



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

RESUMEN: PRODUCCIÓN DE ACEITUNAS VERDES DOYPACK

Marina de la Rosa Alba

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

Tutora académica: Dra. Maria Montserrat Poblet, Agregada, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, montserrat.poblet@urv.cat

En cooperación con: Cándido Miró S.A. y Universidad Politécnica de Valencia

Supervisor: Pablo Verdú Lluch, Director Técnico, Departamento de Producción, pablo.verdu@serpis.com

Septiembre 2021

Yo, Marina de la Rosa Alba, con DNI 21806941C, soy conocedor de la guía de prevención del plagio en la URV Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada el 07 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituyen ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 6 de Septiembre de 2021

(Firma)

ÍNDICE

DATOS DEL CENTRO	4
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
Producción de las aceitunas verdes deshuesadas	6
Empaquetado en bolsas <i>Doypack</i>	10
Microbiota de las aceitunas	10
Microbiota implicada en la producción	11
Contaminaciones microbiológicas durante el proceso de producción	13
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Preparación del producto	16
Acondicionamiento de las aceitunas empleadas	16
Tratamiento térmico determinado.....	16
Embolsado y peso del producto	16
Determinaciones analíticas	17
Análisis físico-químicos del producto	17
Análisis microbiológicos del producto	17
Análisis organolépticos	18
Identificación de las especies contaminantes	18
Identificación de los puntos de contaminación.....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
Diseño y optimización del protocolo	19
Determinaciones analíticas	23
Identificación de puntos de contaminación	24
Preparación del producto	25
Tratamiento térmico determinado	25
Embolsado.....	26
Identificación de las especies contaminantes	26
LIMITACIONES	28
CONCLUSIÓN.....	29
FUTURAS PERSPECTIVAS.....	29
BIBLIOGRAFIA.....	30
AUTOEVALUACIÓN.....	33

DATOS DEL CENTRO

Cándido Miró S.A. es una empresa del sector alimentario dedicada a la fabricación de aceitunas de mesa desde 1926. La empresa se dedica a la venta nacional e internacional de este producto en más de 40 países. La marca de esta empresa es denominada Aceitunas EL SERPIS.

La Universitat Politècnica de València (UPV) es una universidad pública española fundada en 1968. Cuenta con numerosos grupos de investigación y científicos de gran renombre dedicados al estudio de diferentes campos, entre ellos los productos alimenticios.

La empresa Cándido Miró, S.A y la Universitat Politècnica de València (UPV) han colaborado activamente en diferentes proyectos y convenios a través de los cuales, para la optimización de los procesos empleados por la empresa y al desarrollo de nuevos productos.

RESUMEN

España es una de las grandes potencias en producción de aceitunas. El proceso de producción de las aceitunas tiene 7 pasos, siendo el más relevante la fermentación láctica, en la cual la microbiota juega un papel importante. El principal objetivo de este proyecto es la producción de aceitunas verdes deshuesadas doypack utilizando iniciadores. La metodología para la producción del producto se basa en 5 pasos: preparación, acondicionamiento del producto, proceso térmico, embolsado y determinaciones analíticas. Mediante cambios paramétricos se obtuvo un protocolo estandarizado. Las determinaciones mostraron resultados satisfactorios exceptuando la contaminación por levaduras, aun así, se obtuvo el producto deseado.

Palabras clave: Aceitunas de mesa, iniciadores, microbiología

INTRODUCCIÓN

España es la principal potencia en producción de aceitunas de mesa, en la campaña 2020/2021 se produjeron aproximadamente 550.000 toneladas de aceituna de mesa (1). Según el informe del Consejo Oleica Internacional (COI) sobre la campaña de 2018/2019 España fue el segundo país de la Unión Europea con un mayor consumo de aceitunas de mesa por habitante tras Chipre (2) (**Figura 1**). La producción de aceituna tiene una gran relevancia en el mercado español, siendo la presentación con una mayor aceptación en el mercado las derivadas de las aceitunas verdes al estilo sevillano o español.

