente entre clorofilas y carotenoides cambia debido a que la concentración de clorofilas disminuye. En el desarrollo de la aceituna, normalmente se distinguen tres fases: (**Soler-Rivas JC, et al., 2000**) una fase de crecimiento donde se produce una acumulación de oleuropeína, una fase de maduración verde que coincide con una reducción en los niveles de oleuropeína y de clorofila, y una fase de maduración negra que se caracteriza por la aparición de antocianinas, mientras los niveles de oleuropeína siguen cayendo.

Los compuestos fenólicos presentes en la aceituna pueden variar entre el 1 y 2 % y son representados básicamente por la oleuropeína, a la que se le atribuye sobradamente el amargor que aporta en el sabor del fruto (**García JM, et al. 2001; Gutierrez-Rosales F, et al. 2003**). Durante la maduración, la oleuropeína es parcialmente transformada en dimetiloleuropeína que se convertirá en el principal compuesto fenólico en la aceituna negra (**Romero C, et al. 2002**). **Saija y Ucelle (2000)** resumieron la estructura de los compuestos fenólicos, que variaban ampliamente desde simples compuestos hasta sustancias altamente polimerizadas como los taninos.

1.3.3.2 El aderezo de las aceitunas verdes

Las aceitunas verdes aderezadas en salmuera son aquellas tratadas con una lejía alcalina y acondicionadas posteriormente en salmuera (Norma del COI) en la que experimentan una fermentación láctica, total (a la Sevillana) o parcial. En la **Figura 1.4** se resume en esquema el proceso de aderezo (**Fernández Díez et al., 1985**).



Figura 1.4 Esquema del proceso de elaboración de aceitunas verdes aderezadas

Los frutos, que van desde el color verde amarillento al verde, una vez que han sido recogidos, se transportan a la Planta de Aderezo y después de ser escogidos, y parcialmente clasificados, son tratados en una solución diluida de hidróxido sódico, operación que se denomina cocido, así se elimina el amargor. Posteriormente, los frutos se lavan con agua varias veces en unos intervalos de tiempo variables para eliminar el exceso de lejía. Para terminar, se colocan en una salmuera en torno a los 10° Bé donde se produce la típica fermentación láctica de duración variable. Una vez que los frutos han fermentado, se seleccionan y clasifican según su tamaño y son envasados bien enteros, deshuesados, o rellenos con ingredientes varios.

1.3.3.3 Tipos de aceituna de mesa

Como se ha indicado, los distintos tipos de aceitunas de mesa se diferencian, fundamentalmente, por el grado de madurez de los frutos en el momento de la recolección y el color del producto final. Para la utilización entre las distintas variedades disponibles como aceituna de mesa se tienen en cuenta diversos factores; por un lado que la planta posea adecuados caracteres agronómicos y, que los frutos presenten buenas características tecnológicas, entre ellas a destacar, como propiedades físicas: tamaño y forma del fruto, relación pulpa/hueso, facilidad de desprendimiento del hueso (el deshuesado mecánico se facilita con un hueso recto y pequeño), textura (pulpa de calidad y epidermis fina) y color. (Ver principales variedades en epígrafe **1.3.3.7**)

Según la Reglamentación Técnico-Sanitaria Española para la Elaboración, Circulación y Venta de Aceitunas de Mesa, pueden distinguirse cuatro tipos:

- Verdes. Son las obtenidas de frutos recogidos durante el ciclo de maduración, antes del envero y cuando han alcanzado un tamaño normal. Estas aceitunas serán firmes, sanas y resistentes a una suave presión entre los dedos y no tendrán otras manchas distintas de las de su pigmentación natural, con ciertas tolerancias. La coloración del fruto podrá variar del verde al amarillo paja.

- De color cambiante. Obtenidas de frutos con color rosado, rosa vino o castaño, recogidos antes de su completa madurez, sometidos o no a tratamiento alcalino y dispuestas para su consumo.

- Negras. Son las aceitunas obtenidas de frutos que no estando totalmente maduros han sido oscurecidos mediante oxidación y han perdido el amargor mediante el tratamiento con lejía alcalina, debiendo ser envasadas en salmuera y preservadas

mediante esterilización con calor. A este tipo se le conoce en California como “aceitunas maduras” o “negras maduras”.

- **Negras naturales.** Obtenidas de frutos recogidos en plena madurez, o poco antes de ella, pudiendo presentar, según zona de producción y época de la recogida, color negro rojizo, negro violáceo, violeta, negro verdoso o castaño oscuro.

1.3.3.4 Recolección, transporte y valoración del fruto

El momento de la recolección del fruto es crítico para obtener un resultado final óptimo. Hay que recolectarlo cuando adquieren su mayor tamaño y justo antes del “envero” (cuando la coloración externa es verde amarillo-paja y aún no ha comenzado a tomar color rosado). En el caso de recolectarlo antes, la fermentación se desarrolla con dificultad, resultando duras y de sabor poco agradable; si se recolectan después el producto resulta blando y se conserva mal.

La recolección se realiza manualmente por el sistema denominado de “ordeño”, así se evita el dañado del fruto, que se va depositando sobre unos recipientes acolchados que llevan colgados del cuello, denominado “macaco”. Cuando éstos están llenos los colocan en cajas perforadas de unos 22 kg; en cualquier caso, en receptáculos especialmente diseñados para que la aceituna esté bien aireada y no resulte “molestada”.

El transporte se lleva a cabo en estos receptáculos o bien a granel, aunque entonces se produce cierto molestado en los frutos. Lo habitual es que se prescindan en campo de los frutos de pequeño tamaño, no comercializables, que se desechan junto a las hojas y ramillas. En cualquier caso, esta operación hay que realizarla en la Planta de Aderezo antes del tratamiento alcalino.

Ya en la Planta se toman los datos pertinentes del fruto para identificar la partida durante todo el proceso de elaboración, seleccionando una muestra representativa a la que se le realiza una primera valoración, y así fijar la calidad de la misma. Entre los datos fundamentales a determinar, tenemos: el porcentaje de los tamaños que no se aprovechan, el tamaño medio y la distribución de los tamaños, y el porcentaje de los defectos, distinguiendo entre el tipo y la intensidad de éstos. También se toman datos de la variedad, proveedor, finca, sistema de cultivo (secano o regadío), fecha de recolección, de entrada en la fábrica, estado de madurez, etc.

De todos los datos, se dejará constancia por escrito en la Hoja de Registro, en la que, finalmente, se anotará el número de fermentador al que irán destinados los frutos, así como cualquier otra incidencia que se estime oportuna.

En algunas industrias el fruto recibido no es volcado directamente a la tolva para ser procesado directamente tras su recolección, sino que el fruto reposa en unos contenedores, ubicados en el patio de recepción de la industria, antes de pasar a la línea de recepción y de ahí a la sección de procesado.

El “reposo” permite, en los casos en los que la textura del fruto no sea la adecuada, alcanzar la consistencia deseada, en función del estado de maduración de la aceituna, el tiempo estimado para evitar el “despellejado” es de dos a tres días, permaneciendo durante ese tiempo (el menor tiempo posible para evitar el molestado) bien aireadas, almacenadas en jaulas o contenedores de rejilla, fabricados de acero inoxidable, ya que si estuviesen a granel en un recipiente sin aireación, se producirían fermentaciones indeseadas, fenómeno conocido como “atrojado de la aceituna”

Como solución a este problema, y teniendo en cuenta el elevado coste que representa la recolección manual, se han establecido unas condiciones de recolección mecánica y transporte en líquido que reduzcan, en lo posible, el elevado porcentaje de molestado que experimentan los frutos recolectados de esta forma. Por ahora, se ha encontrado que el transporte en lejías diluidas (al 0,2 - 0,3 %), denominado “lejía de transporte”, evita el pardeamiento de las zonas golpeadas hasta el momento de su tratamiento con la lejía de cocido.

1.3.3.5 Cocido, lavado y colocación en salmuera

Se denominan cocederas a los depósitos de aceituna en los que transcurren las operaciones de cocido, lavado y puesta en salmuera, y fermentadores a los recipientes en los que se lleva a cabo el proceso fermentativo y posterior conservación del fruto.

Las cocederas son depósitos cilíndricos, contruidos en poliéster reforzado con fibra de vidrio, con un casquete esférico en la parte inferior que facilita la descarga del fruto. La parte superior debe tener la misma forma, para que los gases que se produzcan durante la fermentación escapen libremente.

En el cono de fondo, se coloca una válvula de esfera de PVC de 90 - 110 mm Ø, para realizar rápidamente la evacuación de los líquidos empleados, así como la descarga del fruto. Próxima a esta válvula se coloca otra de esfera de 30 ó 35 mm Ø, que se comunica al fermentador mediante unos taladros que permiten el

paso del líquido e impide el del fruto, facilitándose las recirculaciones y las correcciones necesarias.

En la parte inferior del carrete se coloca la rejilla del mismo material que el depósito, que encaja en unos pivotes e impiden el paso del fruto; para evitar la entrada de aire, la boca lleva un cierre hidráulico.

Las dimensiones normalizadas suelen ser de 2,5 m. de altura y 3,10 m Ø con un volumen de 16.000 litros y capacidad para unos 16.000 kg de aceitunas. Suelen ir apoyadas sobre pilares de 1,5 a 2 m de altura, debiendo situarse siempre en nave cubierta. (**Fernández-Diez et al., 1985**).

El objetivo de que estén elevados es facilitar la descarga por gravedad a los fermentadores, que como se ha indicado con anterioridad, normalmente son enterrados.

El tratamiento con una solución diluida de hidróxido sódico, operación denominada “cocido”, es la operación fundamental en el proceso de aderezo siendo su principal objetivo la hidrólisis de glucósido amargo oleuropeína, que es el responsable del característico amargor de este fruto. Es más, ejerce una acción muy compleja cuya consecuencia más importante es, que al colocar las aceitunas en la salmuera, ésta se convierta en un adecuado medio de cultivo donde se desarrolla la típica fermentación láctica (**Rodríguez de la Borbolla JM y Rejano L. 1979**).

En primer lugar se cierra la válvula del depósito y se empieza a llenar con agua hasta una cantidad aproximada de 5.000 litros. El objeto de esta operación es amortiguar los golpes que se producirían en el fruto al caer hasta el fondo del depósito, homogeneizar, disminuir la altura de caída del fruto y evitar el aplastamiento de las aceitunas durante la carga. Durante esta adición de agua se coloca el rejón que impedirá el paso del fruto durante las descargas de líquido que se llevará a cabo.

Una vez lleno el depósito con el agua y el fruto, se abre la válvula y se retira toda el agua. Inmediatamente se procede a la adición de lejía, que no durará más de 10 - 15 minutos, ya que desde el primer momento, el fruto en contacto con la lejía, comienza su cocido. Durante la realización del cocido, el fruto absorbe lejía, de 50 á 100 litros, siendo necesario reponerla antes de que las aceitunas queden en contacto con el aire, evitándose de esta forma el ennegrecido de las aceitunas no cubiertas.

El cocido finaliza cuando la lejía penetra de 2/3 a 3/4 de la pulpa y su concentración es tal, que durante el principio de la aplicación de agua al fruto, su acción llega aunque ya más débilmente, hasta el hueso, lo que es conocido como *recocado*.

A continuación, se procede a la descarga de la sosa cáustica, y se enjuaga el fruto, operación conocida como lavado, así hasta que el agua salga por el fondo completamente limpia en color y en partículas. El lavado es la operación complementaria del cocido, siendo su objetivo la eliminación de la lejía que permanece adherida a la superficie de los frutos y una parte de la que penetró en su interior, así como también, la eliminación parcial del amargor característico. La duración de este, dependerá de una serie de factores entre los que podemos resaltar: la concentración de la lejía empleada, la temperatura, programación de la empresa, duración del cocido, etc.

Normalmente, se pueden practicar uno o dos lavados. Si se practica un solo lavado será de larga duración, mientras que si son dos, el primero será más corto (2 - 3 horas) dando lugar al "recocido" de la aceituna indicado anteriormente, mientras que el segundo será más largo (10 - 12 horas).

Un lavado largo y enérgico elimina las últimas trazas de amargor y toda o casi toda la lejía, lo que facilita la consecución de bajos valores de pH durante la fermentación. También elimina el exceso de componentes solubles de las aceitunas, algunos de los cuales, como los azúcares y otras materias, tienen gran importancia en la fermentación posterior.

A mayor concentración de lejía y temperatura, mayor energía de tratamiento y más acentuada será su acción sobre la piel haciéndola más permeable. Se ha comprobado que el descenso del contenido en sal de las salmueras es más rápido cuanto mayor es la concentración de la lejía empleada.

La pérdida de azúcares y otras materias fermentables es tanto mayor cuanto más elevada sea la concentración de la lejía utilizada en el cocido, al aumentar la permeabilidad de la piel.

Por otro lado, los inhibidores presentes en las aceitunas no parecen afectar demasiado la fermentación láctica cuando se trata de aceitunas verdes colocadas directamente en salmuera de baja concentración, lo cual pudiera deberse a que en este tipo de elaboración los equilibrios son más lentos, lo que permitiría a los microorganismos iniciar su desarrollo y adaptarse posteriormente a las cantidades crecientes de inhibidores.

Finalizado el lavado, se deja ir el agua y se llena el depósito de salmuera, a una concentración del 10 - 11 %, pudiéndose en ese momento retirar el rejón.

Como se ha descrito, el cocido, lavado y puesta en salmuera de las aceitunas se lleva a cabo depósitos elevados ubicados en el interior de las instalaciones de la

industria, mientras que la fermentación de la aceituna y posterior conservación, tiene lugar normalmente en fermentadores enterrados en el patio de fermentación, a pesar de que existen otros tipos.

Antes de realizar el trasvase de aceitunas de los depósitos elevados o cocederas, a los fermentadores y desalojar el agua, se realiza la operación de puesta en salmuera del fruto lavado en la cocedera.

De esta forma, transcurridas de seis a ocho horas, se produce un equilibrio entre las aceitunas y la salmuera, dejando éstas de flotar y facilitando su salida. A partir de este momento se puede colocar una manguera de plástico flexible de 110 o 120 mm Ø a la válvula del fermentador y por gravedad se trasvasa el fruto de la cocedera ubicada en la nave hasta los fermentadores enterrados en el patio.

Una vez que ha finalizado el proceso de cocido y lavado, las aceitunas son trasvasadas hacia los depósitos de fermentación, descritos posteriormente.

1.3.3.6 Preparaciones comerciales

El concepto de "preparaciones comerciales" se utiliza en la Norma Cualitativa Unificada del Consejo Oleícola Internacional, y se corresponde con el de "elaboraciones" que aparece en la Reglamentación Técnico-Sanitaria Española. En este apartado se definen los distintos productos que aparecen en el mercado. Trata de incluir, de la forma más completa posible, tanto las elaboraciones artesanas y tradicionales como las derivadas de aquellas y perfeccionadas por la investigación.

La eliminación del amargor natural del fruto (debido a la presencia del glucósido oleuropeína, como se explicará más adelante), puede realizarse de forma prácticamente total y relativamente rápida, por hidrólisis alcalina, mediante el tratamiento de las aceitunas con soluciones acuosas diluidas de hidróxido sódico como fase previa al proceso de fermentación y conservación en salmuera, o de conservación en sal seca. En este caso, las preparaciones comerciales o elaboraciones incluyen en su denominación la palabra genérica "aderezadas".

También esta eliminación de amargor puede ser llevada a cabo de forma parcial y lenta, durante la fermentación en medio ácido de los frutos colocados directamente en salmuera, sin tratamiento alcalino previo, o conservados, también directamente, en sal seca. Estos dos últimos casos se denominan, genéricamente, "aceitunas en salmuera" y "aceitunas en sal seca", sin que aparezca el término aderezada. La expresión "negras naturales al natural", que se usa en algunas denominaciones, se debe a una simple redundancia.

A continuación, se describen las preparaciones comerciales más importantes definidas en la normativa:

- Aceitunas verdes aderezadas en salmuera.

Tratadas con una lejía alcalina y acondicionadas posteriormente en salmuera, en la que sufren una fermentación láctica natural total (a la sevillana, estilo español o estilo sevillano) o parcial. En el caso de que las aceitunas no estén sometidas a fermentación natural total, su conservación posterior, a un valor de pH comprendido entre los límites previstos en las normas, puede realizarse por esterilización o pasteurización, adición de productos de conservación, refrigeración o gas inerte, en este último caso, sin salmuera.

- Aceitunas verdes al natural en salmuera.

Son tratadas directamente con salmuera y conservadas por fermentación natural.

- Aceitunas de color cambiante aderezadas en salmuera.

Son las obtenidas tras un tratamiento alcalino y conservadas por fermentación natural, en salmuera simplemente y/o mediante tratamiento térmico.

- Aceitunas de color cambiante al natural en salmuera.

Tratadas directamente con salmuera, conservadas por fermentación natural y listas para el consumo.

- Aceitunas negras aderezadas.

Se conocen también como ennegrecidas por oxidación o simplemente como aceitunas negras. Se obtienen por oxidación en medio alcalino, a partir de frutos que no han alcanzado su completa madurez, y se conservan en salmuera mediante un proceso de esterilización por calor.

- Aceitunas negras aderezadas en sal seca.

Obtenidas a partir de aceitunas negras aderezadas dispuestas en capas alternativas de aceitunas y sal seca o por pulverización con sal seca.

- Aceitunas negras naturales en salmuera.

Aceitunas de este tipo tratadas directamente con salmuera. Tienen un sabor a fruto más acentuado que las negras naturales aderezadas y mantienen generalmente un ligero amargor. Se conservan por fermentación natural en salmuera, por esterilización o pasterización, o mediante un agente de conservación.

- Aceitunas negras naturales aderezadas.

Obtenidas a partir de frutos de este tipo tras un tratamiento alcalino, y conservadas por fermentación natural en salmuera, por esterilización o pasterización, o mediante un agente de conservación.

- Aceitunas negras naturales en sal seca.

Obtenidas de frutos cogidos en plena madurez que se conservan con capas alternativas de sal seca o por pulverización con sal seca.

- Aceitunas negras naturales arrugadas naturalmente.

Son las obtenidas de frutos cogidos después de su completa maduración, arrugadas en el árbol y tratadas directamente con salmuera o conservados con capas alternativas de sal seca.

- Aceitunas negras naturales, punzadas en sal seca.

Obtenidas de frutos cogidos en plena madurez y que previa perforación de la cutícula, se conservan con capas alternativas de sal seca o por pulverización con sal seca.

- Aceitunas negras naturales deshidratadas.

Obtenidas de frutos maduros después de haber sido escaldados y parcialmente deshidratados en sal, mediante calor muy suave.

- Aceitunas machacadas (partidas voluntariamente).

Obtenidas de frutos enteros, frescos o previamente tratados con salmuera, de cualquier tipo, sometidos a un procedimiento destinado a abrir la pulpa sin fracturar el hueso, que permanece entero en el fruto. Pueden tratarse con una lejía ligera y se conservan en una salmuera, eventualmente aromatizada, con o

sin adición de vinagre. Pueden presentar distintas variantes según el tipo de aceitunas (verdes, de color cambiante, etc.) y dependiendo de que se traten o no con lejía (aderezadas o al natural).

- Aceitunas seccionadas (rayadas).

Son las pertenecientes a cualquiera de los tipos, seccionadas en sentido longitudinal mediante incisiones practicadas en la piel y parte de la pulpa y puestas en salmuera, con vinagre o sin él, pudiendo incorporarse a la misma aceite de oliva y agentes aromatizantes. Pueden presentar, por tanto, distintas variantes, dependiendo del tipo de aceitunas, y según sean aderezadas o al natural.

- Especialidades.

Las aceitunas pueden prepararse de formas diferentes o complementarias de las indicadas anteriormente. Estas especialidades conservan la denominación de “aceitunas” siempre que los frutos utilizados respondan a las definiciones generales establecidas por las normas. Las denominaciones empleadas para las mismas deben ser lo suficientemente explícitas para no suscitar confusión en los compradores o consumidores, en cuanto al origen y naturaleza del producto, y especialmente con respecto a las denominaciones establecidas en la Reglamentación.

1.3.3.7 Principales variedades de aceituna que se cultivan en España

Según su importancia y difusión, las variedades de olivo cultivadas en España se clasifican en: principales (gran superficie cultivada y dominan, al menos, una comarca), secundarias (plantaciones regulares pero que no llegan a dominar ninguna comarca), difundidas (como árboles aislados en varias comarcas) y locales árboles aislados en una comarca). De las 24 variedades principales cultivadas en España (**Tabla 1.10**), destacan, especialmente en Andalucía:

Manzanilla, es la variedad de aceituna de mesa de mayor difusión internacional. Se cultiva en la provincia de Sevilla y se destina fundamentalmente a la elaboración de aceitunas verdes aderezadas en salmuera. Se conoce como aceituna

sevillana en España y como aceituna española en el extranjero. Es una variedad de vigor reducido y se adapta fácilmente al cultivo en plantaciones intensivas.

Es susceptible a la asfixia radical, a la clorosis férrica en suelos calizos y al frío invernal. Tiene una capacidad de enraizamiento media y su entrada en producción es precoz. Su época de floración es media y su polen presenta elevada capacidad para germinar, en España se cultiva sin polinizadores.

Su productividad es elevada y alternante, y su época de maduración es precoz y presenta elevada resistencia al desprendimiento. En España se recoge verde para el aderezo por fermentación al estilo sevillano, en Estados Unidos se recoge en enero, para su aderezo en negro por oxidación al estilo californiano. Suele ser la variedad de mesa más apreciada internacionalmente tanto por su productividad como calidad de su fruto.

Su contenido en aceite es medio y de gran estabilidad y calidad. La separación de la pulpa del hueso es fácil. Se considera muy sensible a verticilosis y sensible a repilo, tuberculosis, lepra y mosca.

Gordal, también está vinculada a la provincia de Sevilla. Tiene un fruto de gran tamaño algo asimétrico usado para aderezo. Es una variedad vigorosa cuando está injertada y presenta escaso vigor en sus propias raíces. Se considera tolerante al frío invernal y humedad pero es susceptible a la sequía. Su capacidad de enraizamiento por estaquillado semileñoso es muy baja, así que normalmente se recurre al injerto para su propagación.

Su entrada en producción es media con una época de floración media, es considerada autoincompatible, de elevado aborto ovárico y con un polen de muy baja germinabilidad. Tiene una productividad baja y alternante. La época de maduración de sus frutos es precoz y se destinan exclusivamente para el aderezo ya que su contenido en aceite es muy bajo.

Como aceituna de mesa es muy apreciada por el gran tamaño de sus frutos más que por su calidad. La separación de la pulpa del hueso es difícil y su débil textura, sensibilidad al cocido y tendencia al “alambrado” exigen un proceso industrial muy cuidadoso.

Su relación pulpa/hueso es alta y produce dos tipos de frutos: los normales y los “zofairones”, que son fruto partenocárpico que detienen su desarrollo prematuramente y maduran antes. Es resistente a repilo y susceptible a tuberculosis y aceitunas jabonosas (enfermedad también conocida por Antracnosis, Lepra o Momificado).

Hojiblanca, es una variedad dominante en Málaga y Córdoba, válida para aceite y para aceituna de mesa, tanto verde como negra. Es muy apreciada para su elaboración como aceitunas negras y aderezadas en salmuera. Tiene un enraizamiento fácil y es resistente a suelos calizos. Presenta resistencia a la sequía y tolerancia al frío invernal. Su entrada en producción es media y época de floración de media a tardía. Es autocompatible y su polen es de una calidad media.

Presenta una maduración tardía y la productividad es elevada alternante. Sus frutos presentan elevada resistencia al desprendimiento, esto hace que se dificulte su recolección mecanizada. Tienen doble aptitud y se consideran adecuados para el aderezo por la textura firme de su pulpa y también para aceite, apreciado por su calidad, aunque presentan un contenido bajo y de baja estabilidad. La separación de la pulpa del hueso es difícil. Es considerada susceptible a repilo, tuberculosis y verticilosis, al igual que no destaca por su resistencia a mosca y lepra.

Cacereña, o manzanilla cacereña, es una variedad poco vigorosa con una buena adaptación a suelos pobres y al frío invernal. Su capacidad de enraizamiento es muy alta. La entrada en producción es precoz y su época de floración es temprana, también considerada autocompatible y de bajo porcentaje de aborto ovárico con una productividad alta y constante.

La maduración de sus frutos es precoz y presentan baja fuerza de retención, lo que facilita su recolección mecanizada. Es muy apreciada para aderezo, tanto en verde como en negro, por la calidad de su pulpa. Su contenido en aceite es bajo aunque de calidad y la separación de la pulpa del hueso es fácil. Es susceptible a verticilosis y tolerante a mosca y tuberculosis.

Picual, así denominada por el ápice apuntado en su fruto, aunque es conocida con otras muchas denominaciones. Es la principal variedad por superficie cultivada en Andalucía al ser muy apreciada por su precoz entrada en producción, alta productividad, rendimiento graso y su facilidad de cultivo.

Aunque su aceite es de calidad media destaca por su alto contenido en ácido oleico e índice de estabilidad, tolerante a tuberculosis pero muy susceptible a repilo y verticilosis.

Carrasqueño de Córdoba, también conocido como *Picudo*. Es probablemente la variedad más emblemática de Córdoba y está amparada bajo la Denominación de

Origen de Baena y Priego de Córdoba. Es una variedad vigorosa y adaptada a zonas calizas. Es valorada por su elevado rendimiento graso y por las excelentes características organolépticas de su aceite. Tiene una gran capacidad germinativa.

Tiene una época de floración entre media y tardía y una maduración tardía. La elevada fuerza de retención de los frutos dificulta la recolección mecanizada. Presenta una doble aptitud aunque su principal destino es el aceite. Es muy sensible a repilo y tuberculosis.

En la **Figura 1.4 (Barranco D. et al., 2008)** pueden verse los frutos de las principales variedades, así como su proporción entre la pulpa y el hueso.

Tabla 1.10. Principales variedades de olivo cultivadas en España

Variedad	Superficie (ha)	Destino	Localización
<i>Picual</i>	860000	A	Jaén, Córdoba, Granada
<i>Cornicabra</i>	269000	A	Ciudad Real, Toledo
<i>Hojiblanca</i>	217000	A/M	Córdoba, Málaga, Sevilla
<i>Lechín de Sevilla</i>	105000	A	Sevilla, Cádiz
<i>Manzanilla de Sevilla</i>	85000	M	Sevilla, Badajoz
<i>Morisca</i>	74000	A	Badajoz
<i>Empeltre</i>	72000	A	Zaragoza, Teruel, Baleares
<i>Arbequina</i>	71000	A	Lérida, Tarragona
<i>Manzanilla Cacereña</i>	64000	A/M	Cáceres, Salamanca
<i>Picudo</i>	60000	A	Córdoba, Granada
<i>Farga</i>	45000	A	Castellón, Tarragona
<i>Lechín de Granada</i>	36000	A	Granada, Almería, Murcia
<i>Verdial de Huelva</i>	34000	A	Huelva, Sevilla
<i>Gordal Sevillana</i>	30000	M	Sevilla
<i>Verdial de Badajoz</i>	29000	A	Badajoz, Cáceres
<i>Morrut</i>	28000	A	Tarragona, Castellón
<i>Sevillena</i>	25000	A	Tarragona, Castellón
<i>Villalonga</i>	24000	A	Valencia
<i>Castellana</i>	22000	A	Guadalajara, Cuenca
<i>Verdial de Vélez-Málaga</i>	20000	A	Málaga
<i>Aloreña</i>	17000	A/M	Málaga
<i>Blanqueta</i>	17000	A	Alicante, Valencia
<i>Changlot Real</i>	5000	A	Valencia
<i>Alfajara</i>	4000	A	Valencia, Albacete
Otras	67000		
ESPAÑA	2280000		

Clave: A: Aceite; M: Mesa

Fuente: Inventarios Agronómicos del olivar

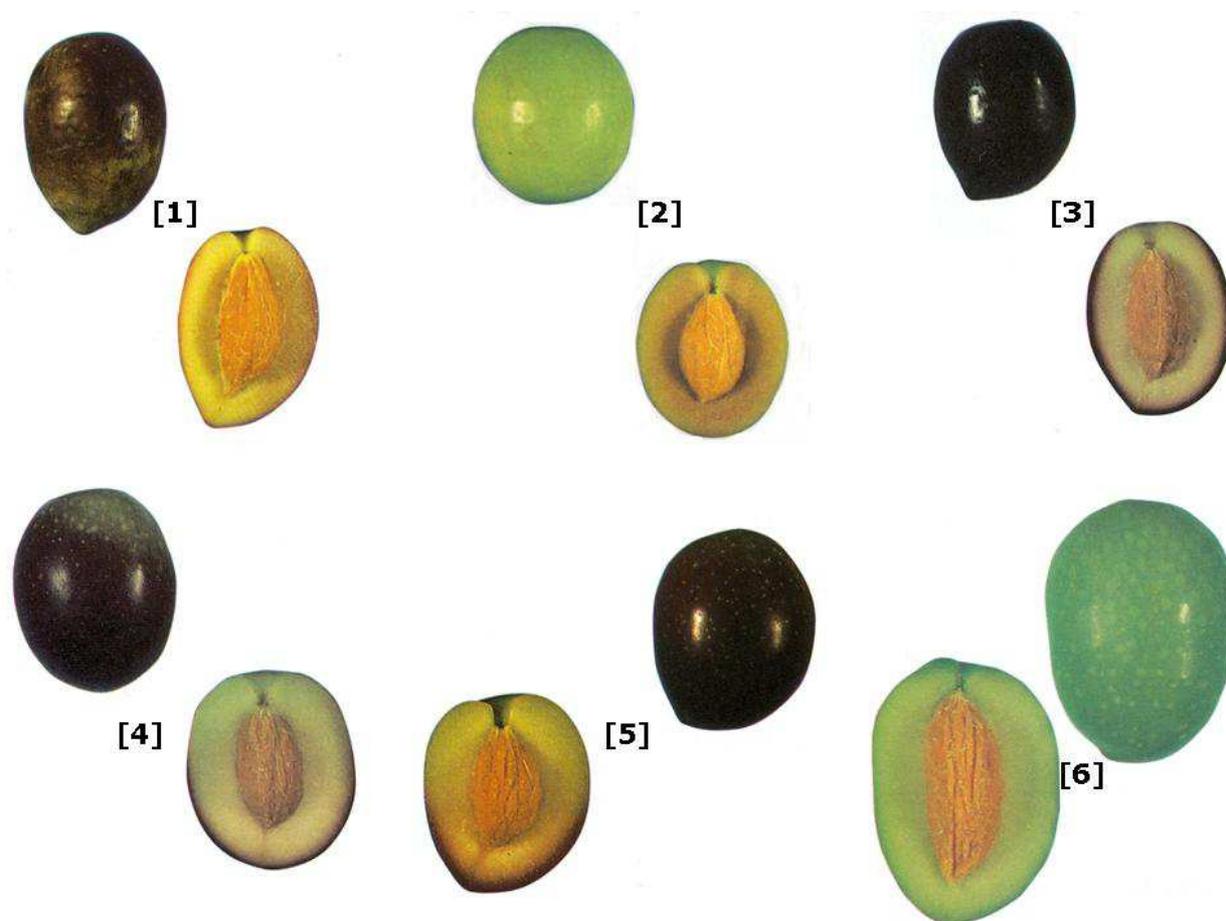


Figura 1.4 Principales variedades de aceitunas en Andalucía

Clave: [1] Carrasqueño de Córdoba; [2] Manzanilla; [3] Picual; [4] Hojiblanca; [5] Cacereña; [6] Gordal

1.3.4 Norma Comercial Aplicable a las aceitunas de mesa

(Fuente: COI. Resolución nº RES-2/91-IV/04)

La Norma Comercial aplicable a las aceitunas de mesa COI/OT/NC nº1 de diciembre de 2004, sustituye y deroga la Norma cualitativa unificada aplicable a las aceitunas de mesa en el comercio internacional T/OT/Doc. nº 15 de 2 de octubre de 1980 revisada en 1981.

Los Miembros adoptarán, según sus respectivas legislaciones, todas las disposiciones oportunas con vistas a la aplicación de la Norma adoptada y

comunicarán dichas disposiciones a la Secretaría Ejecutiva en cuanto hayan sido adoptadas.

Los Estados no miembros que intervienen en el comercio internacional de las aceitunas de mesa son invitados a tomar en consideración la Norma adoptada y a adaptar sus reglamentaciones a las disposiciones de dicha Norma.

Se recogen sólo en las normas del COI, CODEX y en las españolas, tanto internas (Reglamentación Técnico-Sanitaria) como para el comercio exterior (Norma de Calidad para la Exportación).

Pretenden asegurar unos requerimientos mínimos en el producto terminado tanto en condiciones generales como en su composición.

Así pues, las aceitunas de mesa, tras su selección y envasado, deberán presentarse:

- Sanas
- Limpias
- Exentas de sabor y olor anormales
- Con la madurez adecuada
- Exentas de defectos que puedan afectar a su consumo o conservación
- Sin materias extrañas
- Sin síntomas de alteración en curso o fermentación anormal
- Calibradas (sólo para enteras, deshuesadas, rellenas y mitades)
- De una sola variedad en el mismo envase
- De color uniforme, excepto aliñadas y de color cambiante
- Exentas de gérmenes patógenos o de sus toxinas

Para el uso de **ingredientes** se autoriza el empleo de los siguientes productos, que deberán cumplir los requisitos que les exijan sus reglamentaciones específicas, si las hubiere:

- Aceituna
- Agua
- Sal (cloruro sódico)
- Vinagre
- Aceite de oliva
- Azúcares alimentarios
- Rellenos (anchoa, pimiento, cebolla, etc., y sus pastas preparadas)
- Especies o hierbas aromáticas o sus extractos

- Salmuera (acidez mínima: 0,4 % en el caso de fermentación natural. Uso de salmuera madre sólo para envases a granel. Limpia y transparente para vidrio.

Esta definición de la salmuera puede generar algunas dificultades ante la reutilización de las mismas, como una medida de lucha contra la contaminación. Sería necesario contemplar la posibilidad de usar la salmuera madre también para los envasados siempre y cuando se aplicaran los métodos adecuados para su regeneración.

En función de la preparación comercial se marcan los límites de pH y sal en la salmuera de envasado. Deben respetarse escrupulosamente para evitar problemas sanitarios o de alteración del producto.

Otro apartado se refiere a los aditivos autorizados. En estos momentos, los mismos están regulados por una Directiva de tipo horizontal del Parlamento Europeo (Directiva 2001/5/CE, de 12 de febrero), incorporada al ordenamiento jurídico español mediante del Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la Lista Positiva de Aditivos para su uso en la elaboración de productos alimenticios.

En su aspecto de protección al consumidor la aceituna de mesa ha quedado afectada por la Directiva 1993/43/CE, de 14 de junio, relativa a la higiene de los productos alimenticios e incorporada al régimen jurídico español en el Real Decreto 2207/1995, de 28 de diciembre. En ella se establece la obligatoriedad de implementar métodos eficaces de control siguiendo los principios en los que se basa el sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC). La misma Directiva recomienda la puesta en práctica de Planes Generales de Higiene (PGH) y la aplicación de las normas de la serie ISO 9000, que abarcan a la totalidad de los diferentes aspectos de la empresa entre los que sin duda se encuentra el control microbiológico.

Respecto a la clasificación cualitativa tiene una aplicación reducida en las normas del COI, CODEX y españolas. Se limita a establecer tres categorías comerciales con unas determinadas tolerancias en defectos. Otros factores importantes en la valoración económica del producto como son la variedad y el tamaño del fruto tienen escasa relevancia.

En el producto acabado, todas las normas establecen el calibrado. Sin embargo, únicamente las normas estadounidenses ofrecen una denominación para los diferentes calibres. Para aceitunas verdes, éstos son iguales en todas las normas (aunque en las de Estados Unidos se aprecian ciertas agrupaciones). Sin embargo, en aceitunas negras los Estados Unidos adoptan una escala diferente. Si se quiere

exportar a ese país, hay que atenerse a ello y así lo aceptan las normas españolas de exportación.

Las categorías comerciales tampoco son, desafortunadamente, definidas de la misma forma en las normas del COI o en las españolas y en las normas de Estados Unidos. Las normas del COI (y españolas) hacen esta clasificación principalmente en función de los defectos de color, forma, epidermis y firmeza de la pulpa que presentan los frutos. En las de Estados Unidos la clasificación es más compleja.

En general, todas las normas requieren que el color sea apropiado al tipo de que se trate y que sea homogéneo. Por lo que respecta a la textura, que sea también la adecuada y no estén blandas en exceso. Esto significa que las aceitunas deben recogerse formando partidas homogéneas en estos dos atributos o separarse cuando entren en la fábrica.

1.3.4.1 Factores esenciales de composición

Los ingredientes básicos serán las aceitunas, tal como han sido definidas en la Norma, con o sin líquido de gobierno.

Las salmueras de acondicionamiento designan a las disoluciones de sales alimentarias en agua potable, adicionadas o no, en todo o en parte, de ingredientes mencionados anteriormente. La salmuera deberá estar limpia y exenta de materias extrañas no autorizadas, y ajustarse a las normas de higiene definidas en el punto 6 de la Norma (ver epígrafe **1.3.4.5**). Las características fisicoquímicas de la salmuera de acondicionamiento o del jugo tras equilibrio osmótico se muestran en **Tabla 1.11**, a su vez, las características del tratamiento térmico de pasteurización o esterilización aplicado a las aceitunas de mesa en **Tabla 1.12**.

Tabla 1.11 Clave: PCQ: Propias características químicas; ATM: Atmósfera modificada; C: Adición de conservantes; R: Refrigeración; P: Pasteurización; E: Esterilización; BPF: Buenas prácticas de fabricación.

Preparaciones	Concentración mínima de Cloruro Sódico %			Límite máximo de pH			Acidez mínima % Ácido Láctico		
	PCQ, ATM	C, R	P, E	PCQ, ATM	C, R	P, E	PCQ, ATM	C, R	P, E
Aceitunas aderezadas	5	4	BPF	4,0	4,0	4,3	0,5	0,4	BPF
Aceitunas al natural	6	6	BPF	4,3	4,3	4,3	0,3	0,3	BPF
Aceitunas deshidratadas y/o arrugadas	10	10	BPF	BPF	BPF	BPF	BPF	BPF	BPF
Aceitunas ennegrecidas por oxidación	BPF	BPF	BPF	BPF	BPF	BPF	BPF	BPF	BPF

Tabla 1.12 Clave: P: Pasteurización; E: Esterilización;

$UP_{z, tr}$: Unidades de pasteurización. Son los coeficientes de letalidad acumulada en procesos térmicos a temperaturas inferiores a 100 °C. En el caso de las aceitunas de mesa, se toman como microorganismos de referencia las bacterias propiónicas, cuya ecuación para los tiempos de destrucción térmica se define por una temperatura de referencia de 62,4 °C y una pendiente z de 5,25.

tr : Temperatura de referencia. Es la que corresponde a un “tiempo de reducción decimal” y que junto a la pendiente z define la representación logarítmica de la curva T.D.T. (Tiempo de Destrucción Térmica) de un microorganismo específico.

z : Es la pendiente de la representación logarítmica de los “tiempos de destrucción térmica” en función de la temperatura (curva T.D.T.) y equivale al número de grados necesarios para que la curva complete un ciclo logarítmico.

$F_o^{z_{tr}}$: Valor de esterilidad acumulada: es la integral, o suma de los valores de letalidad parcial, alcanzados durante el proceso de esterilización y expresados en términos de tiempos de exposición a una temperatura de referencia. Cuando la temperatura de referencia t_r se fija en 121 °C y la pendiente z en 10 °C se obtiene el valor F_o para las aceitunas ennegrecidas por oxidación.

Tiempo de reducción decimal: Tiempo de exposición al calor, expresado en minutos, necesario para reducir en una décima parte la población activa de una suspensión bacteriana.

Tiempo de destrucción térmica: Es el tiempo de exposición al calor, a una temperatura y condiciones determinadas, necesario para reducir un factor de 10^{12} la población microbiana inicial.

Coefficiente de letalidad: Es el recíproco del número de minutos precisos de exposición al calor para ocasionar la muerte de un microorganismo específico a una temperatura determinada.

Preparaciones	Unidades mínimas de letalidad microbiana	
	UP $5,25_{62,4}^{\circ C}$	$F_o^{10}_{121}^{\circ C}$
	P	E
Aceitunas aderezadas	15	-
Aceitunas al natural	15	-
Aceitunas deshidratadas y/o arrugadas	15	-
Aceitunas ennegrecidas por oxidación	-	15

1.3.4.2 Factores esenciales de calidad

Las aceitunas de mesa deberán tener el sabor, el olor, el color y la textura característicos del producto y ajustarse a las normas de higiene definidas en el punto 6 de la Norma (ver epígrafe **1.3.4.5**).

Haciendo una **clasificación cualitativa**, y según los defectos y tolerancias que figuran en la Norma, las aceitunas se clasificarán en una de las tres categorías comerciales siguientes:

- **Extra**: Se considerarán comprendidas dentro de esta categoría las aceitunas de calidad superior que posean en grado máximo las características propias de su variedad y su preparación comercial. No obstante, siempre que ello no afecte al buen aspecto del conjunto ni a las características organolépticas de cada fruto, podrán presentar muy ligeros defectos de color, forma o firmeza de pulpa o epidermis. En esta categoría solamente podrán clasificarse las aceitunas enteras, partidas, seccionadas, deshuesadas o rellenas de las variedades más selectas, siempre que su calibre sea superior a 351/380.

