



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Aplicación de *Lactobacillus* spp. como cultivos iniciadores de la fermentación de aceitunas verdes

Alumno: Claudia González Crespo

Junio, 2018



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**Aplicación de
Lactobacillus spp. como
cultivos iniciadores de la
fermentación de
aceitunas verdes**

Alumno: Claudia González Crespo

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser la del alumno Claudia González Crespo, con una gran 'C' inicial y una 'G' prominente.

Junio, 2018

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Las bacterias ácido-lácticas	10
1.1.1 Orden Lactobacillales	10
1.1.2. Clasificación de bacterias lácticas	11
1.1.3. Sustancias producidas por bacterias lácticas	12
1.2. El género <i>Lactobacillus</i>	14
1.2.1. Aspectos morfológicos.....	14
1.2.2. Pared celular y ultraestructura.....	14
1.2.3. Las colonias de <i>Lactobacillus</i>	14
1.2.4. Condiciones de crecimiento y necesidades nutritivas.....	15
1.2.5. Condiciones ecológicas	15
1.2.6. Metabolismo	16
1.2.7. Patogenicidad.....	17
1.2.8. Taxonomía.....	17
1.2.9. Acción antimicrobiana.....	19
1.2.10. Bioconservación	21
2. FORMAS PRINCIPALES DE PREPARACIÓN DE ACEITUNAS DE MESA	21
2.1. Aceitunas verdes aderezadas en salmuera, estilo sevillano o español	24
2.2. Aceitunas negras por oxidación o tipo negras	24
2.3. Aceitunas negras naturales	25

3. FACTORES CONDICIONANTES PARA EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) EN LA FERMENTACIÓN DE ACEITUNAS	26
4. CARACTERÍSTICAS DEL DESARROLLO DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN LAS ELBORACIONES MÁS DESTACADAS DE ACEITUNAS DE MESA.....	31
4.1. Aceitunas verdes	31
4.2. Aceitunas tipo negras (y de color cambiante)	33
4.3. Aceitunas negras naturales	34
5. APLICACIÓN DE <i>LACTOBACILLUS</i> SPP. COMO CULTIVOS INICIADORES DE LA FERMENTACIÓN DE ACEITUNAS VERDES.....	35
6. DISCUSIÓN	36
7. CONCLUSIONES	37
8. BIBLIOGRAFÍA	38

RESUMEN

Las aceitunas de mesa son uno de los alimentos fermentados más antiguos y actualmente se consideran un componente esencial en la Dieta Mediterránea, ya que presentan importantes grasas monoinsaturadas (especialmente ácido oleico) y compuestos fenólicos que actúan como antioxidantes en el cuerpo humano. Las aceitunas de mesa, además, son importantes desde el punto de vista económico, siendo España el principal país productor y dentro de este Andalucía es una importantísima región olivarera. Las bacterias del ácido láctico (BAL) y especialmente *Lactobacillus* spp. desempeñan un papel fundamental en la elaboración de aceitunas de mesa y en su conservación. El desarrollo de las BAL en el proceso fermentativo está condicionado por diversos factores como: pH, temperatura, concentración de sal, etc. Entre las principales elaboraciones de aceitunas de mesa es pertinente mencionar las aceitunas verdes estilo sevillano o español, de gran prestigio internacional. El desarrollo de cultivos iniciadores en los que están presentes los lactobacilos constituye una significativa herramienta tecnológica para la fermentación de las aceitunas de mesa.

Palabras clave: aceitunas de mesa, proceso de fermentación, bacterias ácido lácticas, *Lactobacillus* sp., cultivos iniciadores.

ABSTRACT

Table olives are one of the oldest fermented foods and currently considered an essential component in the Mediterranean Diet, since they have important monounsaturated fats (especially oleic acid) and phenolic compounds that act as antioxidants in the human body. Table olives, in addition, are important from the economic point of view, being Spain the main producing country and within this Andalusia is an important olive-growing region. Lactic acid bacteria (LAB) and specially *Lactobacillus* spp. play a fundamental role in the production of table olives and their conservation. The development of LAB in the fermentation process is conditioned by various factors such as: pH, temperature, salt concentration, etc. Among the main elaborations of table olives it is pertinent to mention the green olives of Sevillian or Spanish style, of great international

prestige. The development of starter cultures in which lactobacilli are present constitutes a significant technological tool for the fermentation of table olives.

Key words: table olives, fermentation process, lactic acid bacteria, *Lactobacillus* sp., starter cultures.

1. INTRODUCCIÓN

Las aceitunas de mesa constituyen el producto vegetal fermentado más significativo del mundo occidental, alcanzando, en el año 2015/16 aproximadamente más de dos millones de toneladas (Consejo Oleícola Internacional “COI”, 2017). La previsión del COI indica una tendencia de alrededor de un 2% anual de crecimiento para un futuro cercano, tanto en la elaboración como en el consumo.

El consumo mundial de aceitunas de mesa en los últimos años se multiplica por 2,7 aumentando un 182,0% durante el periodo 1990/91 – 2016/17. El gráfico 1 presenta esta evolución, el mayor consumo se comprueba en los principales productores miembros del COI, en algunos de estos países aumentan considerablemente sus producciones y como resultado, también el consumo, entre ellos, se halla Egipto que pasa de consumir 11.000t en 1990/91 a 400.000 en 2016/17. Argelia pasa en este periodo de 14.000t a 244.000t. y Turquía de 110.000 a 350.000t. Los demás países, aunque aumentan lo hacen en proporciones menores. El gráfico 2 enseña el consumo anual de aceitunas de mesa por habitante en los países miembros del COI durante el año 2015, Albania, es la que presenta un mayor consumo con un 10.7 kg/habitante/año, cabe destacar que Albania muestra un consumo total de 31.000t., y una población aproximada de 2.889.000 habitantes, le sigue Argelia con 6.1 kg, Turquía y Líbano consumen entre 4,2 y 4,0 kg; Egipto y Jordania 3,7 kg y 3,3 kg respectivamente; Israel y Libia 2,6 kg y 2,3 kg y Túnez 1,8 kg. Los demás países consumen entre 0,9 kg y 0,6 kg de aceitunas de mesa por año (ordenados decrecientemente: Uruguay, Marruecos, Argentina, Irán e Iraq).

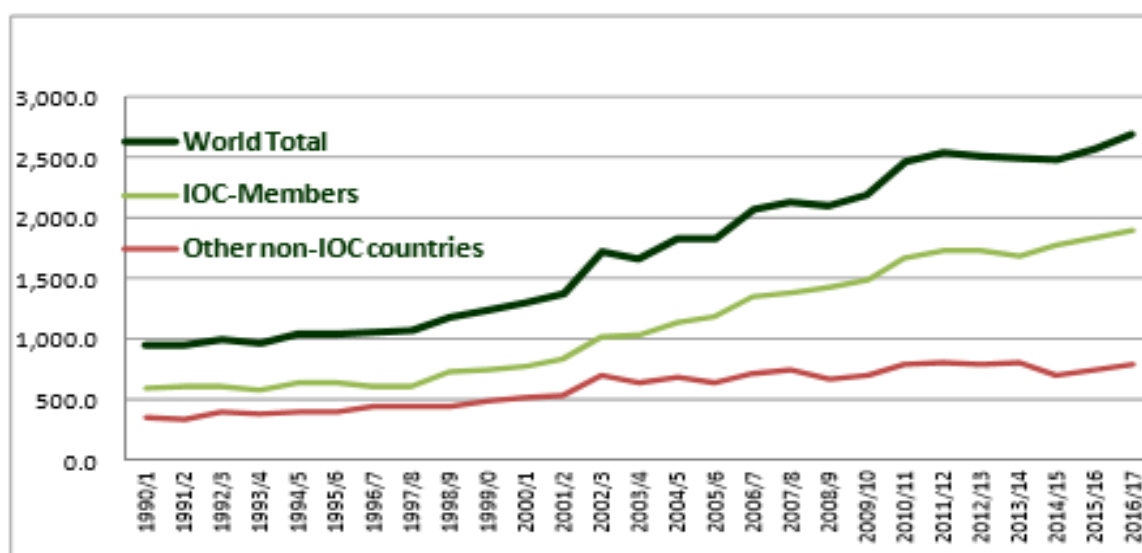


Gráfico 1: Evolución del consumo mundial de aceitunas de mesa por grupos de países (toneladas) (COI, 2017).

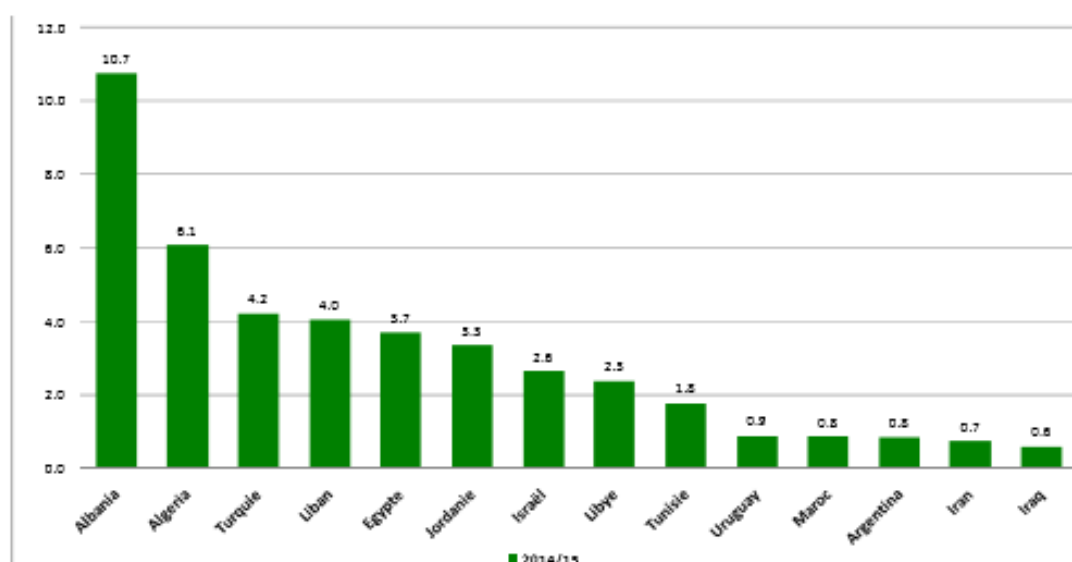


Gráfico 2: Consumo en Kg de aceitunas de mesa por habitante/año en los países miembros del COI en 2015 (COI, 2017).

El gráfico 3 muestra el consumo de aceitunas de mesa por habitante y por año en la Unión Europea, como podemos observar el productor principal, España, es el primer consumidor con 4,1 kg a continuación Chipre con 3,1 kg, Malta 1,9 kg seguido de Grecia y Luxemburgo con 1,8 kg, respectivamente, Bulgaria e Italia 1.7 Kg y Rumanía 1,1 kg. Entre 0,9 kg y 0,5 kg se encuentran ordenados decrecientemente Francia, Suecia, Bélgica, Eslovaquia, Austria, Reino Unido y Dinamarca. El resto de los países de la Unión Europea que su consumo está comprendido entre 0,4 kg y 0,2 kg son: Eslovenia, Lituania, Finlandia,

República Checa, Irlanda, Países Bajos, Polonia, Estonia, Hungría, Croacia y Letonia.