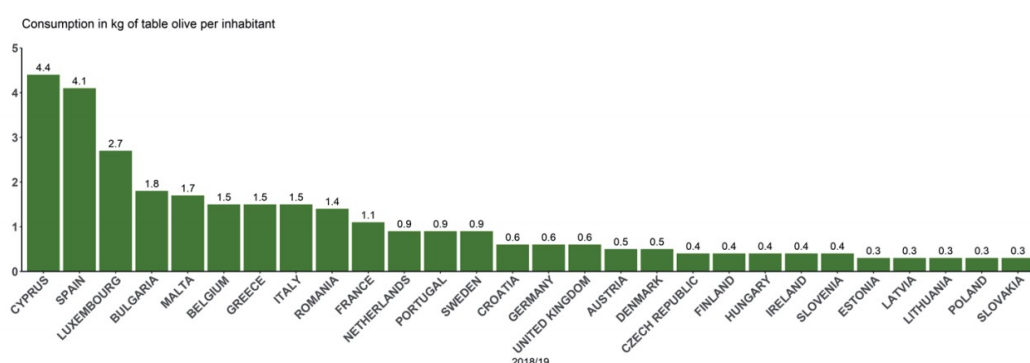


Figura 1. Consumo per cápita de aceituna de mesa en la campaña 2018/2019 (2).

Producción de las aceitunas verdes deshuesadas

La producción de las aceitunas verdes preparadas al estilo español requiere un proceso de fermentación. La producción se divide en 7 pasos: recolección y transporte, clasificación, tratamiento con lejía y lavados, colocación en salmuera, fermentación, deshuesado, envasado y almacenamiento (**Figura 2**). Cada uno de estos pasos es esencial para obtener un producto con las características organolépticas deseadas.



Figura 2. Proceso de producción de las aceitunas verdes deshuesadas.

La recolección y transporte de las aceitunas juega un papel importante en la calidad del producto final. El momento de la recolección marca el grado de madurez de las aceitunas, además tanto durante la recolección como en el transporte se pueden producir alteraciones en las aceitunas que afectan a la calidad del producto final.

Tras la recolección y transporte, se debe realizar una clasificación según el tamaño de las olivas obtenidas. En función de este tamaño se le asigna un calibre. Las aceitunas se calibrarán según el número de frutos que entren en un kilogramo o hectogramo, por lo que un mayor tamaño de la aceituna significa un valor de calibre menor (3). Durante el proceso de clasificación también se eliminarán aquellas aceitunas con fallas.

En cuanto a la etapa de cocido o tratamiento alcalino es el proceso formado por el tratamiento con lejía o sosa caustica. La importancia de este proceso viene dada por la eliminación del amargor natural de la aceituna generando una óptima calidad final, además la óptima realización de este proceso facilita las reacciones de fermentación posteriores por las bacterias ácido-lácticas. El proceso se basa en la preparación de una solución diluida de hidróxido de sodio y su posterior adición a las aceitunas durante 5-8 horas. El principal objetivo es la óptima penetración de la lejía en la aceituna siendo esta penetración 2/3 o 3/4 partes de la distancia de la piel al hueso. Al finalizar el proceso de cocido se retira la lejía y se cubren las aceitunas con agua, etapa denominada lavado, cuyo objetivo es eliminar la lejía adherida en la superficie de las aceitunas y aquella que ha penetrado en el fruto (4). Como consecuencia del lavado se reduce la acidez y la lejía residual de las aceitunas. La duración de este proceso depende de la concentración de lejía utilizada, cantidad de lavados realizados y temperatura del agua de lavado (5,6).

El siguiente paso consiste en la colocación de las aceitunas en salmuera, en esta solución salina se producirá la fermentación. Esta salmuera es una disolución de cloruro sódico (NaCl) a una concentración de 8-10 %, el resto de componentes serán aportados por el propio fruto por fenómenos osmóticos, formándose el caldo de cultivo con los nutrientes y compuestos necesarios para el crecimiento microbiano. Altas concentraciones de NaCl en la salmuera provocan una disminución del crecimiento de microorganismos perjudiciales como las bacterias butíricas y coliformes. Otros factores tales como el pH también afectan al crecimiento de diferentes especies microbianas provocando cambios en las características del producto (5,6).