- **Primera** o "I" o Selecta: En esta categoría se incluirán las aceitunas de buena calidad, con un grado de madurez adecuado y que presenten las características propias de su variedad y preparación comercial, siempre que ello no afecte al buen aspecto del conjunto ni a las características organolépticas individuales de cada fruto, podrán presentar ligeros defectos de color, forma, epidermis o firmeza de pulpa. Podrán clasificarse dentro de esta categoría todos los tipos, preparaciones y presentaciones de aceitunas de mesa, salvo las "troceadas", las "rotas" y la "pasta de aceitunas".

- **Segunda** o "II" o Estándar: Comprenderá las aceitunas de mesa que, no pudiendo clasificarse en las dos categorías anteriores, respondan a las condiciones generales definidas para las aceitunas de mesa.

Defectos y Tolerancias en aceituna de mesa

• **Definición de los defectos**

- Materias extrañas inocuas: toda materia vegetal, como por ejemplo, hojas o pedúnculos aislados, que no sea nociva para la salud ni indeseable estéticamente, excluidas las sustancias cuya adición se autoriza en la Norma.

- Frutos manchados: aceitunas que presenten marcas superficiales que penetren o no en la pulpa, con una superficie superior a 9 mm².

- Frutos mutilados: aceitunas dañadas por desgarraduras del epicarpio hasta el punto de que una parte importante del mesocarpio esté al descubierto.

- Frutos rotos: aceitunas dañadas hasta el punto de que su estructura normal se vea alterada.
- Frutos arrugados: aceitunas anormalmente arrugadas hasta el punto de que su aspecto se vea alterado. No se considerarán como defecto las arrugas superficiales ligeras presentadas por determinadas preparaciones comerciales.
- Textura anormal: aceitunas excesiva o anormalmente blandas o duras en comparación con la preparación comercial considerada y con la media de una muestra representativa del lote.
- Coloración anormal: aceitunas cuya coloración difiera netamente de la que caracteriza la preparación comercial considerada y de la media de una muestra representativa del lote.
- Pedúnculos: pedúnculos adheridos a la aceituna y que sobresalgan más de 3 mm de la parte más saliente de la aceituna. Esto no se considera como un defecto en las aceitunas enteras presentadas con pedúnculo.
- Defectos del relleno: aceitunas presentadas como aceitunas rellenas, total o parcialmente vacías en comparación con la preparación comercial considerada y con la media de una muestra representativa del lote.
- Huesos o fragmentos de huesos (salvo para las aceitunas enteras): huesos enteros o fragmentos de hueso cuyo eje más largo mida más de 2 mm.

- **Tolerancias de defectos**

Las tolerancias máximas de defectos en cada categoría comercial y tipos de aceituna se muestran en **Tabla 1.13**.

Tabla 1.13. La evaluación de las tolerancias se realizará con una muestra mínima de 200 aceitunas recogida según los Planes de Muestreo para Alimentos Preenvasados (NQA 6,5) (CODEX STAN 233-1969).

	Categoría Extra			Categoría I			Categoría II		
	Verdes	Ennegrecidas por oxidación	Color cambiante y Negras	Verdes	Ennegrecidas por oxidación	Color cambiante y Negras	Verdes	Ennegrecidas por oxidación	Color cambiante y Negras
Deshuesadas o rellenas									
Tolerancias máximas en % de frutos									
Huesos y/o fragmentos de hueso	1	1	2	1	1	2	1	1	2
Frutos rotos	3	3	3	5	5	5	7	7	7
Defectos del relleno									
Aceitunas colocadas	1	1	1	2	2	2	-	-	-
Aceitunas tiradas	3	3	3	5	5	5	7	7	7
Enteras, deshuesadas o rellenas									
Tolerancias máximas en % de frutos									
Frutos manchados	4	4	6	6	6	8	10	6	12
Frutos mutilados	2	2	3	4	4	6	8	8	10
Frutos arrugados	2	2	4	3	3	6	6	6	10
Textura anormal	4	4	6	6	6	8	10	10	12
Color anormal	4	4	6	6	6	8	10	10	12
Pedúnculos	3	3	3	5	5	5	6	6	6
Acumulación máxima de tolerancias para estos defectos	12	12	12	17	17	17	22	22	22
Tolerancias máximas en unidades por kilo o por fracción									
Materias extrañas inocuas	1	1	1	1	1	1	1	1	1

NOTA: Para aceitunas presentadas en mitades, en cuartos, en gajos, en lonjas o rodajas, troceadas, rotas, aceitunas para ensalada (salvo su preparación con aceitunas enteras), en pasta de aceituna: se tolera la presencia de un hueso o de un fragmento de hueso por cada 300 g de contenido neto escurrido de pulpa de aceitunas.

1.3.4.3 Aditivos alimentarios y coadyuvantes tecnológicos.

Las sustancias siguientes podrán utilizarse solas o en cualquier combinación:

	Dosis máxima: g/kg [1]
Conservantes	
Ácido benzoico y sus sales de sodio o de potasio	1 g/kg (expresada en ácido benzoico)
Ácido sórbico y sus sales de sodio o de potasio	0,5 g/kg (expresada en ácido sórbico)
Acidificantes	
Ácido láctico	15 g/kg
Ácido cítrico	15 g/kg
Ácido L(+) tartárico	15 g/kg
Acido acético	Limitada por las BPF
Antioxidante	
Acido L-ascórbico	Limitada por las BPF
Estabilizantes [2]	
Gluconato ferroso	0,15 g/kg en Fe total
Lactato ferroso	0,15 g/kg en Fe total
Aromatizantes	
Aromatizantes naturales definidos por el <i>Codex Alimentarius</i>	Limitada por las BPF
Potenciadores del sabor	
Glutamato monosódico	5 g/kg
Otros [3]	
Endurecedores	
Cloruro cálcico	Limitada por las BPF
Lactato cálcico	Limitada por las BPF
Citrato cálcico	Limitada por las BPF

Espesantes y aglutinantes [4]	
Espesantes y aglutinantes para uso alimentario [3]	Limitada por las BPF
Otros aditivos [3]	
Coadyuvantes tecnológicos	
Cultivos de microorganismos lácticos	Limitada por las BPF
Nitrógeno, Gas carbónico, Lactato de manganeso.	Limitada por las BPF
Gluconato de manganeso, Hidróxido de sodio o de potasio, Ácido clorhídrico.	Limitada por las BPF

Clave: [1] Expresada en peso de la pulpa

[2] Para mantener el color de las aceitunas ennegrecidas por oxidación

[3] Definidos por el Codex Alimentarius para este producto

[4] Solamente para las pastas destinadas al relleno

1.3.4.4 Contaminantes

Las aceitunas de mesa de mesa deberán ajustarse a los límites de contaminantes establecidos para este producto por la Comisión del *Codex Alimentarius*.

1.3.4.5 Higiene

Se recomienda que las aceitunas de mesa se preparen y manipulen de conformidad con las secciones pertinentes del *Código Internacional de Prácticas Recomendado. Principios Generales de Higiene de los Alimentos* (CAC/RCP 1-1969, Rev. 3- 1997, enmendado en 1999), con el *Código de Prácticas de Higiene para Alimentos poco Ácidos y Alimentos poco Acidificados Envasados* (CAC/RCP 23-1979, Rev. 2-1993) y con los demás documentos Codex pertinentes, como los códigos de prácticas de higiene y demás códigos de prácticas.

Los productos deberán ajustarse a todo criterio microbiológico establecido de conformidad con los *Principios para el Establecimiento y la Aplicación de Criterios Microbiológicos para los Alimentos* (CAC/GL 21-1997).

En la medida en que lo permitan las buenas prácticas de fabricación, las aceitunas de mesa no deberán contener materias objetables.

Las aceitunas y la salmuera deberán estar exentas de toda alteración microbiológica provocada en particular por una fermentación pútrida, butírica o “zapatera”.

Analizadas con métodos apropiados de muestreo y examen, las aceitunas de mesa:

- No deberán contener microorganismos patógenos y contaminantes capaces de reproducirse en el producto en condiciones normales de almacenamiento; y
- No deberán contener ninguna sustancia que derive de microorganismos en cantidades que puedan representar un peligro para la salud.

Las aceitunas fermentadas conservadas a granel en un líquido de gobierno podrán contener los microorganismos presentes durante la fermentación, en especial bacterias lácticas y levaduras. El número de estos microorganismos (bacterias lácticas y/o levaduras) contados en un medio de cultivo selectivo podrá, en cada caso, ser de 10^9 u.f.c. (unidades formadoras de colonias)/ml de salmuera o por gramo de pulpa según el nivel de fermentación.

Las aceitunas conservadas por esterilización térmica (como las aceitunas ennegrecidas por oxidación) deberán haber recibido un tratamiento de transformación suficiente, tanto en tiempo como en temperatura, para destruir las esporas de *Clostridium botulinum*.

Por último, Las aceitunas deberán etiquetarse de conformidad con la *Norma General del Codex para el Etiquetado de Alimentos Preenvasados* (CODEX STAN 1-1985, Rev. 1-1991, enmendada en 2001).

1.3.5 El sector Agroalimentario Español

La industria alimentaria representa una parte muy importante del producto industrial de España, con un cifra de producción superior a los 55.000 millones de euros y un empleo directo generado de más de 380.000 trabajadores (M.A.P.A., 2002).

En cuanto a su tejido empresarial se puede señalar la concurrencia de un gran número de pequeñas y medianas empresas y, por otro lado, de un reducido número de grandes firmas que, sin embargo, controlan cuotas de mercado muy significativas. Al mismo tiempo conviven grandes compañías multinacionales y empresas de capital español de tamaño no desdeñable, que además se encuentran en la vanguardia competitiva de sus respectivos subsectores.

La industria alimentaria es un sector de importancia estratégica para el país y presenta oportunidades de desarrollo que deben ser aprovechadas. Esto es más

necesario si cabe en Andalucía, donde se encuentra una gran parte de la producción bruta de alimentos, pero no hay un aparato industrial comparable al de otras zonas de España. En consecuencia, muchas veces los productos agrícolas se venden en bruto, perdiendo el valor añadido que se obtiene al adecuarlos a los requisitos que el consumidor pide, los que son cada vez más exigentes.

1.3.5.1 Modelo alimentario español

Los modelos alimentarios de los países evolucionan paralelamente a su desarrollo económico, social y cultural. Por tanto, para analizar el modelo agroalimentario español tenemos que tener en cuenta la evolución que ha sufrido la sociedad y la economía española.

A pesar de la actual situación económica, en la que se ha visto reducido notablemente el crecimiento industrial precedente, entre otros, España conoció en las últimas décadas un sensible desarrollo económico y social, que se constata en los niveles de renta y de consumo, en la mejora de infraestructuras y en los usos y costumbres de una sociedad que ha evolucionado de forma vertiginosa hasta integrarse de forma plena con los principales países europeos.

Este escenario ha englobado al sector agroalimentario en sus múltiples vertientes: la producción de materias primas; la transformación industrial; el comercio exterior, importaciones y exportaciones de materias primas y de productos transformados; la distribución comercial y la relación final entre consumo y dieta alimentaria.

La evolución registrada en este sector se puede resumir en los siguientes aspectos:

En el sector productor, la agricultura española ha tenido que adecuarse a los criterios que rigen en la Unión Europea. Las consecuencias son un mayor protagonismo del mercado frente al intervencionismo oficial, al menos para el comercio dentro de la Unión. En cuanto al comercio exterior se le acusa a la Unión Europea de un excesivo proteccionismo, que es contrario a las tendencias actuales de liberalización del mercado mundial.

También se produce un progresivo ajuste de la oferta a la demanda, existiendo para muchos sectores cuotas de producción y penalizaciones por excedentes, así como una superficie cultivada máxima subvencionable. Éste es otro de los aspectos a destacar, la disposición de crecientes recursos financieros procedentes de la Unión Europea.

Finalmente, con la necesidad de ser competitivos han aflorado las carencias estructurales arrastradas en muchos subsectores, por ello se crearon los programas de desarrollo, subvencionados con fondos europeos. Igualmente se observa una disminución progresiva de la población activa dedicada a la actividad agraria.

En el escalón industrial, la agro-alimentación española se ha visto inmersa en una considerable internacionalización de su mercado nacional, tanto por la presencia de capital foráneo en empresas radicadas en España, como por la apertura hacia producciones de otros países. Entre tanto, algunas empresas nacionales punteras realizaban el camino en sentido contrario (invirtiendo y vendiendo fuera), mientras que el sector en su conjunto demostraba un dinamismo importante en cuanto a su protagonismo dentro del conjunto de la actividad industrial y económica.

La distribución comercial ha acumulado, probablemente, los cambios más espectaculares. La irrupción de nuevas formas comerciales, y su paulatina participación en el mercado, ha traído consigo un nuevo reparto de poderes entre establecimientos tradicionales, supermercados e hipermercados con unas consecuencias evidentes para toda la cadena agroalimentaria.

Finalmente, y en parte como causa y efecto de todo lo anterior, los hábitos de consumo y de dieta alimentaria han ido evolucionando en España hacia una paulatina homogeneización con el resto de países de la Unión Europea. Mayor homogeneidad que pasa, entre otros aspectos, por la exigencia y la existencia de una mayor seguridad alimentaria, la presencia creciente de productos transformados y una preocupación generalizada por el consumo de productos calificados como "sanos y naturales".

1.3.5.2 Búsqueda de la calidad alimentaria.

España ha sido y es uno de los principales defensores y promotores dentro de la Unión Europea de un sector agroalimentario de calidad, entendido este concepto como relación con el origen geográfico o las técnicas de elaboración de determinadas producciones.

La Unión Europea, como ocurre en otras áreas del mundo con economías y agriculturas desarrolladas, ha superado, afortunadamente, el objetivo de abastecimiento y seguridad alimentaria, que figuraban como condición básica en los principios fundacionales de la Política Agraria Común. En este contexto, el concepto de calidad alimentaria, entendido como disposición de alimentos suficientes y en unas correctas condiciones higiénico-sanitarias, pasa a ser sustituido por el de

producciones que se diferencian por sus especiales técnicas de elaboración y ligados generalmente a denominaciones geográficas (**Marsilio V, 2002**).

Actualmente las políticas agroalimentarias intentan combatir las producciones excedentarias, así como las técnicas intensivas de producción, cuyos resultados son a menudo contradictorios. En muchos productos se sustituye por la búsqueda de producciones con denominación de origen, que utilizan en su gran mayoría prácticas extensivas y técnicas de producción perfectamente adaptadas a sus ecosistemas tradicionales y naturales.

Los sectores productivos que se enmarcan en estas políticas obtienen una mayor rentabilidad, una mayor concentración de la oferta y una progresiva y permanente modernización de estructuras, favorecido todo ello por el funcionamiento de mercados con demanda creciente y alta valoración social. En el escalón industrial, las producciones ligadas al origen impulsan el desarrollo de estructuras de transformación en medios rurales, con una importante presencia de cooperativas y de pequeñas y medianas empresas.

El reto está para la industria agroalimentaria española en la distribución comercial y en la búsqueda de nuevos mercados para estos productos. Desde siempre el problema de España ha sido la falta de espíritu mercantilista, lo que ha originado que a pesar de tener los mejores productos en muchos subsectores alimentarios, no hayamos logrado imponernos y vender adecuadamente el producto, o al menos, haber explotado su potencial. Mientras, en otros países con menor tradición agrícola, pero que dominan las artes del comercio, exportan sus productos por todo el mundo y a bajo precio.

Dentro de este contexto, el tener una producción de calidad debido a su relación con el origen y sus técnicas de producción características ayuda, sin lugar a dudas, a ampliar los horizontes comerciales, no sólo por las estrategias de productores e industrias, sino por la presión de la demanda de los consumidores.

1.3.5.3 Denominaciones de Origen como mejora de la competitividad.

El consumo de alimentos muestra una notable inelasticidad respecto a la renta, una vez alcanzado el nivel correspondiente a un país industrial avanzado, como es el caso de España. En ese momento la demanda alimentaria se estanca cuantitativamente y los únicos nichos para el crecimiento se encuentran en una mejor presentación y en una producción diferencial.

Estos conceptos se aplican tanto al consumo interno, como al comercio exterior. La apertura de mercados que conlleva el que España se encuentre dentro de la Unión Europea, así como la progresiva liberalización de los mercados mundiales, supone la entrada, vía importaciones, de productos antes desconocidos, normalmente de elevada calidad y presentación además de bajo precio, que compiten directamente con las producciones propias.

El efecto inverso es que se puede aprovechar un mercado de 500 millones de consumidores europeos, aumentando las exportaciones de nuestros productos. Para ello es imprescindible aumentar la competitividad, tanto en precio, como en presentación y calidad del producto.

En este sentido se está desarrollando y ampliando cada vez más el sistema de las Denominaciones de Origen. Así se ratifican los productos que tradicionalmente han sido amparados por etiquetas de calidad, como por ejemplo los vinos, y se extiende a nuevos productos, en ocasiones difícilmente imaginables como espárragos, alubias o carnes.

En el marco europeo, a su vez, se apoya esta tendencia productiva. De hecho en 1992 se aprobaron dos Reglamentos que dan un marco legal para destacar a las producciones ligadas al origen y elaboradas con técnicas muy cuidadas, respondiendo así al interés demostrado por España en esta materia. Este es un hecho histórico para países que, como España, han defendido un concepto "cualitativo" de lo agroalimentario frente a la posición puramente "higienista y de seguridad" tendente a homogeneizar las producciones, defendida por el bloque de los países del Norte, que perciben los signos de calidad como simples barreras proteccionistas que es preciso eliminar.

En estos Reglamentos se indican las características de esta "Calidad Alimentaria", que en la Unión Europea se articula alrededor de tres grandes objetivos:

- Asegurar la variedad de la producción.
- Representar una vía para la diversificación empresarial.
- Permitir la potenciación de productos propios, ligados a la nueva idea de gastronomía, en la que se incluye el concepto de patrimonio cultural.

En definitiva, la realidad actual de la industria agroalimentaria incluye como elemento imprescindible la calidad higiénica y sanitaria de los productos, incorporada a toda la legislación comunitaria y nacional; y además como una vía de diferenciación y de mejora de la competitividad, dentro de un mercado tan amplio y que cada vez lo

va a ser más, existen las Denominaciones de Origen, con una legislación que da un respaldo oficial a las especificidades de ciertos productos alimentarios.

1.3.5.4 Denominaciones de Calidad en la Unión Europea.

El 14 de julio de 1992, el Consejo de Ministros de Agricultura de la antigua Comunidad Europea aprobó dos Reglamentos destinados a proteger los productos alimentarios con una definición geográfica o que presenten características específicas.

El Reglamento (CEE) n° 2081/1992 relativo a las Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) e Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP) de los productos agrícolas alimenticios, y el Reglamento (CEE) n° 2082/1992 relativo a la certificación de las características específicas de los productos agrícolas y alimenticios.

Así se establecen distintas figuras ligadas al concepto de calidad:

- *Denominación de Origen Protegida (DOP)*
- *Indicación Geográfica Protegida (IGP)*
- *Certificación de características específicas.*

Las figuras de protección DOP e IGP contemplan dos niveles diferentes de exigencias en la vinculación del producto con el medio geográfico. Ambas definiciones tienen una parte común y una que establece netamente la diferenciación. En la parte común, la DOP y la IGP coinciden cuando se asegura que ambas hacen referencia al nombre geográfico de una región o de un lugar determinado.

La diferencia fundamental entre una y otra figura se establece en los siguientes aspectos:

Para las Denominaciones de Origen, se habla de productos "cuya calidad o características se deban fundamentalmente al medio geográfico con sus factores naturales y humanos, y cuya producción, transformación y elaboración se realicen en la zona geográfica delimitada".

Para las Indicaciones Geográficas Protegidas, se habla de productos "que posean una cualidad diferencial entre los de su misma naturaleza y que pueda atribuirse a dicho origen geográfico, ya sea por la materia prima base empleada o porque su transformación y/o elaboración se realicen en la zona geográfica delimitada".

Estas figuras se inscriben perfectamente en la realidad española, siendo la definición de Denominación de Origen concordante con la que existe en España,

mientras que la de Indicación Geográfica puede asimilarse con las Denominaciones Específicas.

Una diferencia importante con la normativa española es que en nuestro sistema la aplicación era directa solamente para el vino y otros productos vitivinícolas o derivados de alcoholes, siendo necesario proceder a sucesivas ampliaciones del régimen para incluir nuevos productos. Los Reglamentos europeos, sin embargo, contemplan todos los que se habían incluido en nuestro régimen y bastantes más, de hecho, la mayoría de los productos agroalimentarios como carnes, pescados, crustáceos y moluscos; leche y productos lácteos; huevos de ave; miel; legumbres; frutos comestibles; cereales; aceites vegetales; etc. No obstante, excluye los productos del sector vitivinícola y las bebidas espirituosas de su ámbito de aplicación.

Por su parte, la certificación de características específicas viene a sancionar los métodos tradicionales de elaboración y el saber hacer de los productores, que en muchos casos han sido objeto de imitación. Así una agrupación de productores y/o transformadores que trabajen con el mismo producto pueden solicitar el registro de esas características específicas con un nombre determinado. Estas certificaciones se conocen también como especialidades tradicionales garantizadas (ETG).

Estos Reglamentos han sido perfectamente adoptados por el sector alimentario español, dando una cobertura legal y un respaldo oficial a los productos ligados al origen o que presenten características específicas. La consecuencia ha sido una mejora de la competitividad y de la imagen frente al consumidor que sabe que hay un respaldo serio tras estos productos.

1.3.5.5 Otras figuras de calidad.

Las Denominaciones de Calidad son unas figuras de protección muy utilizadas en el contexto agroalimentario. No existen, en sentido estricto, en otros productos, sólo en los agroalimentarios. Se pueden clasificar en dos grandes grupos: las que gozan de una protección específica por parte de la Administración como las anteriormente comentadas Denominaciones de Origen, Denominaciones Específicas y Especialidades Tradicionales Garantizadas, además de las indicaciones Agricultura Ecológica y Producción Integrada; y las que están reguladas exclusivamente en la ley de marcas como las Marcas Colectivas y las Marcas de Garantía (con la excepción de algunos distintivos de calidad promovidos por la Administración).

La Agricultura Ecológica está regulada en base al Reglamento (CEE) n° 2092/1991 sobre la producción agrícola ecológica, y está alcanzando un gran

auge. Se trata de un método específico de producción, que implica importantes restricciones en la utilización de fertilizantes o pesticidas con el consiguiente beneficio para la salud y la conservación del medio ambiente. Protege aquellos productos agroalimentarios en cuya producción, elaboración y conservación no se han empleado productos químicos de síntesis, cumpliendo, además, las normas específicas para cada producto y las Reglamentaciones Técnico-Sanitarias vigentes.

La Producción Integrada en Andalucía se rige por el Decreto 215/1995 de la Consejería de Agricultura y Pesca. Es un sistema menos riguroso que la indicación Agricultura Ecológica, permitiendo el uso de fitosanitarios de forma reducida. Preconiza una agricultura moderna, respetuosa con el medio ambiente, que minimice el uso de productos químicos y que permita obtener, a la vez, productos con un alto rendimiento.

Las marcas colectivas pueden ser solicitadas por las asociaciones de productores, fabricantes, comerciales o prestadores de servicios para diferenciar en el mercado los productos o servicios de quienes no forman parte de dicha asociación. Las marcas de garantía son el medio o signo que certifica las características comunes, los componentes y el origen de los productos elaborados por personas debidamente autorizadas y controladas por el titular de la marca.

1.3.5.6 Futuro de la industria agroalimentaria.

Existe un debate sobre si el futuro de la producción alimentaria se va a decantar a la concentración de las empresas que, por una mayor economía de escala y disponibilidad de recursos económicos, sean capaces de cubrir más mercado con una adecuada relación “beneficio-coste”. Y si, como consecuencia de ello, las producciones menos homogéneas, más minoritarias, más personalizadas, acabarían sucumbiendo.

Esto no tiene que suceder, pues cada tipo de producción tiene que buscar su sitio en el mercado. De hecho, en la actualidad, las producciones de calidad diferenciada tienen un gran futuro, en función de que las grandes empresas se van haciendo más homogéneas e incluso más universales en términos geográficos.

Es el principio de la acción y la reacción. Junto a la alimentación que en Estados Unidos denominan tipo *grazing* (pastoreo) existirá la degustación. La etiqueta nutricional es importante, pero también la que nos asegure unas características organolépticas ligadas al buen hacer y la cultura de los pueblos. Por otra parte, la

gran empresa no tiene que estar en confrontación con los denominados productos de calidad, entendida ésta en el sentido de la diferenciación y personalidad.

En resumen, junto a las grandes empresas nacionales o multinacionales que sitúan sus marcas en el mercado al amparo de fuertes campañas de publicidad, se encuentra el sistema de productos con Denominación de Origen que presenta la alternativa de una agricultura diferenciada, con unas normas tradicionales de elaboración, que implican generalmente costes superiores, y proporciona la posibilidad de organizar la economía de las áreas agrícolas teniendo en cuenta únicamente los intereses comunes, sin estar mediatizados por los intereses particulares de otras empresas ajenas a la zona de producción. Son una forma de defender las tradiciones además de un medio eficaz de competir en el mercado.

1.3.6 Instalaciones Industriales

Las fábricas de aderezo por regla general disponen de amplias instalaciones con una tecnología relativamente sencilla y moderna que requiere, en algunas fases del proceso un alto índice de empleo de mano de obra.

El desrabado, deshuesado y relleno son operaciones mecanizadas así como la operación de escogido mecánico donde se separan las aceitunas moradas a la recepción en la fábrica.

Los fermentadores en las fábricas de aderezo en Andalucía están distribuidos principalmente como enterrados (87 %), los aéreos y en bodega son aún minoritarios (6 % y 7 % respectivamente).

1.3.6.1 Fermentadores

Se denominan fermentadores a los depósitos, de gran capacidad, en los que tiene lugar el aderezo y conservación de las aceitunas. Se fabrican en poliéster reforzado con fibra de vidrio y resinas de tipo alimentario. Los hay de distintas capacidades, pero los que funcionan mejor son los de 16.000 litros, que pueden contener de 9.500 a 10.000 kg de aceitunas, dependiendo del tamaño del fruto, y de 6.500 a 6.000 litros de líquido. Con capacidades menores aumentan los costes de instalación y los de mano de obra por kg de fruto elaborado. Se fabrican también fermentadores de 24.000 litros de capacidad, que corresponden a 15.000 kg de aceitunas. Permiten un ahorro de superficie pero pueden presentar problemas en la

homogeneización del conjunto salmuera-aceitunas. En cualquier caso, la altura total de los fermentadores no debe exceder de 3 metros, ya que con cotas superiores se aumenta el riesgo de obtener un fruto aplastado. Los fermentadores se pueden disponer aéreos o enterrados.

Los fermentadores aéreos son de forma cilíndrica, por razones de resistencia mecánica, de 3,1 metros de diámetro y 2,3 m de altura (para 16.000 litros de capacidad). Su parte inferior es un casquete esférico que permite la fácil salida del fruto y la evacuación total de la lejía, aguas de lavado y salmuera. La parte superior tiene la misma forma, para que los gases que se producen durante la fermentación escapen libremente.

En el casquete esférico inferior se disponen dos válvulas de esfera de PVC, una para la salida del fruto, y otra con una reja de poliéster para la evacuación de la lejía de cocido y aguas de lavado, así como para la realización de las recirculaciones y correcciones que tienen lugar durante la fermentación y conservación. Además lleva tres patas de apoyo.

En el centro del casquete superior se dispone una boca, formada por un cilindro de 50 ó 60 cm Ø y 60 ó 70 cm de altura, llamada "carrete", por la que se realiza la carga del fruto, adición de líquidos, limpieza, etc. Este cilindro sirve de vaso de expansión que compensa los aumentos y disminuciones de volumen que se producen por los cambios de temperatura. En la parte inferior del carrete se coloca una rejilla del mismo material que el fermentador, que encaja en unos pivotes e impide que el fruto pase a través de ella. Para evitar la entrada de aire la boca lleva un cierre hidráulico.

Los fermentadores enterrados están cubiertos hasta el cuello por hormigón celular o arena. Para ello se realiza una excavación en la que posteriormente se introducen. Se construyen de forma esférica, de 3,10 m Ø, consiguiéndose con ello una mejor resistencia mecánica que permite reducir el espesor de las paredes y, por lo tanto, su coste. Los materiales de fabricación son los mismos, pero su parte exterior debe protegerse con resinas de poliéster anticorrosivo. La boca es igual que en los fermentadores aéreos. En la parte inferior, en cambio, la válvula de descarga se sustituye por una poza.

1.3.6.2 Sistema tradicional de elaboración: fermentadores enterrados

Muchas industrias disponen de instalaciones de fermentación enterradas. De esta manera se aíslan los depósitos de las fluctuaciones térmicas día-noche y se aprovecha la inercia térmica del suelo para la preservación de las temperaturas estivales. El objetivo es mantener una buena temperatura de fermentación el mayor tiempo posible. Por ello, si la instalación está bien construida, las pérdidas de calor serán pequeñas.

Junto a esta instalación, para las operaciones de cocido y lavado, se precisan un grupo de fermentadores aéreos, que estarán dentro de una nave cubierta donde se realizan también las restantes operaciones de selección, clasificación, preparaciones y envasado.

○ Características constructivas

La instalación de fermentadores enterrados es sencilla, pero necesita una serie de operaciones de acondicionamiento del fondo y de las paredes de la excavación para evitar problemas. Si no se realizan adecuadamente pueden producirse deformaciones del fermentador por empuje del terreno, con el riesgo de formaciones de grietas o fisuras que causan la pérdida y/o la contaminación de la salmuera.

Por otro lado, si la evacuación de las aguas subterráneas no se hace correctamente puede dar lugar a corrosiones o a que el fermentador se mueva o incluso flote mientras se realiza la carga, descarga o en los períodos en que permanezca vacío.

Tras la excavación y preparación del terreno, en el fondo se dispone una capa de hormigón en masa de 10 cm de espesor y una pendiente del 2 %, para conducir las filtraciones de agua que se puedan producir hacia una arqueta fuera de la zona de fermentadores. Esta arqueta debe ir provista de un motor bomba para evacuar el agua acumulada de forma automática cuando se llega al nivel máximo. Las filtraciones de agua pueden ser un grave inconveniente en terrenos en los que durante el invierno el nivel de la capa freática está muy alto.

En las paredes laterales de la excavación se levanta un muro de hormigón en masa para evitar los empujes laterales del terreno.

Sobre la solera de hormigón se extiende una capa de arena o grava de 30 cm de espesor con función filtrante. A continuación se pueden colocar los fermentadores esféricos. Éstos se apoyan en una capa de hormigón ciclópeo vertida previamente, de

altura suficiente para que todo el fondo del fermentador asiente sobre la misma. Esta capa puede sustituirse por una corona esférica de hormigón en masa, o bien, por razones económicas, por arena inerte, en cuyo caso hay que compactarla perfectamente para asegurarse que haya buen asiento. Los fermentadores se colocan a tresbolillo, con lo que se consigue un ahorro de superficie de terreno, debiendo estar separados unos de otros de 10 a 12 cm.

Finalmente, se rellena la excavación hasta el cuello de los fermentadores con arena inerte o con hormigón celular, aunque ésta última solución es más cara. Para poder andar y trabajar con comodidad, en la superficie se dispone una solera de hormigón en masa de 10 cm de espesor con pendiente del 2 % hacia las arquetas de desagüe.

- **Manejo de la instalación**

Además de los fermentadores enterrados, la industria debe disponer de unos fermentadores aéreos para el tratamiento con lejía, lavados y puesta en salmuera del fruto. Éstos estarán en una nave cubierta y apoyados sobre pilares de 1,6 a 1,8 m de altura.

Carga del fermentador aéreo

Una vez que las aceitunas han sido clasificadas se mandan a los fermentadores aéreos mediante cintas elevadoras y transportadoras. Previamente los depósitos se llenan de agua hasta una cantidad de 4.000 - 5.000 litros. Ésta tiene por objeto amortiguar los golpes que se producirían en el fruto al caer hasta el fondo del fermentador, e incluso disminuye la altura de caída, homogeneiza y evita el aplastamiento de las aceitunas durante la carga. No conviene cargar en exceso el fermentador, debido al crecimiento del fruto que podría ocasionar aplastamientos y a que se realizan mejor las operaciones si las aceitunas permanecen sueltas.

Una vez lleno de fruto, se abre la válvula de descarga de líquidos hasta tirar toda el agua y se procede inmediatamente a realizar la adición de lejía. Esta operación no debe durar más de 10 - 15 minutos, para que no haya diferencias en el tiempo de contacto de la disolución de NaOH con las distintas aceitunas. Durante la realización del cocido el fruto absorbe lejía (de 50 a 100 l) que habrá que reponer antes de que éste quede en contacto con el aire, evitándose de esta forma las aceitunas negras de boca.

El punto final del cocido se determina mediante toma de muestras de varios puntos, comprobando que la penetración de la lejía ha alcanzado de dos tercios a tres cuartos de la distancia de la piel al hueso. Una vez terminado se vacía la lejía e inmediatamente se cubren las aceitunas con agua. El número y duración de los lavados es variable y la tendencia actual, considerando la escasez de agua y la contaminación que producen estos vertidos, es dar un solo lavado de unas 12 - 15 h. Si es preciso rebajar el contenido de sosa residual se añaden los equivalentes precisos de un ácido fuerte, generalmente clorhídrico de tipo alimentario.

Finalizado el lavado, el fermentador se llena de salmuera de una concentración de 10 - 11 °Bé. Transcurridas seis u ocho horas se inicia el equilibrio salmuera-aceitunas, donde éstas dejan de flotar y se puede realizar el trasvase del conjunto a los fermentadores enterrados.

Trasvase a los fermentadores enterrados

Este trasvase no precisa ningún gasto de energía, ya que debido a la diferencia de altura se realiza por gravedad, conectando una manguera de plástico flexible de 110 - 120 mm Ø a la válvula de salida del fermentador aéreo. No obstante, es conveniente evitar que el fruto vaya demasiado apretado en la manguera, para lo que es imprescindible un trasvase de salmuera, con una bomba auxiliar de gran capacidad desde el fermentador enterrado al aéreo, para que en todo momento sea mayor la proporción de salmuera que la de aceitunas, con lo que se evitan los atascos y el despellejado que en algunas ocasiones se puede producir al ir rodando y rozando el fruto sobre la pared de la manguera.

Descarga de los fermentadores enterrados

Existen varios procedimientos pero el que presenta mejores resultados es el de descarga mediante bomba de trasiego. Ésta es una bomba especialmente diseñada para el transporte del conjunto salmuera-aceitunas. A la aspiración se conecta una manguera flexible de 110 - 120 mm Ø que termina en un tubo de PVC, y que se introduce hasta el fondo del fermentador. En la impulsión se coloca otra del mismo diámetro que lleva el fruto hasta el separador de salmuera-aceitunas.

Al poner inicialmente la bomba en marcha se necesita disponer de una auxiliar que hace vacío en la aspiración de la de trasiego, hasta que la "ceba" o "carga",

momento éste en el que, mediante unos dispositivos automáticos, se para la de vacío y se conecta la de trasiego, produciendo un chorro continuo de salmuera-aceitunas.

El caudal de la bomba de trasiego debe ser muy elevado, aproximadamente de 100 m³/hora, a 8 - 10 m de columna de agua y 200 - 300 m de longitud. Con ello se descarga por completo un fermentador de 16.000 l de capacidad (10.000 kg de fruto) en 30 ó 35 minutos. Debe instalarse de forma que la aspiración sea lo más corta posible, por lo que ha de estar próxima al fermentador a descargar. Además, al igual que en el procedimiento anterior, se necesita disponer de una bomba e instalación que reenvíe la salmuera al fermentador. Por ello, todo el equipo se monta sobre un carrito desplazable.

La bomba de trasiego ha facilitado enormemente la descarga y transporte de las aceitunas, adoptándose en la mayoría de industrias y haciendo más cómodo y viable el sistema de fermentadores enterrados.

Limpieza de los fermentadores

Es muy importante que una vez que se han vaciado los fermentadores se proceda a su limpieza y desinfección, para evitar que se formen costras y se desarrollen microorganismos en sus paredes interiores. Esta limpieza deberá ser más enérgica, si cabe, cuando en el depósito haya tenido lugar una fermentación anormal o una contaminación.

El método de limpieza más utilizado es un cepillado manual con agua templada y detergente desinfectante, que asegura la asepsia. El detergente empleado no debe ser corrosivo con el material del depósito, ni irritante o peligroso para el operario encargado de la limpieza. Un sistema igualmente efectivo y más cómodo consiste en utilizar boquillas que lanzan un chorro de la solución esterilizante a altas presiones y que el operario va dirigiendo hacia la superficie a limpiar.

Ventajas e inconvenientes

Hay industrias que optan por realizar todo el proceso de aderezo y fermentación directamente en depósitos aéreos. Así se evitan tener que realizar una instalación enterrada y los trasvases de aceituna. Esto presenta diversas ventajas:

- Un manejo más fácil del fruto.

- Poder realizar en el mismo fermentador las operaciones de cocido, lavados, puesta en salmuera, fermentación y conservación del fruto.
- Fácil carga y descarga de los fermentadores. El vaciado se realiza por gravedad mediante manguera de plástico flexible hacia el separador de salmuera-aceitunas.
- Se detectan y reparan fácilmente las posibles fugas de líquido, que pueden ocasionar la contaminación de la salmuera y el desarrollo de fermentaciones anormales.

Sin embargo, tiene los inconvenientes de:

- Un mayor coste de la instalación, entre otros aspectos porque se precisa una nave de mucha superficie donde contener a los fermentadores aéreos. Además éstos son más caros que los enterrados.
- Problemas en el desarrollo de la fermentación. Al no estar los depósitos aislados la temperatura de la salmuera desciende fácilmente, lo que dificulta el arranque y retrasa la terminación del producto.
- Existen riesgos de caídas si no se dispone de unas buenas pasarelas.

Estos inconvenientes hacen que sea más recomendable la instalación de fermentadores enterrados que en comparación presenta las siguientes ventajas:

- Menor coste de la instalación.
- Se conserva mejor la temperatura de la salmuera. Si la instalación está bien construida se produce mucha menos pérdida de calor.
- Los fermentadores no necesitan válvulas.
- No hay riesgos de caídas.
- Fácil manipulación en la carga de los depósitos.

Este sistema, no obstante, también tiene sus limitaciones:

- Necesita un equipo especial para la descarga del fruto.
- Riesgo de contaminaciones transmitidas por el agua infiltrada que queda atrapada en el hormigón celular.
- Difícil y costosa reparación de fisuras y poros que suponen la pérdida del contenido de todo un fermentador.

- Se necesitan un grupo de fermentadores aéreos para realizar el cocido, lavado puesta en salmuera, y mano de obra para trasladar el fruto desde los fermentadores de cocido a los enterrados.
- A pesar del aislamiento, cuando la temperatura ambiente es baja, la temperatura de la salmuera desciende progresivamente, siendo necesario calentar periódicamente la salmuera haciéndola pasar a través de un intercambiador de calor de acero inoxidable.

1.3.6.3 Alternativas al sistema tradicional: bodegas de fermentación

En un intento de compendiar las ventajas de manejo e higiénico-sanitarias de los fermentadores aéreos y las mejores condiciones térmicas del sistema enterrado surgen las bodegas de fermentación. El objetivo es tener una instalación moderna y funcional, donde se obtengan unas buenas condiciones térmicas para el transcurso de la fermentación, con la posibilidad de controlarlas y modificarlas, así como unos niveles de asepsia que aseguren la calidad sanitaria del producto.

La bodega de fermentación consiste en disponer fermentadores de tipo aéreo en unos sótanos, o bodegas, acondicionados para que sean visitables. De esta forma los operarios controlan periódicamente el estado de los depósitos y todos los parámetros de la fermentación. Además se permite la instalación de un sistema de calefacción que pueda mantener la temperatura óptima durante el invierno, reduciendo así la duración de la fermentación.

o Características constructivas

Los fermentadores se disponen en un sótano quedando la boca de los mismos al nivel del patio de la industria, siendo accesibles desde la superficie para las operaciones de llenado de salmuera y aceitunas, así como para la descarga. Para las operaciones de mantenimiento se accede por una escalera al interior del sótano (**Figura 1.5**).

La estructura constructiva de la bodega es toda de hormigón, ya que la salmuera es muy corrosiva para el acero. Tras la excavación y acondicionamiento del terreno se dispone la cimentación de la estructura. El sistema más empleado es una losa de cimentación de hormigón armado. Debe transmitir adecuadamente al terreno

el peso de la estructura y el de los fermentadores de aceituna. Esta losa también hace la función de solera de la bodega por lo que su cara superior deberá estar perfectamente lisa para facilitar la limpieza.

El sistema de saneamiento consiste en una serie de desagües practicados en la losa de cimentación y unas tuberías que circulan por debajo de la misma hasta una arqueta exterior. La losa tendrá una pendiente del 2 % hacia los distintos desagües para la evacuación de líquidos provenientes de pérdidas de salmuera de los fermentadores y para las aguas de limpieza de ellos mismos y del sótano en general.