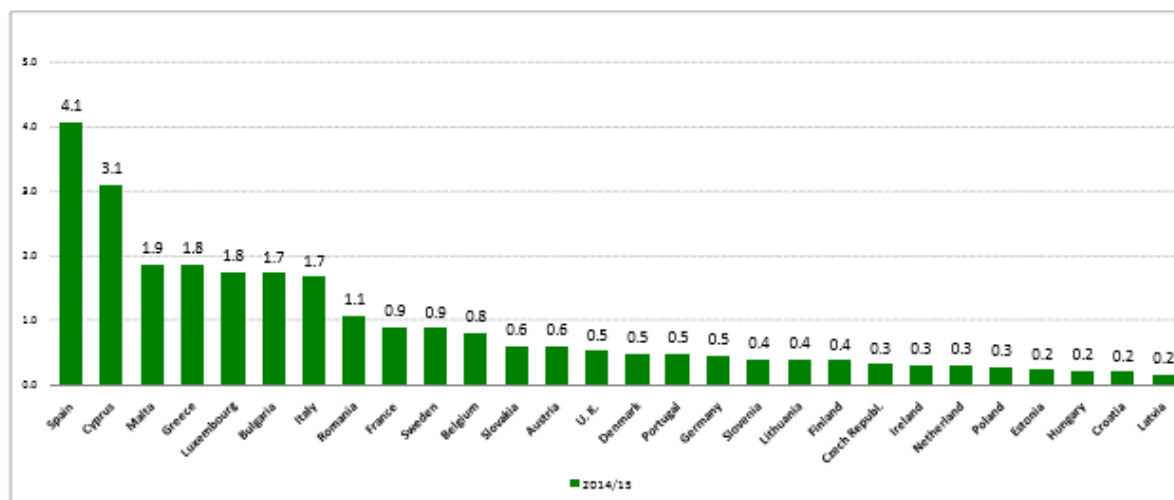


Gráfico 3: Consumo en Kg de aceitunas de mesa por habitante/año en los países de la Unión Europea en 2015 (COI, 2017).

La Unión Europea, según el Consejo Oleícola Internacional, es la principal productora de aceituna de mesa del mundo con unas cifras que representan entre el 40 y 50% del total (826 miles de Toneladas); y adentrándonos en la UE, España es el principal productor con 600 miles de Toneladas, lo que supone que como país también sea el primer productor mundial y está seguida por Turquía (397 miles de Toneladas), Grecia (194 miles de Toneladas) y por Italia (42 miles de Toneladas). A nivel mundial España está también seguida de Turquía (397 miles de Toneladas), y a continuación de Egipto (335 miles de Toneladas), Argelia (221 miles de Toneladas), Siria (150 miles de Toneladas) y Marruecos (120 miles de Toneladas). En el continente sudamericano predomina Argentina (120 miles de Toneladas), Perú (56 miles de Toneladas) y Chile (13 miles de Toneladas) y el norte, EEUU. (70 miles de Toneladas) y México (22 miles de Toneladas). Los datos anteriormente descritos se pueden observar en la tabla 1 y tabla 2, obtenidos de los datos estadísticos del COI, actualizados en 2017.

		2014/15	2015/16	2016/17 (prov.)	2017/18 (prév.)
		(25)	(26)	(27)	(28)
Albanie	Albania	30.0	30.0	38.0	30.0
Argénie	Argentina	233.5	221.0	293.0	280.0
Chypre	Cyprus	120.0	73.0	95.0	105.0
Croatie	Croatia				
Egypte	Egypt	450.5	335.5	500.0	650.0
Iran	Iran	68.0	60.5	75.5	70.0
Iraq	Iraq	8.0	8.0	8.0	8.0
Israël	Israel	17.0	15.0	15.0	17.0
Jordanie	Jordan	34.5	35.5	23.0	35.0
Liban	Lebanon	17.0	19.0	23.0	23.0
Libye	Libya	3.0	3.0	3.0	3.0
Maroc	Morocco	100.0	120.0	110.0	120.0
Monténégro	Montenegro	0.0	0.0	0.0	0.0
Palestine	Palestine	12.0	11.0	10.5	10.0
Tunisie	Tunisia	26.0	26.0	22.0	28.0
Turquie	Turkey	390.0	397.0	400.0	455.0
UE	EU	868.0	886.5	837.5	826.5
Uruguay		0.0	0.0	0.0	0.0
TOTAL A		2,377.5	2,241.0	2,453.5	2,660.5
A. Saoudite	Saudi Arabia	4.5	4.5	4.5	4.5
Australie	Australia	4.0	4.0	4.0	4.0
Brazil	Brazil				
Bulgarie	Bulgaria				
Canada	Canada				
Chili	Chile	12.5	13.0	13.0	13.0
Etats-Unis	USA	33.5	70.5	90.5	66.0
Japon	Japan				
Mexique	Mexico	16.5	22.5	16.0	20.0
Pérou	Peru	40.5	59.0	71.0	70.0
Roumanie	Romania				
Russie	Russia				
Syrie	Syria	75.0	150.0	190.0	100.0
Suisse	Switzerland				
Autres P.prod.	Other pr.coun.	15.0	15.0	15.0	15.0
Autr.P.un.imp.	Oth.non-prod.				
TOTAL B		203.5	335.5	376.0	292.5
WORLD TOTAL		2,581.0	2,576.5	2,829.5	2,953.0

Tabla 1: Producción del Mercado Mundial de aceitunas de mesa (COI, 2017).

		2013/14	2014/15	2015/16	2016/17 (prov.)	2017/18 (prév.)
		(24)	(25)	(26)	(27)	(28)
Chypre	Cyprus	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8
Croatie	Croatia	1.0	0.2	0.8	0.7	0.8
Espagne	Spain	572.2	555.6	601.0	596.1	521.5
France	France	1.1	1.1	1.1	0.7	1.1
Grèce	Greece	130.0	249.0	194.0	180.0	235.0
Italie	Italy	69.3	42.0	66.0	39.9	48.0
Malte	Malta	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Portugal	Portugal	17.5	17.4	20.8	17.3	17.3
Slovénie	Slovenia	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TOTAL A)		793.9	868.1	886.5	837.5	826.5
Allemagne 1)	Germany 1)					
Autriche	Austria					
Belgique	Belgium					
Bulgarie	Bulgaria					
Danemark	Denmark					
Estonie	Estonia					
Finlande	Finland					
Hongrie	Hungary					
Irlande	Ireland					
Lettonie	Latvia					
Lithuanie	Lithuania					
Luxembourg	Luxembourg					
Pays-Bas	Netherlands					
Pologne	Poland					
Rép.Tchèque	Czech. Rep.					
Roumanie	Romania					
Royaume-Uni	United King.					
Slovaquie	Slovakia					
Suède	Sweden					
TOTAL B)		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TOTAL A + B		793.9	868.1	886.5	837.5	826.5

Tabla 2: Producción en la UE de aceitunas de mesa (COI, 2017).

Cabe señalar que Andalucía ha sido durante siglos, y continúa siendo, una de las regiones olivareras más significativas del mundo y, por tanto, de aceite de oliva y aceitunas de mesa. La preparación a nivel industrial de las primeras

aceitunas de mesa en España, “verdes al estilo español o sevillano” se inició a finales del siglo XIX en la provincia de Sevilla. Las preparaciones de mayor aceptación son las provenientes de las aceitunas verdes estilo sevillano o español, que han mostrado una evolución creciente durante los últimos años. La preparación de las aceitunas verdes naturales, que fueron las más significativas hasta los años setenta, ha ido descendiendo lentamente, incluso en los países en los que había una tradición muy arraigada. En la actualidad, el sector, a pesar de disfrutar supuestamente de una sólida situación dentro del conjunto de la industria agro-alimentaria mundial, atraviesa una etapa de cierta crisis. Esta se puede observar de manera clara en el equilibrio, o incluso en una disminución de las producciones. A nivel de la UE, los contratiempos más apremiantes parecen estar derivados de fenómenos coyunturales y de la política agraria de ésta; pero, no hay que omitir que los aspectos tecnológicos y científicos pueden jugar también un papel importante para mejorar esta coyuntura. Por ejemplo, una campaña basada en destacar el valor nutricional de la aceituna de mesa, y en su evolución y progreso desde la antigüedad a la saludable dieta mediterránea, es probable que provocara una repercusión muy beneficiosa en el aumento de su consumo, tanto en aquellos países que sólo son importadores como en los países productores.

De igual manera, conviene mencionar que la fermentación de prácticamente la totalidad de las aceitunas de mesa sucede en la actualidad aún de forma espontánea y que el seguimiento del proceso se hace fundamentalmente basándose en análisis fisicoquímicos.

En general, la evolución de los procedimientos de elaboración de aceitunas de mesa desde los tiempos griegos y romanos hasta la actualidad ha sido muy lenta, específicamente, la del método tradicional de preparación de aceitunas verdes estilo español. Los cambios tecnológicos se vieron favorecidos gracias a las investigaciones que demostraron el papel fundamental que desempeñaban las bacterias lácticas en la fermentación, cuyo adecuado desarrollo en las salmueras de fermentación era imprescindible para lograr un producto final con las propiedades organolépticas idóneas, evitando a la vez el deterioro de las aceitunas. Se basa, fundamentalmente, en procesar las aceitunas de tal forma que la microbiota epifítica ocasional (constituida por

levaduras y bacterias lácticas) empiece a desarrollarse en las salmueras de fermentación, consume los azúcares que contienen las aceitunas produciendo ácido láctico y, como resultado se produzca una significativa bajada de pH. Este descenso de pH, junto con el ácido láctico y otros metabolitos secundarios producidos por las bacterias lácticas (pertenecientes principalmente a las especies *Lactobacillus plantarum* y *L. pentosus*) posibilita una conservación adecuada del producto final, preservando las aceitunas de posibles deterioros producidos por el desarrollo de microorganismos que causan alteraciones (Ruiz Barba, et al., 2004). El proceso de fermentación mejora considerablemente las características organolépticas y de conservación (Campus et al., 2015).

Las bacterias ácido lácticas muestran en la actualidad un gran potencial biotecnológico, dada su presencia en numerosos procesos fermentativos de alimentos destinados al consumo humano (productos lácteos, vegetales, cárnicos y de panadería, así como bebidas alcohólicas) y animal (ensilados). Estas bacterias no sólo cooperan en el desarrollo de las propiedades organolépticas y reológicas de los alimentos, sino que se instauran en los mismos ambientes poco favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos debido a su destacada capacidad antagonista, la cual beneficia la multiplicación en el alimento, en detrimento de cualquier otro grupo microbiano presente en la materia prima (alimento crudo) o que contamine el producto después. Además de este papel importante en procesos de bioconservación, se ha podido constatar que algunas cepas de bacterias lácticas, entre ellas las del género *Lactobacillus*, son beneficiosas para la salud, tanto humana como animal (probióticos).

Los últimos datos proporcionados por investigadores del Proyecto Probiolives informan que algunas de las bacterias lácticas protagonistas de la fermentación de la aceituna de mesa muestran resultados mejores que otras ya consideradas como microorganismos probióticos y que se emplean actualmente en diferentes productos lácteos.

Ambos efectos beneficiosos, originados por su capacidad antagónica, se basan en la producción de ácidos orgánicos y otros metabolitos inhibidores, entre los que cabe nombrar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y otros procedentes del metabolismo del oxígeno, así como compuestos aromáticos (diacetilo,

acetaldehído), derivados deshidratados del glicerol (reuterina), enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas y otros.

Las bacterias lácticas pueden ser empleadas en la prevención y el control de ciertas enfermedades, así como en la mejora de la calidad de conservación de determinados alimentos, por lo que su interés radica en tener a disposición sustancias procedentes de microorganismos que se usen como punto de partida para la obtención de productos biotecnológicos que sean aplicables para solucionar problemas de salud tanto humana como animal. En la presente reseña se describen las características fundamentales de estas bacterias, así como su efecto probiótico, sus propiedades inmunológicas, su clasificación y su acción antimicrobiana y bioconservadora.

1.1. Las bacterias ácido-lácticas

1.1.1 Orden Lactobacillales

Las bacterias lácticas (BAL) son aquellos microorganismos que cuando fermentan hidratos de carbono pueden hacerlo mediante una fermentación homoláctica, produciendo como único producto final ácido láctico, o mediante una fermentación heteroláctica, produciendo una mezcla de ácido láctico y otros ácidos, etanol y CO₂. Este grupo de bacterias seguramente sea el más abundante, ya que están muy distribuidas, pudiendo encontrarlas en la naturaleza, en el tracto digestivo y urinario de humanos y animales formando parte de su microbiota. Además, este grupo ejerce un papel fundamental en la industria alimentaria participando en la producción de alimentos fermentados como leche, productos lácteos, cárnicos, vegetales, vinos y cervezas. Las BAL, aportan propiedades organolépticas nuevas a los alimentos mejorando su olor, sabor, textura y valor nutricional. También, gracias a la acidificación del medio (tras la producción de ácido láctico) ayudan a incrementar la vida útil del alimento y gracias a su capacidad de crecer y desarrollarse en ambientes con un pH ácido y concentración salina relativamente elevada, lo que hace que se impida el crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos y por tanto de sus sustancias tóxicas.