La fermentación es el paso más importante de la producción de aceituna, en este caso es una fermentación ácido láctica. La fermentación láctica es un proceso metabólico anaeróbico basado en la conversión de azúcares a ácido láctico, CO₂ y energía. Este

proceso metabólico ha sido utilizado como método de conservación y producción de alimentos de interés (7). Los azúcares utilizados como sustratos de la fermentación de las aceitunas de mesa provienen de las propias aceitunas, por esta razón la concentración de azúcares en la salmuera no es elevada. Los principales factores que afectan a este proceso son el estado de madurez del fruto, concentración inicial de salmuera, concentración de lejía, temperatura y tratamientos con ácido o azúcares para modificar el caldo de cultivo. El proceso de fermentación se puede dividir en 4 fases:

Primera fase: La fase se inicia con la adición de la salmuera hasta que comienza el crecimiento de las bacterias ácido-lácticas. A lo largo de esta fase se forma el caldo de cultivo, formándose así el ambiente necesario para el crecimiento las bacterias lácticas, más tolerantes a la sal que otros microorganismos. La característica principal de esta etapa es el descenso de pH hasta valores en torno a 6. Durante los procesos de producción, la tendencia es la disminución del tiempo de esta fase debido a que algunas de las bacterias Gram-negativas que se desarrollan pueden estropear el producto final (8).

A lo largo de esta fase se observa el crecimiento de microorganismos muy variados, entre ellos los cocos productores de ácido láctico, mohos, levaduras y coliformes. El crecimiento de estos últimos debe controlarse porque pueden causar alteraciones en el producto final. Entre estos coliformes se encuentran *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Escherichia coli*, entre otros. Por otro lado, los cocos disminuyen el pH mediante la producción de ácido láctico, aunque los coliformes también contribuyen a esta tarea. Entre estos cocos se encuentran *Streptococcus lactis*, *Pediococcus urinaeequi*, *Leuconostoc paramesenteroides* (5,6).

Segunda fase: el inicio de esta fase viene marcado por el crecimiento de los lactobacilos, estos crecen una vez el pH de la salmuera alcanza un valor aproximado de 6. Durante esta fase disminuyen generalmente los porcentajes de todas las especies que caracterizan la primera fase del proceso de fermentación entre ellos los *Enterobacteriaceae* (9) exceptuando a los cocos productores de ácido láctico ya que mantienen su crecimiento (8). Además de los lactobacilos y los cocos, en un proceso adecuado de fermentación, las levaduras también mantienen su crecimiento a lo largo de esta etapa. Las bacterias del ácido láctico también provocan una disminución del pH hasta

niveles aproximados a 4,5, la producción de ácido láctico provoca a su vez un aumento de la acidez libre. Algunos lactobacilos implicados en los procesos de fermentación de las aceitunas son *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus delbrueckii* (5,6).

Tercera fase: la fase se caracteriza por el dominio del crecimiento de los lactobacilos y el agotamiento de la mayoría de azúcares fermentables. Estos microorganismos fermentan azúcares generando ácido láctico, aumentando así la acidez y disminuyendo el pH hasta valores menores a 4,2.

Cuarta fase: esta fase no es deseada, además no siempre se produce. Está caracterizada por un aumento del pH debido al crecimiento de bacterias propiónicas. Estas bacterias, como *Propionibacterium acnes*, producen ácido propiónico y acético utilizando como sustrato el ácido láctico. La concentración de cloruro sódico y el valor de pH están relacionadas con la producción de esta cuarta fase, una alta concentración de sales y un bajo valor de pH evita esta fase (5,6).

A lo largo de todas las fases de fermentación se produce un crecimiento de las levaduras en mayor o menor medida en función de las condiciones de fermentación, algunas de estas levaduras son *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus*, entre otras. El crecimiento de estas puede aportar características únicas al sabor de las aceitunas y mejorar el crecimiento de las bacterias ácido-lácticas ya que liberan compuestos nutritivos. Por otra parte, estas también pueden provocar alteraciones no deseadas (10).