Para la contención de tierras, en el perímetro del sótano se levanta un muro de hormigón armado. Este muro se puede impermeabilizar en su cara exterior por medio de una lámina asfáltica.

El cerramiento superior del sótano se realiza por medio de un forjado unidireccional, con viguetas de hormigón armado y bovedillas de poliestireno expandido. Este es un material ligero y que funciona como aislante térmico. El forjado se apoya en el muro perimetral y para su sustentación se han de disponer una serie de vigas maestras y pilares, todo ello de hormigón armado.

La distribución en planta de los fermentadores y los pilares debe ser tal que permita un fácil acceso a todos los depósitos, con pasillos adecuados por si fuera necesaria la introducción de algún tipo de maquinaria como, por ejemplo, una bomba de trasiego. Los pilares se disponen de sección circular para facilitar el paso entre ellos y los fermentadores. Es conveniente forrarlos con PVC para protegerlos del ambiente salino creado por la salmuera.

Finalmente, sobre el forjado, para permitir el paso de los trabajadores y la maquinaria se dispone una solera de hormigón armado con una pendiente del 2 % para la evacuación del agua de lluvia. Como se ha comentado, la boca de los fermentadores pasa a través del forjado y de esta solera, quedando vista y accesible desde el exterior. La junta entre la boca del fermentador y el forjado es un punto débil por donde podría infiltrarse el agua de lluvia. Para evitar este problema, por debajo de la solera se extiende una lámina de butilo impermeable, que se suelda a la boca de los fermentadores impidiendo así cualquier filtración al interior del sótano.

Si la construcción está bien realizada se obtiene un espacio estanco, donde la temperatura se mantiene varios grados por encima de la temperatura ambiente. Se dispondrá una entrada y una escalera que desciende al interior.



Figura 1.5. Bodega de fermentadores, [1] fermentadores, [2, 3] boca de fermentadores a nivel del patio de la industria, [4] interior de la bodega, bajo el patio.

○ Manejo de la instalación

En los depósitos de la bodega únicamente se realiza la fermentación y conservación de las aceitunas. En otra instalación aneja, al igual que en el sistema tradicional, se realizan las operaciones de cocido, lavados y puesta en salmuera del fruto. Estas operaciones son similares al caso anterior y una vez finalizadas se trasvasa por gravedad el conjunto salmuera-aceitunas a cada uno de los fermentadores en bodega.

La bodega de fermentación permite tener unas óptimas condiciones higiénico-sanitarias. En el fermentador sólo entra lo que es introducido por la boca. No hay posibilidad de contaminación por las paredes. Para ello la bodega debe mantenerse limpia, evitando la presencia de residuos y de agua o salmuera estancada.

Los fermentadores empleados son cilíndricos de tipo aéreo, apoyados en tres patas. Poseen una válvula de PVC en la parte inferior, que se conecta por una tubería a una de las bocas de desagüe del sótano. Una válvula auxiliar permite la toma de muestras de los fondos de fermentación. La descarga de la aceituna se realiza por la boca del depósito usando la bomba de trasiego especial para salmuera y aceitunas. Además de mantener limpia la instalación, debe controlarse el estado de los fermentadores. Periódicamente se realizan inspecciones visuales de las paredes exteriores de los depósitos buscando una posible porosidad que origine una salida de salmuera.

Al finalizar la campaña se procederá a la limpieza interior de los depósitos. La válvula inferior permite la utilización de un sistema continuo que aplique las soluciones detergentes mediante unas boquillas a alta presión a la vez que se produce el desagüe. Todo el programa de limpieza estará controlado por un robot y la función del operario se limita a trasladar las boquillas de un depósito a otro y abrir-cerrar la válvula inferior.

El control del transcurso de la fermentación se lleva a cabo mediante la toma de muestras de salmuera de distintos puntos en cada uno de los fermentadores. Al emplear fermentadores aéreos, por la válvula tomamuestras acoplada a la tubería de salida inferior se puede obtener salmuera del fondo del fermentador sin remover los sedimentos. Estos sedimentos, como el agua residual del lavado, pueden dar lugar a alteraciones y fermentaciones anormales.

Las condiciones térmicas de la bodega mantienen la temperatura bastante uniforme y adecuada para la fermentación. Pero al disminuir de forma importante la temperatura ambiental, la temperatura del sótano, y en consecuencia la de las salmueras de fermentación, desciende a su vez progresivamente.

El diseño de fermentadores en bodega permite la instalación de un sistema de calefacción que mantenga la temperatura dentro del intervalo óptimo de unos 25 °C. Con esto se consigue que la fermentación no se ralentice por una temperatura inferior y, por tanto, se obtiene antes el producto terminado.

Se pueden usar distintos sistemas de calefacción. Uno que está dando muy buenos resultados es la utilización de turboventiladores para el establecimiento de una corriente de aire en el sótano a través de unas aberturas practicadas en el techo. En el lado opuesto de la bodega existen otras aberturas similares provistas cada: una de un equipo de resistencias eléctricas que calientan el aire que entra en la bodega. Todo el sistema estará automatizado a partir de los datos de temperatura que se registren.

1.3.6.4 Evolución de la temperatura de fermentación

Uno de los objetivos fundamentales de disponer una instalación específica para el proceso de fermentación de la aceituna de mesa es conseguir una temperatura adecuada para el desarrollo de dicho proceso.

La velocidad de la fermentación depende de diversos factores: el contenido de azúcares, que está directamente relacionado con el estado de madurez de los frutos, ya que uno de los cambios que tienen lugar durante la maduración es la disminución del contenido de azúcares; la concentración inicial de la salmuera, porque si ésta es muy elevada puede dificultar el desarrollo de las BAL; la capacidad del recipiente, siendo los que presentan un mayor rendimiento y uniformidad los depósitos de 16.000 litros y, finalmente, la temperatura.

La fermentación es un proceso biológico, llevado a cabo por microorganismos, principalmente, por bacterias del género *Lactobacillus*, y la temperatura óptima para la fermentación será aquella en que dichas bacterias obtengan un mayor desarrollo.

La experiencia de muchos años en la industria de aderezo muestra que la temperatura óptima de fermentación oscila entre los 22 y los 25 °C, con temperaturas superiores se presentan muchos problemas de alambrado del fruto, por lo que no son recomendables. Por el contrario, cuando la temperatura es inferior al intervalo óptimo, la fermentación sigue teniendo lugar, aunque la velocidad de transformación de los azúcares en ácido láctico disminuye en función de la temperatura de la salmuera. Así, con temperaturas de 15 °C, consideradas inadecuadas para el desarrollo de lactobacilos, se obtiene una fermentación lenta, con retraso apreciable en su iniciación, aunque finalmente se alcanzan los mismos valores de acidez libre que con temperaturas de 25 °C.

No obstante, cuando la temperatura es excesivamente baja, por debajo de 10 °C, las BAL cesan su actividad y se produce la parada de la fermentación. Antes de llegar a esta situación se debe calentar la salmuera con los medios disponibles según la instalación existente en cada caso.

Tanto con fermentadores enterrados como en bodega, el aislamiento térmico que proporciona el terreno hace que la temperatura en los fermentadores se mantenga constante día tras día. Pero a medida que finaliza el otoño y comienza el invierno, esta temperatura va disminuyendo lenta, pero progresivamente. Este descenso dependerá fundamentalmente de la temperatura ambiental y del nivel de aislamiento térmico de la instalación.

En un sistema tradicional de fermentadores enterrados está muy extendido el uso de intercambiadores de calor para elevar la temperatura de la salmuera. Este es un sistema lento y trabajoso, sobretodo cuando se trata de grandes volúmenes, y presenta numerosos inconvenientes, por lo que en la práctica es un recurso que se utiliza únicamente en años en los que hay problemas de parada de fermentación.

En las instalaciones en bodega se puede ejercer un mayor control de la temperatura. Se observan dos modos de actuación:

- Permitir la evolución natural de la temperatura sin emplear ningún método de calefacción. La mayoría de los años se logra una fermentación completa, con el agotamiento de los azúcares existentes en la aceituna. En años muy fríos en los que existan problemas de parada de fermentación se recurre a recircular la salmuera por intercambiadores de calor o se emplean calefactores para elevar la temperatura de la bodega.
- Utilización de un sistema de calefacción que mantenga la temperatura constante dentro del intervalo 22-25 °C. Esta opción supone, evidentemente, un mayor coste de instalación y un consumo de energía. Lo ideal es tener instalado un sistema automático, como el descrito en el epígrafe anterior, con el que, a partir de las lecturas de temperatura de la bodega y de forma automática, se ponen en marcha las resistencias y ventiladores cuando la temperatura desciende por debajo de 22°C y se apagan cuando alcanza los 25°C.

1.3.7 Microbiología del proceso

Los microorganismos utilizados en los procesos fermentativos en la antigüedad provenían, naturalmente, del exterior. Pero incluso entonces se sabía que la adición de una parte del contenido del proceso anterior al nuevo lote (*batch*) podía servir como iniciante del proceso. Ahora sabemos que lo que hacían era reinocular el proceso con una considerable dosis del, o de los microorganismos deseados. No ha sido hasta muy recientemente que se ha conseguido añadir los microorganismos deseados en forma pura, conociendo así exactamente el contenido del inóculo.

Los elementos críticos en un sistema de fermentación son el microorganismo y la materia prima. En el caso que nos ocupa, la aceituna de mesa es la materia prima y las bacterias del ácido láctico (BAL) el tipo de microorganismo clave en el proceso, tanto cualitativamente como cuantitativamente. No obstante, es necesario destacar el papel desarrollado por las levaduras en fermentaciones de aceituna de mesa, en particular en las elaboradas al natural o aderezadas (**Kotzekidou, 1997; Marquina et al., 1997**), a pesar de que algunas especies pueden ser causa de deterioro del fruto (**Asehrou et al., 2000**). Las especies de levaduras identificadas de forma habitual en el proceso fermentativo son *Candida boidinii*, *Candida diddensiae*, *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotolura glutinis* y *Saccharomyces cerevisiae* (**Arroyo-López et al., 2006; Hernández et al., 2007; Coton et al., 2005; Oliveira et al., 2004**). Pertenecientes a los géneros *Candida*, *Debaromyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces* y *Torulaspora* también se han identificado pero en pocos casos y asociados a determinadas variedades de aceituna (**Arroyo-López et al., 2008**).

Gran variedad de parámetros físicos, químicos y físico-químicos afectan el crecimiento de los microorganismos; a destacar: temperatura, pH, actividad del agua, oxígeno, radiación, presión y agentes estáticos.

Por otro lado es importante regular aquellos organismos que están presentes durante la fermentación de la aceituna, e incluso aquellos que son capaces de crecer y sobrevivir en el producto final. Por un lado, en la actualidad existe la posibilidad de inocular deliberadamente con el/los microorganismo/s deseados, que conseguirán unas ventajas selectivas frente a otros organismos que puedan crecer. Además existen tratamientos físicos o químicos y métodos esterilizantes que son utilizados para reducir notablemente el número de los organismos o su totalidad.

Algunos factores relevantes son:

- Cantidad de microorganismos presentes
- Tipo de microorganismos
- La concentración de agentes antimicrobianos presentes, o la intensidad del tratamiento físico
- Las condiciones reinantes de temperatura, pH y viscosidad
- El tiempo de exposición
- La concentración de materia orgánica

La fermentación por sí misma es un procedimiento que surgió originariamente como un medio de preservación del valor nutritivo de los alimentos. Mediante la fermentación se conseguía disminuir los niveles de sustancias que los organismos contaminantes necesitan para crecer, o se conseguía producir compuestos o condiciones que evitarían el desarrollo de organismos, por ejemplo, la disminución del pH. Durante la producción de aceituna, se pueden introducir deliberadamente agentes antisépticos.

En concreto, en la fermentación de la aceituna el producto final o medio de cultivo, la salmuera, es por sí mismo la base de la protección del fruto fermentado.

La nisina (antimicrobiano que destruye organismos Gram-positivos abriendo poros en sus membranas), producto natural de las BAL, es especialmente interesante por su capacidad de contrarrestar la invasión de otras bacterias (**Bamforth CW, 2005**). Un aspecto esencial del éxito a largo término de las BAL como agente protector en la industria fermentadora es la enorme variedad de maneras de contrarrestar el crecimiento de organismos competidores. Además de la nisina y otros bactericidas también debemos considerar la producción de:

- Ácidos orgánicos, como el ácido láctico, acético y propiónico. El ácido acético es especialmente valioso en contrarrestar bacterias, levaduras y mohos.
- Peróxido de hidrógeno, derivado activo del oxígeno (y potencialmente dañino).
- Diacetilo y acetaldehído, aunque hay discrepancias sobre si las cantidades producidas son o no significantes en la práctica como agentes antimicrobianos.

1.3.7.1 Principales características de las BAL

La reinoculación con cierta cantidad del alimento producido anteriormente al nuevo proceso, realizado durante siglos, permitía empezar la fermentación con los microorganismos preferidos, en muchos casos se trataba de bacterias del ácido láctico, que, en el campo de la fermentación agroalimentaria, son eje fundamental.

Estas bacterias son débilmente proteolíticas y lipolíticas, significando que son suaves en cuanto a su tendencia a producir sabores amargos. Además, están presentes de forma natural en el intestino y el tracto reproductor, por lo que no sorprende que hoy en día hablemos de probióticos y prebióticos en el contexto de enriquecimiento del nivel de bacterias del ácido láctico en el intestino. Entre los organismos probióticos destacan los lactobacilos y bifidobacterias, que se añaden a la dieta para aumentar la flora del intestino grueso y, que son añadidos, por ejemplo, al yogur. Los prebióticos son nutrientes que estimulan el crecimiento de esos organismos.

Al igual que las levaduras del pan y la cerveza, las bacterias del ácido láctico suelen ser GRAS (Generally Recognised As Safe), aunque algunas cepas son patógenas. Joseph Lister aisló la primera bacteria del ácido láctico en 1873. Se trataba de *Lactococcus lactis*, una especie de gran significado en la fermentación de productos lácteos.

Son organismos Gram-positivos, con forma de bacilo, de coco (esférico), o de cocobacilo. La mayor parte son mesófilos, pero algunos pueden crecer a temperaturas de refrigerador (4 °C) o a temperaturas de hasta 45 °C.

Generalmente prefieren un pH en el intervalo de 4,0 - 4,5 aunque ciertas cepas pueden tolerar y crecer en pH superiores a 9,0 o tan bajos como 3,2.

Requieren purinas y pirimidinas ya formadas, aminoácidos y vitamina B. Las BAL no poseen un ciclo de los ácidos tricarbónicos funcional o un sistema de transporte de electrones ligado a un grupo hemo, por lo que utilizan la fosforilación a nivel de sustrato para obtener energía.

Su metabolismo puede ser clasificado como homofermentativo, donde el ácido láctico representa el 95 % del total del producto final, o heterofermentativo, donde además de ácido láctico se produce ácido acético, etanol y dióxido de carbono.

Las bacterias del ácido láctico producen sustancias antimicrobianas conocidas por bacteriocinas. La mayor parte de ellas son péptidos anfipáticos catiónicos que se insertan en las membranas de bacterias parientes cercanas, causando la formación

de poros, escapes y la imposibilidad de mantener el metabolismo, y en consecuencia la muerte. De estos agentes el mejor conocido es la nisina (mencionada anteriormente), que ha sido utilizada sustancialmente como un agente antimicrobiano “natural”. Las BAL también producen ácidos y peróxido de hidrógeno que actúan como antimicrobianos.

1.3.7.2 Posición taxonómica de las BAL

De forma resumida y centrada en la industria agroalimentaria podemos decir que existen 16 géneros de bacterias del ácido láctico, de los que 12 son activos en el campo de la alimentación. No obstante, comprende a un grupo de microorganismos muy heterogéneo que comparten una serie de características bioquímicas y estructurales, a saber:

Son Gram positivos de metabolismo quimiorganotrofo, no esporulados, catalasa-negativo, desprovistos de citocromos, anaerobios, microaerófilos o aerotolerantes, acidófilos o acidotolerantes, y estrictamente fermentadores produciendo ácido láctico como producto final de la fermentación de azúcares (**Holt et al, 1994**).

Comparando la secuencia de rRNA se pueden determinar las verdaderas relaciones filogenéticas entre las bacterias (**Woose, 1987**). Los avances en técnicas moleculares han liderado los métodos de secuenciación de fragmentos largos de rRNA, primero mediante el uso de la transcriptasa inversa (**Lane et al., 1988**) y por la secuenciación directa por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de los genes de rRNA.

La 7ª y 8ª ediciones del “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” recogían la existencia de cuatro géneros dentro de las BL: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*; y la clasificación de las cepas en cada uno de ellos venía determinada por los mismos criterios que utilizó Orla-Jensen (1919).

En la actualidad existen 19 géneros en el grupo de las BAL típicas, que forman una línea de descendencia común con otras bacterias Gram+ de contenido en G+C < 50 %, a esta línea de descendencia se la llama rama *Clostridium*. La proliferación de géneros dentro del grupo de las BAL ha sido el resultado de la aplicación de técnicas de caracterización muy potentes que han proporcionado información tanto a nivel de fenotipo como de genotipo. Los nombres de estos 19 géneros de BAL son:

Aerococcus, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Fructobacillus*, *Paralactobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (**Doyle y Meng, 2006; Endo y Okada, 2008; Holzapfel y Wood, 1998; Leisner et al., 2000**).

El género *Lactobacillus* es el más extenso en cuanto a número de especies se refiere y constantemente se están describiendo nuevas, en la actualidad hay más de 100 especies validadas (**Euzéby, 1998-2006; Felis y Introducción Dellaglio, 2007**). En la 8ª edición del “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” el género *Leuconostoc* estaba formado por 6 especies: *L. mesenteroides*, *L. dextranicum*, *L. cremoris*, *L. lactis*, *L. oenos* y *L. paramesenteroides*. Estudios posteriores de hibridación ADN-ADN y ARN-ADN demostraron que las tres primeras especies en realidad constituían subespecies de *L. mesenteroides* (*cremoris*, *dextranicum* y *mesenteroides*).

El análisis de secuencias de los genes ribosomales 23S llevaron a la conclusión de que *Leuc. oenos* constituía una línea evolutiva independiente del género *Leuconostoc* y se propuso su reclasificación en un nuevo género y especie: *Oenococcus oeni*. (ver **Figura 1.6**). Igualmente ocurrió con la especie *L. paramesenteroides*, de la que se observó que presentaba una mayor homología interna con algunos lactobacilos heterofermentativos que con los propios *Leuconostoc*, por ello se definió un nuevo género *Weissella* donde se agruparon todas estas especies de elevada homología. Recientemente, cuatro especies del género *Leuconostoc* (*L. durionis*, *L. ficulneum*, *L. fructosus*, y *L. pseudoficulneum*) descritas en los últimos años se han reclasificado en un nuevo género *Fructobacillus* con los nombres de *F. durionis*, *F. ficulneum*, *F. fructosus* y *F. pseudoficulneum* (**Endo y Okada, 2008**). Otras tres nuevas especies *L. holzapfelii*, *L. inhae* y *L. kimchii* han sido descritas en los últimos años (**de Bruyne et al., 2007; Kim et al. 2000; Kim et al. 2003**), de manera que en la actualidad el género está formado por 11 especies (*L. carnosum*, *L. citreum*, *L. fallax*, *L. gasocomitatum*, *L. gelidum*, *L. holzapfelii*, *L. inhae*, *L. kimchii*, *L. lactis*, *L. mesenteroides* y sus tres subespecies y *L. pseudomesenteroides*).

El género *Pediococcus* tal y como se describía en el “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”, el “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” de 1994 y el “The Prokaryotes” en su última edición, estaba formado por nueve especies. Sin embargo, **Bergan et al. 1984**, basándose en un estudio de composición celular en ácidos grasos e hidratos de carbono de los géneros *Aerococcus* y *Pediococcus* consideraron que la especie *P. urinaequi* era un sinónimo posterior de la especie

Aerococcus viridans, por lo que el género *Pediococcus* solo tendría 8 especies. En un trabajo posterior de Collins y colaboradores, basándose en estudios de homologías DNA-DNA y de comparación de secuencias del 16S, demostraron que sólo *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus* y *P. pentosaceus* forman un grupo filogenético coherente, mientras que *P. urinaequi* y *A. viridans* forman una línea evolutiva diferente y presentan elevada homología entre ellos confirmando lo hallado por Bergan. No se encontraron especies filogenéticamente afines a *P. halophilus* por lo que propusieron su reclasificación en un nuevo género *Tetragenococcus*.

En los últimos años se han descrito nuevas especies pertenecientes al género *Pediococcus*, de forma que actualmente contiene las especies *P. acidilactici*, *P. argentanicus* (De Bruyne et al., 2008) *P. cellicola*, *P. claussenii*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. ethanolidurans*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, *P. siamensis* (Tanasupawat et al., 2007) y *P. stilesii* (Euzéby, 2008).

El género *Oenococcus* hasta fecha muy reciente contenía una única especie, *O. oeni* (*syn. Leuc. oenos*), sin embargo recientemente se ha descrito la existencia de una bacteria láctica que parece pertenecer a este mismo género y para la que se propone el nombre de *Oenococcus kitaharae* (Endo y Okada, 2006). La relación actual de las especies aceptadas de BAL ("Approved List of bacterial Names", Euzéby, 1998-2008) puede consultarse en la siguiente dirección electrónica: <http://www.bacterio.cict.fr>

El principal género aislado en aceitunas de mesa es *Lactobacillus*. En menor número se han aislado los géneros *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*.

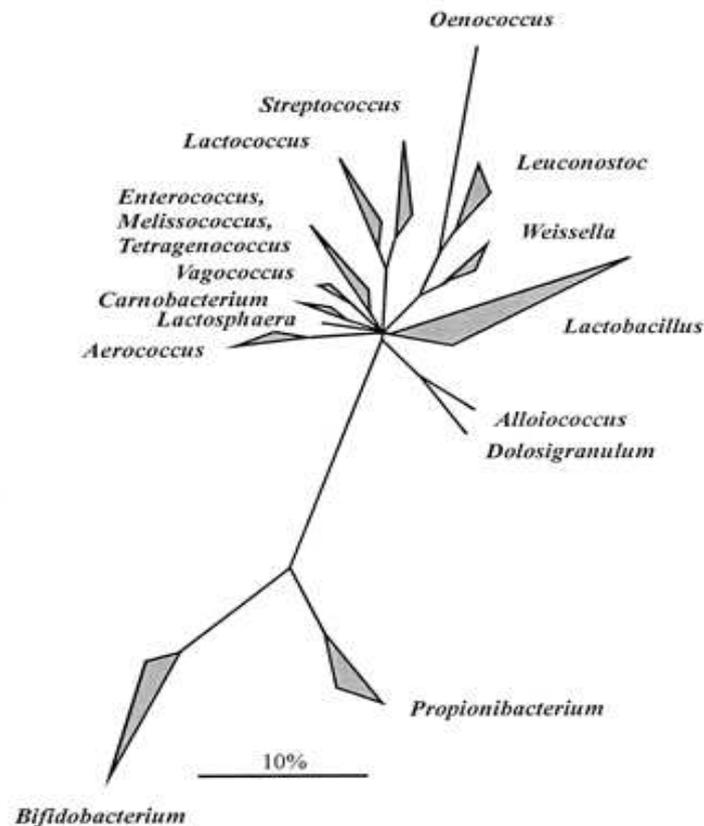


Figura 1.6. Esquema del árbol filogenético de las BAL (incluye algunos aerobios y anaerobios facultativos (Gram-positivos)). Fuente: The Prokaryotes 3ªed. (2006)

1.3.7.3 Fermentación de la aceituna de mesa

Los primeros días de la colocación de las aceitunas en salmuera, debido a la lejía residual que va saliendo de la pulpa, el valor de pH resulta superior a 10 unidades. A lo largo de las diversas etapas de la fermentación, la sucesión de diversos microorganismos hace que el pH descienda a valores de 4 unidades, o menos, lo que facilita la adecuada conservación a largo plazo. Se puede dividir en 4 fases.

La primera fase (**Fernández Díez et al. 1985**), comienza desde la colocación en salmuera hasta que, aproximadamente a la semana, el valor de pH es próximo a 6 unidades; en esta fase se detectan los siguientes grupos de microorganismos: bacilos Gram-negativos, esporulados Gram-positivos y bacterias cocáceas del ácido láctico de los géneros *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Enterococcus*. Los Gram-negativos inician el

descenso del pH; mas, se debe evitar un profuso desarrollo de los mismos, dado que pueden provocar alteraciones. Para ello, se recomienda el descenso del pH pasando una corriente de CO₂ a las 24 h; también se pueden emplear otros ácidos como acético o láctico.

Una vez que comienza el desarrollo de los lactobacilos, se inicia la segunda fase, la que dura hasta que el valor del pH es de 4,5 unidades. Desciende la población de cocos lácticos y desaparecen los bacilos Gram-negativos. Normalmente transcurre en unos 15 - 20 días.

La tercera fase se caracteriza por el predominio de los lactobacilos, de los que se han aislado, además del típico *L. plantarum*, otras especies como y *L. delbrueckii*. Esta fase dura hasta que cesa la producción de ácido por consumo de la materia fermentable. El valor de pH resulta igualo inferior 4 unidades.

Junto a los microorganismos citados en las tres fases de la fermentación, se encuentra, habitualmente, un desarrollo variable de levaduras (**Tabla 1.14**).

La cuarta fase es la de conservación. Una vez terminada la fermentación láctica, se inicia la conservación de las aceitunas que, en el caso de no controlar las condiciones, podría inducir el desarrollo de bacterias del género *Propionibacterium* (**González Cancho et al., 1980**). Ésto origina un aumento del pH, pues estos microorganismos consumen el ácido láctico formado y producen una mezcla de los ácidos acético y propiónico que, al ser más débiles, provocan el incremento del pH citado. Para evitar este efecto, se debe aumentar, al final de la fermentación láctica principal, la concentración de sal hasta niveles de 8,5 - 9,5 %, lo que evita el desarrollo de estas bacterias y garantiza una adecuada conservación al mantener un bajo valor del pH. Es conveniente realizar esta subida de sal en dos etapas, para evitar así el posible arrugado de los frutos.

- Control de la fermentación

Para dirigir y controlar todo el proceso fermentativo, se recomienda el descenso inicial del pH, como se ha indicado, unido al mantenimiento de una temperatura adecuada, 22 - 25 °C, durante al menos unos 30 días utilizando, si es preciso, un intercambiador de calor. Puede ser conveniente añadir un cultivo puro de bacterias lácticas o, en todo caso, se puede utilizar salmuera

madre de otros fermentadores que se encuentren en activa fermentación láctica y cuyo valor de pH sea inferior a 4,5 unidades, lo que implica la ausencia de los bacilos Gram-negativos. Además, si fuese necesario, se añade materia fermentable para completar la fermentación y conseguir un buen valor en el pH final.

- Posibles alteraciones en la aceituna

Cuando la secuencia de microorganismos no es la adecuada y se desarrollan otros ajenos a los de un proceso normal, se producen distintos tipos de alteraciones.

Las principales, según el origen y las fases de la fermentación, son las siguientes:

- Alambrado. Se forman hendiduras en el exterior de las aceitunas y huecos internos en la pulpa. A veces, la formación de gas produce vejigas o ampollas bajo la piel. Se evita ajustando el valor del pH inicial.

- Butírica. Se debe al desarrollo de distintas especies de clostridios en las primeras fases de la fermentación. El ácido butírico que produce altera el sabor, pudiéndose evitar su formación manteniendo un nivel adecuado de sal (nunca menor de 5 %) Y siguiendo buenas prácticas higiénicas de fabricación.

- Zapatería. Producida por el desarrollo de bacterias propiónicas y clostridios, se da durante la conservación cuando el valor de pH no se mantiene por debajo de 4,2 unidades. Se identifican en la salmuera una serie de compuestos volátiles, (**Montaño et al. 1992**), diferentes a los de aceitunas normales. Se evita subiendo la sal para inhibir el desarrollo de los microorganismos responsables y, de esta forma, estabilizar el valor de pH durante la conservación.

- Ablandamiento. Debido a un desarrollo excesivo de microorganismos con actividad pectinolítica, bacilos, levaduras y mohos. Se debe evitar su desarrollo, en especial durante la conservación, manteniendo un buen cierre anaeróbico.

- Sedimento y gas. Se da en el producto envasado cuando no se mantiene estable, bien por desarrollo de diversos tipos de bacterias o levaduras, si existen restos de materia fermentable, o bien por desarrollo de las bacterias propiónicas, que consumen ácido láctico. Se evita usando un producto bien fermentado y ajustando un bajo valor de pH en el envasado, menor de 3,3 unidades, o bien pasterizando.

Tabla 1.14. Desarrollo de microorganismos durante el proceso normal de elaboración de aceitunas verdes aderezadas

Días de fermentación	Bacilos	BAL			Levaduras
	Gram -	Cocos		Lactobacilos	
2	+	+		-	-
4	++	+++		-	-
6	+++	+++		+	+
8	++	++		+++	+
10	+	++		+++	++
12	+	+		++	++
14	+	+		+++	++
16	-	+		++	+
20	-	+		+++	++
30	-	-		+++	+
50	-	-		+++	++
80	-	-		++	++

1.3.8 Objetivos

El objetivo genérico del presente trabajo de tesis doctoral trata del estudio comparativo entre los distintos sistemas de fermentación de la aceituna de mesa, a saber; los fermentadores enterrados frente a la bodega de fermentación.

Se abordará desde un punto de vista económico, mediante el diseño y cálculo de las instalaciones necesarias para fermentar cerca de una tonelada de aceitunas anuales; y desde un punto de vista microbiológico, mediante un seguimiento y estudio de las bacterias del ácido láctico, así como las diferentes condiciones fisico- químicas que rigen cada uno de los sistemas de fermentación.

Se presentará un análisis estadístico que indique el grado de influencia de los distintos parámetros evaluables en la fermentación, además de las principales diferencias entre ambos sistemas, ya sea en costes, constructivas o microbiológicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los distintos puntos que conforman el apartado de Materiales y Métodos se presentan en capítulos que se corresponden con los del apartado de Resultados.

CAPÍTULO 1

2.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO

2.1.1 Material biológico

Para la realización de la presente tesis doctoral se aislaron, purificaron y clasificaron bacterias del ácido láctico procedentes de las salmueras de fermentación tanto en fermentadores enterrados, como en los instalados en la bodega de fermentación de la cooperativa de primer grado *Olivarera Jesús Nazareno, S. C. A.*, situada en Aguilar de la Frontera, Córdoba.

2.1.2 Medios de cultivo

Se utilizaron los siguientes medios artificiales:

- **MRS + JT.** Para el crecimiento de las bacterias del ácido láctico.

MRS (Man, Rogosa y Sharpe)	50 g/l
JT (Jugo de tomate)	2 %
Agar	1,5 % (0,8 % para el semisólido)

Esterilizar por calor húmedo (1 atm., 20 min.)

- **MRS + JT + Cicloheximida.** Para inhibir el crecimiento de levaduras.

Cicloheximida	100 mg/l
---------------------	----------

Esterilizar por calor húmedo (1 atm., 20 min.)

- **MFA.** Para determinar el tipo de metabolismo fermentativo y la fermentación de los azúcares.

Azúcares ensayados (ver epígrafe 2.1.7.8)	1 %
Peptona	5 g/l
Extracto de levadura	1 g/l
K ₂ HPO ₄	1 g/l

Acetato sódico	5 g/l
“Tween” 80	1 ml/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g/l
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,05 g/l

Esterilizar por calor húmedo (1 atm., 20min.)

• **Solución de vitaminas para las bacterias lácticas**

Piridoxina	0.1 mg/l
Pantotenato cálcico	0.1 mg/l
Vitamina C	0.1 mg/l
Clorhidrato de tiamina	0.1 mg/l
Riboflavina	0.1 mg/l
Cianocobalamina (Vit. B12)	0.01 mg/l
Biotina	0.01 mg/l

La esterilización se realizó por filtración (Millipore AAWP, Ø 0,45 µm)

• **MES.** Tampón empleado en ensayos de consumo de glucosa

MES (Ácido morfolinetanosulfónico)	2,13 g/l
KCl	3,7 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,25 g/l
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,1 g/l

Esterilizar por calor húmedo (1 atm., 20min.)

2.1.3 Toma de muestras

A lo largo de las tres campañas sucesivas (2006/2007, 2007/2008 y 2008/2009) se tomaron las muestras de salmuera en tres fermentadores enterrados numerados como 408, 498 y 552, en lo sucesivo FE-1, FE-2 Y FE-3 respectivamente, y en tres fermentadores en bodega numerados como 3, 135 y 268, en lo sucesivo FB-1, FB-2 FB-3 respectivamente.

Dichas muestras fueron tomadas a primera hora de la mañana desde el cuarto día en que los frutos fueron depositados para comenzar la fermentación en los fermentadores ya descritos, la salmuera recogida se corresponde con la zona media o

central del fermentador. Posteriormente las muestras son tomadas en intervalos más pequeños al principio siendo espaciadas en el tiempo en función del desarrollo de las poblaciones bacterianas así como al tipo de fermentador. La práctica totalidad de las fermentaciones comenzaron en el mes de octubre, alguna a finales de septiembre, como se describirá posteriormente en evolución conjunta con las temperaturas.

Las muestras se recogieron en recipientes estériles de plástico dejando una mínima cámara de aire en el envase. En cada recipiente se consignaron los datos de identificación indicativos de la fecha de recogida y número de fermentador. Las muestras se transportaron, convenientemente refrigeradas (nevera con acumuladores de frío), directamente al departamento de microbiología, realizándose las primeras siembras microbiológicas en el mismo día.

2.1.4 Aislamiento y purificación de las bacterias lácticas

Partiendo de cada muestra original (salmuera de fermentación conteniendo la microbiota silvestre) se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} – 10^{-6}) en tubos que contenían agua estéril. A continuación se inocularon 100 μ l de cada uno de los tubos en su correspondiente placa de cultivo compuesta de medio de cultivo sólido (MRS + JT) más cicloheximida (100 mg/l) para inhibir el crecimiento de las levaduras.

Se incubaron las placas (28-32 °C, 48-72 h) en una estufa de cultivo, colocándolas en posición invertida. Se procedió al recuento de las unidades formadoras de colonias (u.f.c.) y al aislamiento, tomando representantes de los diferentes tipos morfológicos encontrados. Seguidamente se procedió a su purificación mediante dos pases de siembra en zig-zag superficial sobre placa de medio de cultivo MRS + JT. En todos los casos se eligieron las colonias más representativas del total de las u.f.c., para proceder al segundo pase de siembra en zig-zag.

2.1.5 Conservación de las cepas

Las cepas aisladas correspondientes a BAL, se conservaron en cultivo semisólido en picadura (MRS + JT, 0,75% de agar). Tras incubar (32 °C, 48-72 h), los tubos se mantuvieron para su conservación en cámara fría a 4°C.

2.1.6 Tiempo de generación

El tiempo de generación (G) es el tiempo que tarda en duplicarse una población que está creciendo activamente. G se obtuvo tras un seguimiento de la densidad óptica de los cultivos en un espectrofotómetro DU 640 de Beckman. Para ello, las cepas se mantuvieron en agitación a 32 °C, y las medidas se tomaron cada 30 minutos, durante 6 – 7 horas. G se calculó a partir de la pendiente obtenida al representar el logaritmo del valor de la absorbancia frente al tiempo en la región lineal de la curva de crecimiento.

2.1.7 Identificación de las cepas

Los aislados obtenidos se sometieron a unas pruebas identificativas, o confirmativas en su caso, de su pertenencia al grupo de las bacterias del ácido láctico a nivel de especie.

2.1.7.1 Observación de las cepas

Se estudiaron varias características morfológicas (forma y tamaño de las colonias, aspecto del borde, presencia de brillo, color, etc.). Las bacterias del ácido láctico son organismos de forma bacilar o esférica que pueden estar agrupados en filamentos, en parejas o en tetradas, dependiendo de los géneros. A partir de preparaciones frescas sobre portaobjetos se observó la morfología celular, utilizando un microscopio de contraste de fases (400 - 1.000 aumentos). Las medidas de la longitud y anchura de las bacterias se realizaron usando un micrómetro, previamente calibrado (2 µm por 1 división del micrómetro, para una lente objetivo de 40) situado en el ocular del microscopio.

2.1.7.2 Movilidad

A partir de preparaciones frescas de los cultivos, se observó por microscopía (x 400 – 1000) la existencia o no de movimiento de traslación.

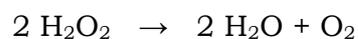
2.1.7.3 Tinción de Gram

Esta tinción, descubierta por Christian Gram de forma empírica, posee un gran valor identificativo y práctico al permitir diferenciar las bacterias en dos grupos según la estructura de su pared. Se utilizaron células en crecimiento, ya que el estado

fisiológico condiciona el resultado. Las células que respondieron a dicha tinción coloreándose de azul-violáceo se consideraron Gram-positivas, mientras que aquellas que lo hicieron de color rosáceo-rojizo se estimaron como Gram-negativas.

2.1.7.4 Reacción de la catalasa

A pesar de que las BAL son anaerobias aerotolerantes, son incapaces de sintetizar ATP por respiración, lo que refleja su incapacidad para sintetizar citocromos y otras enzimas que contengan el grupo hemo. Por tanto, carecen de catalasa siendo incapaces de descomponer el agua oxigenada, de la forma:



Esta es una prueba determinante, ya que dicho grupo bacteriano es dentro de los seres vivos, el único que pudiendo crecer en presencia de O_2 , carece de catalasa. Para poder crecer en aerobiosis, las BAL utilizan una reacción similar a la de la catalasa que depende de altas concentraciones intracelulares de manganeso (**Kandler y Weiss, 1986**). Se resuspendió una muestra de cultivo bacteriano joven en una gota de agua oxigenada al 3%, colocándola sobre un portaobjetos. Se observó inmediatamente la formación de pequeñas burbujas (catalasa +) o su ausencia (catalasa -), bien a simple vista o utilizando una lupa.

2.1.7.5 Crecimiento a diferentes temperaturas

Las BAL muestran diferencias en cuanto al crecimiento a distintas temperaturas: *Lactobacillus* (crece entre 2 – 53 °C, siendo óptimo a 30 – 40 °C), *Leuconostoc* (entre 5 – 30 °C, óptimo a 20 – 30 °C), *Pediococcus* (crece entre 25 – 40 °C, y el óptimo a 30 °C). Las bacterias se sembraron sobre tubos con medio MFA con glucosa (1%) y se incubaron (28 °C, 72 horas). La prueba se consideró positiva ante la aparición de turbidez o formación de depósito.

2.1.7.6 Tipo de metabolismo fermentativo

Las BAL son un conjunto de bacterias con un metabolismo estrictamente fermentativo, produciendo ácido láctico como el mayor producto final de la fermentación de los azúcares, en otras ocasiones producen además etanol, acetato y CO_2 . Es una prueba muy utilizada en la identificación de las BAL, que pueden

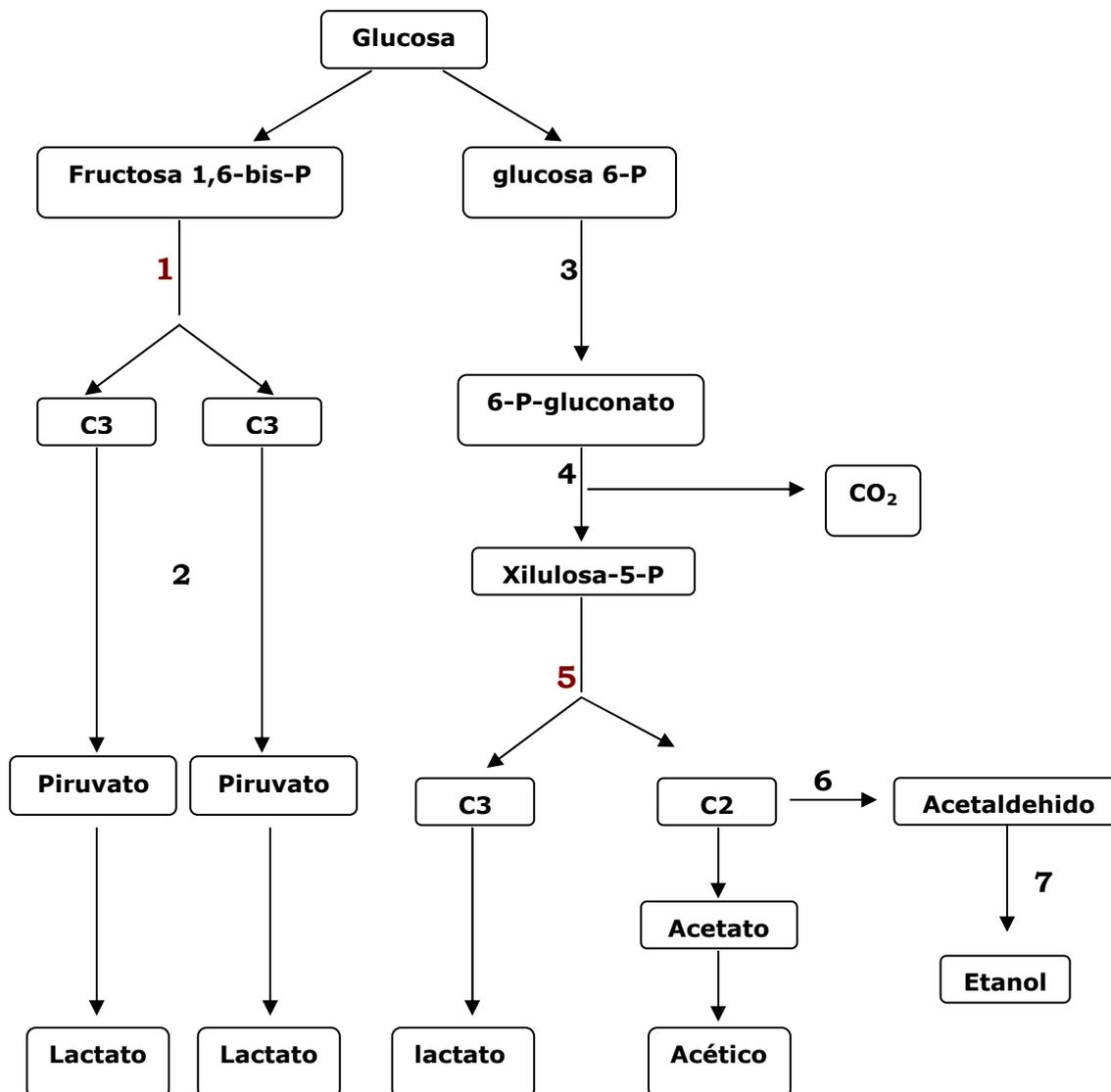
subdividirse en tres grupos bioquímicos según los productos formados a partir de glucosa (**Kandler y Weiss, 1986**).