La extensa distribución de BAL es debida a su capacidad de crecer y desarrollarse en ambientes de temperaturas elevadas, de concentraciones altas de cloruro sódico, en sustratos de origen animal con un pH neutro, así como en sustratos de origen vegetal con acidez elevada (Carr, 1973). Esta amplia heterogeneidad de ambientes se debe a su rica diversidad morfológica y fisiológica. En general, las BAL son cocos o bacilos de bajo contenido en G+C, Gram positivos, no esporulados, anaeróbicos aerotolerantes, inmóviles, microaerofílicos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y bencidina negativas, carecen de citocromos (por lo que solamente pueden obtener energía mediante fosforilación a nivel de sustrato), no reductores de los nitratos y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Carr et al., 2002; Vázquez et al., 2009). Son bacterias que necesitan para crecer el aporte de vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas, ya que carecen de varias rutas biosintéticas.

1.1.2. Clasificación de bacterias lácticas

Las bacterias ácido lácticas forman parte del filo Firmicutes, se clasifican en géneros en función de las diferentes características que presentan, como morfología, crecimiento, modo de fermentación, etc. Son los siguientes géneros:

Principalmente los géneros más representativos son *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, además encontraremos los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weissella* (Gálvez et al., 2007) (Figura 1).

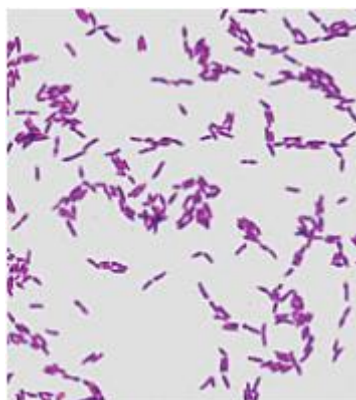


Figura 1: *Lactobacillus*. Micrografía (microscópio óptico) (Prescott y col., 2000).

Las bacterias homofermentadoras como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pedococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus* tienen la enzima aldolasa y producen ácido láctico como único producto final de la fermentación de la glucosa usando la vía de glucólisis. Por otro lado, las del género *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Carnobacterium* y algunos *Lactobacillus* son heterofermentadoras y transforman hexosas a pentosas utilizando la vía de 6-fosfogluconatofosfocetolasa, originando en el proceso, además de ácido láctico, cantidades significativas de otros productos como acetato, etanol y CO₂ (Axelsson, 1998; Carr et al., 2002). Las BAL son capaces de inhibir la acción de microorganismos patógenos y alterantes en los alimentos, por lo que son útiles a la hora de alargar y aumentar la vida útil y la calidad higiénica de los alimentos. Los ácidos que producen dichas bacterias (láctico, acético y propiónico) desempeñan su acción antimicrobiana interfiriendo con el potencial de membrana, inhiben su transporte activo, disminuyen el pH intracelular, causando la liberación de iones hidrógeno y del anión correspondiente, haciendo que ambos iones inhiban una gran variedad de funciones metabólicas y el crecimiento celular (Doores, 1993; Vázquez et al., 2009). Estas bacterias actúan tanto contra bacterias Gram positivas como las bacterias Gram negativas, levaduras o mohos. Las bacterias lácticas consiguen sobrevivir y desarrollarse en presencia de pH relativamente bajo. Esto se debe a que las bacterias lácticas tienen un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y de protones al exterior celular, que además de contribuir a la homeostasis del pH interno, produce energía (Vázquez et al., 2009).

1.1.3. Sustancias producidas por bacterias lácticas

Ácido láctico: Es el ácido que producen en mayor cantidad las bacterias lácticas. Este ácido genera un ambiente desfavorable para agentes patógenos o alterantes y para la putrefacción del alimento ya que el pH del medio influye en gran medida en el crecimiento y desarrollo de los microorganismos causantes del deterioro del alimento. El efecto que produce el ácido en el alimento depende de: la especie de microorganismo, tipo de ácido, concentración y tiempo. Así, por ejemplo, las bacterias lácticas son ácido-tolerantes, esto quiere decir, que algunas crecen a valores de pH tan bajos

como 3.2 y otras pueden crecer a valores de pH tan altos como 9.6 (la mayor parte crecen a pH entre 4 y 4.5) (Carr et al., 2002).

Ácido propiónico: Este ácido al igual que otros, también genera un ambiente desfavorable para bacterias Gram positivas, Gram negativas, mohos y levaduras, esto permite conservar el alimento en el que esté por más tiempo.

Ácido cítrico y algunos ácidos volátiles: También son producidos por las BAL y de la misma manera que el resto de los ácidos, son antagonistas del desarrollo y crecimiento de distintos microorganismos.

Los ácidos producidos por las BAL (láctico, acético y propiónico) ejercen su acción antimicrobiana interfiriendo con el potencial de membrana, inhiben su transporte activo, reducen el pH intracelular, dando lugar a la liberación de iones hidrógeno y del anión correspondiente, esto hace que ambos iones inhiban una gran diversidad de funciones metabólicas y el crecimiento celular (Doores, 1993; Vázquez et al., 2009).

Diacetilo: Otro de los productos finales del metabolismo de las BAL es el diacetilo (2,3 - butanodiona) que procede del piruvato (Kandler, 1983). Este compuesto orgánico aporta aroma a determinados productos como la mantequilla o la cerveza. También inhibe el crecimiento y desarrollo de algunos microorganismos, aunque su uso en la industria alimentaria es algo complicado ya que las BAL no producen una cantidad significativa de dicho compuesto.

Peróxido de hidrógeno: Este se acumula en cultivos con bacterias ácido-lácticas catalasa negativo, esto significa que, carecen de ese enzima. Dicho compuesto, puede reaccionar con otros compuestos dando lugar a sustancias inhibidoras.

Bacteriocinas: son las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas más interesantes desde el punto de vista tecnológico, ya que por su naturaleza proteica (Tagg et al., 1976), las inactivan los enzimas proteolíticos del tracto gastrointestinal y no son tóxicas ni inmunógenas en animales de experimentación (Bhunja et al., 1990), por lo que las bacteriocinas son un perfecto candidato para la conservación de los alimentos.

1.2. El género *Lactobacillus*

1.2.1. Aspectos morfológicos

La morfología del género *Lactobacillus* es variable, presenta desde células en forma de bacilos largos, hasta bacilos cortos o coco-bacilos corineformes. Estos bacilos se encuentran con frecuencia constituyendo cadenas y normalmente son inmóviles, pero algunas especies son móviles por la existencia de flagelación períttrica. Son Gram positivos y sólo las células muertas pueden dar resultados diferentes a la tinción de Gram. Además, no esporulan y algunas cepas muestran cuerpos bipolares que posiblemente contengan polifosfato. Los grandes bacilos homofermentativos que forman bacilos largos, contienen en su interior gránulos, estos se han podido observar mediante la tinción de Gram o por tinción con azul de metileno (Kandler et al., 1992).

1.2.2. Pared celular y ultraestructura

La pared celular de *Lactobacillus* sp., es propiamente Gram positiva observada al microscopio electrónico, esta presenta peptidoglicanos (mureínas) de varios quimiotipos, también presenta polisacáridos unidos al peptidoglicano por enlaces fosfodiéster y sólo presenta ácidos teicoicos vinculados a ella en algunas especies (Knox y Wicken, 1973; citados por Bergey, 1992). También pueden observarse al microscopio electrónico grandes mesosomas que son característicos de este género.

*1.2.3. Las colonias de *Lactobacillus**

En medios sólidos las colonias de *Lactobacillus* son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y no presentan pigmentos. Sólo en determinadas ocasiones presentan coloración amarillenta o rojiza. Algunas especies constituyen colonias rugosas. Otras, como *Lactobacillus confusus*, como excepción muestran colonias viscosas. En general, no presentan actividad proteolítica ni lipolítica que se pueda observar mediante halos claros formados en medios sólidos que incluyan proteínas o grasas. Aunque, muchas cepas muestran una ligera actividad proteolítica debido a proteasas y peptidasas ligadas a la pared celular o liberadas por ésta, así como

una actividad lipolítica débil debido a la acción de lipasas intracelulares (Law y Kolstad, 1983). Generalmente, no reducen los nitratos, pero esta reacción puede suceder en ciertos casos, cuando el pH es superior a 6,0. Los lactobacilos no licúan la gelatina ni asimilan la caseína, aunque muchas cepas producen cantidades pequeñas de Nitrógeno soluble. Tampoco producen indol ni sulfídrico (H_2S). Son catalasa negativos y también son citocromo negativos, por la ausencia de porfirinas. La producción de pigmentos por estas bacterias es rara y cuando sucede, éstos suelen ser de color amarillo o naranja hacia un tono rojizo. Los lactobacilos no producen olores típicos al crecer en medios habituales, pero ayudan a cambiar el sabor de alimentos fermentados, mediante la producción de compuestos volátiles como diacetilo y sus derivados, sulfuro de hidrógeno (H_2S) y aminas en el queso (Law y Kolstad, 1983).

1.2.4. Condiciones de crecimiento y necesidades nutritivas

El género *Lactobacillus* presenta unos requerimientos nutricionales particulares para cada especie, necesitan no sólo carbohidratos como fuentes de carbono y energía, sino también: aminoácidos, vitaminas y nucleótidos. Existen especies que se adaptan a sustratos muy específicos y requieren factores de crecimiento específicos (Bergey, 1992). Debido a los requerimientos nutricionales, la clasificación de las BAL es difícil por los métodos microbiológicos tradicionales. El uso de pruebas moleculares, basadas en secuencias de ADN ribosomal, para identificar las bacterias aisladas de su ambiente natural, fue investigado por Tannock (1988). Debido a la elevada variabilidad de esta región entre especies, se utiliza desde hace varios años un método eficaz para la identificación y detección específica de bacterias ácido-lácticas probióticas, este ha resultado muy útil para una caracterización mejor de las mismas, denominado PCR (polymerase chain reaction o reacción en cadena de la polimerasa) (Castellanos et al., 1996).

1.2.5. Condiciones ecológicas

❖ pH:

El pH del medio influye en el crecimiento de los lactobacilos, estos crecen adecuadamente en medios ligeramente ácidos, con un pH inicial que puede

variar de 6,4 - 4,5 y con un pH óptimo de desarrollo entre 5,5 y 6,2. Su crecimiento se interrumpe cuando el pH toma valores desde 4 hasta 3,6 dependiendo de la especie y cepas y disminuye considerablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. Los lactobacilos son capaces de reducir el pH del sustrato donde están presentes por debajo del valor 4,0 mediante la formación de ácido láctico. De esta manera evitan o al menos reducen notablemente el crecimiento de prácticamente de todos los microorganismos competidores, excluyendo el de otras bacterias lácticas y el de las levaduras (Bergey, 1992).

❖ Necesidades de Oxígeno:

La mayor parte de las cepas de *Lactobacillus* sp. son esencialmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se adquiere bajo condiciones microaerófilas o anaeróbicas y se conoce que un aumento de la concentración de CO₂ (de alrededor el 5% o hasta el 10%) puede estimular el crecimiento, sobre todo en el caso del crecimiento superficial en medios sólidos (Bergey, 1992).

❖ Temperatura de crecimiento:

La mayoría de los lactobacilos son mesófilos (30 - 40°C), tienen un límite superior de 40°C. No obstante, su rango de temperaturas para el crecimiento se encuentra entre 2 y 53°C, algunos crecen a temperaturas inferiores de 15°C y hay cepas que pueden llegar a crecer por debajo de 5°C. Otros crecen a temperaturas bajas, próximas al punto de congelación (por ejemplo, los que residen en carnes y pescados congelados). Los denominados lactobacilos “termófilos” pueden tener un límite superior de temperatura de 55°C y no crecen a una temperatura inferior de 15°C. No se conocen aún los verdaderos lactobacilos termófilos que crezcan a una temperatura superior de 55°C (Bergey, 1992).

1.2.6. Metabolismo

Los lactobacilos son microaerófilos o anaerobios. Estos microorganismos no presentan sistemas de citocromos para efectuar la fosforilación oxidativa y no tienen enzimas superóxido dismutasas ni catalasas.