A lo largo de las fases de fermentación se realizan controles de calidad mediante determinaciones analíticas. Estos controles se basan en análisis físico-químicos de los valores de acidez libre, pH y concentraciones de sales. En algunas ocasiones también se realizan análisis de azúcares reductores. Estos controles permiten realizar un seguimiento del proceso de fermentación y después de este, en caso de las características no sean las deseadas se deben realizar las correcciones pertinentes como la adición de sal, adición de ácido láctico o clorhídrico, sustitución de parte de la salmuera y adición de azúcares (5,6).

En el caso de las aceitunas deshuesadas, una vez finalizada la fermentación de la aceituna, el siguiente paso en el proceso de producción es el deshuesado de la aceituna. El deshuesado consiste en la eliminación del hueso de cada aceituna sin dañarla, esto se realiza industrialmente utilizando una deshuesadora.

A continuación, se procede al envasado de las aceitunas verdes deshuesadas. Este envasado consiste en añadir la aceituna en la tolva de alimentación y llenar el depósito de salmuera. De esta forma, la maquinaria se configurará para obtener la cantidad adecuada de salmuera y aceitunas en cada bolsa.

Finalmente, las bolsas son seleccionadas para eliminar aquellas que muestren errores en los cierres o de peso. Una vez seleccionadas se almacenan hasta su distribución.

Empaquetado en bolsas *Doypack*

El empaquetado es uno de los pasos más importantes de la producción del producto debido a que la conservación y seguridad de las aceitunas de mesa dependen en gran medida del paquete que protege y contiene el producto. En las últimas décadas los envases *doypack* han ganado importancia en la industria cosmética, alimentaria y médica por su menor coste económico, mayor posibilidad de marketing, mayor eficiencia, entre otros (11–13). Estos envases fueron inventados en 1963 por Louis Doyen para contener productos líquidos (14). Generalmente, estos envases están fabricados con fibras de poliéster, polietileno de baja densidad o una mezcla de estos dos, cuyo sellado se realiza mediante selladores térmicos para evitar la salida del líquido por presión hídrica. Los envases *doypack* se pueden fabricar en una operación de un solo paso que consiste en utilizar la maquinaria para el formado, llenado y sellado del envase en un solo paso, también se pueden fabricar en operaciones de dos pasos donde primero se forman las bolsas y luego se llena y sella la bolsa preformada. La operación en un solo paso tiene beneficios económicos y de almacenamiento mientras que la operación en dos pasos es más rápida(12).

La desventaja que presenta este tipo de empaquetado es que en función del tipo de polímero utilizado no son adecuados para resistir algunos tratamientos térmicos aplicados para garantizar la seguridad de los productos produciéndose la deformación del material utilizado y afectando a sus características de permeabilidad.

Microbiota de las aceitunas

Los microorganismos tienen un papel esencial del proceso de producción y preservación de las aceitunas. La producción de las aceitunas implica un proceso de fermentación realizado principalmente por bacterias lácticas. El metabolismo de la microbiota presente durante el proceso tienen una gran implicación en las características del producto (10). Además, las contaminaciones microbiológicas tienen un gran impacto en la vida útil del producto.

El conocimiento de las características de las especies microbiológicas permite el control de estas. Las características usualmente conocidas son temperatura de crecimiento, crecimiento en presencia de oxígeno, nutrientes necesarios para el crecimiento, temperatura de crecimiento, requerimiento de pH... (18)