Las BAL *homofermentativas* convierten la glucosa mayoritariamente en ácido láctico por la ruta de Embden-Meyerhof, los representantes de las BAL homolácticas incluyen *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y el grupo I *Lactobacilli*. Las BAL *heterofermentativas*, al carecer de fructosa-1,6 bisfosfato aldolasa, originan una mezcla equimolar de ácido láctico, acético y CO₂ a través de la ruta de las pentosas fosfato, las BAL obligatoriamente heterofermentativas incluyen *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, y el grupo III *Lactobacilli*. Por último, se denominan *heterofermentativas facultativas*, aquellas BAL homofermentativas que son capaces de consumir las pentosas a través de la ruta 6- fosfogluconato/fosfocetolasa, donde se forman cantidades equimolares de ácido láctico y acético (**Tabla 2.1**), (**Figura 2.1**).

	Aldolasa	Fosfocetolasa
Homofermentativas	+	-
Heterofermentativas	-	+
Heterofermentativas Facultativas	+	+

Tabla 2.1. Presencia (+) o ausencia (-) de las enzimas clave en BAL

El tipo de metabolismo se determinó mediante la observación de la formación de gas a partir de glucosa y glucónico (**McDonald y col., 1987**). Se crecieron las bacterias (28 °C , 72 h) en tubos con medio MFA con glucosa o glucónico (1 %) y se introdujeron campanas Durham invertidas para detectar la posible acumulación de CO₂. Al mismo tiempo, se dispuso de controles con medio sin azúcar. Se consideró positiva la prueba cuando al menos ¼ del total de la campana estaba ocupada por gas. La formación de artefactos se evita adicionando el medio con sales de Mg y Mn.



RUTA HOMOLÁCTICA RUTA HETEROLÁCTICA

- | | |
|--|--|
| 1: Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa | 2: Piruvato quinasa |
| 3: Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa | 4: 6-fosfo-gluconato deshidrogenasa |
| 5: Fosfoacetolasa | 6: Acetato quinasa |
| 7: Alcohol deshidrogenasa | |

Figura 2.1. Esquema general de las rutas metabólicas homoláctica y heteroláctica utilizadas por las BAL

2.1.7.8 Fermentación de azúcares

La identificación hasta alcanzar a la especie se hizo basándose en un patrón de fermentación de azúcares que incluyó: arabinosa, rafinosa, galactosa, melibiosa, celobiosa, lactosa, maltosa, trealosa y xilosa. Las bacterias se crecieron en tubos (MFA y el 1% de los azúcares) con campanas Durham invertidas. Tras la incubación (72 horas, 28 °C) se observó la producción de gas, como en el caso anterior.

2.1.8 Selección de cepas de BAL

Se efectuó partiendo de 115 aislados bacterianos, procedente de las salmueras de fermentación, estudiándose la capacidad para realizar la Fermentación ácido láctica. Se aplicó una técnica rápida de seguimiento del pH, como factor indicativo de la capacidad para realizar dicha fermentación. A continuación, se cuantificó la transformación de la glucosa.

2.1.8.1 Fermentación ácido láctica

Los 115 aislados bacterianos procedentes de un cultivo fresco de MRS + glucosa (1 g/l), se centrifugaron (SIGMA 3K 10; 5.500 r.p.m., 15 minutos, 4 °C). Tras lavarlas por dos veces con MES + glucosa (2 g/l) a pH 4, se volvieron a centrifugar en condiciones similares. Posteriormente se añadió MES + glucosa (2 g/l) a dichas células para así preparar una suspensión de D.O. comprendida entre 1 y 2. Se hizo una dilución 1:10 con MES + glucosa (2 g/l) (D.O. = 0,1-0,2) en un matraz y se incubó a 28 °C con agitación durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se midió el pH. Se seleccionaron las cepas que modificaron más el pH del medio tamponado reduciendo así su acidez. Se tomaron muestras de los matraces y del MES control, y una vez filtradas, se analizó el contenido en ácido láctico mediante HPLC (cromatografía líquida de alta presión).

2.1.8.2 Evolución del pH

Se pretende seleccionar las cepas más eficientes en la producción de ácido láctico, para ello se empleó una técnica simple y suficientemente rápida consistente en determinar los cambios producidos en el pH de un medio que contenía glucosa como fuente carbonada. Tras las mediciones pertinentes, se eligieron las 14 cepas que

en la prueba anterior, habían bajado más el pH del medio. Se repitieron las condiciones del ensayo anterior y se registró la evolución del pH del tampón durante 4 horas. Con tal fin se empleó un pHmetro-registrador (pHM 62 Standard-REC 61 Servograph Radiometer) que permite ajustar la velocidad de la carta y el desplazamiento del cursor.

2.1.8.3 Viabilidad de los cultivos iniciadores

Con el fin de cuantificar la población viable de BAL ensayadas, se procedió a hacer un recuento según la técnica del “número más probable”. Así, en base al número de u.f.c. determinadas en cada dilución correspondiente (para un número comprendido entre 50 y 500 u.f.c.) se calculó la concentración de células vivas. El recuento de bacterias se realizó, según el procedimiento descrito, empleando placas con MRS + cicloheximida (100 mg/l). El antibiótico usado inhibe el crecimiento de levaduras.

CAPÍTULO 2

2.2.1 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

2.2.1.1 Medidas del ácido láctico

La evolución del contenido de ácido láctico a lo largo de los ensayos, se realizó cualitativamente, mediante cromatografía líquida (HPLC) y cuantitativamente, por medio de kits enzimáticos (*Boehringer Mannheim*).

- **HPLC**

Se tomaron alícuotas (1 ml) filtradas a través de membranas (0,45 µm de diámetro de poro). El análisis se realizó tomando 20 µl de las muestras filtradas.

Las características del sistema fueron las siguientes:

- Columna de intercambio catiónico (7,8 x 300 mm de WATERS) mantenida a 65 °C
- Fase móvil (solución de H₃PO₄)
- Bomba distribuidora (flujo de 0,7 ml/min), suministrada por BECKMAN.

Los componentes de las muestras fueron:

- detector de ácidos (168 DETECTOR SYSTEM GOLD BECKMAN) con longitud de onda fijada a 254 nm, conectado en serie con el otro detector
- detector de índice de refracción (156 REFRACTIVE INDEX DETECTOR BECKMAN).

- **Método enzimático**

La determinación de **ácido láctico** se basa en la reacción de oxidación de D-lactato (ó L-lactato) a piruvato por medio de nicotin-adenin-dinucleótido (NAD), catalizada por D (ó L)-lactato deshidrogenasa (L-LDH):



El equilibrio en estas reacciones está desplazado hacia la izquierda. Si se retira el piruvato del sistema, se producirá un desplazamiento del equilibrio hacia la derecha, favoreciendo la producción del mismo. Posteriormente, mediante la enzima glutamato-piruvato transaminasa (GTP) y en presencia de L-glutamato, se forma L-alanina y 2-oxoglutarato, mediante la siguiente reacción:



La cantidad de ácido D (ó L) láctico presente en una muestra se deduce midiendo la cantidad de NADH formado, que tiene una absorbancia máxima a una longitud de onda de 340 nm.

Procedimiento:

A temperatura ambiente (aprox. 25 °C), se usan cubetas de 1 cm de paso de luz que contienen las siguientes medidas:

	Blanco	Muestra	Estándar
Ácido L-glutámico	1.000 ml	1.000 ml	1.000 ml
NAD	0.200 ml	0.200 ml	0.200 ml
GTP	0.020 ml	0.020 ml	0.020 ml
Muestra	-	0.100 ml	-
Estándar	-	-	0.100 ml
Agua destilada	1.000 ml	0.900 ml	0.900 ml

- Agitar suavemente y transcurridos 5 minutos leer la absorbancia (A_1)
- Añadir D (ó L)-LDH (0.020 ml) para cada uno (blanco, muestra y estándar)
- Mezclar y medir la absorbancia a los 30 minutos. Se realizó con un espectrofotómetro (DU 640 Spectrophotometer BECKMAN).
- Determinar las diferencias de absorbancia ($A_2 - A_1$) para el blanco, las muestras y el estándar, y calcular el incremento de absorbancia:

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{muestra}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco}} \quad \text{para cada muestra y}$$

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{estándar}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco}} \quad \text{para el estándar.}$$

La cantidad de ácido láctico se calcula por la siguiente fórmula:

$$c = (V \cdot P_m \cdot \Delta A) / (\epsilon \cdot d \cdot v \cdot 1.000) \quad (\text{g/l}), \text{ siendo:}$$

V = volumen final (ml)

v = volumen de muestra (ml)

P_m = peso molecular de la sustancia a determinar (ácido láctico) (g/mol)

d = paso de luz (cm)

ϵ = coeficiente de extinción del NADH = 6,3 ($l \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a 340 nm.

Según se tratase de ácido D ó L-láctico, tendríamos:

$$c = (2.24 \cdot 90.1 \cdot \Delta A) / (6.3 \cdot 1.00 \cdot 0.1 \cdot 1.000) \text{ (g}_{\text{ácido D-láctico}} / l_{\text{muestra}})$$

$$c = (2.26 \cdot 90.1 \cdot \Delta A) / (6.3 \cdot 1.00 \cdot 0.1 \cdot 1.000) \text{ (g}_{\text{ácido L-láctico}} / l_{\text{muestra}})$$

- Multiplicar el resultado por el factor de dilución F (x 10), puesto que las muestras fueron diluidas (1:10).

2.2.1.2 Acidez combinada

(Fernández Díez *et al.*, 1985)

Se expresa como equivalentes de ácido añadido a la salmuera hasta alcanzar un pH de 2,6, también denominada como lejía residual expresada en equivalentes por litro o normalidad (N). Es un indicador de la capacidad buffer de la salmuera de fermentación, para determinar su medida, se utilizó un pHmetro, anteriormente referido, una microbureta de 5-10 ml (graduada en 0.01 ml) y un agitador magnético. Como reactivo se usó una solución valorada de HCL 2N.

Método: Se valoran 25 ml de salmuera exactamente medidos, en un vaso de precipitado de 50-100 ml, con la solución de HCL, añadiéndolo muy lentamente y con agitación, hasta llegar a un pH=2,6.

2.2.1.3 Acidez libre

(Fernández Díez *et al.*, 1985)

La determinación se realiza en la salmuera de fermentación siempre que se haya establecido el equilibrio aceitunas-salmuera.

Reactivos: - Disolución alcohólica de fenolftaleína a 1%
- Disolución de NaOH 0,2 N

Método: Se valoran 10 ml de salmuera usando fenolftaleína como indicador, con la solución de NaOH, hasta observar un color rosa persistente al agitar durante unos segundos. A continuación se añaden 0,1 ml más de solución alcalina y si la salmuera toma un color rosa-rojizo intenso, el punto final

anteriormente obtenido era correcto. En el caso de que este cambio de color no tenga lugar se sigue añadiendo solución de hidróxido sódico, siempre de 0,1 en 0,1 ml hasta que aparezca el color rosado, anotando como volumen de solución consumido en la valoración de la salmuera el último volumen gastado menos 0,1 ml.

Cálculos:

$$\text{Acidez Libre} = 0,9 \times N \times V$$

Siendo:

N = normalidad de la solución de NaOH

V = volumen de la solución de NaOH de normalidad N consumidos en la valoración de 10ml de salmuera

La acidez libre se expresa en gramos de ácido láctico por 100 ml de salmuera (p/v)

2.2.1.4 Cloruro sódico **(Fernández Díez *et al.*, 1985)**

El análisis se realiza sobre una solución al 5%, en agua destilada, de salmuera de aceitunas, en las condiciones especificadas en la determinación de acidez libre. Como material se usa frasco y bureta color topacio para el nitrato de plata.

Reactivos: - Solución patrón NaCl 0.1 N

- Solución de nitrato de plata aproximadamente 0,1 N, exactamente valorada (es deseable que la normalidad de esta solución sea exactamente 0,086, para facilitar los cálculos).

- Solución- indicador de cromato potásico al 5%

Método: Se valoran 10 ml de la solución diluida de salmuera (equivalentes a 0,5 ml originales) con la solución de nitrato de plata, usando como indicador la solución de cromato potásico.

Cálculos:

$$N' = (N \times V) / 0,5 ; \quad \% \text{ NaCl} = N' \times 5,845$$

$$\% \text{ NaCl} = 0,086 \times (5,845 / 0,5) \times V = 1 \times V$$

Siendo:

- N' = equivalentes por litro de NaCl en la salmuera original
- N = normalidad de la solución de nitrato de plata (0,086 N).
- V = volumen de la solución de nitrato de plata gastados en la solución de 0,5 ml de salmuera original

El contenido en NaCl se expresa en % en peso de NaCl por 100 ml de salmuera (p/v).

2.2.1.5 Temperatura

Los datos de temperatura se tomaron con un termómetro digital (Amarell, Dual Thermo) de máxima y mínima interior y exterior. Se anotaron las temperaturas tanto del interior de la bodega como la temperatura exterior o ambiente. Por otro lado, junto a la toma de las muestras, se anotó la temperatura de la salmuera de fermentación *in situ*.

2.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental se ha realizado con el software Statgraphics® en su versión 5.1. La respuesta, o variable dependiente, se puede expresar como una función polinómica de las variables de estudio (factores):

$$y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ij} x_i x_j$$

En el estudio de la evolución de fermentación de las bacterias ácido-lácticas se han fijado intervalos de estudio para las siguientes variables: Acidez combinada, acidez libre, Ac/Al, y pH.

CAPÍTULO 3

BODEGA DE FERMENTACIÓN

El objetivo de este estudio es comparar el sistema tradicional de elaboración que emplea fermentadores enterrados con una alternativa al mismo, como son las bodegas de fermentación. Se analizarán las diferencias constructivas y de manejo, así como su influencia en la calidad final del producto obtenido.

2.3.1 EVALUACIÓN PRESUPUESTARIA

Uno de los elementos más importantes a la hora de decidir el tipo de instalación para la fermentación que se va a disponer es, sin lugar a dudas, la cuantía de la inversión necesaria.

Se pretende dar una idea, lo más exacta posible, del coste de cada uno de los dos sistemas para la fermentación estudiados. Para ello se parte de un volumen de elaboración de 800.000 kg de aceituna al año. Esta es una cantidad media para el tipo de empresas ubicadas en Andalucía, más concretamente en el sur de la provincia de Córdoba, en su mayoría cooperativas y empresas familiares.

Se realizará el presupuesto para una bodega de fermentación y para una instalación de fermentadores enterrados, pudiendo así comparar ambos costes y su repercusión en el precio final del fruto.

2.3.1.1 Bodega de fermentación.

Se emplean fermentadores de 16.000 litros de capacidad, que contienen 10.000 kg de aceitunas cada uno. Por tanto para un volumen de producción de 800.000 kg se necesitan 80 fermentadores.

Con dichos requisitos la bodega ocupa una superficie de 1.111 m², con unas dimensiones de 39,40 metros de largo por 28,20 metros de ancho. Además tendrá una altura libre de 3,40 metros. Con las mediciones resultantes se confeccionará el presupuesto de la obra civil y la maquinaria.

2.3.1.2 Fermentadores enterrados.

Los depósitos se colocan a tresbolillo con una pequeña separación para conseguir un ahorro de superficie. Al igual que en el caso anterior se emplean 80 fermentadores de 16.000 litros de capacidad para cubrir los 800.000 kg de aceituna elaborada al año.

La superficie ocupada será:

- Datos

Distribución fermentadores	8 x 10
Diámetro de fermentador	3,10 m.
Separación entre fermentadores	0,12 m.
Separación fermentador-muro	0,20 m.
Espesor de muro	0,25 m.

- Anchura de patio:

$$8 \times 3,10 + 7 \times 0,12 + 2 \times 0,20 + 2 \times 0,25 = 26,54 \text{ m}$$

con distribución a tresbolillo = 23,52 m.

- Longitud de patio:

$$10 \times 3,10 + 9 \times 0,12 + 2 \times 0,20 + 2 \times 0,25 = 32,98 \text{ m}$$

con distribución a tresbolillo = 34,59 m.

Superficie de patio distribución tresbolillo:

$$34,59 \times 23,52 = 813,56 \text{ m}^2$$

Se consigue un ahorro de 297m² con respecto a la bodega de fermentación y la profundidad de la excavación que se requiere es también menor.

2.3.2 CARACTERÍSTICAS CONSTRUCTIVAS Y DE DISEÑO

Se describirá el diseño en planta de la bodega de fermentación imponiéndose una visión global pero completa de los elementos constructivos necesarios para la construcción de dicha bodega, los datos usados y cálculos desarrollados han sido generados por el programa informático Metal 3D, de CYPE Ingenieros. Serán expuestos como resultados finales y para información práctica de los cálculos estructurales, no mostrando así las salidas informáticas generadas en los cálculos informáticos para el dimensionamiento del forjado, pilares, vigas maestras, muro de contención y losa de cimentación.

No es objeto de esta tesis un estudio ingenieril en profundidad en lo relativo a la construcción de la bodega, como sí el estudio comparativo de ambos sistemas de fermentación desde una perspectiva microbiológica.

Se ha tenido en cuenta que la bodega de fermentadores cumpla todos los requisitos necesarios de seguridad y salud en el trabajo. Con este fin se han dispuesto pasillos de anchura suficiente, que permitan un cómodo acceso para el control visual del estado de los fermentadores y unas óptimas condiciones higiénico-sanitarias.

A partir de las mediciones se presupuestará la obra para considerar la diferencia de inversión entre el sistema de fermentadores enterrados y el de construir un sótano visitable donde ubicar fermentadores de tipo aéreo.

Las tablas y figuras que conforman esta tesis son de elaboración propia, citando la fuente, en su caso.

RESULTADOS

Los distintos puntos que conforman el apartado de Resultados se presentan en capítulos que se corresponden con los de Materiales y Métodos.

CAPÍTULO 1

3.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO

3.1.1 Aislamiento de bacterias del ácido láctico

A lo largo de las campañas 2006/07, 2007/08, y 2008/09 se tomaron las muestras microbiológicas en el período que abarca desde la puesta del fruto en los fermentadores hasta completarse la fermentación. Tras sembrarlas en medios en placas de cultivo, y considerando 150 de ellas, se realizó una observación macroscópica del aspecto de las colonias y microscópica de algunas de ellas, aislándose 115 unidades formadoras de colonias procedentes de los cultivos silvestres de la bodega de fermentación, y 150 de los fermentadores enterrados en la primera campaña, 90 y 104 en la segunda, 102 y 128 en la tercera, respectivamente (**Tabla 3.1**). Todos los aislados se conservaron en picadura de MRS + JT.

Tabla 3.1 Número de aislados en campaña (n = 689).

F.E. fermentador enterrado **F.B.** fermentador en bodega

Campaña	2006/07		2007/08		2008/09	
	F.E.	F.B.	F.E.	F.B.	F.E.	F.B.
Tipo de fermentador						
Número de aislados	150	115	104	90	128	102
Total	265		194		230	

3.1.2 Identificación de las cepas de bacterias del ácido láctico

La observación del crecimiento colonial no ofreció diferencias significativas, la casi totalidad de las colonias mostró el mismo aspecto. Eran colonias con tonalidades cremosas, de borde liso y generalmente con brillo. Su tamaño era bastante homogéneo (> 85 % de las colonias, Ø 1 – 2 mm) (**Figura 3.1**), correspondiendo un porcentaje pequeño a colonias puntuales.



Figura 3.1. Aspecto de las colonias de bacterias del ácido láctico

Se aislaron 689 cepas (durante las tres campañas), que fueron sometidas a la reacción de la catalasa para determinar su pertenencia o no al grupo de las BAL. La gran mayoría, en cada campaña y fermentador fueron catalasa negativas, 604 cepas del total (87,6 %) (**Figura 3.2**).

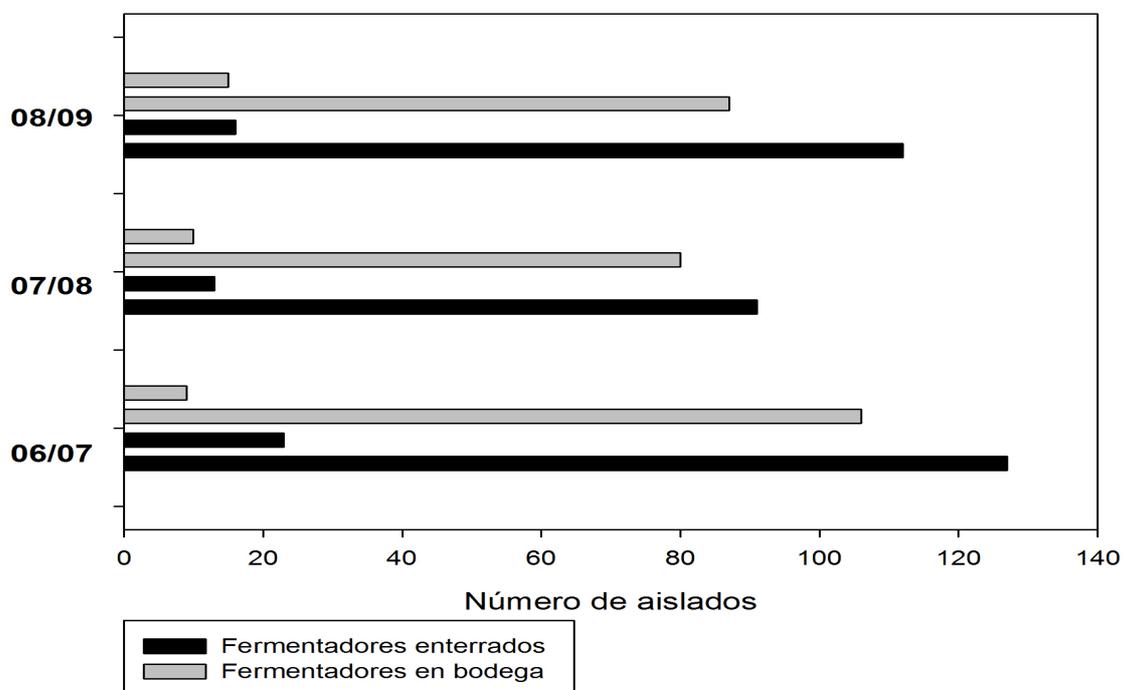


Figura 3.2. Distribución de las cepas bacterianas por su respuesta a la reacción de la catalasa (campañas 2006/07, 2007/08, 2008/09)

La mayoría de las cepas ensayadas resultaron ser anaerobias facultativas, 549 de las 689 aisladas (**Figura 3.3**), casi el 80% del total.

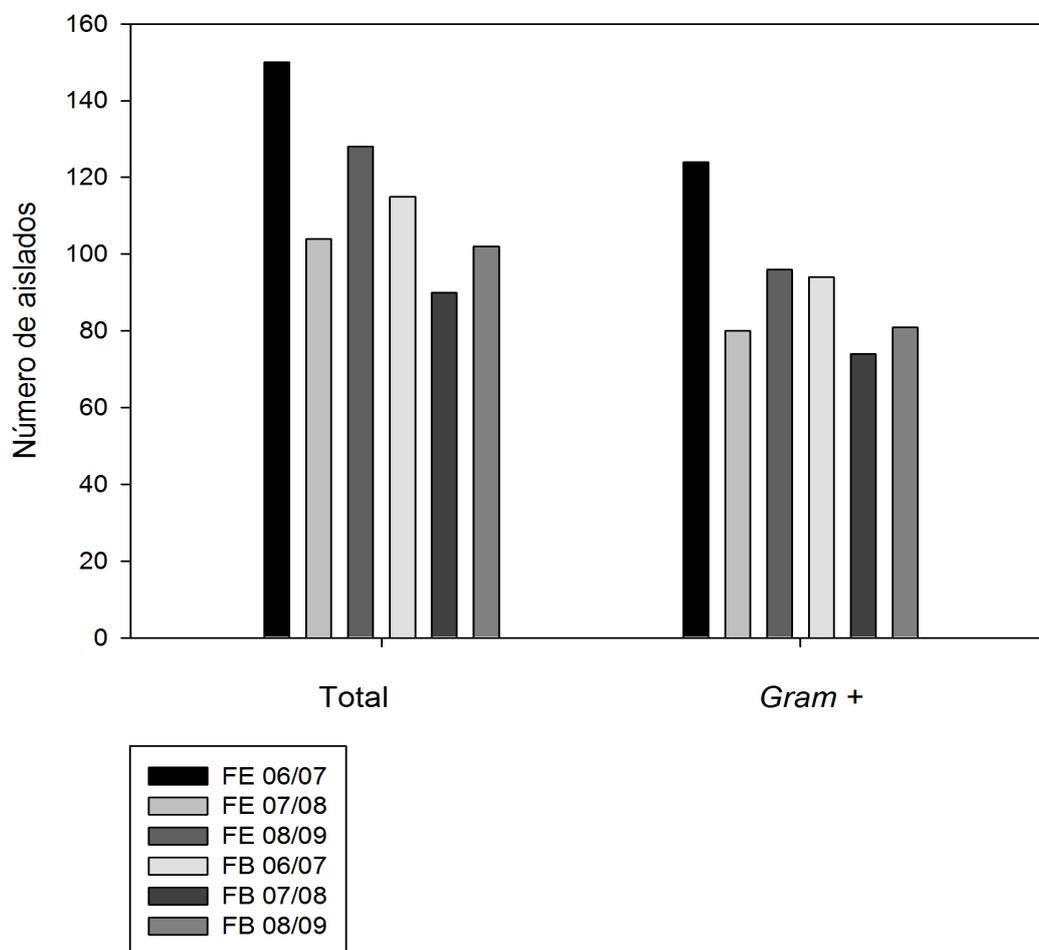


Figura 3.3. Distribución de las cepas por su respuesta a la tinción de Gram

La observación al microscopio de los aislados, tras descartar a las cepas Gram variables y catalasa positivas, mostró los siguientes resultados:

Ninguna de las bacterias mostró movilidad por traslación, tal como corresponde a las BAL. La morfología celular permitió encontrar un grupo ampliamente mayoritario de cepas (bacilos alargados, de tamaño $0,5 - 1,5 \mu\text{m} \times 1,5 - 10 \mu\text{m}$; aislados en su gran mayoría, pero formando a veces parejas o cadenas cortas), y otras cepas, en torno al 10 % (bacilos cortos, $0,5 - 1,2 \mu\text{m} \times 1,5 - 4 \mu\text{m}$; agrupados en cadenas variables y una minoría aislados) (**Figura 3.4**). La observación morfológica de los aislados permitió, en una primera aproximación, considerar en un porcentaje superior al 90 %, que las cepas pertenecían a especies de lactobacilos.



Figura 3.4. Observación al microscopio (x 40) de las cepas *Lactobacillus*

La prueba siguiente consistió en la determinación de la ruta metabólica utilizada para fermentar la glucosa y el glucónico, siendo determinante la producción o no de CO₂ a partir de dichos sustratos carbonados. Todas las cepas crecieron en medio con glucosa o con glucónico, pudiendo ser divididas en tres grupos fermentativos diferentes dependiendo de los resultados mostrados en la Tabla 3.2

Tabla 3.2 Tipos de metabolismo de las bacterias ácido lácticas

METABOLISMO	TIPO I Homofermentativo	TIPO II Heterofermentativo	TIPO III Heterofermentativo facultativo
CO ₂ a partir de glucosa	-	+	-
CO ₂ a partir de glucónico	-	+	+

La utilización de glucosa o glucónico por las cepas aisladas dio como resultado la existencia de los tres tipos de fermentación anteriormente señalados (Figura 3.5). Se observa un predominio notable de BAL heterolácticas facultativas, lo que supone alrededor del 95 % al final de campaña en los fermentadores enterrados y del 90 % en los fermentadores en bodega, siendo las BAL homofermentativas obligadas las minoritarias en todas las campañas y fermentadores. La distribución a lo largo de las tres campañas fue prácticamente constante.

Todas las cepas de BAL aisladas se sometieron a la fermentación de diversos azúcares para determinar el tipo de metabolismo fermentativo al que pertenecen. En base a todos los resultados obtenidos en esta prueba, se obtuvieron dos grupos dentro del tipo fermentativo heteroláctico (HE1, HE2,) y dos grupos dentro de los restantes tipos fermentativos, el homoláctico (H1) y el heteroláctico facultativo (HF1) (Tabla 3.3).

La **Tabla 3.4** muestra los resultados del crecimiento de las cepas a diferentes temperaturas de incubación, observándose que prácticamente todas las cepas mostraron un crecimiento a 15 °C, mientras que a 45 °C fue escaso.

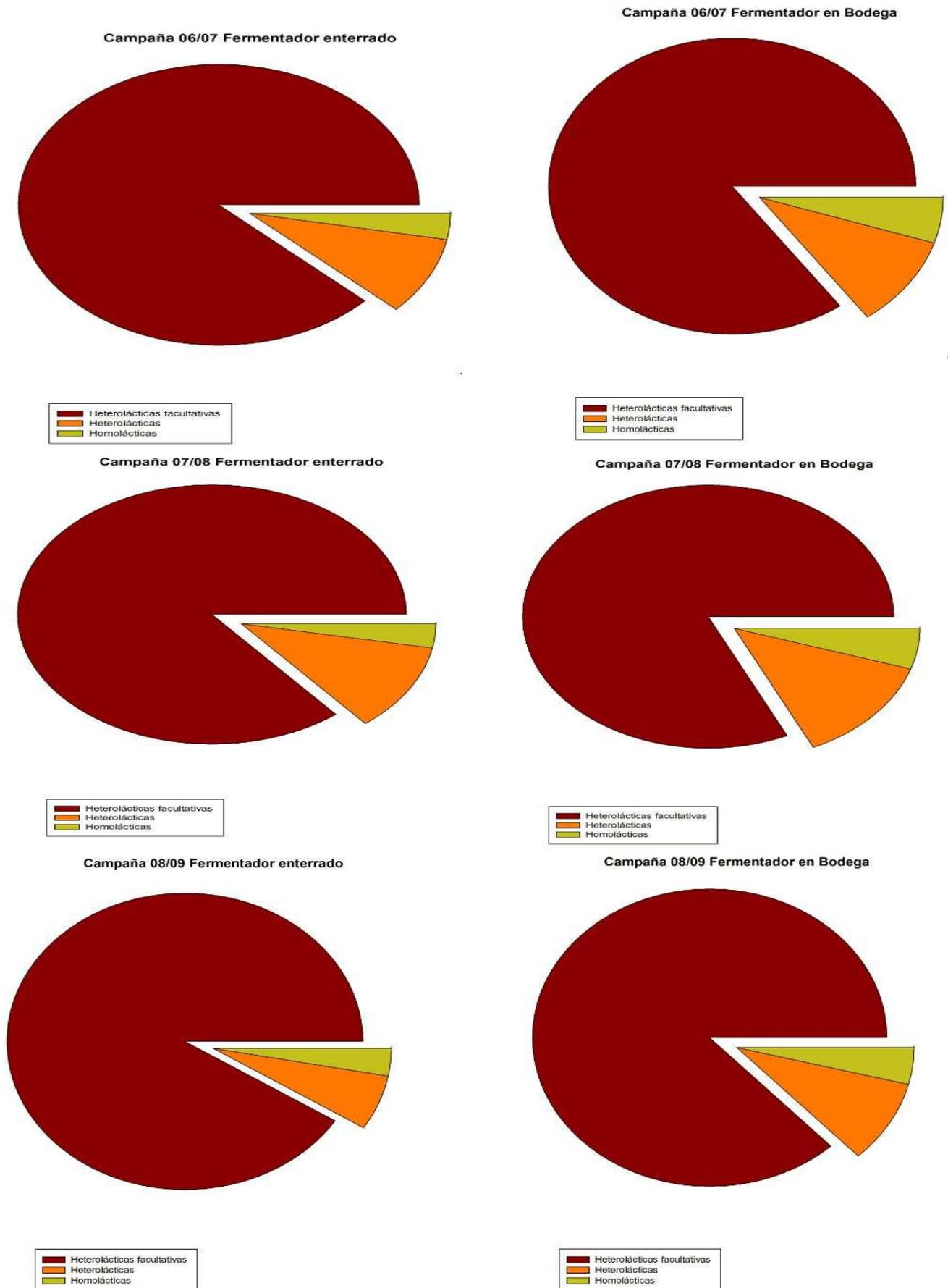


Figura 3.5. Distribución de los diferentes tipos fermentativos de las cepas de bacterias del ácido láctico aisladas (campañas de 2006/07, 2007/08 y 2008/09)

Tabla 3.3 Grupos fermentativos de las bacterias ácido lácticas ensayadas

	H1	HE1	HE2	HF1
Arabinosa	-	-	+	d
Xilosa	-	+	d	-
Celobiosa	+	-	-	+
Galactosa	+	d	d	+
Lactosa	-	+	d	+
Maltosa	-	+	+	+
Meliobiosa	-	-	+	+
Rafinosa	-	-	d	+
Trealosa	-	-	-	+

+, crecimiento; -, no crecimiento; d, crecimiento muy débil.

Tabla 3.4. Crecimiento de las distintas cepas a 15 °C y 45 °C

	H1	HE1	HE2	HF1
Crecimiento a 15 °C	d	+	+	+
Crecimiento a 45 °C	d	-	-	d

Finalizadas las pruebas, se hizo corresponder a cada grupo con una especie, obteniendo los siguientes resultados:

H1: *Pediococcus sp.*

HE1: *Leuconostoc sp. (L. mesenteroides)*

HE2: *Lactobacillus brevis*

HE2: *Lactobacillus plantarum*

La especie predominante es *Lactobacillus plantarum*, llegando a predominar en gran parte del proceso y hasta finalizar la fermentación (**Figuras 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10 y 3.11**). Los géneros *Leuconostoc* y *Pediococcus* dominan al comienzo de la fermentación, hasta que se desarrollan los lactobacilos y, prácticamente en solitario, la completan.