Los miembros de este género transforman por homofermentación la glucosa y las hexosas aldehídicas similares, los carbohidratos que producen estos azúcares simples y los alcoholes polihidroxílicos en ácido láctico o bien, en ácido láctico y otros productos finales adicionales como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico por heterofermentación (Kandler, 1983), al menos un 50% de los productos finales lo constituye el ácido láctico, el cual normalmente no es fermentado (Kandler y Weiss, citados por Bergey, 1992). Las vías principales de la fermentación de las hexosas son: la de Embden-Meyerhof, en la cual se transforma 1 mol de hexosa en 2 moles de ácido láctico mediante la fermentación homoláctica y la vía del 6-fosfogluconato, cuyo resultado es 1 mol de CO₂, 1 mol de etanol (o de ácido acético) y 1 mol de ácido láctico, mediante la fermentación heteroláctica. En condiciones aerobias, la mayor parte de las cepas reoxidan el NADH₂ usando el O₂ como aceptor final de electrones, de manera que el Acetil-CoA no es, o al menos no es totalmente reducido a etanol. De este modo, se genera ATP adicional por fosforilación a nivel de sustrato, así como proporciones variables de ácido acético y etanol, en relación al suministro de Oxígeno (Archibald y Fridovich; 1981). En lo que se refiere a los niveles enzimáticos, los lactobacilos heterofermentativos poseen fosfocetolasas, pero no FDP aldolasas, mientras que los homofermentativos poseen FDP aldolasas, pero no fosfocetolasas.

1.2.7. Patogenicidad

Excepto las caries dentales, la patogenicidad de los lactobacilos es inusual; sin embargo, últimamente se han conocido algunos procesos infecciosos en humanos en los que estos microorganismos se han hallado implicados. Como por ejemplo los casos de abscesos, septicemias sistémicas y endocarditis bacterianas, causados por *L. casei* subsp. *rhannosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y ocasionalmente *Lactobacillus salivarius* (Bourne et al., 1978; citados por Bergey, 1992).

1.2.8. Taxonomía

Inicialmente la taxonomía de los lactobacilos se realizaba en función de sus características fenotípicas como los patrones de fermentación de carbohidratos, la resistencia a distintas concentraciones de NaCl, el crecimiento

en diferentes medios a una temperatura o rango de pH determinados y la resistencia a antibióticos y otras características de las células. Primeramente, los lactobacilos se clasificaron teniendo en cuenta su temperatura de crecimiento y la fermentación de las hexosas y, después, en función de su capacidad homo/heterofermentativa. Kandler y Weiss (1992) clasificaron a los lactobacilos en tres grupos: termobacterias (lactobacilos homofermentativos obligados), estreptobacterias (lactobacilos heterofermentativos facultativos) y betabacterias (lactobacilos heterofermentativos obligados), esta clasificación no tiene en cuenta ni las temperaturas de crecimiento ni la morfología.

Hammes et al. (1995) definieron el género *Lactobacillus*, y fue la definición "moderna" más admitida, que divide los lactobacilos como homofermentativos obligados, heterofermentativos facultativos y heterofermentativos obligados, basada en el tipo de azúcares fermentados y productos de fermentación. Los lactobacilos homofermentativos (habitualmente denominados grupo metabólico A) fermentan las hexosas casi únicamente (85%) a ácido láctico a través de la ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) o la glucólisis; no fermentan las pentosas y el gluconato. Las especies heterofermentativas facultativas (grupo metabólico B) fermentan las hexosas en ácido láctico a través de EMP y pueden degradar las pentosas y gluconato a través de una fosfocetolasa inducible, una enzima de la ruta de la pentosa fosfato (PP), produciendo ácido acético, etanol y ácido fórmico en condiciones limitantes de glucosa. Por último, los lactobacilos heterofermentativos obligados (grupo metabólico C) tienen una aldolasa FDB, pero no fosfocetolasa, y metabolizan pentosas y hexosas únicamente por la vía del fosfogluconato (que corresponde a la primera parte del PP) y originan ácido láctico, etanol (o ácido acético) y CO₂.

La actualización taxonómica realizada por Salvetti et al. (2012), basada en el análisis de secuencias de genes ARNr 16S, aunque en ciertas ocasiones es insuficiente y han recurrido a técnicas adicionales como la secuenciación de genes codificadores de proteínas más divergentes y/o técnicas de tipado molecular para diferenciar las cepas e incluirlas a la especie correcta después de la agrupación fundamentada en el gen ARNr 16S. La combinación de varios modelos y métodos proporcionó la identificación de 15 grupos de *Lactobacillus* (Gráfico 4):

L. delbrueckii, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. buchneri*, *L. alimentarius*, *L. brevis*, *L. collinoides*, *L. fructivorans*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. casei*, *L. coryniformis*, *L. manihotivorans*, *L. perolens*, *L. vaccinostercus*.

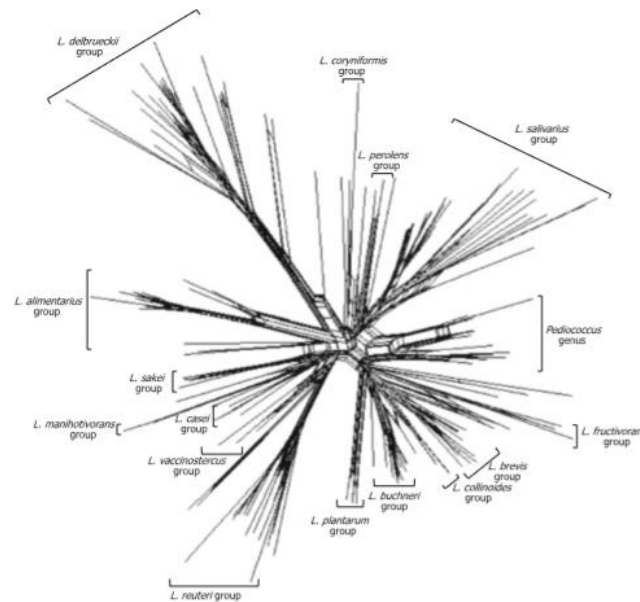


Gráfico 4: Especies de *Lactobacillus* y *Pediococcus* resultantes del análisis del gen ARNr 16S. Sólo se indican los nombres de los grupos (Salvetti et al., 2012).

1.2.9. Acción antimicrobiana

Se pueden exponer multitud de ejemplos que ilustren la actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas. *Lactobacillus plantarum* es la cepa más comúnmente productora de bacteriocinas, lo cual demuestra su capacidad para controlar otros microorganismos, incluyendo los patógenos. Determinados microorganismos producen antibióticos y antimetabolitos como: bacteriocinas, acidofilinas, lactalinas y toxinas destructoras de levaduras.

Gran parte de las cepas de *Lactobacillus* producen sustancias antimicrobianas inhibitoras del crecimiento y desarrollo de otros microorganismos “*in vivo*” (Saxelin, 1997).

Bacteriocinas

Son moléculas que tienen una estructura tipo péptido o proteína de origen ribosomal que se secretan al medio extracelular y poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos (Monroy et al., 2009; Beshkova y Frengova, 2012; Mondragón Preciado et al., 2013).

Las bacteriocinas pueden actuar tanto contra bacterias Gram positivas como Gram negativas aunque en menor medida.

Las bacteriocinas de las bacterias ácido lácticas incluyen residuos de aminoácidos como lisina, arginina e histidina, los cuales les otorgan un carácter catiónico (pH neutro), y también incluyen residuos de alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina y triptófano, esto les otorga carácter hidrofóbico; además, las bacteriocinas presentan carácter anfipático (Diep y Nes, 2002; Yusuf, 2013). Las bacteriocinas se clasifican en cinco grupos (Tabla 3) teniendo en cuenta diferentes criterios (Nes et al., 2007; Monroy et al., 2009; Balciunas et al., 2013).

CLASIFICACIÓN LAS BACTERIOCINAS			
Clasificación	Característica	Subcategoría	Ejemplo
Clase I (lantibióticos)	– Péptidos que contienen aminoácidos modificados (lantionina, β -lantioninato).	– Tipo A (moléculas lineales) – Tipo B (moléculas globulares)	– Nisina, subtilina, epidermina. – Mersacidina.
Clase II	– Clase heterogénea de péptidos termoestables pequeños.	– Subclase IIa (pediocina-antilisteria) – Subclase IIb (compuesto de dos péptidos) – Subclase IIc (otras bacteriocinas)	– Pediocina, enterocina, sakacina. – Plantaricina, lacticina F. – Lactococcina.
	– Grupo de péptidos lineales	– Subclase IId	– Lacticina Q.
	– Degradación de proteínas grandes.	– Subclase IIE	– Propionicina F.
Clase III	– Péptidos grandes termolábiles.		– Helveticina J, millericina B.
Clase IV	– Péptidos cíclicos*		– Reutericina 6.
Clase V	– Péptidos de estructura circular.		– Enterocina AS-48, gaseiricina A.

* Asociados con lípidos o carbohidratos.

Tabla 3: Clasificación de las bacteriocinas (Nes et al., 2007; Monroy et al., 2009 y Balciunas et al., 2013).

Gran parte de las bacteriocinas producidas por las BAL inhiben el crecimiento de las bacterias formando poros en la membrana celular, las bacterias diana son atraídas por las bacteriocinas mediante fuerzas electrostáticas, dado que las bacteriocinas presentan cargas positivas pueden interactuar con los fosfolípidos de la membrana de las bacterias que presentan cargas negativas. Asimismo, el carácter anfipático de las bacteriocinas posibilita aún más su distribución a lo largo de la superficie de la membrana celular de la bacteria (Cotter et al., 2005; Nishie et al., 2012; Yusuf, 2013). Una vez producida la unión de la bacteriocina y la bacteria, la región hidrofóbica se introduce en el interior no polar de la membrana celular, esto hace que se formen poros en la membrana y como resultado se origina la salida del contenido intracelular, produciendo la pérdida de iones K, de energía en forma de ATP y en

determinadas ocasiones, de aminoácidos y moléculas de bajo peso molecular (Bemena et al., 2014).

1.2.10. Bioconservación

Las bacterias ácido lácticas conservan los alimentos como resultado de una exclusión competitiva y también debido a la producción de bacteriocinas. Por esta razón, ejercen un papel primordial en las fermentaciones de alimentos, ya que causan los cambios de sabores característicos y producen un efecto conservante sobre los productos fermentados. Entre las diferentes especies de *Lactobacillus* que ejercen un papel importante en la bioconservación se halla *L. plantarum*, bacteria que posee plásmidos portadores de genes que codifican para enzimas importantes de la fermentación (Nes, 1984).

Lactobacillus plantarum no sólo brinda una conservación adecuada, sino que, además, en ciertas ocasiones, aumenta el contenido de nutrientes significativos como los ácidos grasos W-3.

Su capacidad característica para inhibir el crecimiento de patógenos es empleada en la industria alimentaria para la bioconservación. Se ha demostrado que cuando se usa en la conservación de alimentos inhibe totalmente el crecimiento de bacterias aeróbicas, varias enterobacterias y *Staphylococcus aureus*. El género *Lactobacillus*, también está implicado en la conservación de forrajes en forma de ensilajes, debido a que las bacterias ácido lácticas de este género presentan dos características fundamentales:

- Tienen mayor efecto sobre el pH final de los ensilajes.
- Desempeñan un buen control sobre el resto de las bacterias presentes.

Por esta razón en el mundo actual se confirma su efectividad como conservantes biológicos, además de determinadas ventajas como no contaminar el ambiente, entre otras (Esperance et al., 1997).

2. FORMAS PRINCIPALES DE PREPARACIÓN DE ACEITUNAS DE MESA

El fruto del olivo (*Olea europaea* var. *sativa*), recolectado en un estado de madurez adecuado y tratado de una forma apropiada, se transforma en un producto alimenticio con unas propiedades organolépticas muy apreciadas.

Según el Consejo Oleícola Internacional (COI), la aceituna es una drupa, un pequeño fruto de forma elipsoidal o globosa, que posee un principio amargo, que es la oleuropeína, un contenido de azúcares bajo (2,6 a 6%) en relación con el resto de las drupas, y un alto contenido en aceite (desde el 12% al 30%), en función de la variedad y del estado de madurez.

Dichas características suscitan que sea un fruto que no se puede tomar tal como lo encontramos en, el árbol, sino que deba de someterse a una serie de procesos que cambian de manera significativa de unas regiones a otras y que también dependen de la variedad.