Microbiota implicada en la producción

Diversos microorganismos están implicados en el proceso de producción de las aceitunas, principalmente a lo largo de la fermentación como se ha explicado en el apartado anterior. La fermentación se puede realizar con la microbiota presente en el material vegetal, sin necesidad de añadir cultivos de bacterias iniciadores de la fermentación, es decir, una fermentación espontánea tradicional. Durante la fermentación tradicional el microbioma está formado por diferentes microorganismos incluyendo bacterias y levaduras que deben encontrarse en las proporciones adecuadas en cada una de las fases para obtener el producto deseado (9). Por otro lado, se pueden inocular iniciadores al medio de fermentación produciéndose una colonización y competitividad con el microbioma endógeno, pudiendo controlar mejor los resultados de este proceso de fermentación láctica, este tipo de procesos se denominan fermentaciones inoculadas (4,19). Las fermentaciones inoculadas suponen una gran ventaja respecto a las fermentaciones tradicionales debido a la posibilidad de obtener resultados más uniformes en cuanto a las características organolépticas, evitar la producción de sabores inadecuados, agilizar el proceso de fermentación, aceleración de la acidificación, inhibición más rápida de las bacterias Gram-negativas, entre otros (10,20,21). Normalmente, los microorganismos inoculados son bacterias lácticas como *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus pentosus*, aunque en algunas ocasiones junto a estas se inoculan levaduras creando un microbioma diverso (9,22). En el caso de las fermentaciones inoculadas, se ha estudiado la posibilidad de eliminar o disminuir el microbioma autóctono de las aceitunas mediante un aumento de temperatura por métodos como la pasteurización. Este tratamiento por aumento de temperatura permite disminuir la competitividad entre el iniciador y el microbioma endógeno, facilitando la colonización del medio por parte del iniciador (19).

Lactobacillus plantarum

Lactobacillus plantarum produce ácido láctico y ATP mediante una fermentación láctica. Esta especie ha sido catalogada como patógeno. Esta bacteria se cataloga como mesófila y microaerófila debido a que su temperatura de crecimiento óptima se encuentra en 30-37°C y crecen idealmente en concentraciones de oxígeno menores a las atmosféricas (23–25).

Estas bacterias han sido identificadas en la epidermis de las aceitunas verdes naturalmente, es decir, forman parte de la microbiota autóctona del fruto (8,10,20). Además, también han sido estudiadas como cultivos iniciadores en fermentaciones inoculadas por sí solas y junto a otros microorganismos (22).

Lactobacillus pentosus

Lactobacillus pentosus, al igual que *Lactobacillus plantarum*, produce ATP y ácido láctico mediante una fermentación láctica. Esta bacteria se categoriza como mesófila porque su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 30-37°C (26).

Esta bacteria, al igual que *Lactobacillus plantarum*, se identificó como parte de la microbiota autóctona en la epidermis de las aceitunas de mesa (10,20). También se ha utilizado junto a otros microorganismos como iniciador en fermentaciones inoculadas debido a su capacidad de generación de ácido láctico a través de la fermentación de azúcares (22,27).

Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae crece naturalmente durante la fermentación de la aceituna de mesa, formando parte de la microbiota autóctona (28). Esta levadura está involucrada en procesos de fermentación del pan, el vino y el queso, ya que es capaz de llevar a cabo la fermentación alcohólica. En cuanto a su papel en la fermentación de las aceitunas, junto con las bacterias ácido-lácticas genera ácido láctico en pequeñas cantidades debido a que principalmente realiza la fermentación alcohólica permitiendo el avance del proceso por reducción del pH (10). Pero estas también generan una gran cantidad de dióxido de carbono que puede acabar formando bolsas de gas en la epidermis de las aceitunas. Se ha estudiado su posible utilización en los cultivos iniciadores junto con diversas especies ácido-lácticas (22).

Pichia myanmarensis

La presencia de *Pichia myanmarensis* en la microbiota autóctona de las aceitunas de mesa no se ha demostrado en estudios previos. Por otro lado, los estudios indicaron la presencia de levaduras de su mismo género. Incluso las levaduras de este género han sido utilizadas en cultivos iniciadores junto con bacterias ácido-lácticas (22).

Contaminaciones microbiológicas durante el proceso de producción

Las contaminaciones microbiológicas pueden tener un gran impacto en la calidad y sabor del producto final provocando un deterioro temprano y una conservación inadecuada. Por esta razón, el control microbiológico del producto final es esencial en el proceso de producción de las aceitunas. Las contaminaciones microbiológicas pueden ser producidas por patógenos u otros microorganismos que aporten características indeseadas para el producto. La mayoría de alteraciones son producidas por un desajuste de las proporciones de algunos microorganismos durante el proceso de producción.