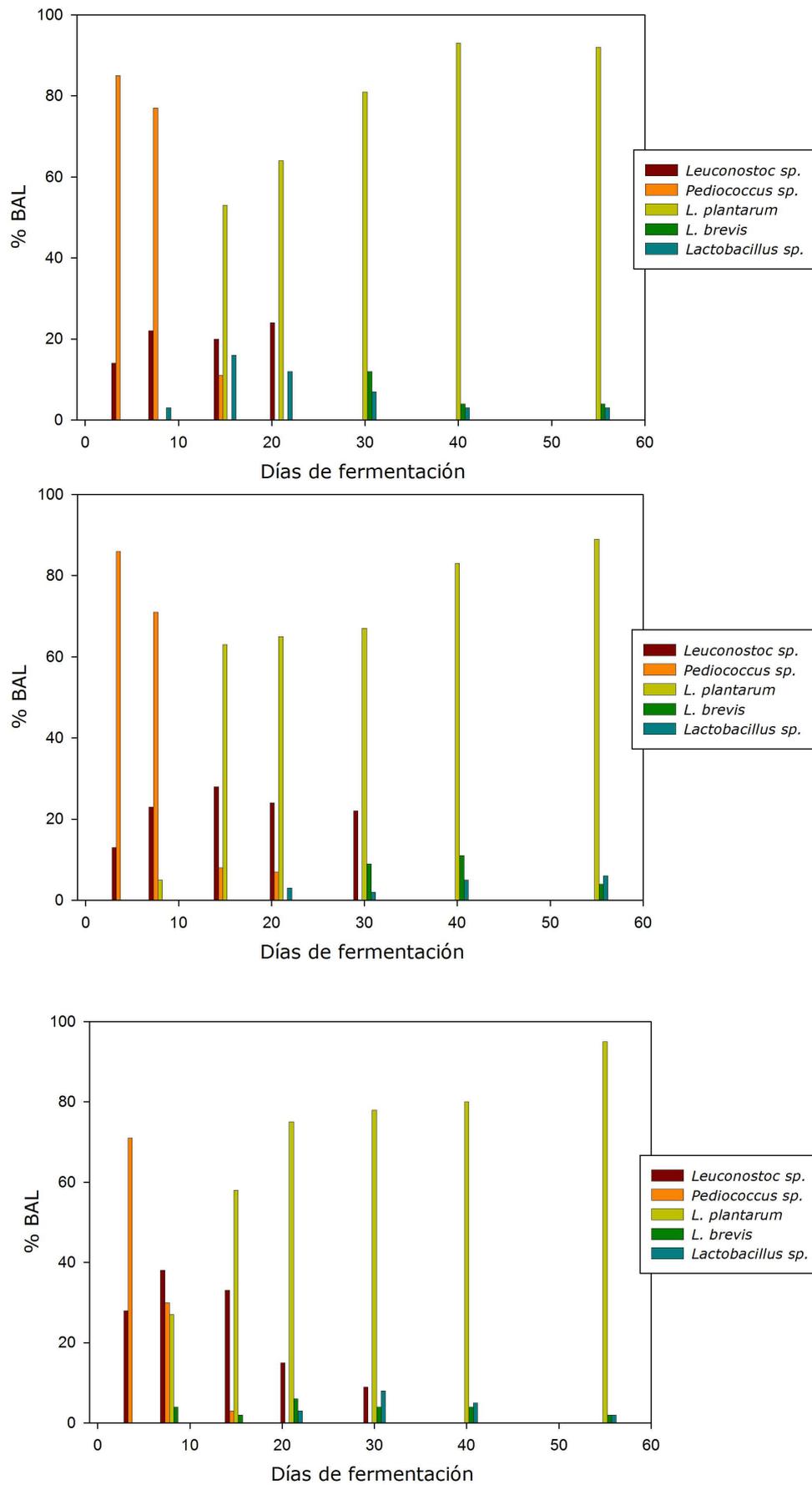


Figura 3.6. Fermentadores en bodega. Campaña 2006/07

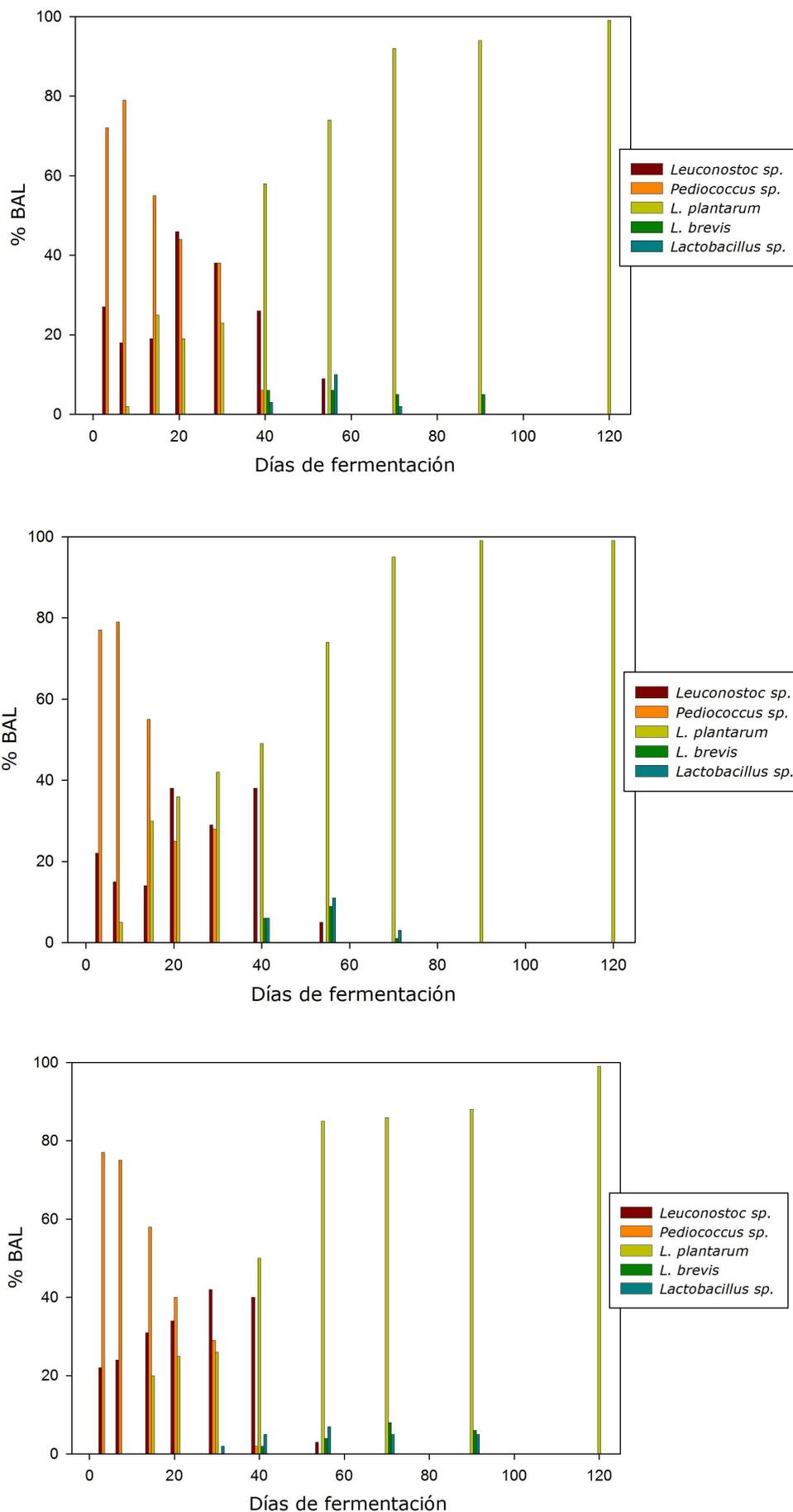


Figura 3.7. Fermentadores enterrados. Campaña 2006/07

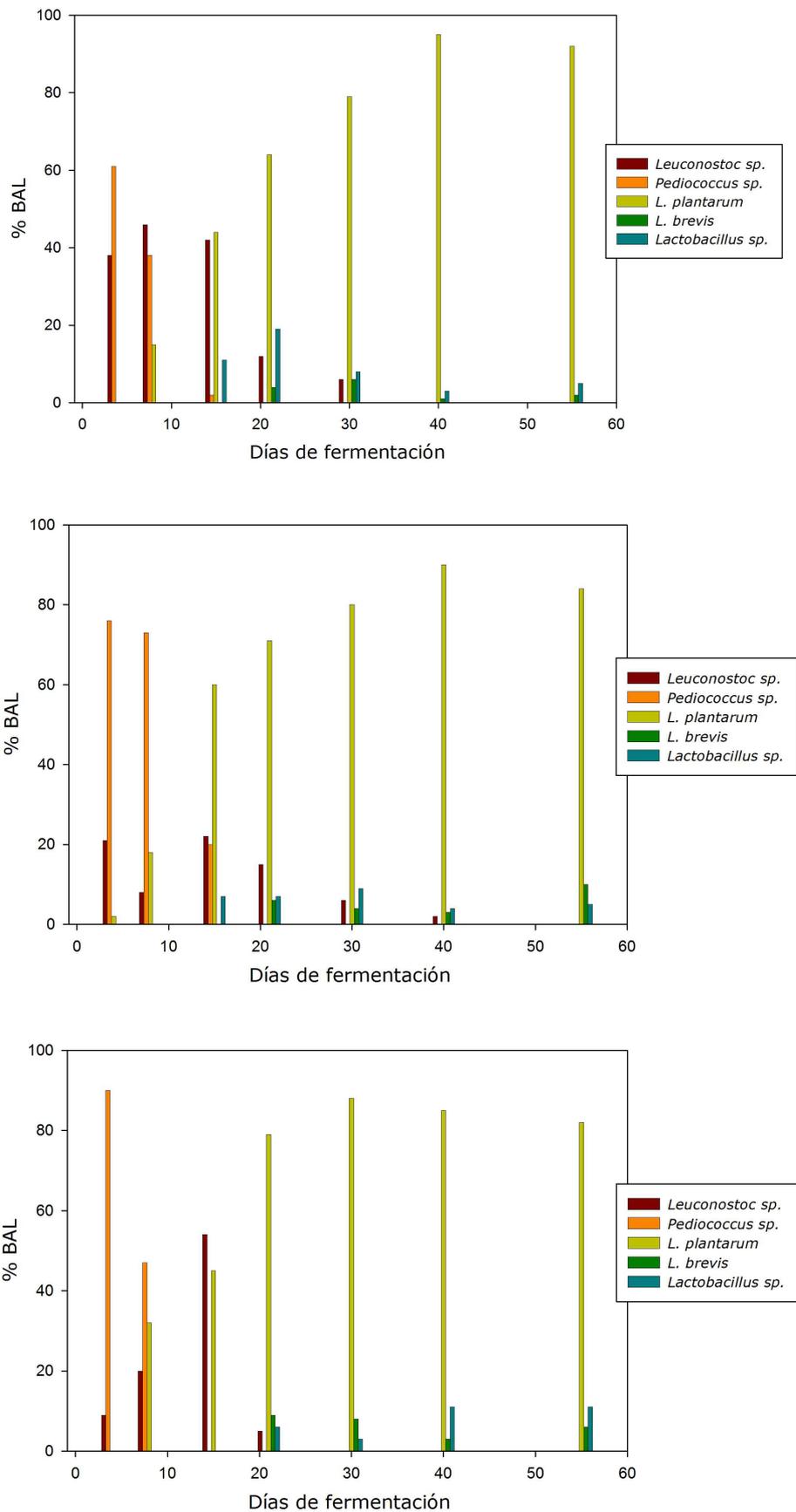


Figura 3.8. Fermentadores en bodega. Campaña 2007/08

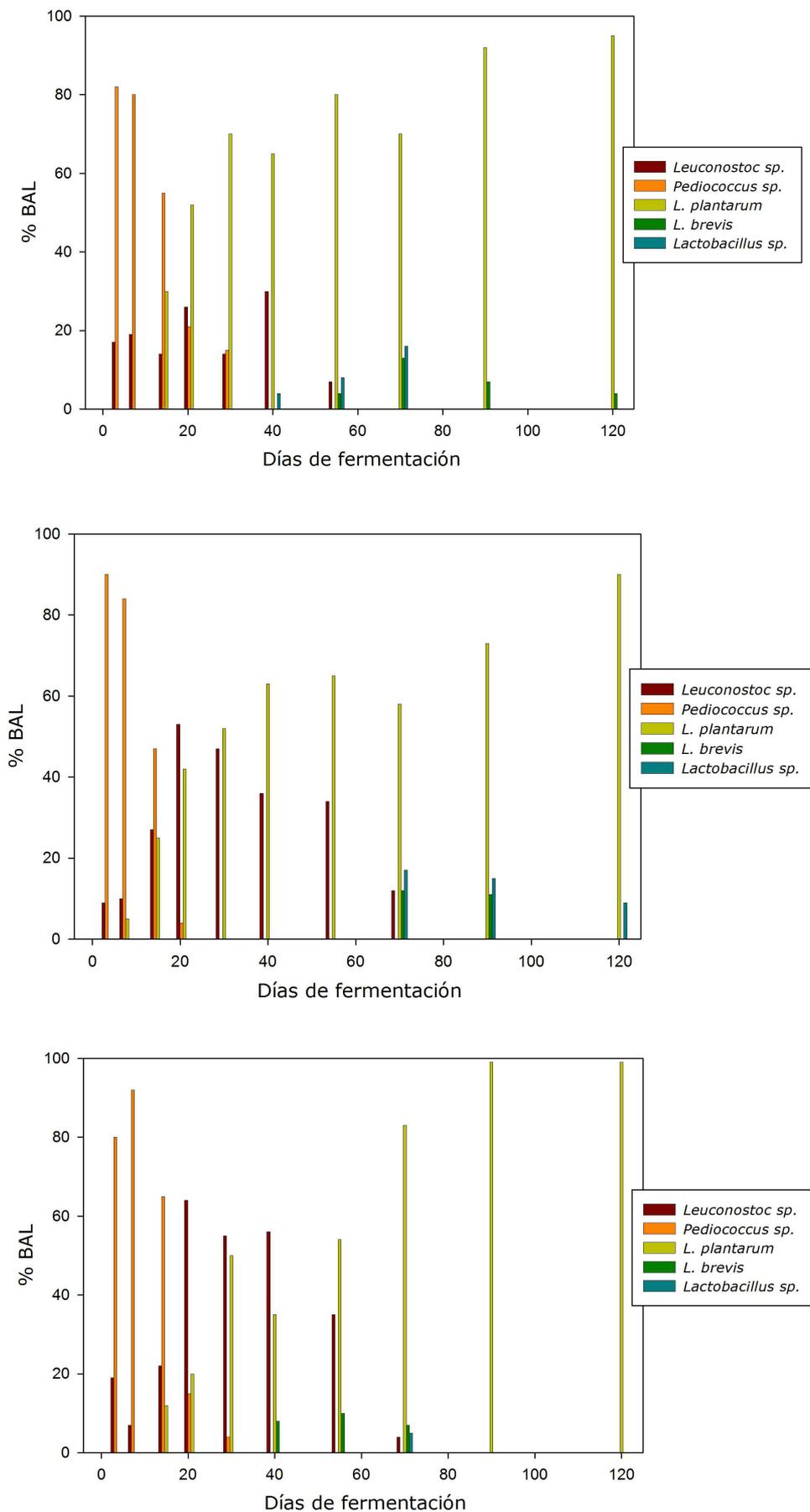


Figura 3.9. Fermentadores enterrados. Campaña 2007/08

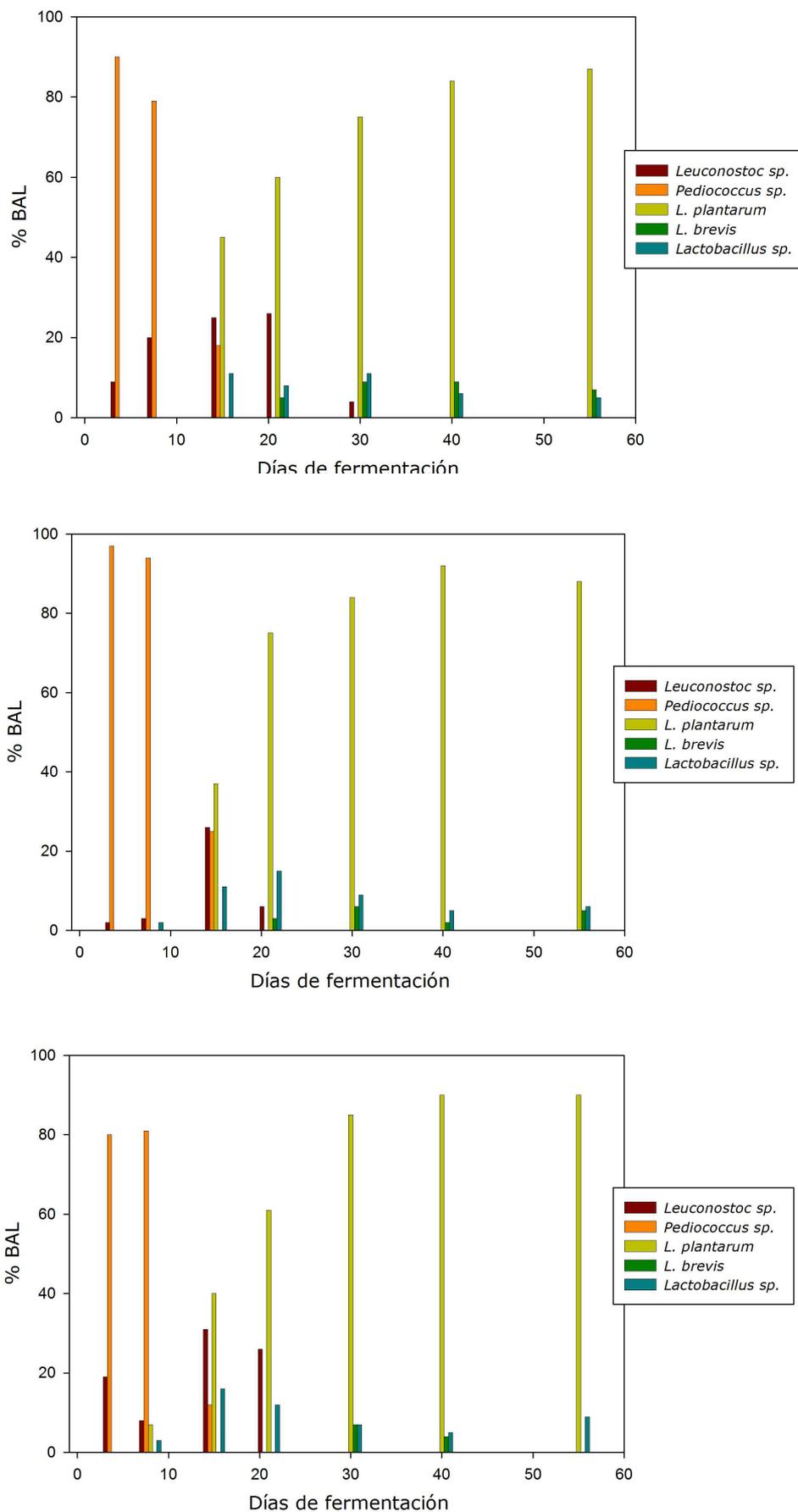


Figura 3.10. Fermentadores en bodega. Campaña 2008/09

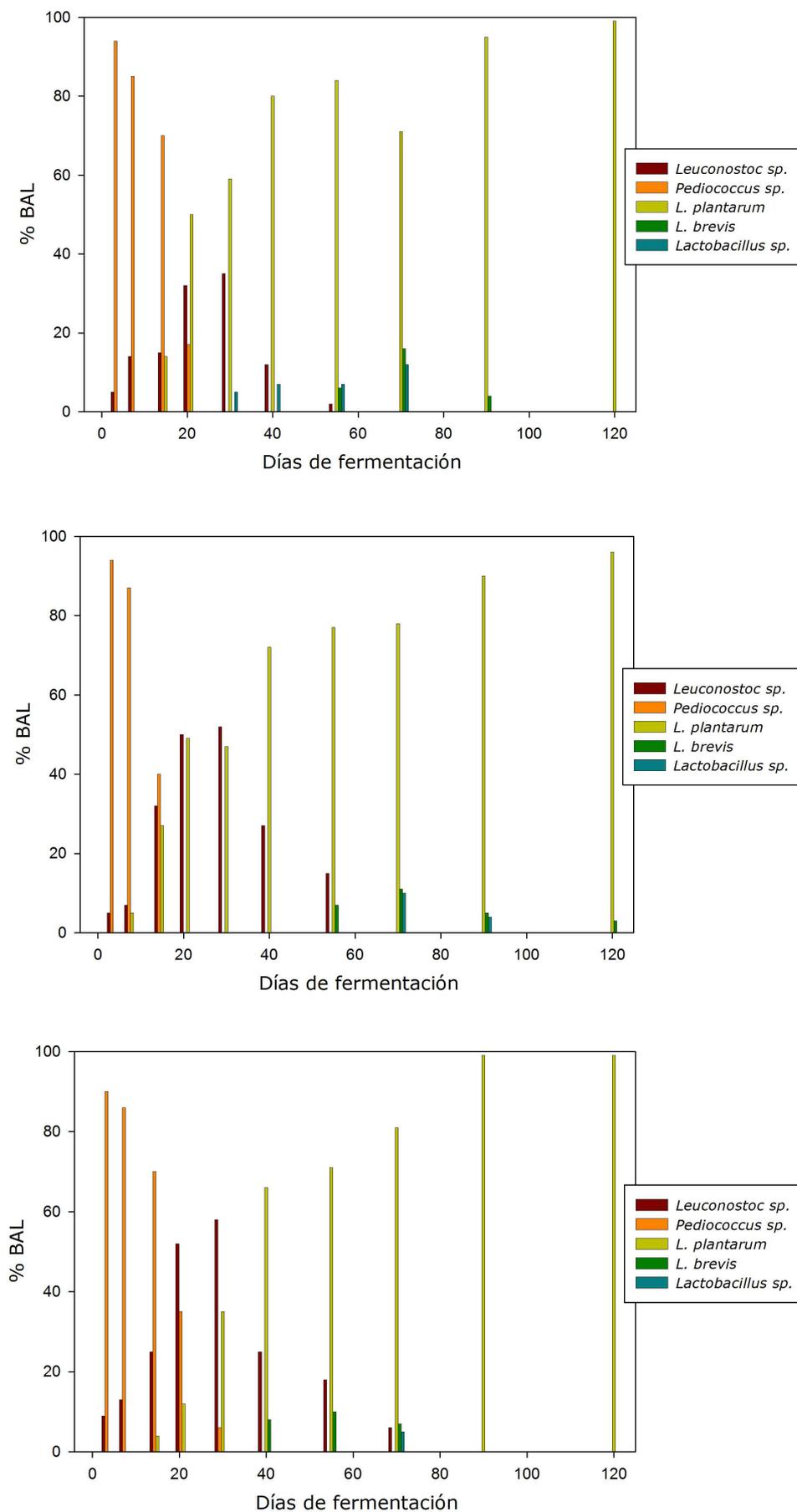


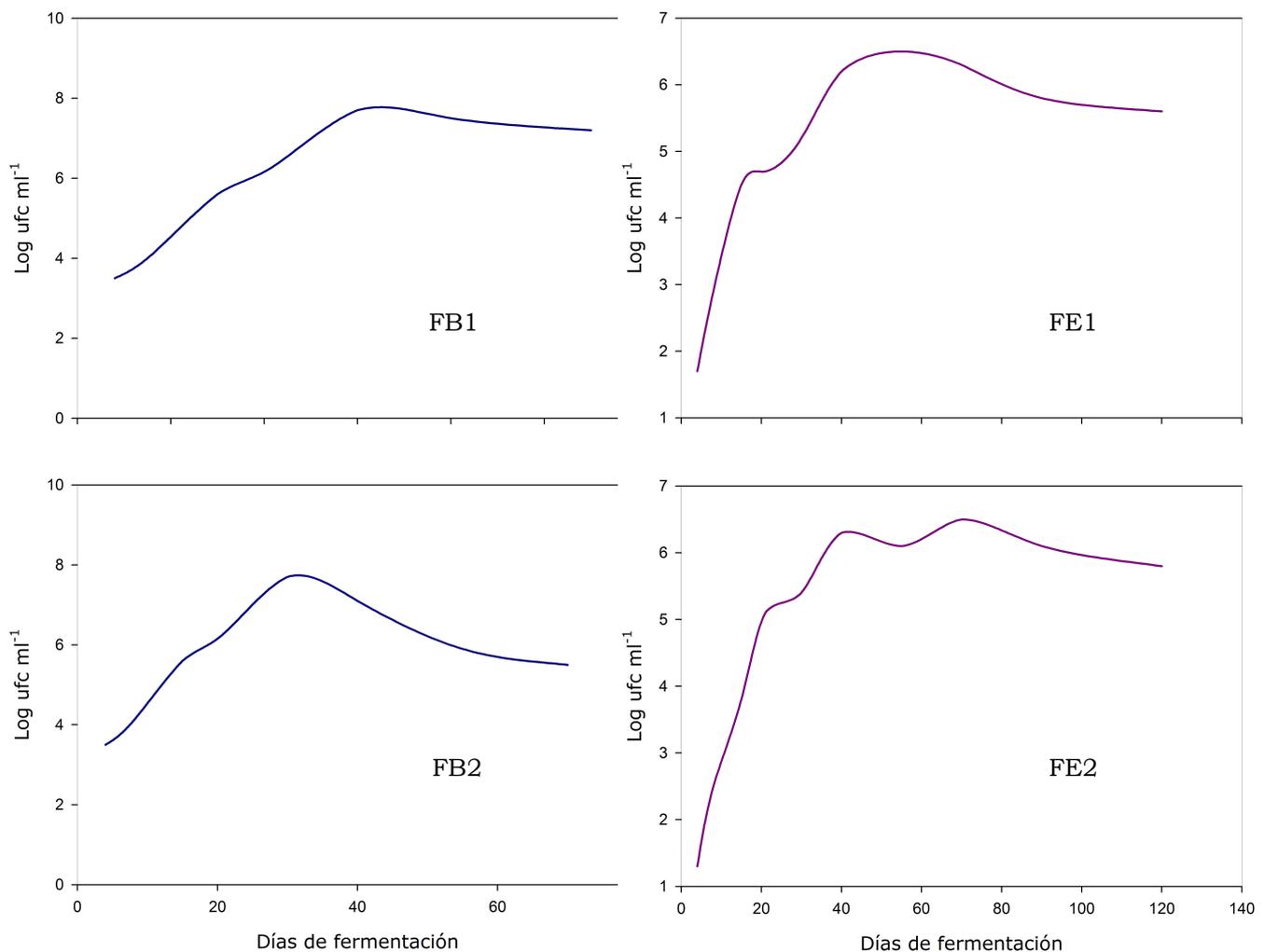
Figura 3.11. Fermentadores enterrados. Campaña 2008/09

3.1.3 Evolución poblacional de bacterias del ácido láctico

Se hizo un seguimiento como recuento de viables de las poblaciones de bacterias ácido lácticas totales en cada uno de los fermentadores en bodega (FB1, FB2, FB3) y enterrados (FE1, FE2, FE3) a lo largo de las tres campañas.

Los resultados para una mejor representación gráfica, se expresan como log de u.f.c./ml, entendidos como el número de colonias por placa de Petri partido por el factor de dilución y el volumen (ml) añadido en placa.

Como puede verse en las siguientes figuras 3.12, 3.13 y 3.14, para todos los casos y cuantitativamente, las poblaciones son superiores, a veces hasta en más de dos unidades logarítmicas en los fermentadores en bodega, siendo para las distintas campañas los valores similares y más homogéneos que en los fermentadores enterrados.



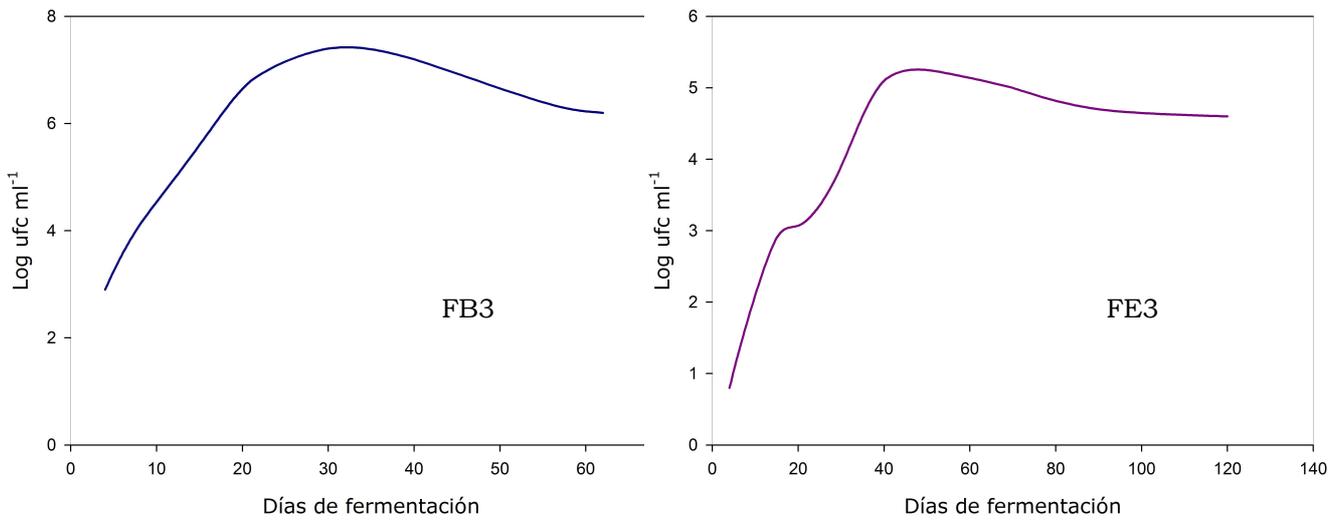
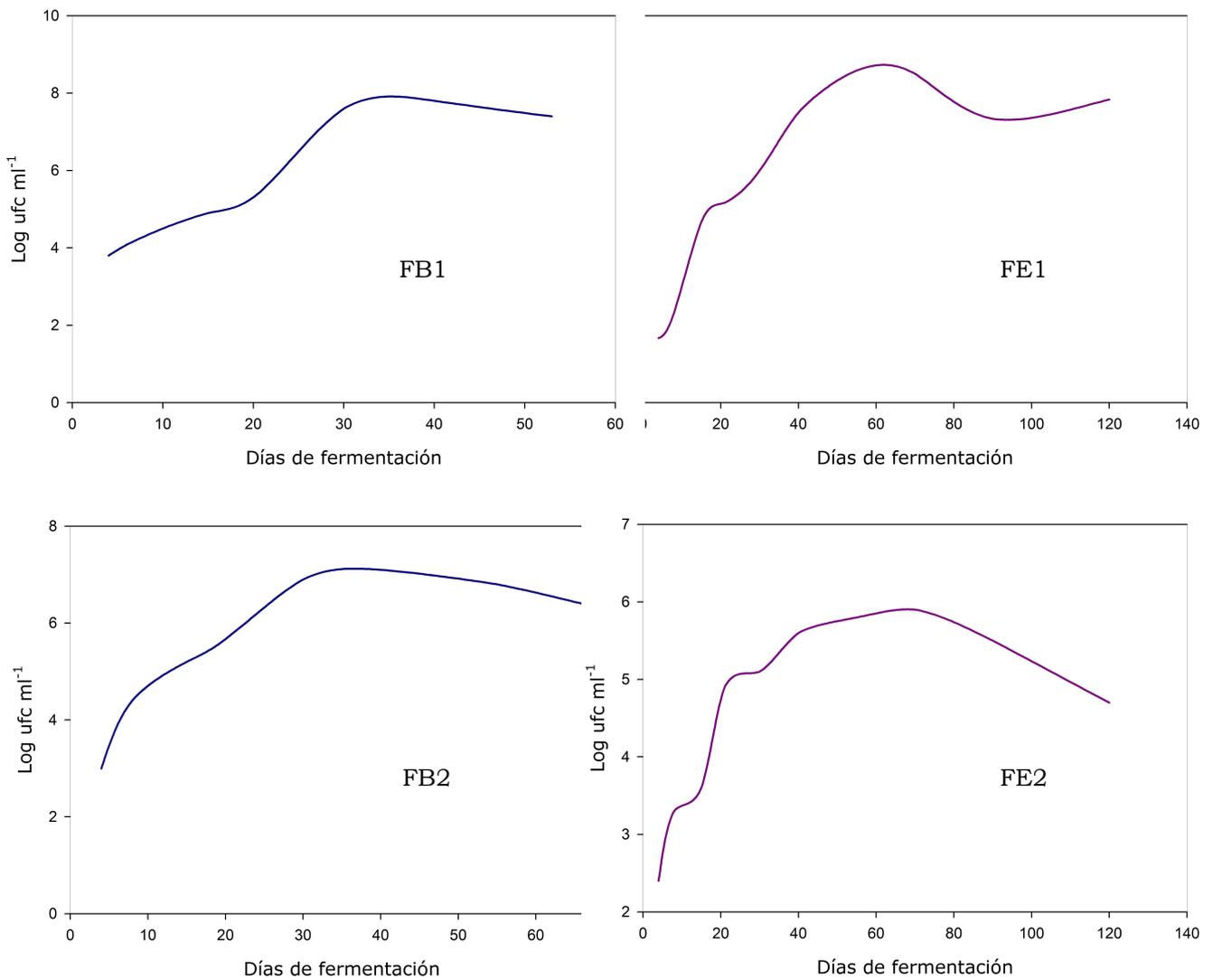


Figura 3.12. Campaña 2006/2007. Población total de bacterias ácido lácticas



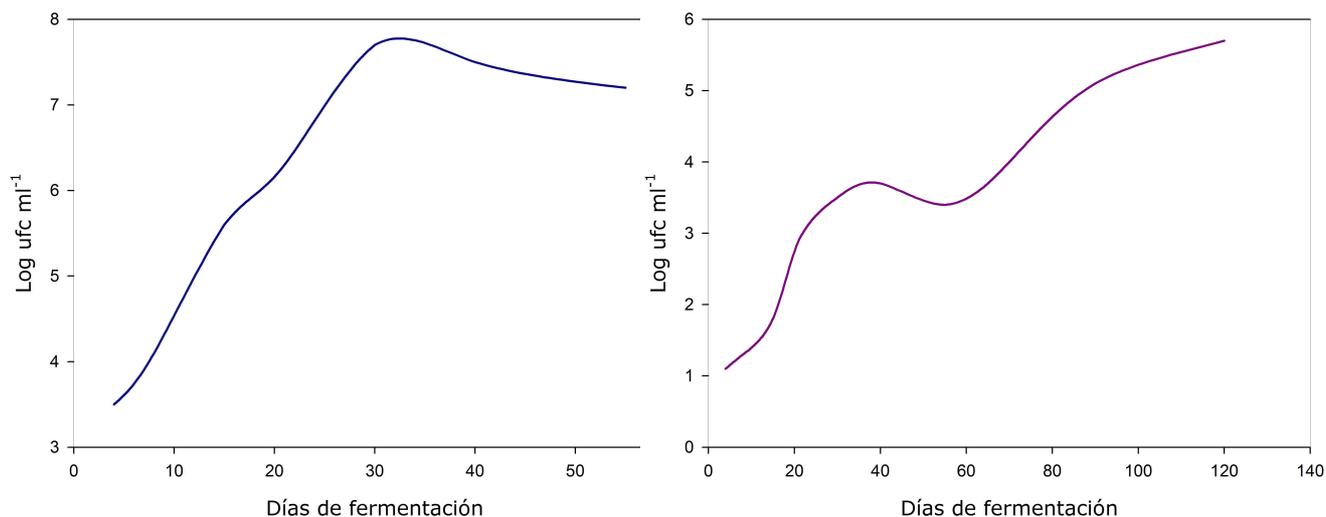
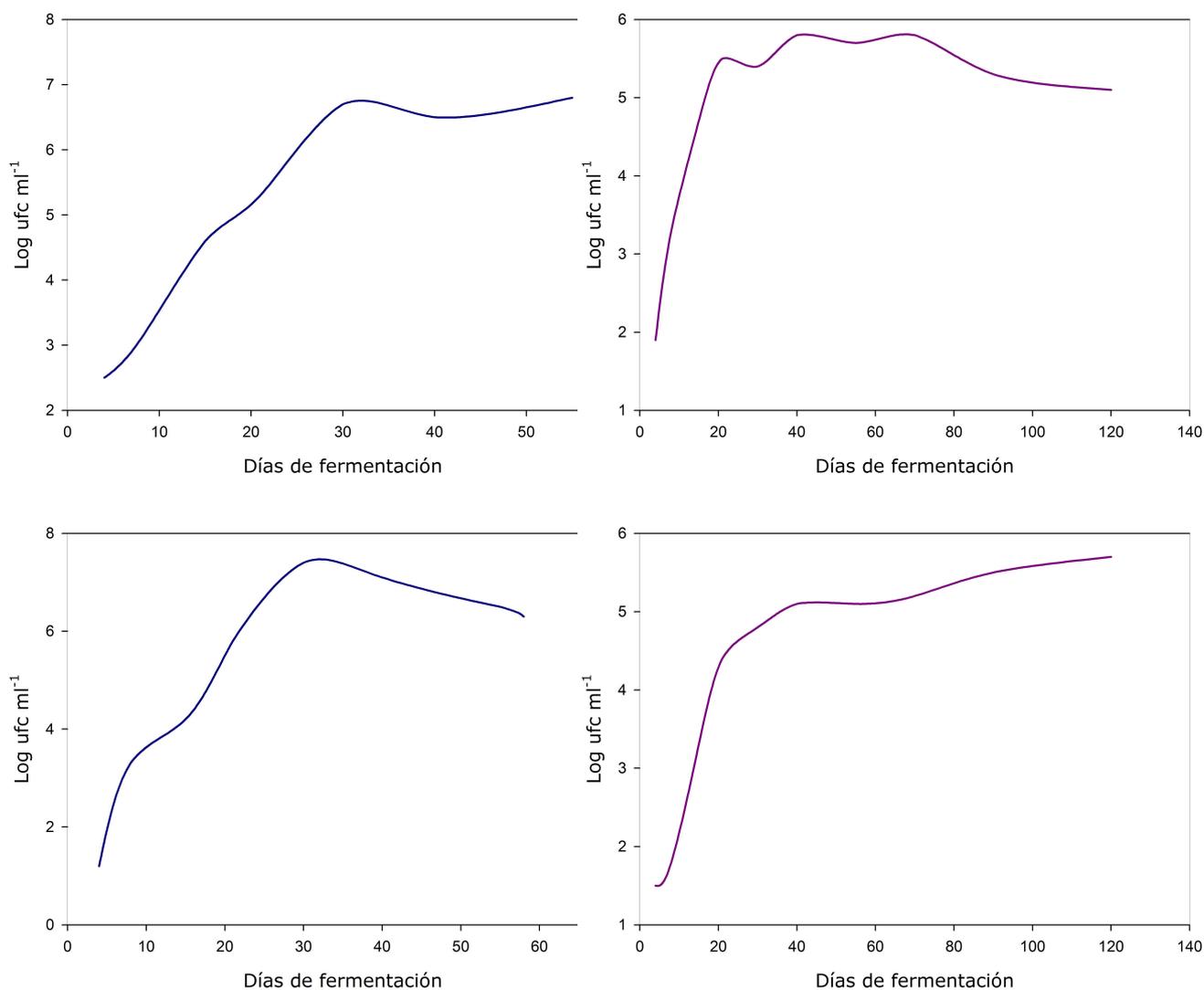


Figura 3.13. Campaña 2007/2008. Población total de bacterias ácido lácticas



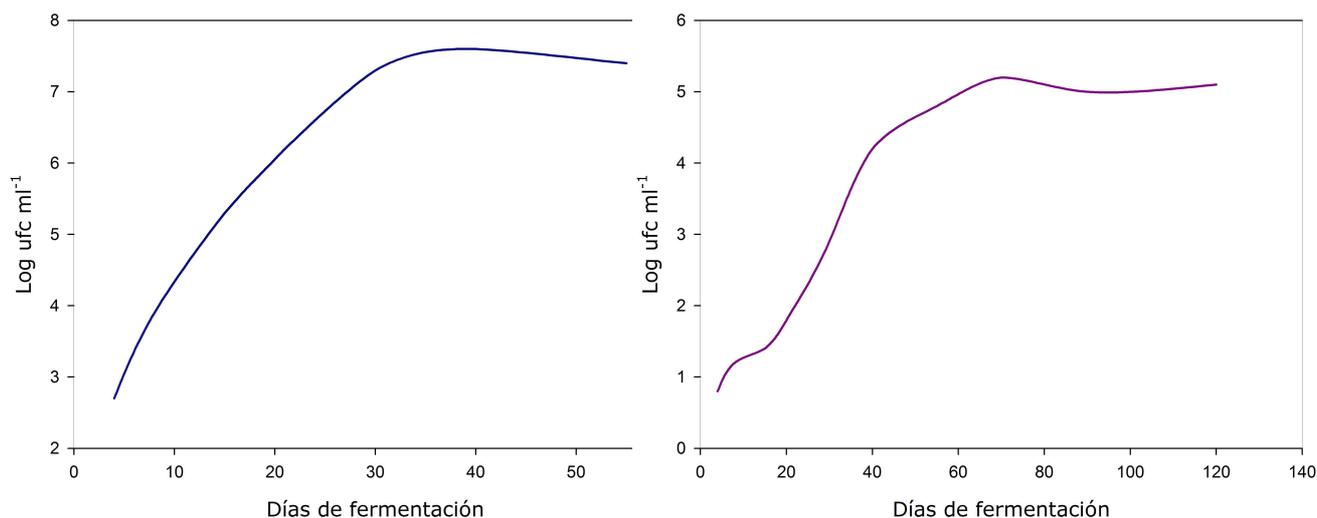


Figura 3.14. Campaña 2008/2009. Población total de bacterias ácido lácticas

3.1.4 Selección de cepas de bacterias del láctico

Se realizaron pruebas selectivas partiendo de 115 aislados bacterianos, procedentes de las salmueras de fermentación que mostraron una evolución de los parámetros químicos más eficientes y cuando la concentración microbiana era más alta, estudiándose la capacidad para realizar la fermentación ácido láctica.

Las pruebas siguieron un orden secuencial que nos permitió ir seleccionando a las BAL de forma progresiva. Evidentemente el consumo de glucosa es un parámetro crítico, con independencia de otras características deseables en las cepas, por lo que se incluyó en los medios selectivos una cantidad de glucosa (2 g/l).

3.1.5 Evolución del pH en presencia de tampón

Este método permitió hacer una selección primaria y eliminar así la mayor parte de los aislados silvestres carentes de interés. Del total de los 115 aislados, se comprobó que a las 24 horas, 52 no modificaron el pH (Grupo I), 41 lo modificaron ligeramente, entre 0,2 y 0,4 unidades de pH (Grupo II), y 22 lo modificaron en más de 0,6 unidades (Grupo III) (**Figura 3.15**). En estas últimas cepas, los cambios de pH pudieron registrarse a tiempos cortos, como se aprecia en la **Figura 3.16**, donde en una hora, el pH se incrementó en 0,1 unidades.

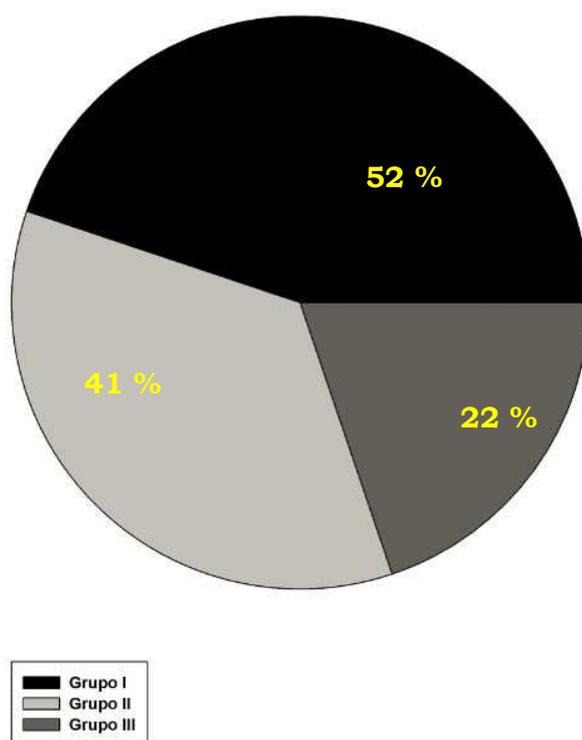


Figura 3.15. Distribución de las cepas modificadoras de pH

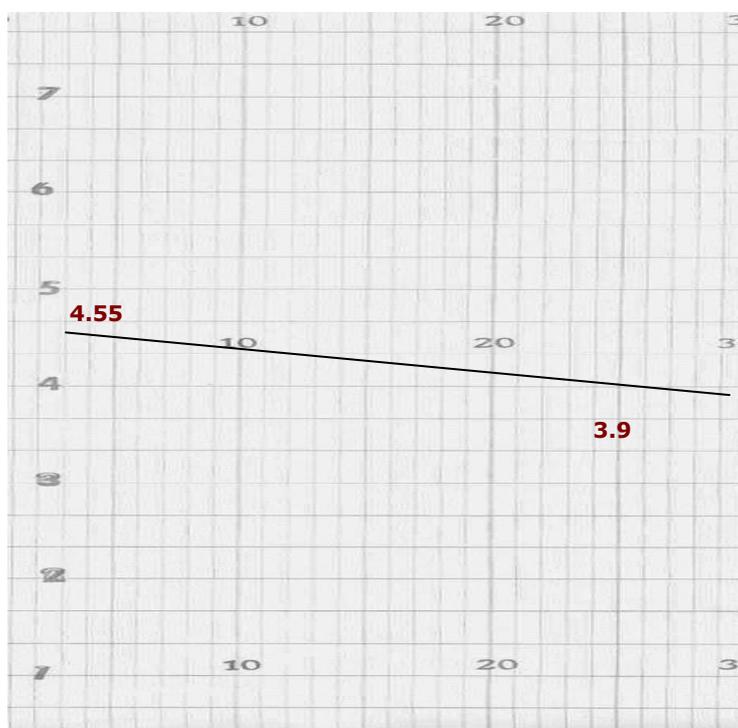


Figura 3.16. Evolución del pH (24 horas) de un medio con glucosa como única fuente carbonada, tras ser inoculado con la cepa BAL-17 (*L. plantarum*).

3.1.6 Fermentación ácido-láctica

En base a los resultados del apartado anterior, se procedió a elegir 10 cepas de las que no habían modificado el pH del tampón con glucosa, otras 10 que lo habían hecho parcialmente, y las 22 cepas seleccionadas. Las condiciones del ensayo fueron similares a las anteriores. Con esta prueba se perseguía el objetivo de cuantificar el ácido láctico, mediante análisis cromatográfico (**Figura 3.17**).