De manera excepcional, las aceitunas pueden madurar en el árbol y convertirse en frutos dulces, en la inmensa mayoría de los casos esto se debe a fermentaciones. Un ejemplo es el de la variedad Thrubolea en Grecia.

La oleuropeína característica de la aceituna tiene que ser eliminada por su intenso sabor amargo, aunque no es dañina para la salud. Normalmente, las aceitunas se someten a procedimientos con hidróxido sódico o potásico, salmuera o repetidos lavados con agua, según sistemas y costumbres locales.

Además, según la Norma de Calidad emitida por el Consejo Oleícola Internacional (1980), se considera aceituna de mesa al fruto de diferentes variedades de olivo cultivado, cosechado en el estado de madurez apropiado y de calidad tal que, preparado adecuadamente, se obtiene un producto para el consumo, saludable, de buena conservación y constituye un producto comercial. La aceituna de mesa es un alimento de elevado valor nutritivo y muy equilibrado, tiene todos los aminoácidos esenciales en una proporción perfecta y aunque presenta un contenido en proteína pequeño, su nivel de fibra favorece que sea muy digestiva. Poseen minerales como calcio y hierro, y vitaminas como la provitamina A, la vitamina C y la tiamina. Según la Norma citada anteriormente, las aceitunas de mesa se clasifican en los siguientes tipos:

- verdes, son las aceitunas de frutos recolectados durante el ciclo de maduración, cuando han adquirido un tamaño normal (Figura 2). La coloración

del fruto podrá cambiar del verde al amarillo paja. Este tipo es el único que se somete a fermentación láctica.



Figura 2: aceitunas verdes (COI).

- de color cambiante, obtenidas a partir de frutos de color rosa vinoso o castaño, recolectadas antes de su total madurez, sometidos o no a tratamiento alcalino y preparadas para el consumo (Figura 3).



Figura 3: aceitunas color cambiante (COI).

- negras naturales, se obtienen de frutos recolectados en completa madurez o poco antes de ella, presentan un color negro rojizo, negro violáceo, violeta oscuro, negro verdoso o castaño oscuro (Figura 4).



Figura 4: aceitunas negras (COI).

- negras oxidadas, obtenidas de frutos que no estando completamente maduros se han oscurecido mediante oxidación y han perdido el amargor mediante tratamiento con hidróxido sódico (sosa cáustica), deben ser envasadas en salmuera y preservadas por esterilización con calor.

En España, se cultivan un gran número de variedades de aceitunas de las cuales las más significativas son la manzanilla de Sevilla, la gordal sevillana (popular internacionalmente con la denominación de “sevillano”), la morona, la hojiblanca, la cacereña y la verdial. Otras variedades menos significativas son la cañivana, la picolimón, la gordalilla, la aloreña, la rapazalla, la picuda, la cordobí y lacuquillo. A continuación, se describen las tres elaboraciones de mayor aceptación.

2.1. Aceitunas verdes aderezadas en salmuera, estilo sevillano o español

Se someten a un tratamiento con una solución de hidróxido sódico (NaOH) y, después de una fase de lavado con agua o con agua acidulada, se colocan en salmuera del 10-12% de NaCl, donde se mantienen durante las fases de fermentación y conservación.

2.2. Aceitunas negras por oxidación o tipo negras

Este tipo de aceitunas están incluidas según el Consejo Oleícola Internacional, en las aceitunas de color cambiante. Se someten a varios tratamientos de solución alcalina (lejía a baja concentración), cada tratamiento va seguido de aireación, los sucesivos tratamientos de solución alcalina y aireación producen

el ennegrecimiento. En determinadas ocasiones se utilizan soluciones de gluconato ferroso o lactato ferroso (0,1%) para ennegrecer más las aceitunas.

2.3. Aceitunas negras naturales

Se lavan y se introducen en salmuera (del 8% al 10%) directamente, según los hábitos de los distintos países. Se mantienen en salmuera hasta que hayan eliminado casi todo el sabor amargo y con la salmuera se induce la acción microbiana para la fermentación.

Las diferentes formas de preparación de las aceitunas de mesa desde su recolecta en el estado de maduración apropiado para los diferentes tipos se pueden resumir en el siguiente esquema (Figura 5):

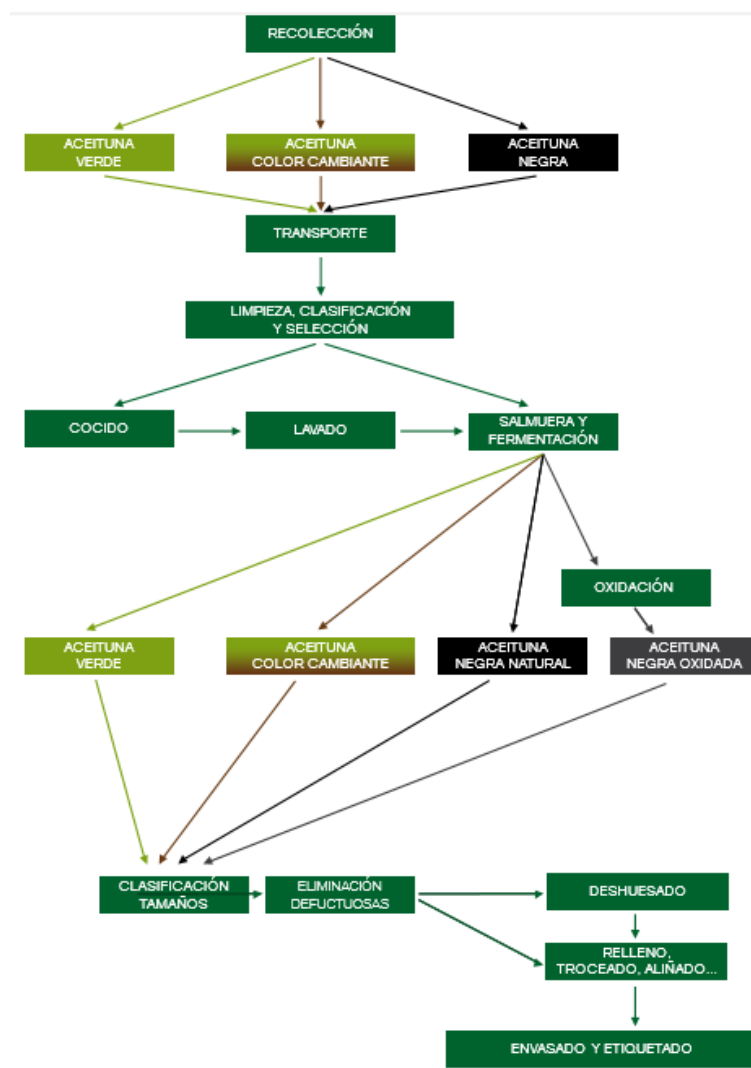


Figura 5: Esquema de los procesos de elaboración (Estradas Cabezas, 2011).

3. FACTORES CONDICIONANTES PARA EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) EN LA FERMENTACIÓN DE ACEITUNAS

El desarrollo de las bacterias ácido lácticas en la fermentación de aceitunas depende de varios factores. Aunque, la manera de reducir su fuerte sabor amargo, debido a las características de la oleuropeína y otros polifenoles que forman parte de su composición, es esencial. Las aceitunas tratadas con una solución de hidróxido sódico (lejía), manifiestan siempre una disposición muy propicia para el crecimiento de las BAL. Por el contrario, las tratadas mediante dilución, o cuando la lejía no penetra de forma adecuada, frecuentemente muestran dificultades más o menos importantes y, además, en gran cantidad de ocasiones, inhiben totalmente el crecimiento de las bacterias ácido lácticas. De modo que, el factor más significativo es la presencia de polifenoles; otros requisitos son la concentración de sal, variedad, temperatura, azúcares disponibles, etc.

a) Efecto de los polifenoles

El fenol que se encuentra en mayor proporción en las aceitunas es la oleuropeína, este, junto con otros compuestos fenólicos, se hidrolizan a lo largo del proceso de fermentación, originando tirosol e hidroxitirosol, mostrando ambos compuestos fuertes características antioxidantes (Cornwell et al., 2008; Peyrol et al., 2015).

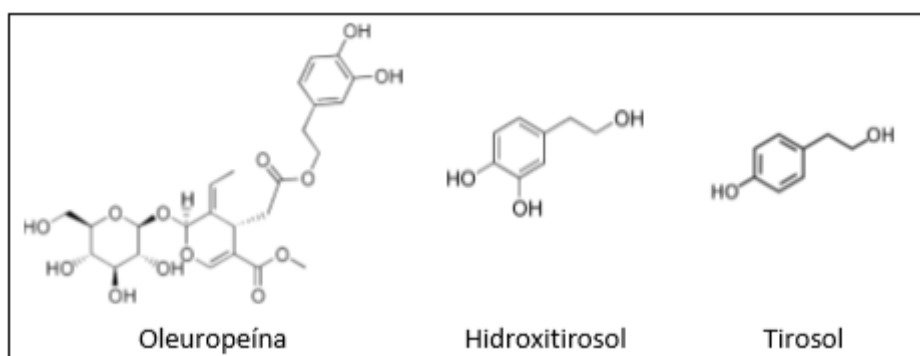


Figura 6: Polifenoles más significativos existentes en las aceitunas (Carbonell-Alcaina, 2017).

Dichos polifenoles, impiden la oxidación de los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, procesos que pueden dar lugar al inicio de enfermedades degenerativas como cáncer, enfermedades del corazón, trastornos dérmicos y envejecimiento (Middleton et al., 2000; Schroeter et al., 2006; Perez-Vizcaino et al., 2009).

Etchells et al. (1966) observaron que las aceitunas de la variedad Manzanilla no experimentaban una fermentación láctica cuando se introducían directamente en salmuera, ni siquiera adicionándoles un cultivo puro de *Lactobacillus plantarum*. Sin embargo, cuando se introducía una solución de hidróxido sódico o un tratamiento anterior con calor (74°C durante 3 minutos) las BAL experimentaban un importante crecimiento. Esta conducta distinta la asignaron a la presencia en las aceitunas de un compuesto inhibidor de las BAL, que desaparecía al utilizar los procesos anteriores. Además, Juven et al. (1968 a) observaron una mejoría en la fermentación láctica tras meter las aceitunas en lejía caliente durante un tiempo breve. Las primeras pruebas de la presencia de esas sustancias las aportaron Fleming y Etchells (1967) y Fleming et al. (1969). Posteriormente, se dieron cuenta que, los compuestos obtenidos de la hidrólisis de la oleuropeína, la aglucona y el ácido elenólico, mostraban una mayor actividad frente a las BAL (Fleming et al., 1973; Walter et al., 1973). Diferentes compuestos provenientes de la oleuropeína u otros fenoles muestran de igual manera efecto inhibidor, siendo el hidroxitirosol el que lo ha manifestado de manera más significativa (Ruiz Barba et al., 1993).

Definitivamente, un estudio realizado por Rózes y Peres (1996) ha mostrado que la oleuropeína no es por sí misma inhibidora de *Lactobacillus plantarum*. Sin embargo, cuando se produce la aglucona, por la actividad de la p-glucosidasa, se origina una pronta reducción de las células viables, que depende de la concentración de la aglucona y es esencialmente considerable en presencia de pequeñas concentraciones de azúcares. No obstante, la oleuropeína presentaba un efecto bactericida muy significativo, que se reducía a medida que la concentración de glucosa se incrementaba, en presencia de sal (6%).

b) Concentración de sal y pH

Son factores muy importantes para el crecimiento de las bacterias ácido lácticas y además, en este caso, se pueden controlar. Concentraciones de NaCl mayores del 8%, inhiben casi totalmente el crecimiento de las BAL en las fermentaciones de aceitunas. Balatsouras (1985) hizo una extensa selección de bacterias ácido lácticas provenientes de salmueras de todo tipo. En cuanto a la tolerancia a la sal, se inhiben el 33% de las cepas procedentes de aceitunas verdes estilo sevillano con una concentración de NaCl del 6%; con una concentración del 7%, se inhiben el 50%; al 8% sólo perduran alrededor del 10%; y por encima del 9% no crece ninguna cepa. Por lo que, este parece ser el límite superior para el crecimiento de las bacterias ácido lácticas en aceitunas de tipo verdes estilo sevillano. Los lactobacilos provenientes de aceitunas negras naturales manifestaron una tolerancia un poco superior (Figura 7).