Las contaminaciones más relevantes son:

Las contaminaciones por patógenos pueden provocar grandes riesgos en las aceitunas, aunque no son habituales. Provocando que estas estén totalmente contaminadas y que no sean adecuadas para el consumo. El crecimiento de microorganismos patógenos normalmente sucede cuando las condiciones de fermentación no están siendo adecuadas (pH alto, bajas concentraciones de sales, condiciones aeróbicas, entre otros). Algunos de los microorganismos identificados en estudios fueron *Listeria monocytogenes* y *Vibrio* sp. (29).

El alambrado se debe a la producción de gas debajo de la epidermis del fruto por parte de las bacterias Gram-negativas (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia* y *Aeromonas*). El problema principal que provoca esta producción de gas que termina por acumularse produciendo una vejiga o bolsa de gas. Esta bolsa de gas provoca la destrucción de la pulpa y separación de la epidermis del fruto. Este hecho se suele producir entre la primera y segunda fase del proceso de fermentación. Un aumento de temperatura, una insuficiente acidificación del medio o una lenta primera fase de la fermentación pueden provocar una mayor proliferación de bacterias Gram-negativas (5).

El ablandamiento del fruto perdiendo la textura habitual de la aceituna de mesa puede ser provocado por el crecimiento de levaduras como *Saccharomyces*

oleaginosus, *Pichia anomala*, *Candida boidinii*, entre otros, aunque las bacterias Gram-negativas también se han relacionado con esta alteración. El ablandamiento es provocado por la ruptura de las uniones celulares y el degradado de las paredes celulares (4).

La zapatería es una alteración del sabor de las aceitunas provocada principalmente por bacterias de los géneros *Clostridium* y *Propionibacterium*. La zapatería se suele producir debido a un aumento de pH y una concentración de sales baja ya que estos factores benefician el crecimiento de estos microorganismos. Normalmente, la pasteurización del producto evita esta alteración (4,5,10).

Las fermentaciones pútrida y butírica son producidas por bacterias del género *Clostridium*, estas generan productos que provocan una alteración de las características organolépticas. Estas fermentaciones se identifican gracias al olor producido por los productos de estas. Los factores que influyen en la aparición de estas alteraciones son el aumento del pH, la anaerobiosis total, exceso de nutrientes y concentraciones de sal bajas. Estos factores tienen una gran relevancia para el adecuado crecimiento de las bacterias del género *Clostridium*. Estas fermentaciones se producen en la primera etapa de fermentación (4,5).

Para reducir la mayoría de estas contaminaciones se debe mantener el producto bajo unas condiciones de pH bajo y elevadas concentraciones de sal. Además, es necesario mantener unas prácticas adecuadas y aumentar las medidas higiénicas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Es posible obtener un producto de aceitunas manzanilla deshuesado en *doypack*.

El principal objetivo es optimizar y estandarizar el protocolo de elaboración para obtener el producto final. La estabilidad microbiológica de las aceitunas comerciales normalmente se consigue mediante la disminución del pH empleando aditivos acidulantes, con el aumento de la concentración de sal en el producto final y el uso de aditivos conservantes, combinado con tratamientos térmicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo de este proyecto se basa en 5 pasos: preparación del producto, acondicionamiento de las aceitunas, tratamiento térmico determinado, embolsado y peso del producto y determinaciones analíticas del producto.

El número de pruebas realizado fue 26 durante un periodo de tiempo de dos meses aproximadamente.

Preparación del producto

La preparación del inóculo se basa la adición del iniciador liofilizado y nutrientes a un volumen de agua libre de cloro.

Acondicionamiento de las aceitunas empleadas

En cada una de las pruebas realizadas se emplearon 20 kg de aceitunas que fueron extraídas de los fermentadores o las bombonas. Las aceitunas se deshuesaron en una deshuesadora PSL-52 Versión X (OFM, Sevilla, España) obteniendo aproximadamente 15 kg de aceitunas deshuesadas. Las aceitunas se mantuvieron en la misma salmuera durante todo el proceso de extracción y deshuesado para evitar el cambio de sus propiedades físico-químicas y microbiológicas. Los fermentadores o bombonas fueron “arreglados” una semana antes de su utilización para la producción siguiendo el proceso habitual de fabricación.