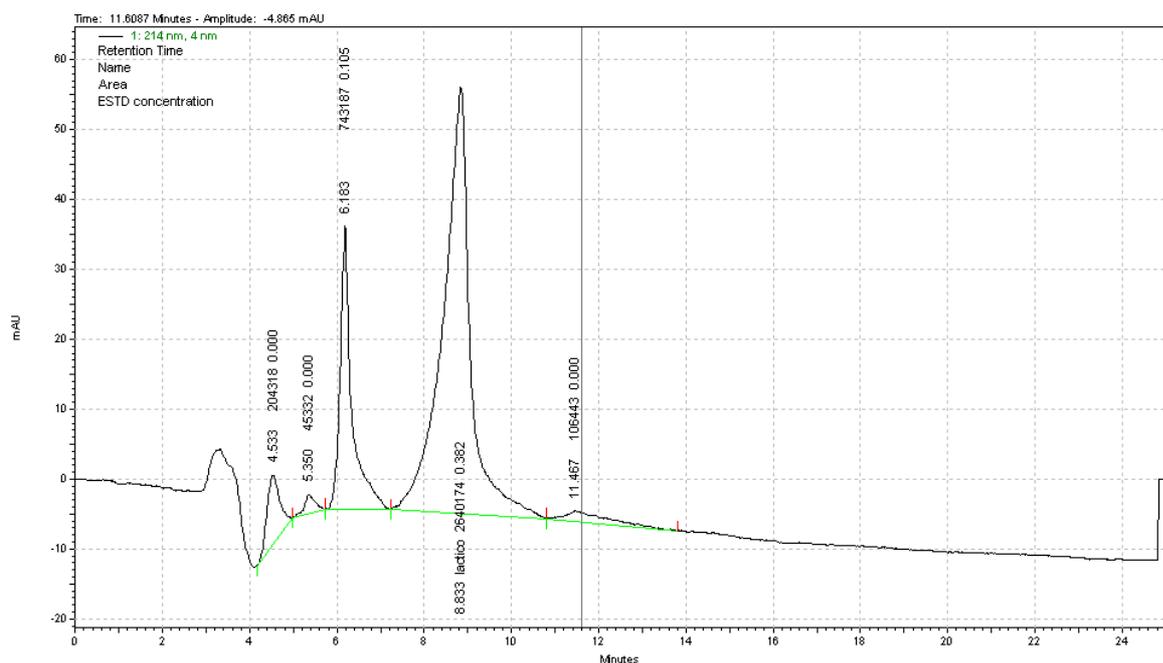


Figura 3.17. Cromatograma de BAL grupo III, donde se muestra el pico para la determinación en la producción de ácido láctico

Los resultados obtenidos fueron concluyentes, de modo que las cepas que no modificaron el pH tampoco consumieron la glucosa, las que lo hicieron ligeramente, también lo modificaron parcialmente (en torno al 25 %) y, las cepas seleccionadas lo consumieron prácticamente en su totalidad (**Figura 3.18**).

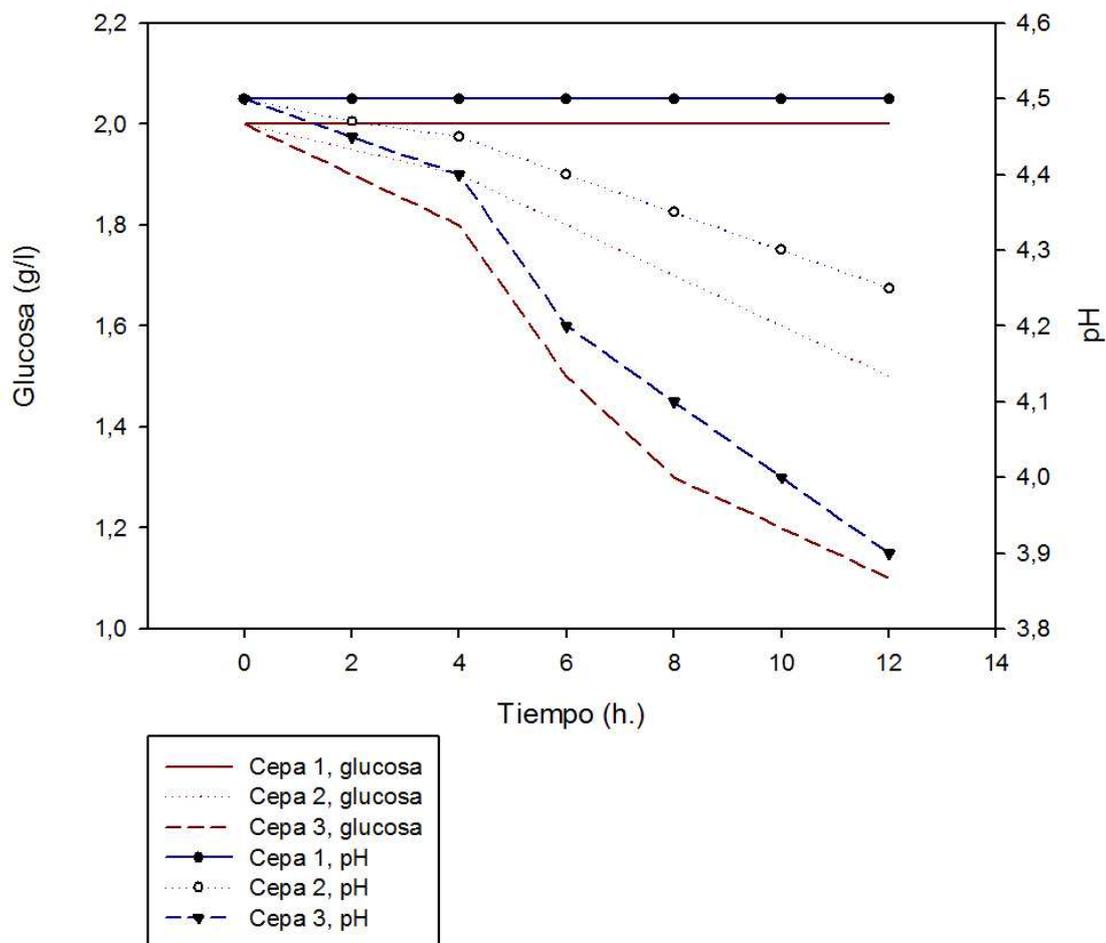


Figura 3.18. Evolución de la glucosa y el pH, en un medio tamponado e inoculado con tres BAL seleccionadas.

3.1.7 Tiempo de generación

La determinación del tiempo de generación (G) de cada cepa seleccionada, es un parámetro de interés en cualquier estudio que implique un desarrollo activo y un crecimiento de la población de bacterias. Este ensayo nos permitió eliminar algunas cepas de las 22 cepas seleccionadas, exactamente las que mostraron un valor superior de G. Los valores de G estuvieron comprendidos entre 45 y 150 minutos. La **Tabla 3.5** representa el tiempo de generación de algunas de las cepas consideradas.

Tabla 3.5. Tiempo de generación de las cepas seleccionadas

CEPA	BAL-31	BAL-6	BAL-108	BAL-55	BAL-19	BAL-40	BAL-27	BAL-17	BAL-82	BAL-12
G	85	72	143	91	47	64	116	62	77	96

Los resultados obtenidos en este ensayo nos permitió seleccionar a la cepa BAL-19 (*Lactobacillus plantarum*), como la que mostró una G menor, así como una notable capacidad para modificar el pH en un medio tamponado.

CAPÍTULO 2

3.2.1 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

- **Medidas del ácido láctico**

En primer lugar, para comprender el comportamiento del ácido láctico ($\text{CH}_3\text{CH}[\text{OH}]\text{-COOH}$) en disolución (salmuera de fermentación en nuestro caso), hay que tener en cuenta que se trata de un ácido monoprótico parcialmente ionizado (neutralizado), y que se encuentra en constante equilibrio con el otro ácido involucrado en la concentración de H^+ en el medio, el ácido acético (CH_3COOH).

$$\text{H}^+ = \frac{K_1(\text{AH})_1 + K_2(\text{AH})_2}{A^{-1} + A^{-2}}$$

El pH ($-\log [\text{H}^+]$) es función de cada uno de los ácidos y de la cantidad de base añadida, la que a su vez condiciona la fracción de base que corresponden a la forma ionizada de cada ácido (A^{-1} , A^{-2}). Se pueden calcular éstas fracciones conociendo las cantidades totales de cada ácido y la base añadida, por las siguientes ecuaciones:

$$[(\text{AH}_1)] = (\text{AH}_1) + A^{-1}$$

$$\text{Acidez combinada: } b = A^{-1} + A^{-2}$$

$$[(\text{AH}_2)] = (\text{AH}_2) + A^{-2}$$

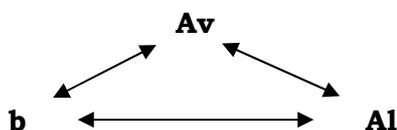
$$\text{Acidez libre: } A1 = (\text{AH})_1 + (\text{AH})_2$$

$$A^{-1} + A^{-2} = b$$

$$\text{Acidez volátil: } A_v = (\text{AH})_2 + A^{-2}$$

En nuestro caso A^{-1} sería el ión lactato y A^{-2} el ión acetato. Como tales, en salmuera están formando sales o como forma ácida $(\text{AH})_1$ ácido láctico y $(\text{AH})_2$ ácido acético, nunca como iones libres. La acidez volátil se supone que corresponde a la cantidad total de ácido acético. La cantidad total de ácido láctico se determina:

$$\text{Láctico total} = A1 + b - A_v = (\text{AH})_1 + (\text{AH})_2 + A^{-1} + A^{-2} - (\text{AH})_2 - A^{-2} = (\text{AH})_1 + A^{-1}$$



*Al añadir sales, varía el equilibrio
y cambia la acidez*

la acidez volátil, como ya se ha comprobado en anteriores estudios (**Montaño A. et al. 2003**), en la variedad Hojiblanca tiene una incidencia no significativa, inferior al 5 %.

En todos los resultados obtenidos se expresan las medidas de acidez, pH, cloruro sódico y temperatura medias por temporada en función del tipo de fermentador empleado.

En los fermentadores en bodega, los valores medios por campaña relativos a la acidez fueron similares. Los primeros días de la puesta del fruto en salmuera ofrecieron una acidez libre en torno al 0,1 % (de ácido láctico por 100 ml de salmuera (p/v)), que se comenzaron a estabilizar, al igual que los valores de acidez combinada, a los 25 - 30 días del comienzo de la fermentación, llegando a alcanzar unos valores al final de campaña cercanos al 1 % (**Figura 3.19**). Los valores de acidez combinada frecuentemente llegaron a final de campaña por debajo de 0,1 N, mientras que los primeros valores estaban sobre 0,13 – 0,15 N.

Se presenta la relación acidez combinada / acidez libre pues fue uno de los ratios que mostró una correlación directa con el grado de desarrollo de la cuarta fase de fermentación del fruto.

El pH, a pesar de arrojar valores incluso superiores a 7, presentó un descenso acusado en las dos primeras semanas, estabilizándose de forma gradual hasta valores en torno a 4 incluso inferiores al final de campaña (**Figura 3.20**).

La concentración de cloruro sódico, que al colocar las aceitunas en la salmuera era del 10 – 11 %, a los pocos días se equilibra hacia valores comprendidos entre 5 – 6 %, manteniéndose prácticamente constante hasta el final de la campaña.

La temperatura en todos los fermentadores en bodega mantuvo unos valores en salmuera sobre los 21° C – 22° C. La temperatura ambiente en el exterior de la bodega osciló hacia unos valores medios bajos propios de la temporada (**Figura 3.21**).

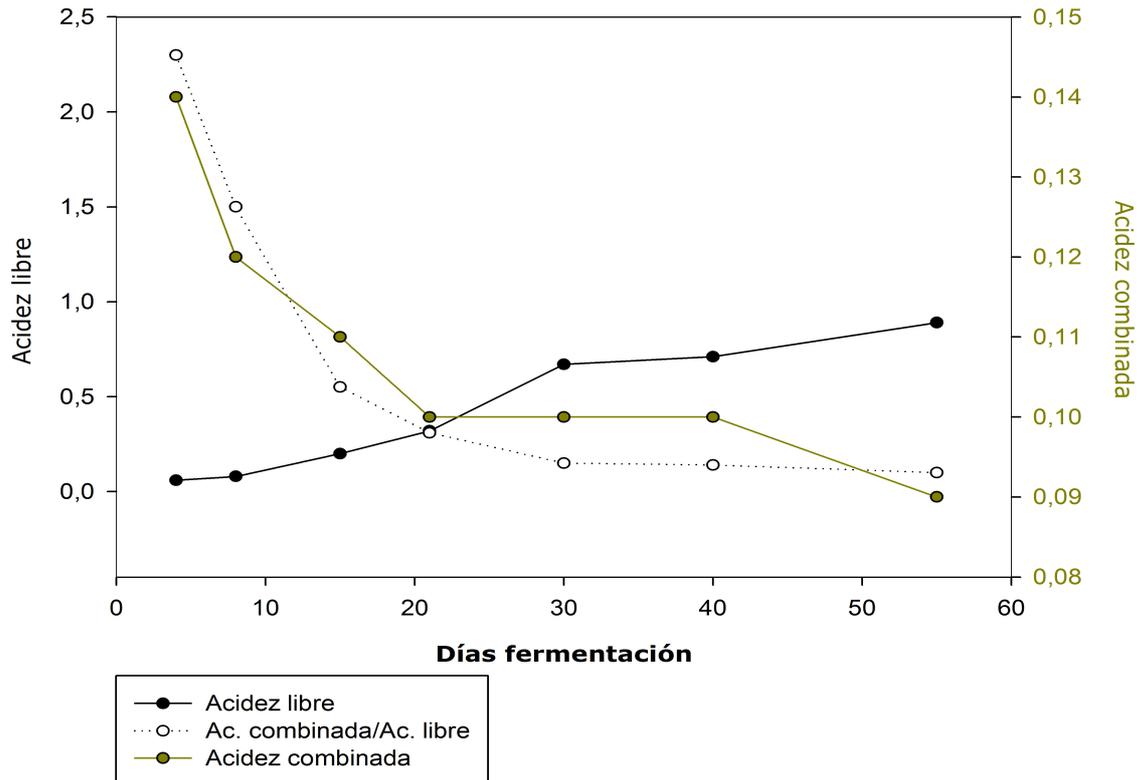


Figura 3.19. Valores medios de acidez en fermentadores en bodega (FB1, FB2, FB3), campaña 2006 / 2007

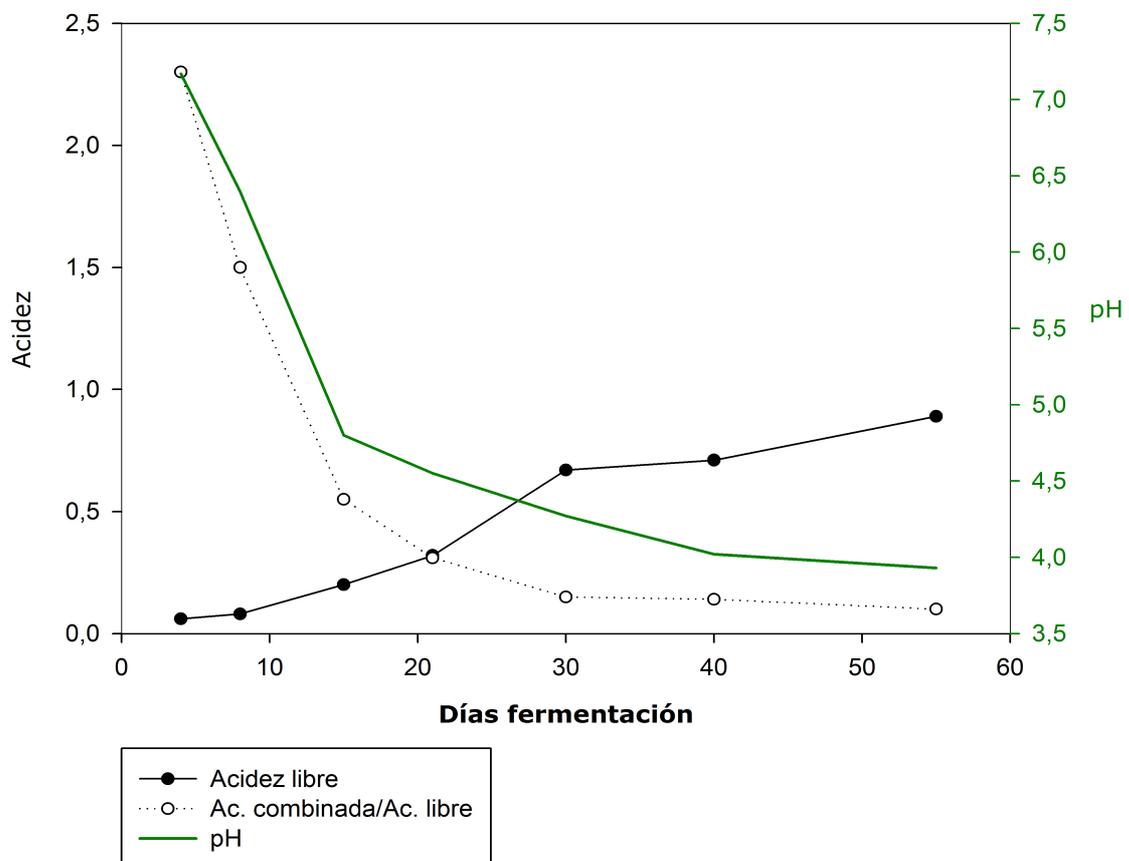


Figura 3.20. Valores medios de acidez y pH en fermentadores en bodega (FB1, FB2, FB3), campaña 2006 / 2007

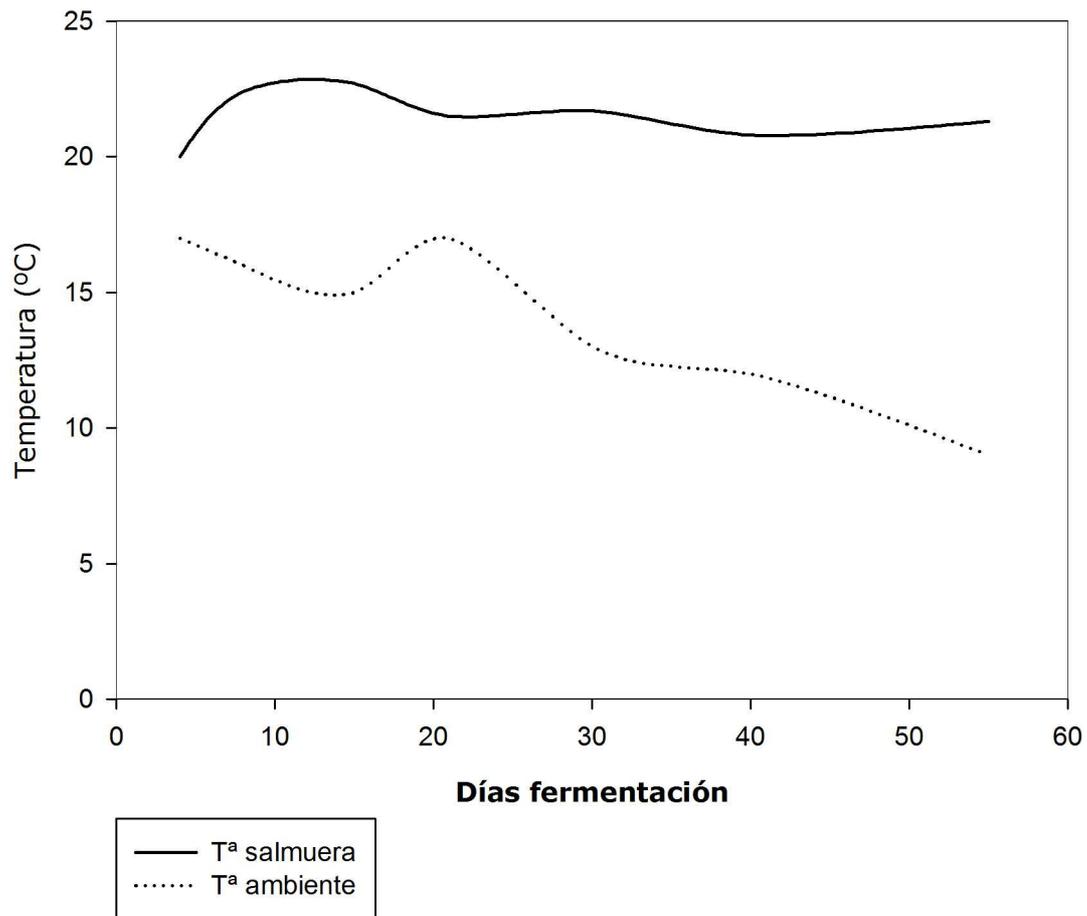


Figura 3.21. Valores medios de temperatura en fermentadores en bodega (FB1, FB2, FB3), campaña 2006 / 2007

Los datos de temperatura ambiente registrados a lo largo de las tres campañas se muestran gráficamente como datos medios (Figura 3.22). Éstos inciden con mayor relevancia en las fermentaciones acontecidas en los fermentadores enterrados, ya que éstos, como se mencionó anteriormente, están dirigidos por la propia inercia térmica del proceso de fermentación presentando fluctuaciones que hacen que el rango de temperatura en estos fermentadores sea mayor.

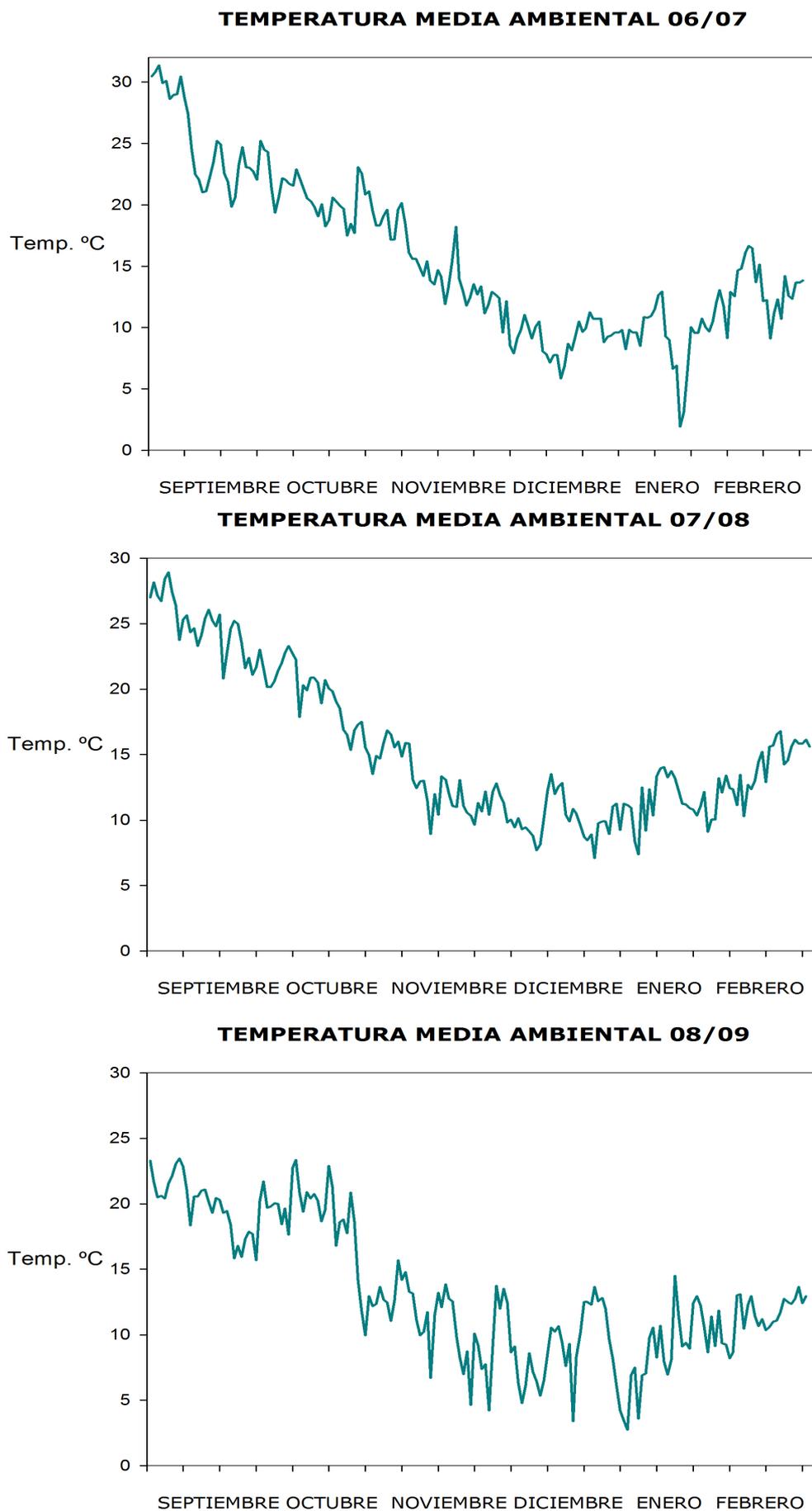


Figura 3.22. Valores medios de temperatura ambiente en las tres campañas

En los fermentadores enterrados, la media de campaña por fermentador fue de unos 4 meses. Los valores de acidez, pH y temperatura de fermentación se mostraron diferentes a los situados en bodega, ver **Figuras 3.23, 3.24 y 3.25**.

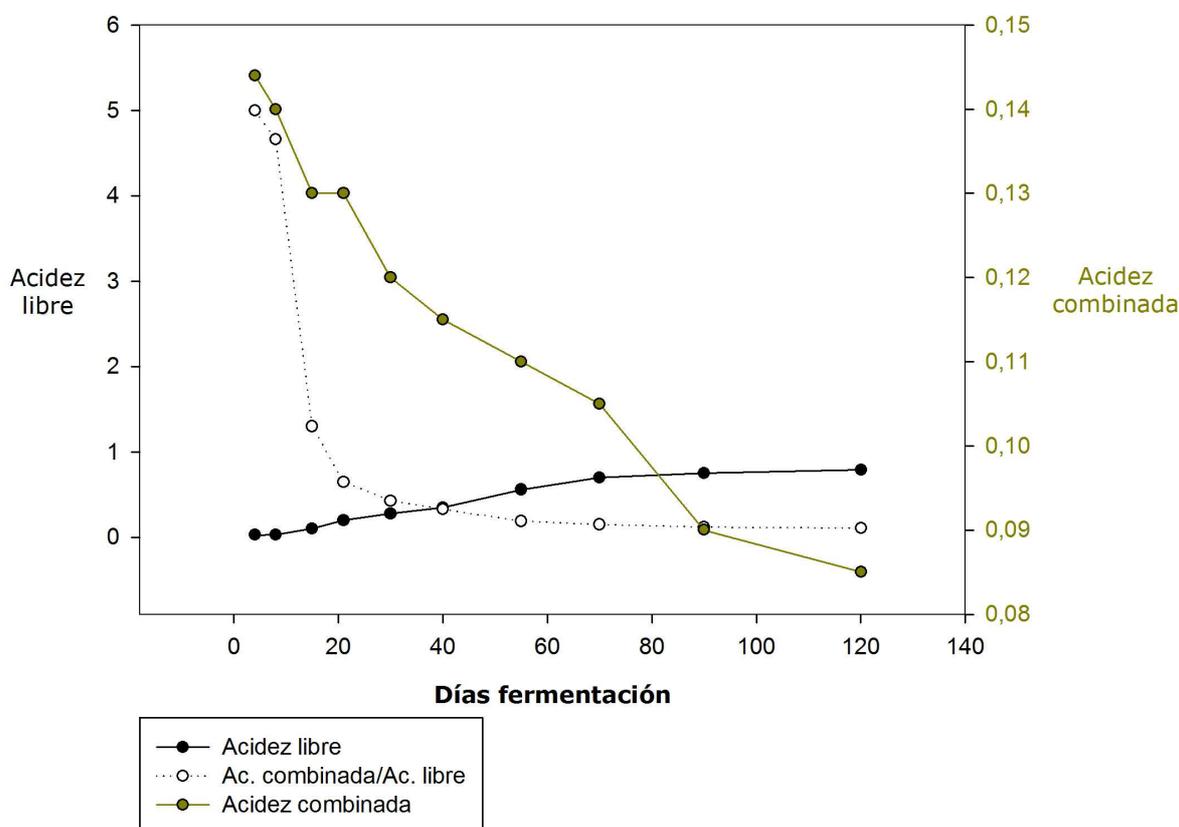


Figura 3.23. Valores medios de acidez en fermentadores enterrados (FE1, FE2, FE3), campaña 2006 / 2007

Principalmente, se observa una reducción de la acidez combinada gradualmente más espaciada en el tiempo y unos valores de acidez libre similares aunque algo inferiores al final de campaña respecto a los fermentadores en bodega, del orden de unas 0,2 unidades.

Para alcanzar el umbral de un pH inferior a 4,5 transcurren unos 50 días de media, mientras que en los fermentadores en bodega se alcanzaba en torno a las tres semanas. Siendo crítico un valor de pH inferior a 5 - 4,5 para evitar el crecimiento de bacilos Gram-negativos tipo coliformes (*Enterobacter sp.*, *Citrobacter sp.*, *Klebsiella aerogenes* y *Escherichia coli*) y otras especies (*Aeromonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Achromobacter sp.*, y *Flavobacterium sp.*)

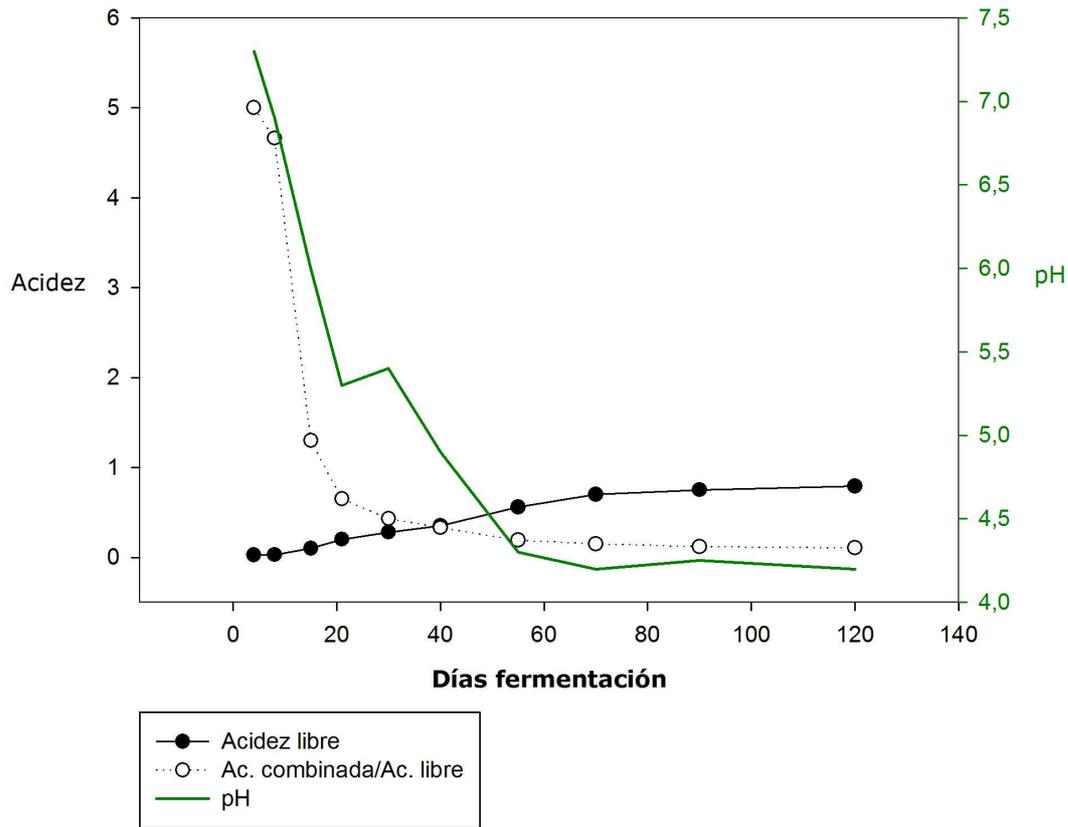


Figura 3.24. Valores medios de acidez y pH en fermentadores enterrados (FE1, FE2, FE3), campaña 2006 / 2007

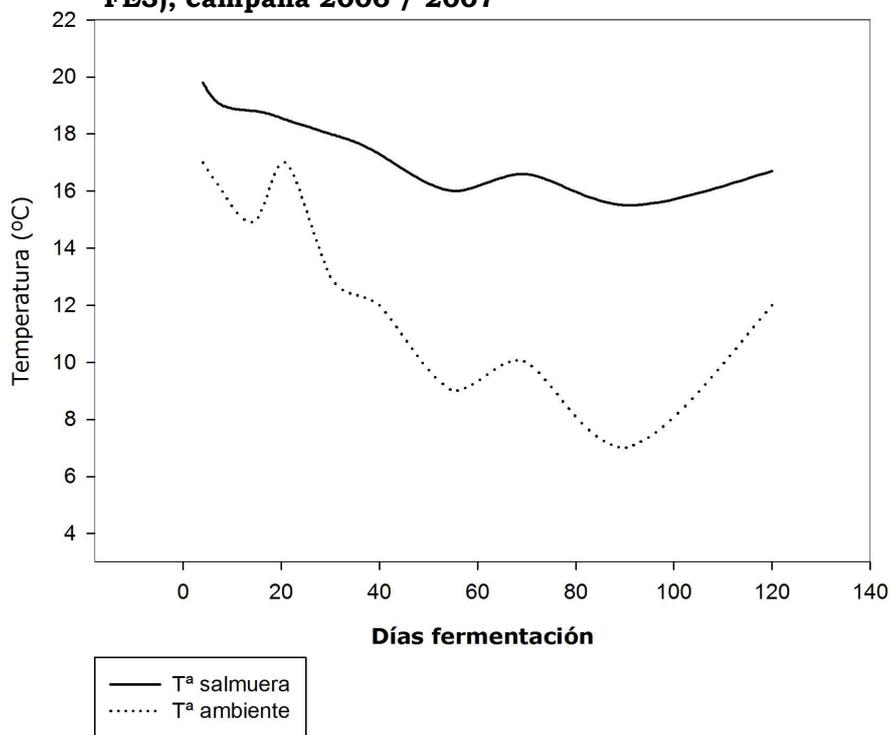


Figura 3.25. Valores medios de temperatura en fermentadores enterrados (FE1, FE2, FE3), campaña 2006 / 2007

Se aprecian unas diferencias notables en la temperatura de la salmuera de fermentación (**Figura 3.25**), como en las sucesivas campañas (**Figura 3.26 y 3.27**), mientras en los fermentadores en bodega se mantenía alrededor de los 21° C. En el caso de los fermentadores enterrados la temperatura fluctúa entre los 20° C y los 16° C, en función de la temperatura ambiental. Lo que incide principalmente en el número de UFC/ml de cada tipo de fermentador (epígrafe 3.1.3).

Asimismo, los valores en las sucesivas campañas no mostraron diferencias significativas, salvo las señaladas para ambos tipos de fermentadores, como se expone a continuación.

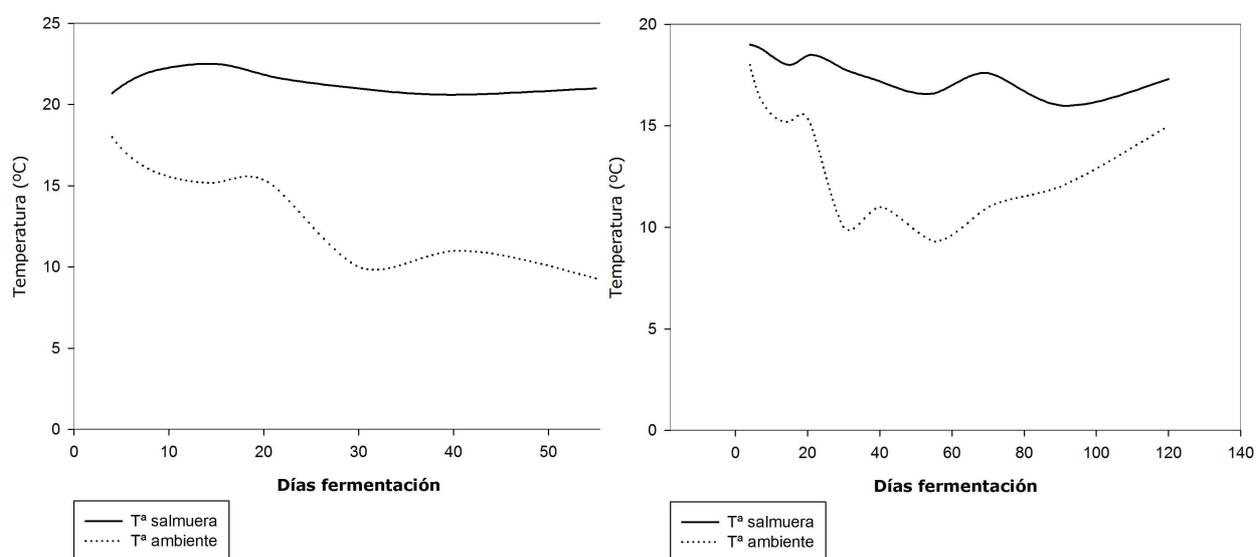


Figura 3.26. Valores medios de temperatura en fermentadores en bodega [A] y enterrados [B], campaña 2007 / 2008

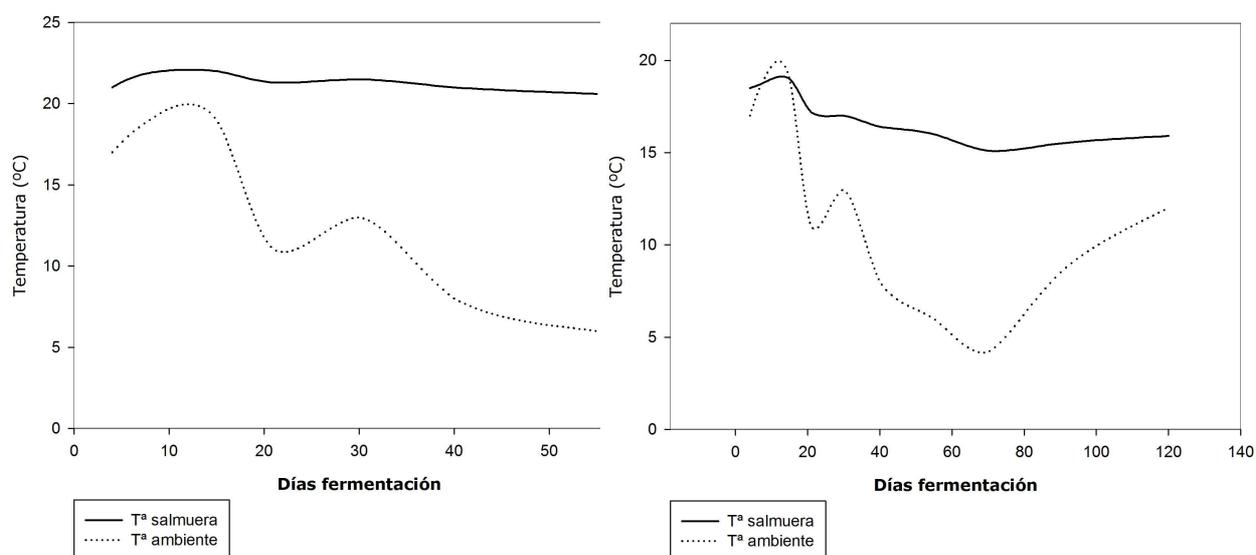


Figura 3.27. Valores medios de temperatura en fermentadores en bodega [A] y enterrados [B], campaña 2008 / 2009

Los datos obtenidos de pH, acidez libre, combinada y ratio AC/AL para las campañas 07/08 y 08/09 se muestran gráficamente en **figuras 3.28 y 3.29**.