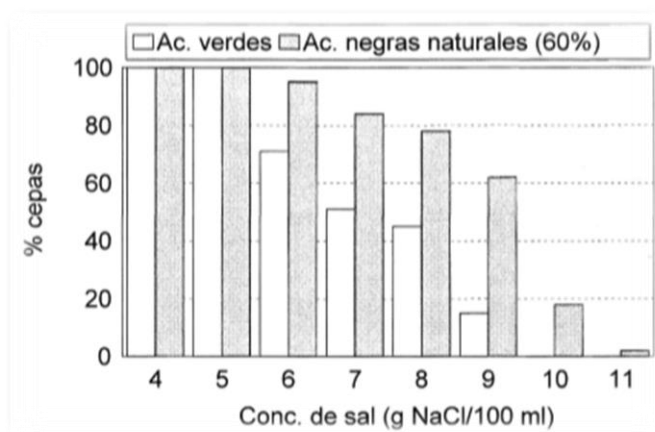


Figura 7: Tolerancia a la sal de *Lactobacillus plantarum* procedentes de salmueras de fermentación de aceitunas verdes estilo sevillano y negras naturales (60% de las muestras) (Balatsouras et al., 1985).

Sabiendo que, en otros productos, como por ejemplo pepinillos, se han descrito cepas más resistentes de estas bacterias, es posible, que en el caso de las aceitunas, la existencia de oleuropeína y otros fenoles puede originar una cierta sinergia con la sal y ayudar a reducir la resistencia de las mismas a la sal únicamente (Rózés et al., 1996).

Características determinadas de ciertas cepas de *Lactobacillus plantarum* pueden estar relacionadas con diferentes tolerancias a la cantidad de sal. Así, la cepa H4 (no productora de bacteriocina) manifestó ser más tolerante a la sal (8%) que otra productora de ella, LPCO10, que sólo resistió el 6%

probablemente como una respuesta de la primera para su supervivencia frente a la segunda (Montano et al., 1993).

En cuanto a la tolerancia al pH, Balatsouras (1985) descubrió que casi la totalidad de las cepas de *Lactobacillus plantarum* crecían bien en un rango de pH que comprende desde 3,25 a 8,00. A valores de pH superiores a 8,50 no sobrevivía ninguna de las cepas y muy pocas las que resistían un pH muy ácido. Sorprendentemente, las cepas más tolerantes a la acidez procedieron de los cultivos aislados de aceitunas negras naturales, mientras que las provenientes de aceitunas verdes estilo sevillano mostraban, generalmente, tolerancias igualmente muy elevadas (entre el 1,3 y 1,9% de acidez) (Figura 8).

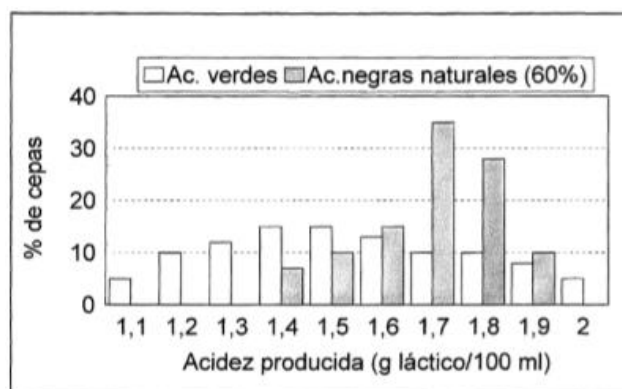


Figura 8: Producción de ácidos de cepas de *Lactobacillus plantarum* procedentes de salmueras de fermentación de aceitunas verdes estilo sevillano y negras naturales (60% de las muestras) (Balatsouras et al., 1985).

c) Disponibilidad de azúcares fermentables

La concentración de azúcares fermentables es diferente en las distintas variedades y disminuye a medida que avanza la maduración (Fernández Diez et al., 1985; Garrido Fernández et al., 1997). Además, la cantidad de dichos compuestos en las salmueras depende de los tratamientos a los que se someten las aceitunas en cada elaboración. En el caso de las aceitunas estilo sevillano o español, las soluciones alcalinas y los lavados eliminan una proporción considerable de los mismos; pero el aumento de permeabilidad que ello provoca en la piel y en la pulpa hace que el nivel de materia fermentable (y otros nutrientes) disponible desde un principio sea relativamente alto (0,5-2,0%), a no ser que el número de lavados o sus duraciones hayan sido excesivos. En España, las cantidades perdidas pueden cuantificarse entre el 1

y 2%, dependiendo de las variedades y condiciones de los tratamientos (Fernández Díez et al., 1985); pero, aun así, no se requiere normalmente añadirlos.

Si a las salmueras se les añaden azúcares y se emplea un cultivo iniciador, se consigue una fermentación láctica completa y se alcanzan unas características finales deseables (Balatsouras et al., 1983).

d) Disponibilidad de aminoácidos y vitaminas

Las aceitunas poseen un bajo contenido de proteínas (entre el 1-2%). Aunque, se ha comprobado que presentan un excelente valor nutricional y además poseen todos los aminoácidos que son esenciales para el hombre (Fernández Díez et al., 1985). En el proceso fermentativo de las aceitunas, la presencia de las BAL, ya suprimidos los inhibidores, es muy sencilla aun sabiendo los requisitos nutritivos de las BAL. El desarrollo de las BAL en la fermentación de aceitunas verdes se contempla prácticamente desde que estas se introducen en salmuera. En las aceitunas tipo negras y en las aceitunas negras naturales debido a que se introducen directamente en salmuera el desarrollo de las BAL es más complejo en dichas fermentaciones. A pesar de todo, posteriormente, una vez que se cambia la salmuera de fermentación, la cantidad de compuestos proteicos es aún menor (Casaroli et al., 1980). Ruiz Barba y Jiménez Díaz (1985), analizaron en las salmueras de aceitunas verdes la existencia de vitaminas esenciales del grupo B. De sus análisis pudieron deducir que en las salmueras, desde el comienzo el proceso fermentativo se puede hallar ácido nicotínico y pantoténico, biotina y vitamina B₆. También hallaron la presencia de levaduras en el proceso fermentativo y estas producían cantidades significativas de dichos compuestos. Las levaduras juegan un papel favorable en el proceso fermentativo de las aceitunas de mesa (Kotzekidou et al., 1997). Sin embargo, ciertas especies de levaduras también pueden causar deterioros en las aceitunas (Asehaou et al., 2000). A lo largo del proceso de fermentación y almacenamiento, las levaduras tienen la capacidad de producir etanol, glicerol, ácidos orgánicos, ésteres y otros compuestos volátiles que ayudan a mejorar la textura y el aroma de las aceitunas (Montaño et al., 2003; Sabatini et al., 2008). Varias actividades enzimáticas presentadas

por las levaduras pueden ser significativas a lo largo del proceso fermentativo de la aceituna de mesa, como por ejemplo, la actividad β -glucosidasa influye en la hidrólisis de la oleuropeina favoreciendo el establecimiento de las BAL (Psani y Kotzeidou, 2006).

4. CARACTERÍSTICAS DEL DESARROLLO DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN LAS ELBORACIONES MÁS DESTACADAS DE ACEITUNAS DE MESA

4.1. Aceitunas verdes

Gracias a las exquisitas propiedades organolépticas han llegado a obtener un gran prestigio internacional, logrando ser denominadas mundialmente como aceitunas estilo sevillano o español. Las características climatológicas particulares de las proximidades de Sevilla y de las variedades que se cultivan en dicha zona fueron elementos muy importantes para el desarrollo de este tratamiento. Se utilizan depósitos de fibra de vidrio y poliéster, en los que se pueden introducir unos 10.000 kg de aceitunas. La elaboración de este tipo de aceitunas continúa siendo la misma y las BAL siguen jugando un papel fundamental en ella. La fermentación es espontánea y es bastante complicada. Se divide en cuatro fases. La primera fase, tiene una duración entre 5 y 15 días, en ella tiene lugar el crecimiento de bacterias Gram negativas y cocos lácticos. La actividad de estas bacterias disminuye el pH en esta fase. La segunda fase, dura entre 10 y 15 días, comienza cuando afloran los primeros lactobacilos, estos crecen cada vez más, conforme avanza el tiempo. Finaliza cuando desaparecen las bacterias Gram-negativas. En la tercera fase, los lactobacilos predominan con respecto a otras bacterias. En esta fase tienen lugar alteraciones físico-químicas y organolépticas más importantes. En dicha fase las aceitunas adquieren sus propiedades características. Termina cuando se consumen los azúcares fermentables. Esta última fase comprende toda la etapa de conservación de las aceitunas, además, tienen lugar un incremento de la acidez volátil y un cierto aumento de pH. Si este aumento de pH es mayor

de 0,4 unidades, pueden tener lugar modificaciones desfavorables (Garrido Fernández et al., 1997). La especie representativa de este tipo de fermentación es *Lactobacillus plantarum*, pero también *Lactobacillus pentosus* se puede encontrar en mayor proporción. Mientras las aceitunas están en salmuera también encontramos una población de levaduras (González Cancho, 1965) que se desarrollan produciendo un resultado de sinergia para el crecimiento de las BAL. Las BAL pueden ser perjudicadas, además de los factores que pueden influir en el proceso fermentativo anteriormente contados, también hay otros factores particulares del proceso de elaboración de aceitunas verdes que podemos destacar:

a) Modificaciones en los tratamientos alcalinos y lavados

En los últimos años, se están llevando a cabo una serie de cambios con el objetivo de reducir la contaminación y la cantidad de vertidos producidos. Como primera medida de control para disminuir el volumen de vertidos se recurre a la reutilización de las lejías de cocido. Es un ejercicio sencillo y necesita pocas instalaciones adicionales, pues es suficiente con una bomba y un depósito auxiliar. Este cambio es muy rentable ya que se utiliza la mayor parte del hidróxido sódico que se perdería. La concentración de compuestos contaminantes, después de diez o doce reutilizaciones, no llega a ser tres veces la carga de las de un solo uso. Con ello, se disminuye el volumen de los vertidos, se reduce una gran cantidad de materia contaminante, y además se ahorra agua, lo que en algunas regiones es de gran importancia. Se ha verificado, varias veces, que la fermentación y las propiedades organolépticas de las aceitunas producidas con lejías reutilizadas son normales y no se diferencian de las obtenidas por el tratamiento tradicional (Montes, 2010-2011).

La otra medida llevada a cabo es la reducción del número de lavados. Los cambios analizados por (Castro et al., 1983) han llevado a cabo la eliminación de una o las dos aguas de lavado. En el caso de eliminar un lavado, la fermentación producida y el producto final no muestran diferencias con respecto a los elaborados por el método tradicional. Actualmente, es corriente la práctica de un solo lavado. Cuando se elimina todo el lavado, las aceitunas muestran un sabor más concentrado de lo habitual. Se recomienda suprimir el

segundo lavado y extender el primer lavado a 12-15 horas, esto no perjudica las propiedades químicas, microbiológicas y organolépticas.

b) Tratamientos con calor y facilidad de fermentación

Juven et al. (1968a) revelaron que las aceitunas a las que se les aplicaba una solución caliente de NaOH fermentaban mejor, adquirirían una acidez mayor en ácido láctico y mostraban un color y propiedades organolépticas mejores que aquellas a las que se les habían realizado el mismo proceso, pero a temperatura ambiente. Además, la coordinación del control de la temperatura con una concentración baja de lejía, dio lugar a una fermentación normal y a una gran disminución en la contaminación, ya que se podían eliminar las aguas de lavado (Sánchez Gómez et al., 1990). En este procedimiento un pequeño exceso en la temperatura o en la concentración de NaOH puede provocar daños irreversibles en la textura de las aceitunas, tal como indican los autores nombrados anteriormente. Luego, la utilización de estos cambios sólo cobrará sentido cuando se empleen como una medida descontaminante, dado que, Borbolla et al. (1969), demostraron que el tratamiento alcalino a temperatura ambiente, realizado bien, es adecuado para lograr una buena fermentación. No obstante, Sánchez et al. (1995) hallaron que, cuando se utiliza agua caliente (alrededor de los 40°C) en la fase de los lavados, se estimula el proceso láctico.