Tratamiento térmico determinado

Las aceitunas se sometieron a un proceso de tratamiento térmico determinado.

Embolsado y peso del producto

El envasado de las aceitunas pasteurizadas en bolsas *doypack* se realizó en la STE-20/FD (Servitem, Toledo, España). Las aceitunas se cargaron en la cinta de la STE-20/FD, mientras que el inóculo se cargó en el tanque de líquido utilizando una bomba de presión. Un paso esencial en este proceso fue la configuración de la máquina para acabar obteniendo bolsas con un peso mayor a 170 gramos. La configuración se basa en la modificación de la cantidad de salmuera y aceitunas en la bolsa, en las cuales la ratio es 70 gramos de aceitunas:100 gramos de salmuera. Siguiendo el proceso de producción habitual de producción en *doypack* marcado por la empresa y la normativa de calidad (3).

Una vez obtenido el producto, todas las bolsas *doypack* se pesaron en un granatario y se descartaron todas aquellas que pesan menos de 170 g. El resto de bolsas se almacenaron en cajas para su posterior análisis.

Determinaciones analíticas

Las determinaciones analíticas realizadas al producto obtenido consistieron en análisis físico-químicos, organolépticos y microbiológicos acordes a la normativa internacional de calidad de la aceituna de mesa COI/OT/NC nº 1 (3).

Análisis físico-químicos del producto

Durante el mes posterior a la realización de la prueba, se realizaron análisis físico-químicos periódicos de las muestras. El producto de cada prueba se analizó en 3 puntos de muestreo a lo largo de un mes (**Figura 3**). Los análisis físico-químicos consistieron en un análisis de lejía (hidróxido de sodio residual), pH, acidez libre y concentración de cloruros.

Lejía

Para analizar la lejía en la salmuera de las bolsas *doypack* se utilizó el titrador AT100 (Hach, Iowa, Estados Unidos). La preparación consistió en la adición de 30 mL de la salmuera de las bolsas de aceitunas medidos con una probeta en un vaso (100 mL) para su análisis en el titrador.

pH y Acidez libre

El pH y acidez libre se determinaron añadiendo 40 mL de salmuera en un vaso (100 mL) medida mediante una probeta. Para la determinación de pH y Acidez libre se empleó el titrador Titromatic 2S (Crison, Hach, Iowa, Estados Unidos).

Concentración de cloruros

Para el análisis de la concentración de cloruros, se pipeteó 500 μ L de salmuera en un vaso (100 mL) y se ennesó con agua destilada a 30 mL. Para este análisis también se empleó el titrador Titromatic 2S (Crison, Hach, Iowa, Estados Unidos).

Análisis microbiológicos del producto

Durante el primer mes posterior a la producción se llevaron a cabo análisis microbiológicos del producto a los 10, 20 y 30 días. Para llevar a cabo estos análisis, se tomaron muestras de las aceitunas a partir de las cuales se prepararon diluciones decimales, tal y como se describe en la Norma UNE EN-ISO 6887-4 (30). Las diluciones se utilizaron para realizar las determinaciones de mohos y levaduras y bacterias ácido lácticas.

Mohos y levaduras

La determinación de mohos y levaduras se realizó empleando Agar Sabouraud Oxitetraciclina ((OGYEA) Sharlau, Barcelona, España), suplementado con el oxitetraciclina que se incorporó al medio con el objetivo de inhibir el desarrollo de la mayoría de bacterias, favoreciendo así el crecimiento de mohos y levaduras. Se realizó una siembra en superficie e incubación a 20 °C durante 5 días. Transcurridos los 5 días, el recuento de mohos y levaduras debe realizarse en las placas que contengan entre 10 y 150 colonias.