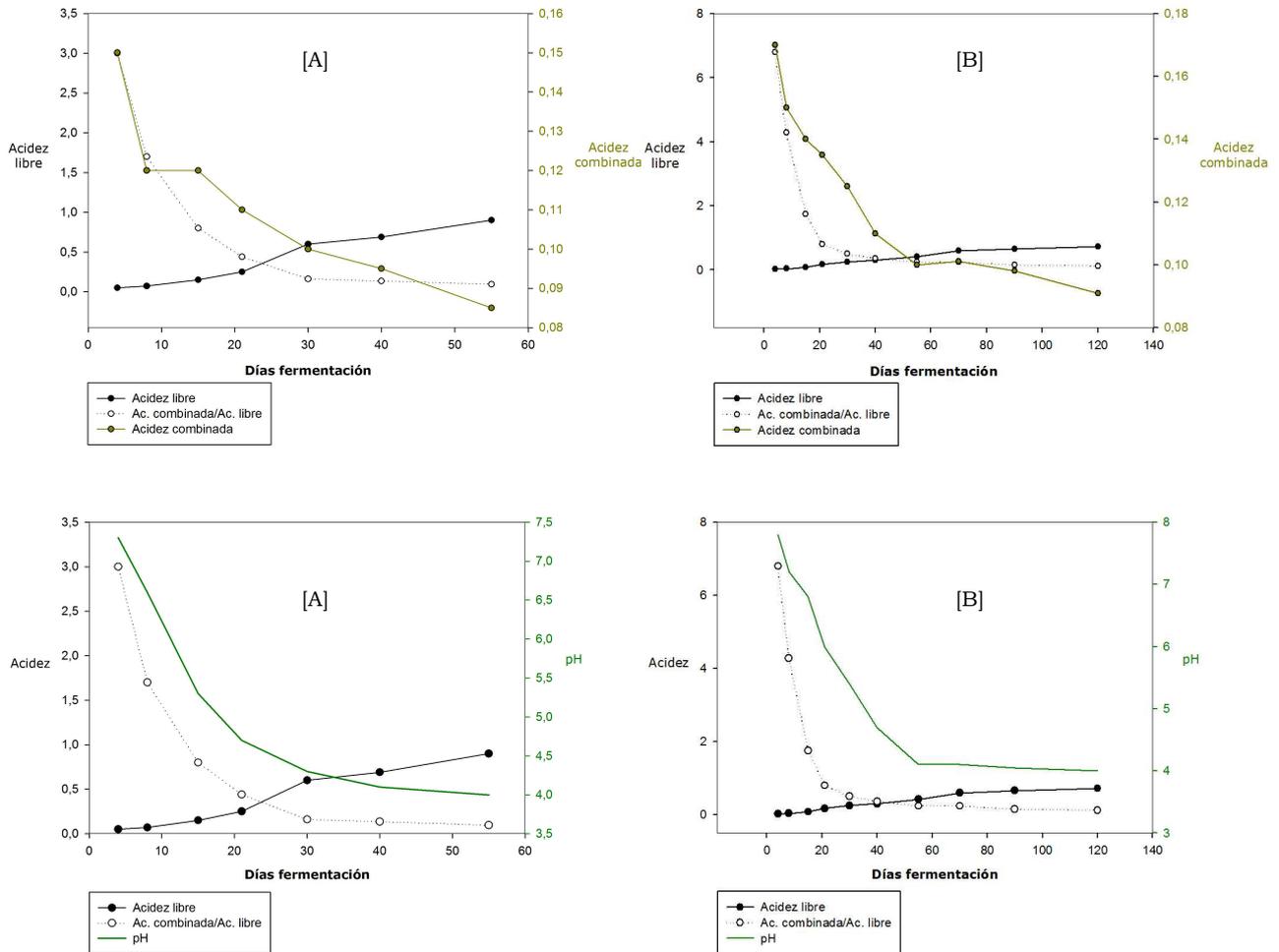


Figura 3.28. Valores medios en fermentadores en bodega [A] y enterrados [B], campaña 2007 / 2008

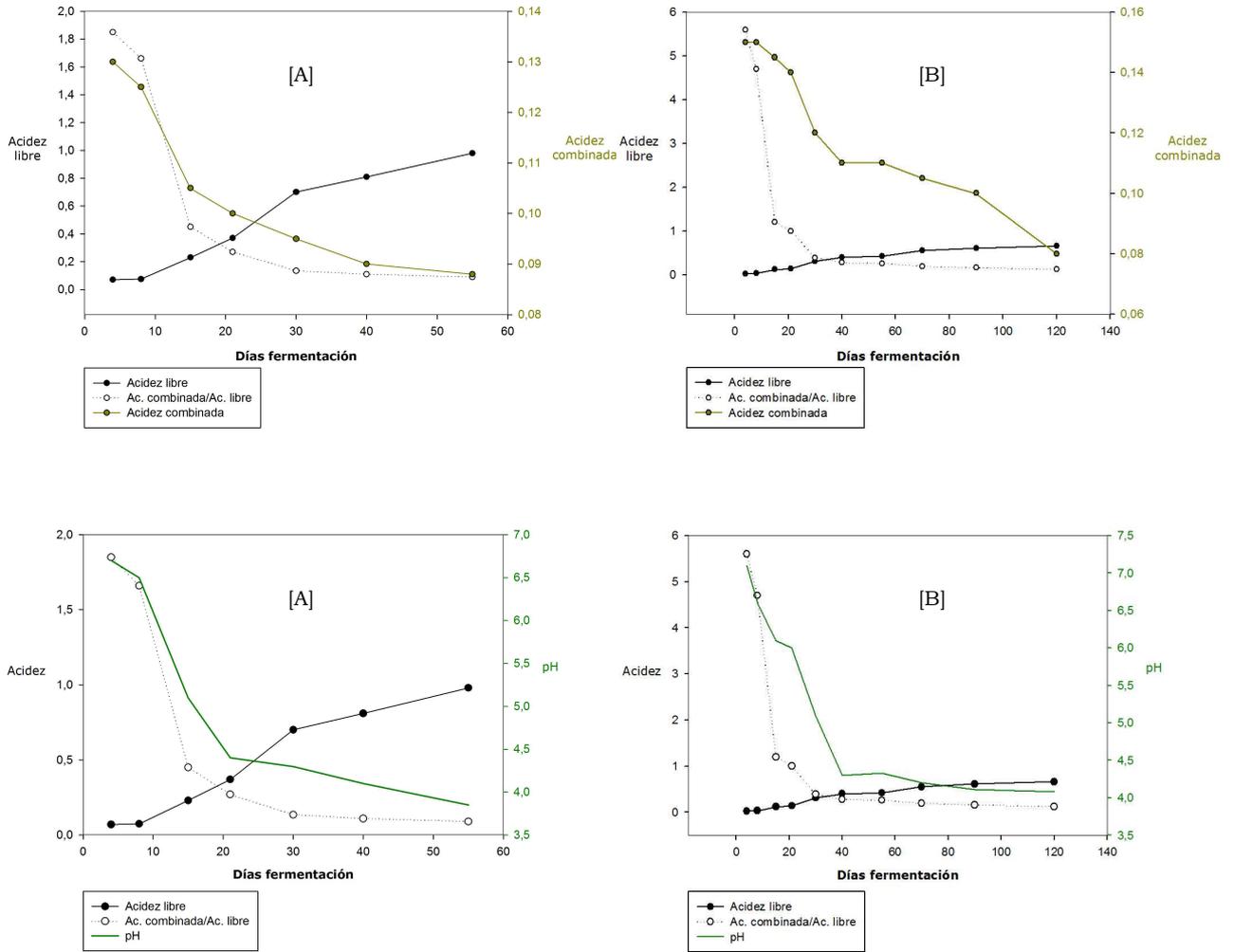


Figura 3.29. Valores medios en fermentadores en bodega [A] y enterrados [B], campaña 2008 / 2009

3.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se toma como modelo para análisis estadístico los datos de una fermentación media para bodega de fermentación y otra para fermentadores enterrados. Teniendo en cuenta a su vez los valores medios alcanzados en las tres campañas, es decir, la fermentación modelo para bodega y para fermentadores enterrados, arrojando los siguientes resultados.

3.2.2.1 Fermentadores en bodega

- **Ajuste de curva de pH con la acidez.**

El pH se considera como variable de respuesta y el cociente de relación acidez combinada / acidez libre, como factor explicativo cuantitativo para predecir la variable de respuesta (**Figura 3.31**).

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo lineal para describir la relación entre pH y Ac/Al. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{pH} = 3,96573 + 1,45072 \times (\text{Ac/Al})$$

Puesto que el valor-P para la pendiente es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un 95,0 nivel de confianza.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 98,10% de la variabilidad en pH. El coeficiente de correlación es igual a 0,9905, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0,190416. Este valor se usa para construir los límites de predicción para las nuevas observaciones.

El error absoluto medio (MAE) de 0,146637 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el valor-P es mayor que 0,05, no existe indicación de una posible correlación serial en los residuos.

La salida también muestra una gráfica del modelo ajustado. Las cotas muestran los límites de 99,0% de predicción para nuevas observaciones de pH a valores dados de Ac:Al. Se han tabulado tanto los límites de confianza para la media como los límites de predicción de las nuevas observaciones para los valores elegidos de Ac:Al.

La gráfica de residuos muestra los residuos Estudentizados frente a los valores de Ac:Al y frente al número de fila. Cualquier patrón no aleatorio indicaría que el modelo seleccionado no es adecuado para describir los datos observados. Además, cualquier valor fuera del rango de -3 a +3 bien podría ser un dato aberrante.

Se puede apreciar la tabla de frecuencias para Ac/Al (**Tabla 3.6**) y gráficamente los resultados de la tabulación en histograma (**Figura 3.30**), donde se ejecuta una tabulación de frecuencias dividiendo el rango de Ac:Al en intervalos del mismo ancho, y contando el número de datos en cada intervalo. Las frecuencias muestran el número de datos en cada intervalo, mientras que las frecuencias relativas muestran las proporciones en cada intervalo

Tabla 3.6. Frecuencias para Ac:Al

Clase	Límite Inferior	Límite Superior	Punto Medio	Frecuencia	Frecuencia Relativa	Frecuencia Acumulada	Frecuencia Rel. Acum.
	menor o igual	-0,1		0	0,0000	0	0,0000
1	-0,1	0,65	0,275	5	0,7143	5	0,7143
2	0,65	1,4	1,025	0	0,0000	5	0,7143
3	1,4	2,15	1,775	1	0,1429	6	0,8571
4	2,15	2,9	2,525	1	0,1429	7	1,0000
	mayor de	2,9		0	0,0000	7	1,0000

Media = 0,726722 Desviación Estándar = 0,861207

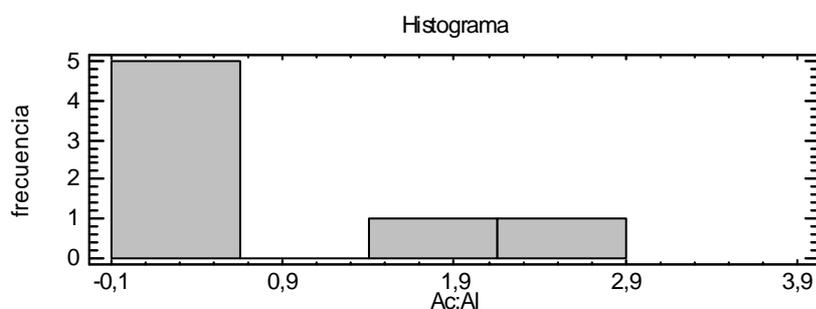


Figura 3.30. Histograma de tablas de frecuencia para Ac/Al

SnapStat: Ajuste de Curva

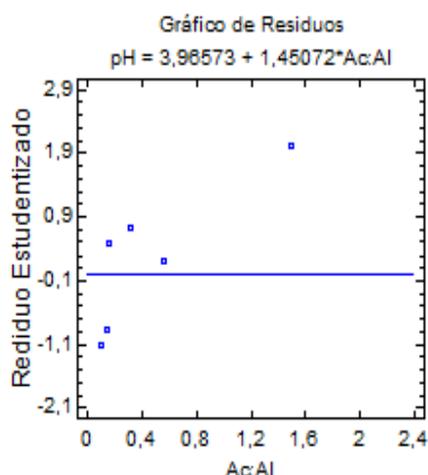
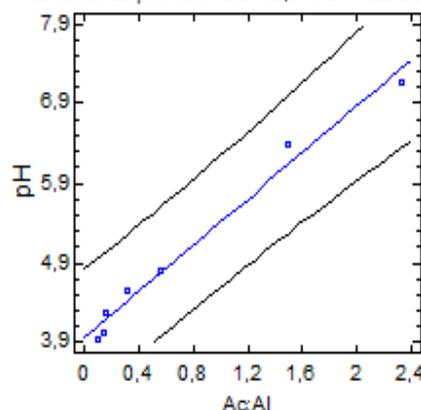
$pH = 3,96573 + 1,45072 \cdot Ac:Al$

	Estimado	Valor-P
Intercepto	3,96573	0,0000
Pendiente	1,45072	0,0000

Coefficiente de Correlación = 0,9905
 R-cuadrada = 98,10 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 97,72 por ciento

Error estándar del est. = 0,190416
 Error absoluto medio = 0,146637
 Estadístico Durbin-Watson = 1,71142 (P=0,1702)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0,0375929

Gráfico del Modelo Ajustado
 Con intervalos de previsión del 99,0% Límites de Predicción



X	Predicho Y	Límite de Pred. Inferior 99,0%	Límite de Pred. Superior 99,0%
0,0	3,96573	3,10337	4,8281
0,48	4,66208	3,83638	5,48777
0,96	5,35842	4,53324	6,1836
1,44	6,05476	5,19389	6,91564
1,92	6,75111	5,82249	7,67973
2,4	7,44745	6,42539	8,46951

X	Predicho Y	Límite de Conf. Inferior 99,0%	Límite de Conf. Superior 99,0%
0,0	3,96573	3,57308	4,35838
0,48	4,66208	4,3583	4,96585
0,96	5,35842	5,05606	5,66078
1,44	6,05476	5,66539	6,44413
1,92	6,75111	6,22877	7,27345
2,4	7,44745	6,77283	8,12207

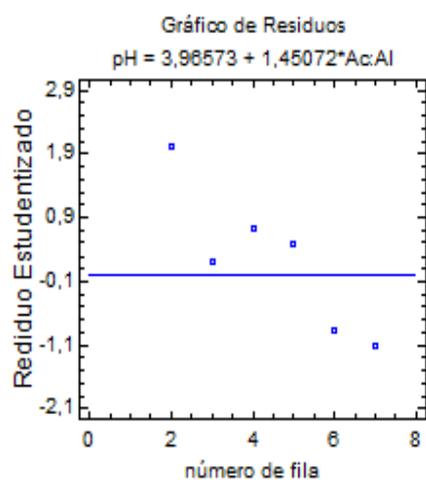
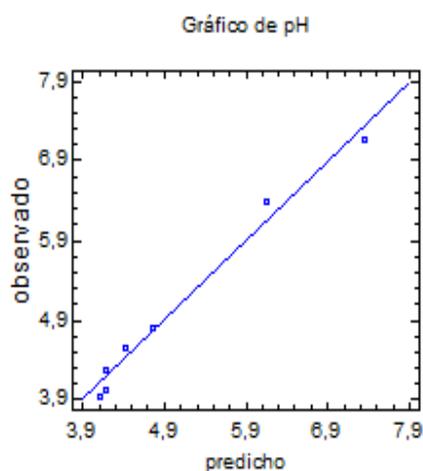


Figura 3.31. Resultados de ajustar un modelo lineal para describir la relación entre pH y Ac/Al

Si hacemos una comparación entre las variables acidez combinada, libre y pH, podemos, mediante una tabla ANOVA, descomponer la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de grupos (**Figura 3.32**).

La salida muestra el tamaño de muestra, media y desviación estándar para cada columna de datos. También se muestra un diagrama de dispersión, uno de caja y bigote, la tabla ANOVA, la gráfica de medias y la gráfica de análisis de medias.

La salida también muestra 3 diagramas de caja y bigote, uno para cada columna de datos. La parte rectangular de la gráfica se extiende desde el cuartil inferior hasta el cuartil superior, cubriendo la mitad central de cada muestra. La línea central dentro de cada caja indica la localización de la mediana de cada muestra. El signo + indica la localización de la media de cada muestra. Los bigotes se extienden desde la caja hasta los valores mínimo y máximo de cada muestra, excepto para cualquier punto alejado ó muy alejado, los que se grafican en forma individual. Puntos alejados son aquellos que quedan a más de 1,5 veces el rango intercuartílico por arriba ó por debajo de la caja y se muestran como pequeños cuadrados. Puntos muy alejados son aquellos que quedan a más de 3,0 veces el rango intercuartílico por arriba ó por abajo de la caja, y se muestran como pequeños cuadrados con un signo + en su interior. En este caso, no hay puntos alejados ni puntos muy alejados.

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes; un componente entre grupos y un componente dentro de los grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 93,2739, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95,0% de confianza.

Las pruebas de verificación de varianzas evalúan la hipótesis nula de que las desviaciones estándar de cada una de las 3 columnas es la misma. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza. Esto viola uno de los supuestos importantes subyacentes en el análisis de varianza e invalidará la mayoría de las pruebas estadísticas comunes.

La Gráfica de Medias muestra las medias de las 3 columnas de datos. También muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus

intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. Cualquier par de intervalos que no se solapen verticalmente corresponden a pares de medias que tienen una diferencia estadísticamente significativa.

La Gráfico de Análisis de Medias muestra la media de cada una de las 3 muestras. También se muestra la media global y los límites del 95% de decisión. La muestra que se encuentren afuera de los límites de decisión son estadísticamente diferentes de la media global.

SnapStat: Comparación Varias Muestras

Muestra	Recuento	Media	Sigma
Acidez combinada		0,108571	0,0167616
Acidez libre	7	0,418571	0,334436
pH	7	5,02	1,2614
	21	1,84905	2,4097

Gráfico de Dispersión

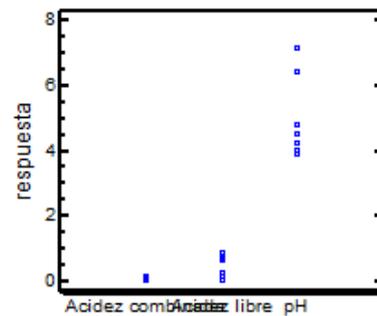


Gráfico Caja y Bigotes

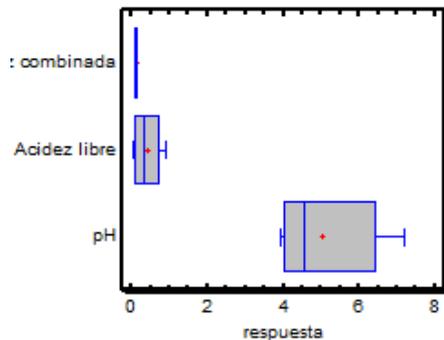


Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Media Cuadrado	Razón-F
Entre	105,913	2	52,9566	93,27
Dentro de	10,2196	18	0,567754	
Total	116,133	20		

Valor-P = 0,0000

Verificación de Varianza

Levene's: 4,21991

Valor-P = 0,0314

Gráfico de Medias

Con intervalos LSD del 95,0%

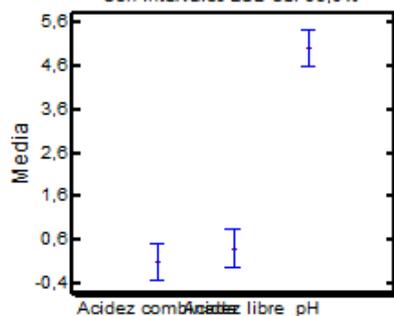


Gráfico ANOM

Con 95% Límites de Decisión



Figura 3.32. Comparación variables acidez combinada, acidez libre y pH

- **Análisis multivariado.**

Este procedimiento está diseñado para resumir varias columnas de datos cuantitativos. Calculará varios estadísticos, incluyendo correlaciones, covarianzas y correlaciones parciales. En el procedimiento también están incluidas una serie de gráficas multivariadas, que proporcionan vistas interesantes de los datos.

Datos/VARIABLES:

Ac/Al

pH

Acidez combinada

Acidez libre

Tabla 3.7. Resumen Estadístico

	<i>Ac:Al</i>	<i>pH</i>	<i>Acidez combinada</i>	<i>Acidez libre</i>
Recuento	7	7	7	7
Promedio	0,726722	5,02	0,108571	0,418571
Desviación Estándar	0,861207	1,2614	0,0167616	0,334436
Coefficiente de Variación	118,506%	25,1275%	15,4383%	79,8995%
Mínimo	0,101124	3,93	0,09	0,06
Máximo	2,33333	7,17	0,14	0,89
Rango	2,23221	3,24	0,05	0,83
Sesgo Estandarizado	1,53657	1,22245	1,29754	0,330854
Curtosis Estandarizada	0,489082	-0,151521	0,684844	-1,04977

Esta tabla muestra el resumen estadístico para cada una de las variables seleccionadas. Incluye medidas de tendencia central, de variabilidad, y de forma. De particular interés aquí es el sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada, las que pueden usarse para determinar si la muestra proviene de una distribución normal (**Tabla 3.7**). Valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican desviaciones significativas de la normalidad, las que tenderían a invalidar muchos de los procedimientos estadísticos que se aplican habitualmente a estos datos. En este caso, ninguna de las variables muestran valores de sesgo estandarizado y de curtosis estandarizada fuera del rango esperado. Igualmente, ninguna de las variables muestran curtosis estandarizada fuera del rango esperado.

La **Tabla 3.8** muestra las correlaciones momento producto de Pearson, entre cada par de variables. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables. También se muestra, entre paréntesis, el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. El tercer número en cada bloque de la tabla es un valor-P que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas. Valores-P por debajo de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%. Los siguientes pares de variables tienen valores-P por debajo de 0,05:

Ac:Al y pH

Ac:Al y Acidez combinada

Ac:Al y Acidez libre

pH y Acidez combinada

pH y Acidez libre

Acidez combinada y Acidez libre

Tabla 3.8 Correlaciones

	Ac:Al	pH	Acidez combinada	Acidez libre
Ac:Al		0,9905	0,9724	-0,7924
		(7)	(7)	(7)
		0,0000	0,0002	0,0336
pH	0,9905		0,9641	-0,8445
	(7)		(7)	(7)
	0,0000		0,0005	0,0168
Acidez combinada	0,9724	0,9641		-0,8329
	(7)	(7)		(7)
	0,0002	0,0005		0,0200
Acidez libre	-0,7924	-0,8445	-0,8329	
	(7)	(7)	(7)	
	0,0336	0,0168	0,0200	

Correlación
(Tamaño de Muestra)
Valor-P

3.2.2.2 Fermentadores enterrados

- **Ajuste de curva de pH con la acidez.**

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo lineal para describir la relación entre pH y Ac/Al. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{pH} = 4,56181 + 0,544805 \times (\text{Ac/Al})$$

Puesto que el valor-P para la pendiente es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un 95,0 nivel de confianza.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 84,93% de la variabilidad en pH. El coeficiente de correlación es igual a 0,9216, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0,470223.

El error absoluto medio (MAE) de 0,375577 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe indicación de una posible correlación serial.

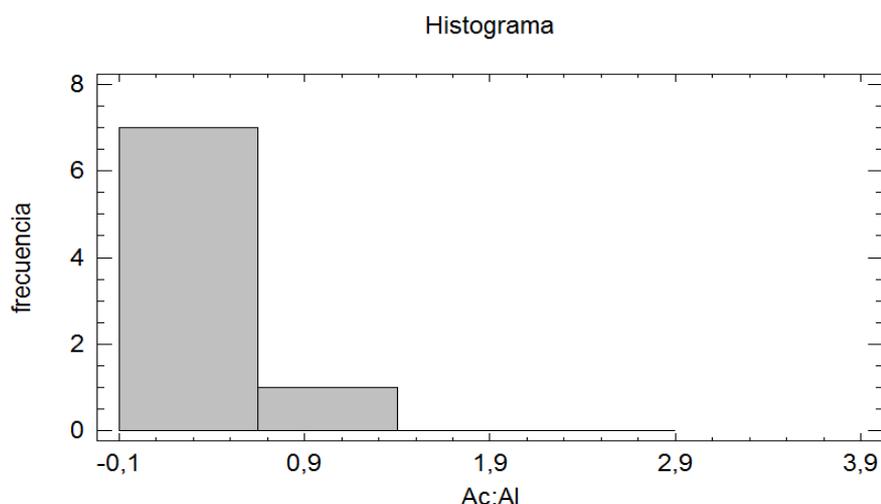
La salida también muestra una gráfica del modelo ajustado (**Figura 3.34**). Las cotas muestran los límites de 99,0% de predicción para nuevas observaciones de pH a valores dados de Ac:Al.

Se puede apreciar la tabla de frecuencias para Ac/Al (**Tabla 3.9**) y gráficamente los resultados de la tabulación en histograma (**Figura 3.34**) mostrados en fermentadores enterrados.

Tabla 3.9. Frecuencias para Ac:Al

	Límite Inferior	Límite Superior	Punto Medio	Frecuencia	Frecuencia Relativa	Frecuencia Acumulada	Frecuencia Rel. Acum.
	menor o igual	-0,1		0	0,0000	0	0,0000
1	-0,1	0,65	0,275	7	0,7000	7	0,7000
2	0,65	1,4	1,025	1	0,1000	8	0,8000
3	1,4	2,15	1,775	0	0,0000	8	0,8000
4	2,15	2,9	2,525	0	0,0000	8	0,8000
	mayor de	2,9		2	0,2000	10	1,0000

Media = 1,30907 Desviación Estándar = 1,93165

**Figura 3.33. Histograma de tablas de frecuencia para Ac/Al**

En la figura 3.33, se han formado 4 intervalos cubriendo desde el límite inferior de -0,1 hasta el límite superior de 2,9. Se ha tabulado el número de datos que caen en cada intervalo. La gráfica despliega el número de datos en cada intervalo. *NOTA: Hay 2 datos fuera del rango de la gráfica.*

La comparación entre las variables acidez combinada, libre y pH, expresada mediante una tabla ANOVA, puede verse en la **figura 3.35**

La razón-F, para el caso de fermentadores enterrados es igual a 181,637. Como el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95,0% de confianza. El valor-P es menor que 0,05, luego existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza. Esto viola uno de los supuestos importantes subyacentes en el análisis de varianza e invalidará la mayoría de las pruebas estadísticas comunes.

SnapStat: Ajuste de Curva

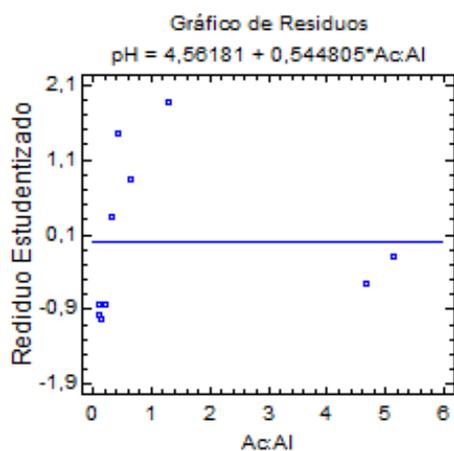
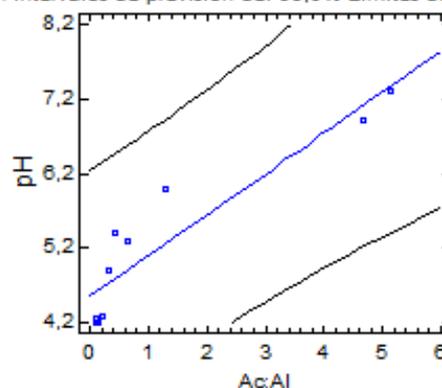
$pH = 4,56181 + 0,544805 \cdot Ac/Al$

	Estimado	Valor-P
Intercepto	4,56181	0,0000
Pendiente	0,544805	0,0002

Coefficiente de Correlación = 0,9216
 R-cuadrada = 84,93 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 83,04 por ciento

Error estándar del est. = 0,470223
 Error absoluto medio = 0,375577
 Estadístico Durbin-Watson = 0,876202 (P=0,0070)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,510789

Gráfico del Modelo Ajustado
 Con intervalos de previsión del 99,0% Límites de Predicción



X	Predicho Y	Límite de Pred. Inferior 99,0%	Límite de Pred. Superior 99,0%
0,0	4,56181	2,86907	6,25455
1,2	5,21558	3,56052	6,87064
2,4	5,86935	4,18811	7,55058
3,6	6,52311	4,75467	8,29156
4,8	7,17688	5,26854	9,08521
6	7,83064	5,74029	9,921

X	Predicho Y	Límite de Conf. Inferior 99,0%	Límite de Conf. Superior 99,0%
0,0	4,56181	3,94864	5,17498
1,2	5,21558	4,71578	5,7154
2,4	5,86935	5,28869	6,45
3,6	6,52311	5,72438	7,32186
4,8	7,17688	6,10341	8,25035
6	7,83064	6,45945	9,20184

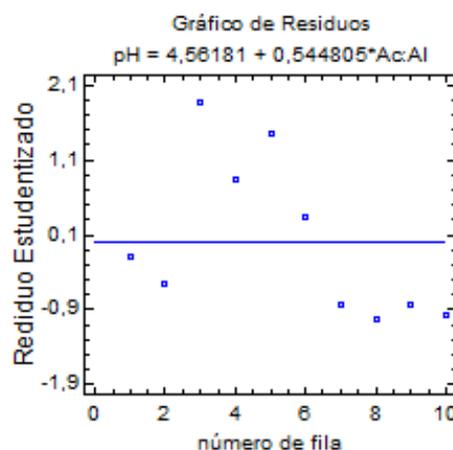
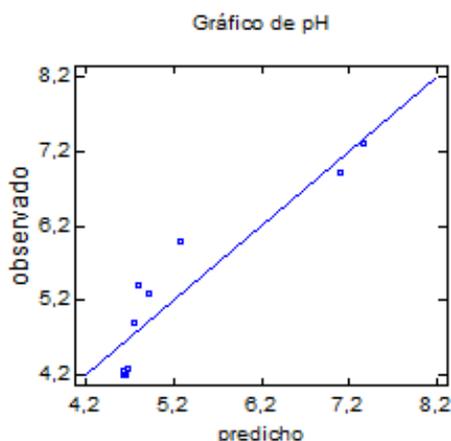


Figura 3.34. Resultados de ajustar un modelo lineal para describir la relación entre pH y Ac/Al

SnapStat: Comparación Varias Muestras

Muestra	Recuento	Media	Sigma
Acidez combinada	10	0,1169	0,0198743
Acidez libre	10	0,3788	0,299809
pH	10	5,275	1,14194
	30	1,92357	2,50084

Gráfico de Dispersión

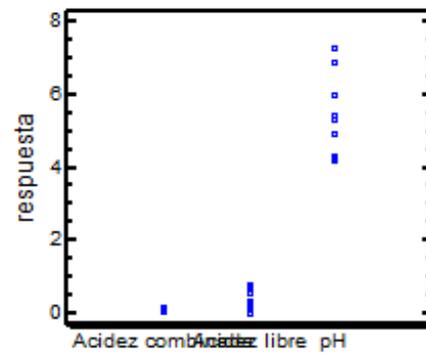


Gráfico Caja y Bigotes

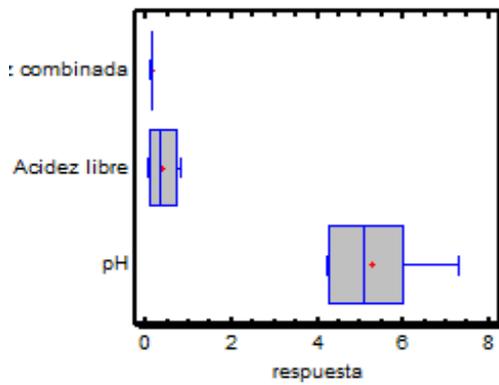


Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Media Cuadrado	Razón-F
Entre	168,825	2	84,4123	181,84
Dentro de	12,5477	27	0,464729	
Total	181,372	29		

Valor-P = 0,0000

Verificación de Varianza

Levene's: 14,0755

Valor-P = 0,0001

Gráfico de Medias
Con intervalos LSD del 95,0%

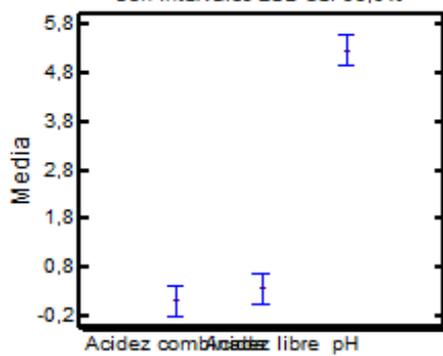


Gráfico ANOM
Con 95% Límites de Decisión

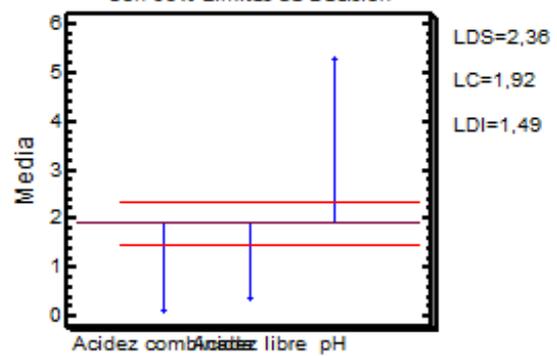


Figura 3.35. Comparación variables acidez combinada, acidez libre y pH

- **Análisis multivariado.**

En el caso de fermentadores enterrados, para este tipo de análisis, encontramos el siguiente resumen estadístico (**Tabla 3.10**):

Datos/VARIABLES:

Ac/Al

pH

Acidez combinada

Acidez libre

Tabla 3.10. Resumen Estadístico

	<i>Ac:Al</i>	<i>pH</i>	<i>Acidez combinada</i>	<i>Acidez libre</i>
Recuento	10	10	10	10
Promedio	1,30907	5,275	0,1169	0,3788
Desviación Estándar	1,93165	1,14194	0,0198743	0,299609
Coefficiente de Variación	147,559%	21,6482%	17,0011%	79,0942%
Mínimo	0,107595	4,2	0,085	0,028
Máximo	5,14286	7,3	0,144	0,79
Rango	5,03526	3,1	0,059	0,762
Sesgo Estandarizado	2,13795	1,01587	-0,392694	0,305228
Curtosis Estandarizada	0,763531	-0,418055	-0,5755	-1,1155

En el caso de fermentadores enterrados, las siguientes variables muestran valores de sesgo estandarizado:

Ac/Al

No obstante, ninguna de las variables muestran curtosis estandarizada fuera del rango esperado.

Las correlaciones entre cada par de variables pueden verse en la **tabla 3.11**, donde todos los pares de variables, igualmente que para los fermentadores en bodega, presentan Valores-P por debajo de 0,05 indicando correlaciones significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 3.11. Correlaciones

	Ac:Al	pH	Acidez combinada	Acidez libre
Ac:Al		0,9216 (10)	0,7630 (10)	-0,7276 (10)
		0,0002	0,0103	0,0171
pH	0,9216 (10)		0,9044 (10)	-0,9190 (10)
		0,0002	0,0003	0,0002
Acidez combinada	0,7630 (10)	0,9044 (10)		-0,9700 (10)
		0,0103	0,0003	0,0000
Acidez libre	-0,7276 (10)	-0,9190 (10)	-0,9700 (10)	
		0,0171	0,0002	0,0000

Correlación
(Tamaño de Muestra)
Valor-P

Como resumen gráfico se muestran todos los diagramas de dispersión entre cada par de las variables seleccionadas en el análisis tanto para los fermentadores en bodega (**Figura 3.36**), como para los fermentadores enterrados (**Figura 3.37**). Cada par de variables se grafica dos veces, una con la primera variable en el eje-X, y otra con esa en el eje-Y. Por ejemplo, todos los diagramas en la primera fila tienen a Ac:Al en el eje-Y, y todos los diagramas en la primer columna tienen a Ac:Al en el eje-X.

Este es el equivalente gráfico de una matriz de correlaciones y se utiliza para ayudar a determinar qué variables están más fuertemente relacionadas con otras.

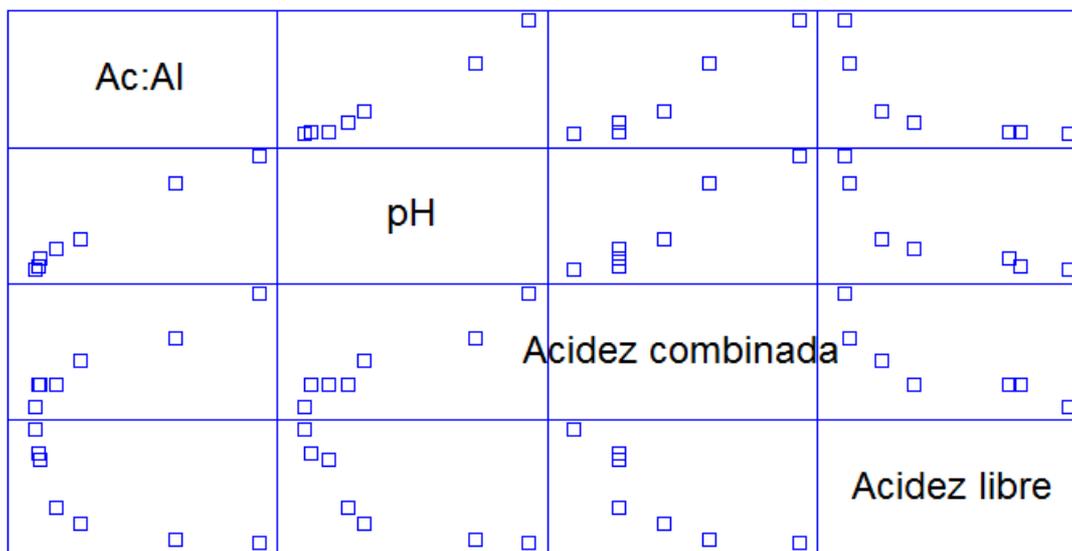


Figura 3.36. Diagrama de dispersión en fermentadores en bodega

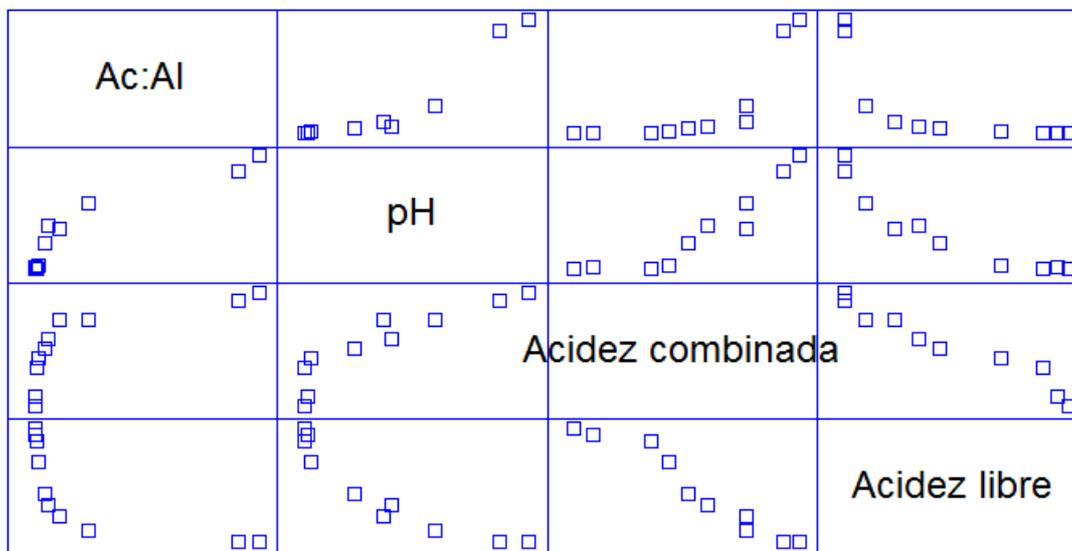


Figura 3.37. Diagrama de dispersión en fermentadores enterrados

CAPÍTULO 3

A continuación, se incluye el resumen general del presupuesto elaborado.

3.3.1 EVALUACIÓN PRESUPUESTARIA

3.3.1.1 BODEGA DE FERMENTACIÓN

En la **tabla 3.12** se resume el presupuesto para fermentadores en bodega. Seguidamente, se muestran los presupuestos parciales (**Tabla 3.13**)

Tabla 3.12. Resumen general del presupuesto para fermentadores en bodega

Apartado	Resumen	Importe (€)
	OBRA CIVIL	
A1	MOVIMIENTO DE TIERRAS	37.703,02
A2	CIMENTACIÓN	83.714,89
A3	ESTRUCTURA DE HORMIGÓN	106.560,54
	TOTAL PRESUPUESTO EJECUCIÓN MATERIAL	227.978,45
	10 % Gastos Generales	22.797,84
	6 % Beneficio Industrial	13.678,70
	Suma de G.G. y B.I.	36.476,54
	TOTAL PRESUPUESTO EJECUCIÓN POR CONTRATA	264.454,99
	MAQUINARIA	
A4	MAQUINARIA	109.440
	Total Presupuesto Compra Directa	109.440
	RESUMEN GENERAL DEL PRESUPUESTO	
	PRESUPUESTO EJECUCIÓN POR CONTRATA DE OBRA CIVIL	264.454,99
	PRESUPUESTO POR COMPRA DIRECTA DE MAQUINARIA	109.440
		373.894,99
	18 % I.V.A.	67.301,10
	TOTAL PRESUPUESTO GENERAL	441.196,09

El total del presupuesto general asciende a la expresada cantidad de CUATROCIENTOS CUARENTA Y UN MIL CIENTO NOVENTA Y SEIS EUROS CON NUEVE CÉNTIMOS.