4.2. Aceitunas tipo negras (y de color cambiante)

La cantidad de azúcares y polifenoles, exceptuando las antocianinas, se reduce conforme avanza la maduración de las aceitunas. Del mismo modo, desde el inicio de la presencia de las primeras coloraciones rosadas, se origina un incremento progresivo de la permeabilidad de la piel y de la concentración de sustancias hidrosolubles en la pulpa. Todo esto condiciona de forma significativa el desarrollo de la fermentación en las aceitunas introducidas directamente en salmuera, favoreciendo el crecimiento de las BAL conforme avanza la madurez de las aceitunas. De modo que, al trabajar con aceitunas verdes de la variedad Hojiblanca complicadamente se llega a obtener el

desarrollo de las BAL; pero, cuando están en la fase de color cambiante, comienzan a aparecer de forma esporádica. Si se utilizan en estado de total madurez, es común encontrar BAL, siempre que las concentraciones de sal no sean tan elevadas que inhiban dichas bacterias. Generalmente, la fermentación de aceitunas verdes y de color cambiante en salmuera se produce gracias a la acción de levaduras (Fernández Díez et al., 1985; Garrido Fernández et al., 1997; González Cancho et al., 1975; Balatsouras, 1966). La aparición de las BAL es eventual, dependiendo de las variedades y de las concentraciones de sal. Ya que en estas aceitunas no se realiza una esterilización superficial (tratamiento con lejía), la carga microbiana inicial que tienen las aceitunas del campo puede condicionar los microorganismos que crezcan después en las salmueras. El uso de cultivos iniciadores puede resultar de gran interés para mejorar el crecimiento de las BAL en las aceitunas de color cambiante o verdes utilizadas para elaborar las de tipo negras.

4.3. Aceitunas negras naturales

Los polifenoles más abundantes en las aceitunas negras naturales son las antocianinas, que son las causantes de la tonalidad rosada a púrpura que va apareciendo en estas. Su contenido crece conforme progresa la maduración (Maestro Duran et al., 1976; Vhalov, 1990), al igual que las sustancias hidrosolubles. Sin embargo, el contenido en oleuropeína, se reduce por lo que las aceitunas van perdiendo el sabor amargo. Para elaborar este tipo de aceitunas no se puede aguardar a la total madurez, ya que en ese instante la textura sería inapropiada.

El crecimiento de BAL en las salmueras de aceitunas negras naturales depende de la variedad. Algunos de los factores que condicionan las fermentaciones en las salmueras de dicho tipo, en el proceso anaerobio tradicional, son: contenido de polifenoles en las salmueras, concentración de sal, disponibilidad de materia fermentable y temperatura (González Cancho et al., 1975).

5. APLICACIÓN DE *LACTOBACILLUS* SPP. COMO CULTIVOS INICIADORES DE LA FERMENTACIÓN DE ACEITUNAS VERDES

Los cultivos iniciadores se pueden determinar como una preparación o material que incluye grandes cantidades de un solo microorganismo o varios microorganismos, que pueden añadirse para aligerar y mejorar el proceso fermentativo (Holzapfel, 2002). La utilización de cultivos iniciadores no sólo contribuye a reducir el riesgo de deterioro sino que proporcionará una rápida y mayor acidificación de la salmuera, además, colaborará a reducir la energía requerida a lo largo del proceso (Panagou y Tassou, 2006). Los microorganismos utilizados como cultivos iniciadores deben presentar las siguientes características: a) presentar un crecimiento rápido; b) metabolismo homofermentativo, alta tasa de acidificación y un consumo rápido de sustratos fermentables; c) tolerancia a los ácidos orgánicos, a la sal y los polifenoles del medio; d) muy pocos requisitos nutricionales; e) capacidad para tolerar la congelación o el liofilizado si va a ser utilizado comercialmente (Durán-Quintana et al., 1999). La utilización de cultivos iniciadores permite la degradación de factores antinutricionales, favorece la digestión de proteínas y la disponibilidad de micronutrientes a través de la biosíntesis de vitaminas, aminoácidos esenciales y otros compuestos nitrogenados. Además, los cultivos iniciadores alargan la vida útil de los alimentos inhibiendo a los microorganismos responsables del deterioro de estos. Las BAL empleadas como cultivos iniciadores pueden originar gran variedad de compuestos antimicrobianos, como ácidos orgánicos, CO₂, H₂O₂, etanol, bacteriocinas, diacetilo, reuterina y reuteriicina, responsables de la inhibición o disminución de microorganismos patógenos (Holzapfel, 2002). Ya que la industria alimentaria tiene que afrontar la demanda de los consumidores de aumentar la vida útil y conservación de los alimentos escasamente procesados y sin conservantes químicos, varios autores sugirieron la utilización de cepas generadoras de bacteriocinas como cultivos iniciadores para la fermentación de aceitunas (Arroyo-López et al., 2005; Delgado et al., 2005).

Una de las líneas de investigación más recientes es la utilización de inóculos probióticos con el fin de obtener aceitunas de mesa como alimento probiótico. Para conseguir tal fin los microorganismos tienen que jugar un doble papel

como cultivo iniciador y como probiótico, lo que permitió controlar el proceso fermentativo y conseguir un producto final con características probióticas. Se ha comprobado que *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus* pueden colonizar la piel de la aceituna de mesa (Lavermicocca et al., 2005). Además, se ha utilizado la cepa probiótica *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 como cultivo iniciador en la fermentación de la aceituna de mesa Bella di Cerignola observando que la cepa se encuentra al final del proceso de elaboración en la piel de la aceituna, por lo que actúa a la vez como cultivo iniciador y como cepa probiótica (De Bellis et al., 2010).

Las BAL llevan a cabo un papel significativo a lo largo de la fermentación de las aceitunas de mesa, tienen la capacidad de mejorar la conservación de las aceitunas gracias a una acidificación progresiva de la salmuera, debido a la bajada del pH, a la producción de sustancias antimicrobianas (Ruiz-Barba y Jiménez-Díaz, 1994; Marsilio et al., 2005). Las BAL, además, mejoran el aroma y el sabor del producto (Borcakli et al., 1993).

De manera que, un inóculo adecuado de las cepas elegidas nos permite mejorar la calidad del producto (Garrido-Fernández et al., 1997; Sánchez et al., 2001; de Castro et al., 2002; Leal-Sánchez et al., 2003). Las BAL más importantes utilizadas como cultivos iniciadores son *Lactobacillus plantarum* (Etchells et al., 1966; Leal-Sánchez et al., 2003; Marsilio et al., 2005) y *Lactobacillus pentosus* (de Castro et al., 2002; Panagou et al., 2003, 2008).

Todas las investigaciones anteriormente nombradas manifestaron la capacidad que tienen las BAL para mejorar el control microbiológico de la fermentación y dar lugar a unas aceitunas de mesa fermentadas de elevada calidad.

6. DISCUSIÓN

En la presente revisión se han utilizado diferentes revisiones bibliográficas las cuales han aportado numerosos datos estadísticos de la importancia económica y comercial de las aceitunas de mesa. De cuáles son los países productores más significativos tanto a nivel mundial como europeo.

En esta revisión también se ha puesto de manifiesto la gran importancia de las bacterias ácido lácticas y en particular del género *Lactobacillus* en el proceso de fermentación de aceitunas de mesa. Estas bacterias presentan numerosas características y propiedades que hacen que cobren tanta importancia en dicho

proceso. A pesar de que el proceso fermentativo ocurre de manera espontánea diversas condiciones intervienen en el proceso. El proceso fermentativo debe suceder en las condiciones adecuadas para que el producto resultante presente las propiedades organolépticas deseadas.

Además, dicha revisión cuenta cuales son las principales elaboraciones de aceitunas de mesa, como es el proceso de elaboración de dichos tipos y como las BAL se desarrollan en cada uno de estos tipos más representativos, siendo las aceitunas verdes estilo sevillano o español las más importantes a nivel mundial y de gran prestigio internacional. El último punto tratado en esta revisión hace referencia al título de esta y trata de las aplicaciones del género *Lactobacillus* como cultivo iniciador en la fermentación de aceitunas de mesa. Sobre este tema actualmente se están realizando numerosas investigaciones en las diferentes variedades de aceitunas de mesa. El desarrollo de cultivos iniciadores es un instrumento tecnológico de gran potencial que nos permite obtener productos para el consumo humano mejorados, con mejores características de aroma, sabor y textura, además de alargar la vida útil del producto. También, la utilización de cultivos iniciadores en la fermentación de aceitunas de mesa es de gran interés en la industria agroalimentaria no solo por mejorar la calidad del producto final y de aumentar su vida útil sino también por reducir costos (por ejemplo, energía), reducción de tiempos de fermentación y mejora el control de proceso fermentativo.

7. CONCLUSIONES

1. Gran importancia del género *Lactobacillus* en el proceso de fermentación de las aceitunas de mesa.
2. Las condiciones de las salmueras, los factores que condicionan la presencia de las BAL en el proceso fermentativo, son de gran importancia, cualquier alteración en el proceso de fermentación hace que los productos finales resultantes tengan características inapropiadas y no deseadas para la comercialización.
3. Aplicación de la microbiota autóctona para la elaboración de un producto estable. Esta aplicación favorece mejorar las propiedades probióticas, bioconservantes y antimicrobianas del producto final.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Arroyo-López, F. N., Romero, C., Duran-Quintana, M., Lopez Lopez, A., Garcia Garcia P., and Garrido— Fernández, A. (2005). Kinetic study of the physicochemical and microbiological changes in seasoned olives during the shelf life period. *J. Agric. Food Chem.* 53,5285–5292.
- Asehrou, 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. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects. Marcel Dekker Inc. 2, 1-72
- Balatsouras, G. D. (1985). Taxonomic and physiological characteristics of the facultative rod type lactic acid bacteria isolated from fermenting green and black olives. *Grasas y Aceites* 36, 239-249.
- Balatsouras, G. D., Tisibri, A., Dalles, T. and Doutsias, G. (1983). Effects of fermentation and its control on the sensory characteristics of Conservolea variety green olives. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 68-74.
- Balciunas, E.M., Castillo Martinez, F.A., Todorov, S.D., Franco, B.D.G.d.M, Converti, A., Oliveira, R.P.d.S., (2013) Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* 32: 134-142.
- Bemena, L. D., Mohamed, L. A., Fernandes, A. M., Lee, B. H. (2014) Applications of bacteriocins in food, livestock health and medicine. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3: 924-949
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 10th edition, vol. 2.
- Beshkova, D., Frengova, G., (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Eng. Life Sci.* 12: 419-432
- Borbolla y Alcalá, J. M. R. de la, Fernández Diez, M. J. y González Cancho, F. (1969). Influence of pasteurización and lye treatment on the fermentación of Spanish-style Manzanilla olives.
- Borbolla y Alcalá, J. M. R. de la, Fernández Diez, M. J., González Cancho, F. y Cordon Casanueva, J. L. (1969). Estudios sobre el aderezo de aceitunas

verdes XXIII. La preparación y fermentación de las aceitunas en recipientes de gran capacidad.

Borcakli, M., Ozay, G., Alperden, I., Ozsan, E., and Erdek, Y. (1993). Changes in chemical and microbiological composition of olive during fermentation. *Grasas Y Aceites*. 44, 253–258.

Bhunja, A. K., Johnson, M. C., Ray, B., Belden, E. L. (1990). Antigenic property of pediocinAcH produced by *Pediococcus aciditacticí* H. 3. *Applied Bacteriology*. 69, 211-215.

Campus, M., Cauli, E., Scano, E., Piras, F., Comunian, R., Paba, A., et al. (2015). Evaluation of a single strain starter culture, a selected inoculum enrichment, and natural microflora in the processing of Tonda di Cagliari natural table olives: Impact on chemical, microbiological, sensory and texture quality. *LWT-food Science and Technology*, 64, 671–677.

Carbonell-Alcaina. (2017). Recuperación de compuestos fenólicos contenidos en la salmuera residual del proceso de fermentación de las aceitunas de mesa mediante procesos de membrana: Combinación de la ultrafiltración y la nanofiltración. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.

Carr, F., Chill, D., Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28, 281- 370.