Como índice comparativo se emplea la inversión por kilogramo de aceituna procesada, que para la bodega de fermentación asciende a:

$$\frac{\text{Inversión}}{\text{Kg. Aceituna}} = \frac{441.196,09}{800.000} = \mathbf{0,55 \text{ €/Kg.}}$$

Tabla 3.13. Presupuestos parciales para fermentadores en bodega

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	PRECIO	IMPORTE (€)
APARTADO 1. MOVIMIENTO DE TIERRAS				
01.01	M² DESBROCE Y LIMPIEZA DEL TERRENO			
	M ² Desbroce y limpieza de terreno por medios mecánicos, sin carga ni transporte.	1111,08	0,54	599,98
01.02	M³ EXCAVACIÓN MECÁNICA			
	M ³ Excavación a cielo abierto en terreno de consistencia floja, con excavadora de 2 m ³ de capacidad de cuchara, con extracción de tierra a los bordes, en vaciado.	4.888,75	2,26	11.048,58
01.03	M³ TRANSPORTE TIERRAS < 10 KM CARGA MECÁNICA			
	M ³ Transporte de tierras procedentes de excavación a vertedero, a una distancia menor de 10 Km., con camión volquete de 10 Tm. y con carga por medios mecánicos.	4.888,75	4,06	19.848,32
01.04	M² COMPACTADO DE TIERRAS SIN APORTE			
	M ² Compactación de tierras con apisonadora vibrante de 6 Tm. sin aporte de tierras, con un espesor de 30 cm.	1111,08	2,05	2.277,71
01.05	M³ RELLENO Y COMPACTADO MECÁNICO C/ APORTE			
	M ³ Relleno, extendido y compactado de una base de zahorra de 20 cm. de espesor, por medios mecánicos y regado de la misma	222,22	17,84	
TOTAL APARTADO 1				37.703,02

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	PRECIO	IMPORTE (€)
APARTADO 2. CIMENTACIÓN				
02.01	M³ HORMIGÓN LIMP. HM-10 /P/ 40 CIM. VERT. GRUA			
	M ³ Hormigón en masa HM-10 N/mm ² (H-100 Kg/cm ²) T máx. 40 mm. elaborado en central para limpieza y nivelado de fondos de cimentación, incluso vertido con pluma-grúa, vibrado y colocación.			
		55,55	80,04	4.446,22
02.02	M³ HORMIGÓN HM-25 /P/ 40 LOSA C.I.V.G. CIM.			
	M ³ Hormigón en masa h-m25 N/mm ² (H-250 Kg/cm ²) T máx. 40 mm. elaborado en central, en losas de cimentación, incluso vertido con pluma-grúa, vibrado y colocación.			
		443,43	103,27	45.793,90
02.03	KG. ACERO CORRUGADO B 400-S			
	Kg. de acero corrugado B 400-S incluso cortado, doblado, armado y colocado en obra, i/p.p. de mermas y despuntes			
		30.700	0,88	27.016
02.04	M² ENCOFRADO MADERA LOSAS CIMENTACIÓN			
	M ² Encofrado y desencofrado con madera suelta en losas de cimentación, considerando 8 posturas			
		650	9,86	6.409
TOTAL APARTADO 2				83.714,89

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	PRECIO	IMPORTE (€)
APARTADO 3. ESTRUCTURA DE HORMIGÓN				
03.01	KG. ACERO CORRUGADO B 400-S			
	Kg. Acero corrugado B 400-S incluso cortado, doblado, armado y colocado en obra, i/p.p. de mermas y despuntes.			
		16.480,00	0,88	14.502,40
03.02	M³ HOR.HM-25/P/20 MUROS V.G.CEN			
	M³ Hormigón en masa para armar HM-25 N/mm² (H-250 Kg/cm²) Tmáx. 20 mm. elaborado en central, en muros de cimentación, incluso vertido con pluma-grúa, vibrado y colocación.			
		136,69	109,26	14.934,75
03.03	M² ENCOFRADO METALICO EN MUROS 1 C			
	M² Encofrado y desencofrado a una cara en muros con paneles metálicos de 5 a 10 m² de superficie, considerando 20 posturas, aplicación de desencofrante.			
		340,00	26,02	8.846,80
03.04	M³ HORMIGON PARA ARMAR HM-25 PILAR			
	M³ Hormigón para armar HM-25 N/mm² (H-250 Kg/cm²) Tmáx. 20 mm. elaborado en central, en pilares, incluso vertido con pluma-grúa, vibrado y colocado.			
		16,82	94,11	1.582,93
03.05	M² ENCOFRADO PILAR CIRC. PVC			
	M² Encofrado de pilares circulares con tubo de PVC, de hasta 4 m. de altura y 30 cm. Ø, que permanece como recubrimiento.			
		238,00	18,73	4.457,74
03.06	M³ HORM. PARA ARMAR HM-25 VIGAS			
	M³ Hormigón para armar HM-25 N/mm² (H-250 Kg/cm²) Tmáx. 20 mm. elaborado en central, en vigas, incluso vertido con pluma-grúa, vibrado y colocado.			
		25,38	95,52	2.424,30
03.07	M² FORJA.VIG. AUT. C=22+4, B. 80			
	M² Forjado 22+4 cm. formado a base de viguetas de hormigón pretensadas autoresistentes, separadas 80 cm. entre ejes, bovedilla de poliestireno expandido de 80x25x22 cm. y capa de compresión de			

	4 cm. de HM-25 N/mm ² (H-250 Kg/cm ²) Tmáx. 20 mm. elaborado en central y con armadura de reparto, conectores, encofrado y desencofrado, totalmente terminado. (Carga total 760 Kg/m ²).	1.111,08	40,88	45.420,95
03.08	M² SOLERA HA-25/P/20 ARM. 2,65 kg. e=8cm			
	M ² Solera de 8 cm. de espesor, realizada con hormigón HA-25 N/mm ² (H-250 Kg/cm ²) Tmáx. 20 mm. elaborado en central, vertido, colocación y armado con acero corrugado 8-400 S con una cuantía (2,65 Kg/m ²), p.p. de juntas, aserrado de las mismas y fratasado.	1.111,08	13,01	14.455,15
TOTAL APARTADO 3				37.703,02

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	PRECIO	IMPORTE (€)
APARTADO 4. MAQUINARIA				
04.01	UD. FERMENTADOR ACEITUNAS AÉREO			
	Modelo cilíndrico de 16.000 litros de capacidad, con tres patas de apoyo para instalación en sótano. Fabricado en poliéster con resinas isoftálicas especiales para almacenar productos alimenticios y reforzado con fibra de vidrio. Provisto de conjunto de boca-tapadera-rejilla retenedora de fruto de 500 mm. Ø y tubo de PVC de 110 mm. Ø, con válvula de 110 mm. acoplada. Incluye transporte y montaje.	80,00	1.368	109.440
TOTAL APARTADO 4				109.440
TOTAL				337.418,45

3.3.1.2 FERMENTADORES ENTERRADOS

En **tabla 3.14** se resume el presupuesto para fermentadores enterrados. Seguidamente, se muestran los presupuestos parciales (**Tabla 3.15**)

Tabla 3.14. Resumen general del presupuesto para fermentadores enterrados

Apartado	Resumen	Importe (€)
	OBRA CIVIL	
A1	MOVIMIENTO DE TIERRAS	22.135,91
A2	ESTRUCTURA Y RELLENO	117.970,04
	TOTAL PRESUPUESTO EJECUCIÓN MATERIAL	140.105,95
	10 % Gastos Generales	14.010,60
	6 % Beneficio Industrial	8.406,36
	Suma de G.G. y B.I.	22.416,96
	TOTAL PRESUPUESTO EJECUCIÓN POR CONTRATA	162.522,91
	MAQUINARIA	
A3	MAQUINARIA	86.400
	Total Presupuesto Compra Directa	86.400
	RESUMEN GENERAL DEL PRESUPUESTO	
	PRESUPUESTO EJECUCIÓN POR CONTRATA DE OBRA CIVIL	162.522,91
	PRESUPUESTO POR COMPRA DIRECTA DE MAQUINARIA	86.400
		248.922,91
	18 % I.V.A.	44.806,12
	TOTAL PRESUPUESTO GENERAL	293.729,03

El total del presupuesto general asciende a la expresada cantidad de DOSCIENTOS NOVENTA Y TRES MIL SETECIENTOS VEINTINUEVE EUROS CON TRES CÉNTIMOS.

El índice de inversión por kilogramo de aceituna procesada asciende a:

$$\frac{\text{Inversión}}{\text{Kg. Aceituna}} = \frac{293729,03}{800.000} = \mathbf{0,37 \text{ €/Kg.}}$$

Por consiguiente la construcción de una instalación para la fermentación de la aceituna como bodega visitable es casi un 50 % más cara que instalar los depósitos directamente enterrados.

Tabla 3.15. Presupuestos parciales para fermentadores enterrados

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	PRECIO	IMPORTE (€)
APARTADO 1. MOVIMIENTO DE TIERRAS				
01.01	M² DESBROCE Y LIMPIEZA DEL TERRENO			
	M ² Desbroce y limpieza de terreno por medios mecánicos, sin carga ni transporte.			
		813,56	0,54	439,32
01.02	M³ EXCAVACIÓN MECÁNICA			
	M ³ Excavación a cielo abierto en terreno de consistencia floja, con excavadora de 2 m ³ de capacidad de cuchara, con extracción de tierra a los bordes, en vaciado.			
		3.172,87	2,26	7.170,69
01.03	M³ TRANSPORTE TIERRAS < 10 KM CARGA MECÁNICA			
	M ³ Transporte de tierras procedentes de excavación a vertedero, a una distancia menor de 10 Km., con camión volquete de 10 Tm. y con carga por medios mecánicos.			
		3.172,87	4,06	12.881,85
01.04	M² COMPACTADO DE TIERRAS SIN APORTE			
	M ² Compactación de tierras con apisonadora vibrante de 6 Tm. sin aporte de tierras, con un espesor de 30 cm.			
		813,56	2,05	1.667,80
TOTAL APARTADO 1				22.135,91

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	PRECIO	IMPORTE (€)
APARTADO 2. ESTRUCTURA Y RELLENO				
02.01	M² SOLERA HORMIGÓN HM-25/P/20 C.e=10cm			
	M ² Solera de 10 cm. de espesor, realizada con hormigón HM-25 N/mm ² (H-250 Kg/cm ²) Tmáx. 20 mm. elaborado en central, vertido y colocado y p.p. de juntas, aserrado de las mismas y fratasado.			
		1.627,12	16,36	26.619,68
02.02	M³ HORMIGÓN HM-25 /P/ 20 MUROS V.G. CIM.			
	M ³ Hormigón en masa para armar HM-25 N/mm ² (H-250 Kg/cm ²) T máx. 20 mm. elaborado en central, en muros de cimentación, incluso vertido con pluma-grúa, vibrado y colocación.			
		106,57	109,26	11.643,84
02.03	M² ENCOFRADO METÁLICO EN MUROS 1C			
	M ² Encofrado y desencofrado a una cara en muros con paneles metálicos de 5 a 10 m ² de superficie, considerando 20 posturas, i/ aplicación de desencofrante.			
		270,00	26,02	7.025,40
02.04	M³ SUB-BASE ZAHORRA NATURAL			
	M ³ Sub-base de zahorra natural con función filtrante, i/ extendido y compactado con pisón.			
		235,43	25,10	5.909,29
02.05	M³ HORMIGÓN CICLÓPEO HM-10 CIM.V.M.			
	M ³ Hormigón ciclópeo HM-10 N/mm ² (H-100) Tmáx. 40mm. y morro 80/150 mm., en cimentaciones, i/ vertido por medios manuales y colocación.			
		544,75	76,96	41.923,96
02.06	M³ RELLENO ARENA INERTE MAN.			
	M ³ Relleno y extendido de arena inerte, por medios manuales.			
		843,40	29,47	24.854,00
TOTAL APARTADO 2				117.970,04

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	PRECIO	IMPORTE (€)
APARTADO 3. MAQUINARIA				
04.01	UD. FERMENTADOR ACEITUNAS AÉREO			
	Modelo cilíndrico de 16.000 litros de capacidad, para instalación enterrada. Fabricado en poliéster con resinas isoftálicas especiales para almacenar productos alimenticios, reforzado con fibra de vidrio y protegido exteriormente con resina de poliéster anticorrosiva. Provisto de conjunto de boca-tapadera-rejilla retenedora de fruto de 500 mm. Incluye transporte y colocación en fosa.	80,00	1.080	86.400
TOTAL APARTADO 3				86.400
TOTAL				226.505,95

3.3.2 CARACTERÍSTICAS CONSTRUCTIVAS Y DE DISEÑO

3.3.2.1 Características generales del sótano

Los fermentadores se disponen en un sótano quedando la boca de los mismos al nivel del patio de la industria, siendo accesibles desde la superficie para las operaciones de llenado de salmuera y aceitunas, así como para la descarga, para las operaciones de mantenimiento de los fermentadores se accede por una escalera al interior.

El sótano tiene unas dimensiones de 39,40 metros de largo por 28,20 metros de anchura ocupando una superficie de 1.111 m². Tiene una altura libre de 3,40 metros.

La estructura es toda de hormigón, ya que la salmuera de fermentación es muy corrosiva para el acero, y está rodeado perimetralmente por un muro para la contención de tierras. En la parte superior se dispone de un forjado unidireccional de hormigón armado apoyado sobre diez pórticos del mismo material. La cimentación tanto del muro como de los pilares se realiza mediante una losa de hormigón armado.

3.3.2.2 Materiales de construcción

- **Hormigón**

El hormigón empleado tanto en la estructura como en el muro y la cimentación es del tipo HA-25, como se especifica en la norma EHE-98: “*Instrucción para el proyecto y ejecución de obras de hormigón en masa o armado*”. Sus características son las que se indican a continuación:

Resistencia característica de proyecto	$f_{ck} = 25 \text{ N/mm}^2$
Peso específico	$\gamma_{\text{horm}} = 2.500 \text{ kg/m}^3$

• **Acero**

Para las armaduras del hormigón armado se utilizarán barras corrugadas de acero B-400-S, según la norma EHE-98. Dichas armaduras se caracterizan por:

Valor del límite elástico característico	$f_{yk} = 400 \text{ N/mm}^2$
--	-------------------------------

- **Coefficientes de seguridad**

En el cálculo se considerarán los coeficientes parciales de seguridad de los materiales para los Estados Límites Últimos recogidos en la norma EHE-98:

Coefficiente de minoración del acero	$\gamma_s = 1,15$
Coefficiente de minoración del hormigón	$\gamma_c = 1,50$

- **Cuantías geométricas mínimas**

A continuación se indican los valores de las cuantías geométricas mínimas que según la norma EHE-98 deben disponerse en los diferentes elementos estructurales para el acero B-400-S:

TIPO DE ELEMENTO ESTRUCTURAL	CUANTÍA GEOMÉTRICA MÍNIMA (‰)	
Pilares	4,0	
Losas	2,0	En cada una de las armaduras, longitudinal y transversal repartida en las dos caras
Vigas	3,3	En la cara de tracción
Muro arm. horizontal	4,0	Deberá repartirse en ambas caras
Muro arm. vertical	1,2	En la cara de tracción

3.3.2.3 Estructura del sótano

Se dispone un forjado unidireccional de viguetas de hormigón y bovedillas de poliestireno expandido que aligeran la estructura y a la vez sirven de aislamiento térmico. La distancia entre ejes de viguetas es de 80 cm para permitir el paso de la boca del depósito fermentador entre dos viguetas consecutivas.

El canto total del forjado es de 26 cm incluyendo una capa de compresión de 4 cm, según la norma EF-96: *“Instrucción para el proyecto y la ejecución de forjados unidireccionales de hormigón armado o pretensado”*.

Sobre el forjado, para el paso de los trabajadores y la maquinaria se dispone una solera de hormigón HA-25 de 8 cm de espesor con malla de acero que reparte cargas y evita que se agriete. Tendrá una pendiente del 2% para la evacuación del agua de lluvia. En la parte inferior lleva una lámina de butilo impermeable que irá soldada la boca de los fermentadores impidiendo cualquier filtración de agua al interior del sótano.

- Pórticos

Para la sustentación del forjado se disponen diez pórticos de hormigón armado. En cada uno de ellos el dintel apoya en sus extremos en el muro perimetral e interiormente en siete pilares. Estos pilares tienen una altura de 3,40 metros y se diseñan de sección circular para facilitar el paso de las personas entre ellos y los fermentadores y estarán forrados de PVC para evitar las agresiones de la salmuera al hormigón.

La distancia entre pilares así como la separación entre pórticos es variable para dejar una mayor anchura libre en los pasillos.

- Muro de contención

El sótano está rodeado por un muro de contención de hormigón armado de 4,06 metros de altura impermeabilizado en la cara exterior a base de lámina asfáltica. En su parte superior apoya el forjado y las vigas maestras de los pórticos. Inferiormente, queda arriostrado mediante la losa de cimentación.

- Cimentaciones

La cimentación del muro de contención y de los pilares se realiza mediante una losa de hormigón armado HA-25. Se adopta esta solución porque además de transmitir adecuadamente al terreno los esfuerzos provenientes del muro y los pilares, hace la función de solera del sótano y debe resistir el peso de los fermentadores que cuando están llenos de aceituna suponen 10 toneladas cada uno.

Dispone de desagües para la evacuación de líquidos provenientes de pérdidas de salmuera de los fermentadores y para las aguas de limpieza de ellos mismos y del sótano en general.

DISCUSIÓN

En la **Introducción (1.1)** se esbozó el planteamiento general del trabajo señalando el carácter innovador del mismo, puesto que se trata de un estudio del proceso de aderezo de aceitunas verdes en salmuera, que aborda tanto el análisis microbiológico de los principales microorganismos implicados en él, las Bacterias del Ácido Láctico (BAL), así como las principales diferencias entre los sistemas de elaboración tradicional, los fermentadores enterrados, y una alternativa al mismo, como son las bodegas de fermentación.

Cabe destacar que en ambos tipos de fermentadores las bacterias lácticas que fueron aisladas pertenecían a las mismas especies, por lo que el desarrollo de ambos tipo de fermentadores se rige por el mismo tipo de bacterias. Destaca el género *Lactobacillus* y de él, la especie *plantarum*, que domina de principio a fin del proceso, quedando en el caso de fermentadores enterrados acompañada al final de campaña por *Lactobacillus brevis* y otras especies de Lactobacilos pero en unas proporciones muy bajas.

En el caso de los fermentadores enterrados, prácticamente a partir de los tres meses de campaña, *L. plantarum* prevalece como especie única en los fermentadores (**Figuras 3.7 a 3.11**). Las especies de *Leuconostoc* y *Pediococcus* se encuentran en grandes porcentajes, principalmente la segunda, y dominando las especies lácticas en la primera fase de la fermentación, llegando a permanecer en los fermentadores en bodega *Leuconostoc* unas tres semanas y desapareciendo ambas seguidamente, quedando el género *Lactobacillus* en solitario. Sin embargo, ambas especies se encuentran en los fermentadores enterrados durante prácticamente los dos primeros meses.

El número de viables (u.f.c./ml) en ambos tipos de fermentadores, muestra una de las más claras diferencias entre ambos tipos de fermentadores, donde para todos los casos y cuantitativamente, las poblaciones son superiores, a veces hasta en más de dos unidades logarítmicas en los fermentadores en bodega (**Figuras 3.12, 3.13 y 3.14**), siendo para las distintas campañas los valores similares y más homogéneos que en los fermentadores enterrados. Este dato es de especial relevancia pues son el número de viables, en última instancia, los responsables de dirigir una fermentación hacia los valores idóneos en cuanto a los parámetros bioquímicos, ya que ellos son los encargados de metabolizar los sustratos, azúcares reductores en

nuestro caso, para producir los ácidos necesarios, láctico principalmente, que favorecen el entorno de acidez y pH que la fermentación requiere.

La producción de ácido láctico, como ya se ha mencionado, es un factor esencial y deseable por parte de las BAL. Por ello, tras la selección que se llevó a cabo en las mejores cepas modificadoras del pH (**Figuras 3.15 y 3.16**) se aisló una de ellas, la cepa *BAL-19*, que ofreció un tiempo de generación (G) corto y una notable capacidad para modificar el pH en un medio tamponado (**Tabla 3.5**).

Respecto a los parámetros físico-químicos, es el pH uno de los más importantes a controlar en toda fermentación microbiana. Hasta alcanzar el umbral de un pH inferior a 4,5 transcurren unos 50 días de media, mientras que en los fermentadores en bodega se alcanzaba en torno a las tres semanas. Siendo crítico un valor de pH inferior a 5 - 4,5 para evitar el crecimiento de bacilos Gram-negativos tipo coliformes (*Enterobacter sp.*, *Citrobacter sp.*, *Klebsiella aerogenes* y *Escherichia coli*) y otras especies, potencialmente indeseables (*Aeromonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Achromobacter sp.*, y *Flavobacterium sp.*).

En los fermentadores enterrados se aprecia una reducción de la acidez combinada gradualmente más espaciada en el tiempo y unos valores de acidez libre similares aunque algo inferiores al final de campaña respecto a los fermentadores en bodega, del orden de unas 0,2 unidades (**Figuras 3.23 y 3.24**).

Otro de los factores diferenciadores entre ambos tipos de fermentadores es la temperatura de la salmuera de fermentación, crítico para la velocidad en la que se desarrolla la fermentación. La temperatura idónea es de unos 22 °C, siendo el tope de unos 24 °C que conllevaría unas fermentaciones muy rápidas pudiendo provocar el alambrado o separación de la pulpa del hueso de la aceituna.

En los fermentadores enterrados la temperatura de la salmuera se encuentra entre los 17-18 °C, con pocas alteraciones estacionales, salvo bajadas bruscas de temperatura. Se aprecia que estas son fermentaciones más lentas (**Figura 3.25**) que obligan a actuar al operario en caso de heladas con intercambiadores de calor, donde entra agua a unos 28 °C y sale en circuito cerrado hasta alcanzar la salmuera una temperatura de unos 21-22 °C. Este tipo de operaciones debe hacerse cuando la temperatura de la salmuera baja de 15 °C, que es cuando se aprecia una parada técnica de la fermentación microbiana.

En la bodega de fermentación si se mantienen correctamente las condiciones de aislamiento térmico tiende a haber una temperatura de 20-21 °C y, en caso de ser necesario, se activan los calefactores por lo que no debe haber ningún tipo de incidencia.

En vista de los datos indicados, se puede apreciar unas diferencias notables en la temperatura de la salmuera de fermentación (**Figura 3.25, 3.26 y 3.27**). Mientras en los fermentadores en bodega se mantenía alrededor de los 21 °C, en el caso de los fermentadores enterrados la temperatura fluctúa entre los 20 y 16 °C, en función de la temperatura ambiental. Lo que incide principalmente en el número de UFC/ml de cada tipo de fermentador (epígrafe 3.1.3).

Con el diseño experimental se pretendió ver si existía una relación estadísticamente significativa entre la variable de respuesta pH y el cociente de relación acidez combinada / acidez libre como factor explicativo cuantitativo. Se ajustó con un nivel de confianza del 95 %.

El ajuste de curva de pH con la acidez muestra la ecuación del modelo ajustado para fermentadores en bodega siguiente:

$$\text{pH} = 3,96573 + 1,45072 \times (\text{Ac}/\text{Al})$$

La salida informática (**Figura 3.31**) muestra que existe una relación estadísticamente significativa y una relación relativamente fuerte entre las variables, con un 95,0 de nivel de confianza. De igual forma se construyeron los límites de predicción para las nuevas observaciones.

El análisis multivariado (**Tabla 3.7**) mostró que ninguna de las variables presentan valores de sesgo estandarizado y de curtosis estandarizada fuera del rango esperado, determinando que la muestra proviene de una distribución normal.

Las correlaciones entre variables demostraron que es el cociente acidez combinada /acidez libre, con un valor-P = 0,000 las que mostraron una mayor correlación, del orden del 99,05 % (**Tabla 3.8**), por lo que consideramos este cociente como altamente significativo en la descripción de una fermentación en bodega modelo.

Prácticamente en todos los fermentadores y para todos los casos cuando este cociente alcanza valores en torno a 1/10 la fermentación se encuentra en su última fase o estadio para completar el proceso, y los valores tanto de acidez libre, como combinada y pH están totalmente estabilizados (**Figura 3.28 y 3.29**).

En los fermentadores enterrados el ajuste de curva de pH con la acidez es el siguiente:

$$\text{pH} = 4,56181 + 0,544805 \times (\text{Ac}/\text{Al})$$

El modelo ajustado (**Figura 3.34**) explica en un 84,93 % la variabilidad del pH con un coeficiente de correlación igual a 0,9216. Se aprecia una relación relativamente fuerte aunque considerablemente inferior a la mostrada en bodega de fermentación.

La única variable en los fermentadores enterrados que muestra un sesgo estandarizado es el cociente Ac/Al.

Como demuestran los datos estadísticos, en consonancia con los empíricos, en un fermentador enterrado los valores bioquímicos predecibles durante el proceso son de un orden menor a los fermentadores en bodega, donde el desarrollo del proceso se mantiene en un rango donde lo observado y lo predicho difieren en menor medida.

Uno de los factores claves es el control y la pequeña variabilidad en las temperaturas de salmuera, lo que permite el mejor desarrollo de la población microbiana con los beneficios que conlleva en el desarrollo de la fermentación. A pesar que en un fermentador enterrado la fermentación transcurra con normalidad y se obtenga un fruto final de similares características a otro en un fermentador en bodega, el tiempo hasta completar la campaña es siempre mayor.

Si tenemos en cuenta lo expuesto vemos que la principal ventaja de una instalación de fermentadores enterrados es el menor coste de la misma (**Tabla 3.14**). La elección de una instalación de fermentadores enterrados o de una bodega de fermentación dependerá en gran medida de las características climáticas de la zona y de la inversión que el promotor esté dispuesto a realizar.

En zonas templadas, como la zona sur de España, los fermentadores enterrados se han venido utilizando con muy buenos resultados la mayoría de los años, cuando los veranos son cálidos y los inviernos no son muy fríos, completándose la fermentación en cuatro o cinco meses.

Su principal ventaja, como se ha dicho, es el menor coste de la instalación, 0,37 €/kg de aceituna, y que se precisa menor superficie para el mismo número de fermentadores, ya que éstos se colocan a tresbolillo y con una pequeña separación.

Por el contrario, la rusticidad de la construcción que hace posible su bajo coste lleva consigo que, cuando el clima no es favorable, se presenten diversos inconvenientes que pueden limitar la rentabilidad.

En primer lugar, todos los años al final de la campaña la temperatura ambiente disminuye, lo que hace que las últimas fermentaciones se alarguen y puedan quedar incompletas, no alcanzando los valores necesarios de pH y acidez necesarios para una correcta conservación, y dejando azúcares residuales que pueden ser causa de desarrollos microbianos indeseables.

Además, en inviernos fríos el aislamiento de arena no impide que la temperatura de la salmuera descienda en exceso, siendo necesarias periódicas recirculaciones por un intercambiador de calor y la inoculación con salmuera en fermentación activa procedente de otros depósitos.

Por otra parte, al estar los fermentadores rodeados de tierra, tienen un mayor riesgo de deformaciones y corrosiones por el agua infiltrada. Una buena instalación aumenta la vida de los depósitos, pero no impide completamente su deterioro, lo que obliga a ir renovándolos periódicamente. Además, los fermentadores pasan largas temporadas llenos de aceitunas y salmuera, y otras largas temporadas vacíos a la espera de la campaña siguiente. Estas variaciones prolongadas en la presión interna de los depósitos, y estando sometidos continuamente al empuje exterior de la arena de relleno, provocan que se vayan abollando en los meses en que permanecen vacíos.

Todos estos factores van originando la formación de poros y fisuras que conllevan una pérdida de salmuera y la contaminación del contenido del fermentador. Estas contaminaciones se detectan porque se desprende un olor muy desagradable, como de materia orgánica en descomposición, y, cuando se llega a este punto ha pasado un tiempo desde la formación del poro y prácticamente la totalidad de las aceitunas contenidas se habrán estropeado.

Finalmente, la reparación de cualquier problema en los fermentadores enterrados es difícil y costosa. Supone el levantamiento de la solera de hormigón y extracción de toda la tierra que recubre el depósito.

Por otro lado, el sistema de bodega de fermentación precisa una inversión superior en cercana al 50 %, estando su coste en 0'55 euros por kg de aceituna para la instalación diseñada en este estudio. Además, la superficie ocupada es también mayor. Por el contrario, permite mejorar las condiciones higiénicas y de manejo, así como eliminar los problemas ocasionados por las bajas temperaturas ambientales.

Una ventaja importante es la mayor asepsia, así como un mejor control de las posibles contaminaciones. Los fermentadores están al aire y se conservan mucho mejor que enterrados. No tienen problemas de corrosión ni abollado. Mediante la inspección visual se revisan regularmente, y en caso de existir algún poro o fisura se puede solucionar rápida y fácilmente, sin peligro de que se contamine el contenido. En el fermentador solamente entra aquello que le es introducido por la boca, no habiendo posibilidad de contaminación por las paredes.

Se mejoran las condiciones higiénicas externas y se facilita la limpieza interior de los depósitos una vez que se han vaciado al finalizar la campaña. La limpieza manual tradicional con cepillo, que emplea a dos personas durante veinte minutos por cada fermentador, es sustituida por un sistema automático de boquillas que expulsan la solución detergente a alta presión. Se indican los programas de lavado y enjuague en el robot y en 10 minutos se completa el ciclo para un fermentador. La salida del agua se produce por la válvula inferior del depósito.

La presencia de esta válvula permite también que durante la fermentación se pueda obtener salmuera del fondo del fermentador sin remover los sedimentos, lo que es muy interesante para el control y la detección de fermentaciones anormales.

Otra de las ventajas del sistema de fermentación en bodega es poder controlar la temperatura. Con un sistema de calefacción se evitan las fermentaciones incompletas y, al mantener en todo momento la temperatura óptima, se logra un importante adelanto en la terminación de las aceitunas. De este modo la fermentación se completa en algo menos de dos meses.

Este adelanto en la obtención del producto terminado es importante, ya que permite conseguir un precio de venta mayor. Como ejemplo, en la campaña 2005/2006, las aceitunas verdes aderezadas en salmuera elaboradas en bodega con calefacción que salieron en el mes de noviembre se vendieron a 0,68 €/kg. En el mes de marzo, cuando sale al mercado el grueso de la producción, el precio de venta estuvo en 0,58 €/kg, diez céntimos de euro menos.

Además, en la actualidad la producción de aceituna de mesa es excedentaria. El problema no es tanto encontrar un buen precio, sino lograr vender la producción.

Finalmente, se pueden aprovechar las características de la bodega para el desarrollo de nuevos productos como son las aceitunas negras aderezadas en salmuera aplicando, en este caso, refrigeración.

En resumen, la bodega de fermentación proporciona a los fermentadores una mayor vida y unas mejores condiciones higiénicas y de manejo, siempre que se realice un mantenimiento adecuado. Además, se tiene un mayor control del proceso fermentativo.

El mayor coste será rentable si se obtiene un producto adelantado y se sabe sacar partido a sus ventajas para la elaboración de productos de calidad con un valor añadido.

Por su parte, la instalación de fermentadores enterrados dará un buen funcionamiento en zonas donde la incidencia de los inconvenientes comentados sea pequeña, consiguiéndose un ahorro en la inversión que, si la obra está bien ejecutada y el manejo es adecuado, permite obtener un buen producto.

En lo que respecta a la calidad final de la aceituna, el sistema en bodega permite una mayor fiabilidad en cuanto a la calidad comercial y mejores posibilidades para la estandarización del producto, al tener más control sobre las condiciones en que se desarrolla la fermentación.

CONCLUSIONES

1. Las bacterias del ácido láctico predominantes durante la fermentación en salmuera de aceitunas en la zona campiña-sur de Aguilar de la Frontera, pertenecen principalmente a varias especies de *Lactobacillus*; predominando *L. plantarum* y *L. brevis*.
2. Se han seleccionado cepas de bacterias autóctonas que pueden ser utilizadas como inóculos debido a su elevada eficiencia en la realización de la fermentación acido-láctica y disminución de pH, especialmente la cepa *BAL-19*.
3. Se ha diseñado un modelo lineal ajustado para describir la relación de pH con la acidez tanto en fermentadores en bodega como para fermentadores enterrados, explicando la correlación existente entre las principales variables fisico-químicas.
4. Se propone un ratio acidez combinada / acidez libre, que podría ser usado como un índice que muestra el grado de desarrollo en la salmuera de fermentación, indicando la entrada del fruto en el cuarto estadio de fermentación o final del proceso de aderezo.
5. La principal diferencia entre ambos tipos de instalaciones para la fermentación de aceituna de mesa es la duración de la campaña. Estando relacionado principalmente con el número de viables en fermentadores, temperatura de salmuera de fermentación y unas mejores condiciones higiénicas y de manejo.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Arroyo-López F N, Durán-Quintana M C, Ruiz-Barba J L, Querol A & Garrido-Fernández A.** 2006. Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology*, 23, 791–796
- Arroyo-López F N, Querol A, Bautista-Gallego J & Garrido-Fernández A.** 2008. Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 189-196
- Asehraou A, Peres C, Brito D, Faid M, and Serhrouchni M.** 2000. Characterization of yeast strains isolated from bloaters of fermented green table olives during storage. *Grasas y aceites*, 51, 225-229
- Axelsson L.T.** 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification y Physiology p. 1-66. S. Salminen, A. von Wright y A. Ouwehand (Eds.), Lactic Acid Bacteria. Microbiological and functional aspects. Third Edition, revised and expanded. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Bamforth Charles W.** 2005. Food, Fermentation and Micro-organisms. 1^a ed.
- Barranco D, Rallo L.** 1984. Las Variedades del Olivo Cultivadas en Andalucía. Junta de Andalucía y MAPA. Madrid
- Barranco D, Fernández-Escobar R, Rallo L.** 2008. El Cultivo del Olivo. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa y Junta de Andalucía, 6^o ed.
- Belaj A, Trujillo I, De la Rosa R, Rallo L. Giménez M.J.** 2001. Polymorphism and discrimination capacity on Randomly Amplified Polymorphic markers in an Olive Germplasm Bank. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.*, 126 (1): 64-71
- Bergan T, R. Solberg, and O. Solberg.** 1984. Fatty acid and carbohydrate cell composition in pediococci and aerococci, and identification of related species, p. 179–211. *In* T. Bergan (ed.), *Methods in microbiology*. Academic Press, Inc., New York.

Cancho FG, Rejano L and Borbolla y Alcalá JMR. 1980. La formación de ácido propiónico durante la conservación de las aceitunas verdes de mesa. III. Microorganismos responsables. *Grasas y Aceites*, 31, 245–250

Consejo Oleícola Internacional. 2004. Norma Comercial Aplicable a las Aceitunas de Mesa. Resolución N° RES-2/91-IV/04

Coton E, Coton M, Levert D, Casaregola S and Sohier D. 2005. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 130-135

De Bruyne K, Franz C. M. A. P., Vancanneyt M, Schillinger U, Mozzi F, Font de Valdez G, De Vuyst L, y Vandamme P. 2008. *Pediococcus argentinicus* sp. nov. from Argentinean fermented wheat flour and identification of *Pediococcus* species by *pheS*, *rpoA* and *atpA* sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58: 2909 - 2916

De Bruyne K, Schillinger U, Caroline L, Boehringer B, Cleenwerck I, Vancanneyt M, De Vuyst L, Franz CMA, y Vandamme P. 2007. *Leuconostoc holzapfelii* sp. nov., isolated from Ethiopian coffee fermentation and assessment of sequence analysis of housekeeping genes for delineation of *Leuconostoc* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57, 2952-2959.

De la Viesca R, Fernández E, Salvador J. 2007. Analysis of the scientific production of olive products. I – Table olives. *Grasas y Aceites*, 58 (2)

Doyle MP. y Meng J. 2006. Bacteria in food and beverage production In: *The Prokaryotes* Vol. 3 Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.)

Endo A, Okada S. 2008. Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 2195-2205.

Euzéby, J. P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (1998-2008), <http://www.bacterio.cict.fr> or <http://bacterio.net>

Felis G. y Dellaglio, F. 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues Intestinal Microbiology*. 8, 44-61

Fernández MJ, Castro R, Garrido A, González F, González F, Nosti M, Heredia A, Minguez MI, Rejano L, Durán MC, Sánchez F. García P y de Castro A. 1985. *Biología de la Aceituna de Mesa*. Servicio de Publicaciones del CSIC. Madrid-Sevilla

García JM, Yousfi K, Mateos R, Olmo M, Cert A. 2001. Reduction of oil bitterness by heating of olive (*Olea europaea*) fruits, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4231–4235

Guillen R, Heredia-Moreno A, Felizon B, Jiménez A, Montano A, Fernández-Bolanos J. 1992. Fiber fractions carbohydrates in *Olea europaea* (Gordal and manzanilla cultivars), *Food Chem.*, 44, 173–178

Gutiérrez-Rosales F, Ríos JJ, Gómez-Rey ML. 2003. Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil: Structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6021–6025

Hassapidou MN, Balatsouras GD, Manoukas AG. 1994. Effect of processing upon the tocopherol and tocotrienol composition of table olives, *Food Chem.*, 50, 111–114

Hernández A, Martín A, Córdoba M G, Benito M J, Aranda E and Pérez-Nevado F. 2007. Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiology*, 24, 346-351

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, and Williams ST. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Baltimore, MD: Williams and Williams

Kandler O. and Weiss N. 1986. Regular, nonsporing Gram-positive rods. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, ed. Sneath, PH, Mair, NS, Sharpe, ME and Holt, JG Vol. 2, pp.1208–1234. Baltimore: Williams and Wilkins Co

Kim J, Chun J, Han HU. 2000. *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 1915-1919.

Kim B, Lee J, Jang J, Kim J, y Han H. 2003. *Leuconostoc inhae* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 53, 1123-1126.

Kotzekidou P. 1997. Identification of yeast from black olives in rapid system microtitre plates. *Food Microbiology*, 14, 609-616

Lane DL, Field KG, Olsen GJ, and Pace NR. 1998. Reverse transcriptase sequencing of ribosomal RNA for phylogenetic analysis. *Meth. Enzymol.* 167, 138-144.

Leisner J, Vancanneyt M, Goris J, Christensen H, Rusul G. 2000. Description of *Paralactobacillus selangorensis* gen. nov., sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from chili bo, a Malaysian food ingredient. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 50, 19-24

Marquina D, Toufani S, Llorente P, Santos A, Peinado JM. 1997. Killer activity in yeast isolated from olive brines. *Advances in Food Science*, 19, 41-46

Marsilio V. 2002. Análisis sensorial de las aceitunas de mesa. *Olivae* n° 90, febrero. Pags. 32-40

McDonald IJ, Walker T, Johnson BF, Aveledo AJ, Tsai CS. 1987. Effects of ethanol and acetate on glucose-limited chemostat cultures of *Schizosaccharomyces pombe*, a fission yeast. *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 33, No. 7 : pp. 598-601 (doi: 10.1139/m87-104)

Minguez-Mosquera MI, Garrido-Fernández J. 1989. Chlorophyll and carotenoid presence in olive fruit (*Olea europea*), *J. Agric. Food Chem.*, 37, 1–7

Minguez-Mosquera MI, Gallard-Guerrero L, Roca M. 2002. Pectinesterase and polygalacturonase in changes of pectin matter in olives (cv. Hojiblanca) intended for milling, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 79, 93–99

Montaño A, de Castro A, Rejano L, Sánchez A. 1992. Analysis of zapatera olives by gas and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography* 594: 259-267

Montaño A, Sánchez AH, Casado FJ, Castro A. de, and Rejano, L. 2003. Chemical profile of industrially fermented green olives of different varieties. *Food Chemistry* 82 (297-302)

Norma del Codex para la Aceituna de Mesa. 1981. CODEX STAN 66-1981

Oliveira M, Brito D, Catulo L, Leitao F, Gomes L, Silva S, Vilas-Boas L, Peito A, Fernandes I, Gordo F, Peres C. 2004. Biotechnology of olive fermentation of 'Galega' Portuguese variety. *Grasas y Aceites*, 55, 219-226

Real Decreto 1230/2001. Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y venta de las aceitunas de mesa. BOE núm. 279

Rejano L, Barranco D, Fernández-Escolar R, Rallo L. 1977 El aderezo de las aceitunas, in *El Cultivo Del Olivo*. Eds. Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 565–586

Roca M, Minguez-Mosquera M I. 2001. Changes in chloroplast pigments of olive varieties during fruit ripening, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 832–839

Rodríguez de la Borbolla J M, Rejano L. 1979. Sobre la preparación de la aceituna estilo sevillano. La fermentación I. *Grasas y Aceites* 30, 175–185.

Romero C, García P, Brenes M, García A, Garrido A. 2002. Phenolic compounds in natural black Spanish olive varieties, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 215, 489–496

Saija A, Uccella N. 2000. Olive biophenols: functional effects on human wellbeing, *Trends Food Sci.Technol.*, 11, 357–363

Soler-Rivas J C, Espin H, Wichers H J. 2000.Oleuropein and related compounds, *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1013–1023

Trujillo I, Rallo L, Arús P. (1995). Identifying olive cultivars by isozyme analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 120(2): 318-324

Tanasupawat S, Pakdeeto A, Thawai C, Yukphan P, y Okada S. 2007. Identification of lactic acid bacteria from fermented tea leaves (miang) in Thailand and proposals of *Lactobacillus thailandensis* sp. nov., *Lactobacillus camelliae* sp. nov., and *Pediococcus siamensis* sp. nov. *The Journal of General and Applied Microbiology.* 53, 7-15

Wood B J B y Holzapfel W H. 1998. Lactic acid bacteria in contemporary perspective. In “The genera of lactic acid bacteria” Vol 2 . Wood B. J. B. y Holzapfel, W. H. (Eds). Blackie Academic and Professional. London.

Woose C R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271