Casaroli, A., Trabucchi, G. y Gola, S. (1980). Fermentazione e stabilita délia olive In salamoia. *Industria Conserve* 55, 23-30.

Castellanos, María Inés, Chauvet, A. Deschamps, A. and Barreau, C. (1996). PCR methods for specification and specific detection of probiotic acid lactic bacteria. *Current Microbiology*. Vol. 33:100-103.

Castro Gómez- Millán, A., Durán Quintana, M.C., García García, P., Garrido Fernández A., González Cancho, F., Rejano Navarro, L., Sánchez Roldán F. y Sánc Sánchez Roldán, F., Sánchez Tebar, J.C. (1983). *Grasa y Aceites*. Vol. 34. Fasc. 3:162-167.

Consejo Oleícola Internacional. (2000). Catálogo mundial de variedades de olivo. Madrid. ISBN: 84-931663-3-2.

Cornwell, D.G., Ma, J. (2008). Nutritional benefit of olive oil: The biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. *J. Agric. Food*, 56, 8774-8786

Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 777-788.

De Bellis, P., Valerio, F., Sisto, A., Lonigro, S.L. and Lavermicocca, P. (2010). Probiotic table olives: Microbial populations adhering on olive surface in fermentation sets inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 in an industrial plant, *International Journal of Food Microbiology*, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.024.

de Castro, A., Montano, A., Casado, F. J., Sánchez, A. H., and Rejano, L. (2002). Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanishstyle green olive fermentation. *Food Microbiol.* 19,637–644.

Delgado, A., Brito, D., Peres, C., NoeArroyo, F., and Garrido-Fernández, A. (2005). Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiol.* 22,521–528.

Diep, D.B., Nes, I.F. (2002). Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets* 3: 107-122

Doores, S., (1993). Organic Acids. In: Davidson, P. M, Branen, A. L. (eds.), pp. 95- 136. Marcel Dekker, New York.

Durán Quintana, M.C., Garcia Garcia, P. and Garrido Fernandez, A. (1999). Establishment of conditions for green table olive fermentation at low temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 51, 133-143.

Duran Quintana, M. C, y González Cancho, F. (1973). Estudio microbiológico de la fermentación de aceitunas verdes. *Microbiología Española* 26.

Esperance, M. Y Ojeda, F. (1997). Conservación de forrajes. *Pastos y Forrajes* 20 #1:45-71.

Estradas Cabezas, José María. (2011). Las aceitunas de mesa: nociones sobre sus características, elaboración y cualidades. Diputación de Sevilla.

Etchells, J. L., Borg, A. F, Kittel, J. D., Bell, T. A. y Fleming, H. R (1967). Pure culture fermentation of green olives. *Appl. Microbiol.* 14, 1027-1041.

Fernández Diez, M. J., De Castro Ramos, R., Garrido Fernández, A., González Cancho, F, González Pellissó, F, Nosti Vega, M., Heredia Moreno, A., Mínguez Mosquera, M. I., Rejano Navarro, L., Duran Quintana, M. C, Sánchez Roldan, F, García García, P. y Castro de A. (1985). *Biotechnología de las aceitunas de mesa*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid.

Fernández González, M. J., Garrido Fernández, A., García García, R, Brenes Balbuena, M. y Duran Quintana, M. C. (1992). Características del proceso fermentativo durante la conservación de aceitunas, destinadas a la elaboración del tipo verdes. *Grasas y Aceites* 43.

Fleming, H. P. y Etchells, J. L. (1967). Occurrence of an inhibitor of lactic bacteria in green olives. *Appl. Microbiol.* 15, 1178-1184.

Fleming, H. B, Walter. W. M. y Etchells, J. L. (1969). Isolation of a bacterial inhibitor from green olives. *Appl. Microbiol.* 18, 856-860.

Fleming, H. R, Walter, W. M., Etchells, J. L. (1973). Antimicrobial properties and products of its hydrolysis from green olives. *Appl. Microbiol.* 26, 777-782.

Galvez, A., Abriouel, H., López, R. L., Ben Omar, N. (2007). Bacteriocinbased strategies for food biopreservation, *International Journal of Food Microbiology*. 120, 51-70.

Garrido Fernández, A., Fernández Diez, M. J. y Adams, R. M. (1997). *Table olive. Production and processing*. Chapman & Hall. London.

González Cancho, F (1965). Levaduras en la fermentación de aceitunas verdes estilo español. Estudio cuantitativo. *Grasas y Aceites* 18, 230-234.

González Cancho, F, Nosti Vega, M., Duran Quintana, M. C, Garrido Fernández, A. y Fernández Diez, M. J. (1975). El proceso de fermentación en las aceitunas negras maduras en salmuera. *Grasas y Aceites* 26, 297-309.

Hammes, W.P., Vogel, R.F. (1995). The genus *Lactobacillus*. In: Wood BJB, Holzapfel WH (eds) The genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic & Professional. London. 19–54.

Holzapfel, W. H. (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.* 75,197–212.

Juven, B., Samish, Z. y Henis, Y. (1968a). Identification of deuropein as a natural inhibitor of lactic fermentation of green olives. *Israel J. Agric. Res.* 18,137-138.

Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. 3. *Serol.* 4, 209-224.

Kandler, O. and Weiss, N. (1992). Regular nonsporing Gram-positive rods. P. 1208-1260. En P. H. A. Sneath, M. S. Mair, M. E. Sharpe y J. G. Holt (Editor).

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

Lavermicocca, P., Valerio, F., Lonigro, S. L., De Angelis, M., Morelli, L., Callegari, M. L., Rizzello, C. G., and Visconti, A. (2005). Study of adhesion and survival of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* on Table Olives with the aim of formulating a new probiotic. *Food Appl. Environ. Microbiol.* 71,4233–4240.

Leal-Sánchez, M. V., Ruiz-Barba, J. L., Sánchez, A. H., Rejano, L., JiménezDíaz, R., and Garrido, A. (2003). Fermentation profile and optimization of green olive fermentation using *Lactobacillus plantarum* LPCO10 as a starter culture. *Food Microbiol.* 20, 421–430.

Maestro Duran R. y Vázquez Roncero, A. (1976). Colorantes antociánicos de las aceitunas manzanillas maduras. *Grasas y Aceites* 27, 237-243.

Marín, M., Bantar, C., Monterisi, A., Smayevsy, J., Suárez de Basnec, M.C. y Bianchini, H. (1993). Aislamiento e identificación de *Lactobacillus spp.* *Infect. & Microbiol. Clin.* Vol. 5.

Marsilio, V., Seghetti, L., Iannucci, E., Russi, F., Lanza, B., and Felicioni,

M. (2005). Use of a lactic acid bacteria starter culture during green olive (*Olea europaea* L cvAscolana tenera) processing. *J. Sci. Food Agric.* 85, 1084–1090.

Middleton E. Jr., Kandaswami C., Theoharides T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, 52, 673-751.

Montaño, A., Bobillo, M. y Marshall, V. M. (1993). Effect of sodium chloride on metabolism of two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermenting green olives. *Letter in Appl. Microbiol.* 16, 315-318.

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

Montes, Joaquín. (2010-2011). Introducción de mejoras en el proceso de aderezo de aceitunas. Master profesional en ingeniería y gestión medioambiental. Escuela de organización industrial. Sevilla.

Monroy, D.M.C., Castro, B.T., Fernández, P.F.J., Mayorga, R.L. (2009). Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS* 73: 63-72.

Nes, I.F., Yoon, S.S., Diep, D.B., (2007). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Sci. Biotechnol.* 16: 675-690

Nishie. M., Nagao, J., Sonomoto, K., (2012). Antibacterial peptides “bacteriocins”: An overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci.* 17: 1-16.

Panagou, E.Z. and Tassou, C.C. (2006). Changes in volatile compounds and related biochemical profile during controlled fermentation of cv. Conservolea green olives. *Food Microbiology*, 23, 738-746.

Panagou, E. Z., Schillinger, U., Franz, C. M. A. P., and Nychas G. J. E. (2008). Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 25,348–358.

Panagou, E. Z., Tassou, C. C., and Katsaboxakis, C. Z. (2003). Induced lactic acid fermentation of untreated green olives of the Conservolea cultivar by *Lactobacillus pentosus*. *J. Sci. Food Agric.* 83,667–674.

Perez-Vizcaino F., Duarte J., Jimenez R., Santos-Buelga C., Osuna A. (2009). Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep*, 61, 67-75.

Peter, S. (2014). *Microbiología de la Fermentación Industrial*. Madrid.

Peyrol, J., Meyer, G., Desrois, M., Bernard, M., Obert, P., Dangles, O., Pechere, L., Amiot-Carlin, M.-J., Riva, C. (2015). Effect of polyphenols of olive oil, hydroxytyrosol and its glucuronides on the vascular reactivity in a type 2 diabetes context. *Arch. Cardiovasc. Dis. Suppl*, 7, 137-138

Prescott, L., Harley, J. y Klein, D. *Microbiología*. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid España.

Psani, M. and Kotzekidou, P. (2006). Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 22, 1329-1336.

Rózés, N. y Peres, C. (1996). Effect of oleuropein y sodium chloride on viability and metabolism of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 839-843.

Ruiz Barba, J. L., Brenes Balbuena, M., Jiménez Díaz, R. García García, P. y Garrido Fernández, A. (1993). Inhibition of *Lactobacillus plantarum* by polyphenols extracted from two different kind of olive brines. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 15-19.

Ruiz Barba, J. L., y Jiménez Díaz, Rufino (2004). *Aceituna de mesa: de la fermentación tradicional a la utilización de cultivos iniciadores*. Departamento de Biotecnología de Alimentos. Instituto de la Grasa. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Agrosic. Sevilla.

Sabatini, N., Mucciarella, M.R. and Marsilio, V. (2008). Volatile compounds in inoculated and inoculated table olives with *Lactobacillus plantarum* (*Olea europaea* L., cv. Moresca and Kalamata). *Food Science and Technology*, 41, 2017-2022.

Salveti, E., Torriani, S. and Felis, G.E. (2012). The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics & Antimicro. Prot.* (2012) 4:217–226.

Samaniego Fernández, Luz María y Sosa del Castillo, Maryla. (2000). *Lactobacillus* spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Editorial Universitaria del Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba. Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos. Centro de Estudios Biotecnológicos, Facultad de Agronomía. Ciudad de Matanzas, Cuba.

Sánchez, A. H., García, P., Rejano, L., Brenes, M. y Garrido, A. (1995). The effects of acidification y temperature during washing of Spanish-style green olives on the fermentation process. *J. Sci. Food Agrie.* 68, 197-202.

Sánchez, A.H., Rejano, L., Montano, A., and de Castro, A. (2001). Utilization at high pH of starter cultures of lactobacilli for Spanish-style green olive fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 67,115–122.

Sánchez Gómez, A. H., Rejano Navarro, L., Duran Quintana, M. C, Castro Gómez Millán, A., Montano Asquerino, A., García García, P. y Garrido Fernández, A. (1990). Elaboración de aceitunas verdes con tratamiento alcalino y temperatura controlada. *Grasas y Aceites* 41,218-223.

Saxelin, M. (1997). *Lactobacillus* GG: A human probiotic strain with thorough clinical documentation. *Food Rev. Int.* 13(2): 293-313

Schroeter H., Heiss C., Balzer J., Kleinbongard P., Keen C.L., Hollenberg N.K., Sies H., Kwik-Urbe C., Schmitz H.H., Kelm M. (2006). Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 61, 67-75.

Tagg, J. R., Dajani, A. S., Wannamaker, L. W. (1975). Bacteriocin of a group B streptococcus: partial purification and characterization. *Antimicrobial Agents Chemother.* 7, 764-772.

Tannock, G. W. (1988). Mini-Review: Molecular Genetics: a new tool for investigating the microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Microb. Ecol.* 15: 239.

Vázquez, S.M., Suárez, H., Zapata, S., (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista chilena de Nutrición*. 36, 64-71.

Vhalov, G. (1990). Gli antociani polimeri delle olive nere. Loro determinazione in funzione del proceso de maturazione. *Industrie Alimentan XXIX*, gennaio, 11-18.

Yusuf, M.A. (2013). Lactic Acid Bacteria: Bacteriocin producer: A mini review. *IOSR J. Pharm.* 3: 44-50.