Bacterias ácido lácticas

La determinación de bacterias ácido lácticas se realizó empleando Agar de Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Sharlau, Barcelona, España) suplementado con ácido sórbico. Aunque la formulación del agar MRS muestra un cierto grado de selectividad se recurrió a la adición de ácido sórbico como agente selectivo para evitar la proliferación de mohos y levaduras en las placas. Se realizó una siembra en doble capa, una incubación a 37 °C durante 72 horas. Transcurrido el periodo de incubación, se realizó el recuento directo de aquellas placas que presentaban entre 30 y 300 colonias.

Análisis organolépticos

Los análisis organolépticos se realizaron mediante una cata de las aceitunas a los 7, 14 y 30 días. Las características organolépticas que se tuvieron en cuenta fueron: sabor, olor y textura.

Identificación de las especies contaminantes

Se llevó a cabo un estudio microbiológico para identificar las levaduras que se encontraban en el producto. Para identificar las especies de levaduras primero se seleccionaron colonias de levaduras de diferentes morfologías procedentes de los análisis microbiológicos de las aceitunas. Seguidamente, se prepararon tubos de 10 mL de caldo de cultivo Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD), Potato Dextrose Broth (PDB) y MRS con campanas Durham a los que se inocularon una colonia de cada levadura seleccionada. Los cultivos se dejaron crecer a 25 °C durante 14 días y se observó la presencia o ausencia de gas.

Tras el periodo de incubación, se seleccionaron como posibles alterantes aquellas levaduras productoras de gas y aquellas que provocaban la formación de turbidez. Estas levaduras se aislaron y cultivaron en medio Sabouraud para su posterior identificación. Se realizó una tinción con azul de etileno para identificar la morfología

de las levaduras. Para la identificación a nivel de especie se analizaron las siguientes regiones genómicas: Amplificación y secuenciación (con lecturas en las dos direcciones) de la zona del DNA ribosómico que comprende los espacios intergénicos ITS1 e ITS2 y que incluye el gen 5,8S rRNA (región ITS) con los cebadores *its1* e *its4*. También de la zona que comprende los dominios D1/D2 del extremo 5' del gen que codifica el 28S rRNA con los cebadores *nl1* y *nl4*. Tras la secuenciación, se compararon las secuencias obtenidas del análisis Blast frente a las bases de datos NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) y Mycobank (<http://www.mycobank.org>).

Identificación de los puntos de contaminación

Al igual que con los análisis microbiológicos, el análisis de los puntos de contaminación por levaduras para llevar a cabo estos análisis se tomaron muestras de las aceitunas o del líquido de gobierno para identificar la presencia de mohos y levaduras.

El procedimiento seguido fue el mismo que en el caso de los análisis microbiológicos utilizando el medio de cultivo Sabouraud suplementado con Oxitetraciclina. Además, también se realizaron análisis utilizando como medio de cultivo el MRS para realizar un recuento de mohos y levaduras. El procedimiento de siembra, incubación y recuento de mohos y levaduras fue el mismo que en el caso de los análisis microbiológicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La producción de las aceitunas verdes deshuesadas mediante la adición de cultivos iniciadores es compleja. En los últimos años diversas investigaciones han utilizado cultivos iniciadores para llevar a cabo fermentaciones inoculadas (9,27). De hecho, algún estudio ha utilizado técnicas para la eliminación previa de la microbiota autóctona de las aceitunas verdes (31). En cambio, diferentes investigaciones han demostrado la supervivencia de la microbiota inoculada tras la fermentación durante el empaquetado en salmuera. Este estudio mostró resultados muy prometedores en materia de vida útil y recuento de bacterias ácido-lácticas (32).

Diseño y optimización del protocolo

A lo largo de las 26 pruebas se han modificado diferentes condiciones y parámetros para comprobar cuál de ellas permite la obtención del producto final deseado.

Durante la preparación del preinóculo hay diversas condiciones que han sido alteradas a lo largo del proyecto para intentar mejorar la calidad del producto final. Entre estas

condiciones se encuentran el iniciador seleccionado, la cantidad de iniciador, la presencia y cantidad de nutrientes, el tiempo de incubación y condiciones de O₂ (**Tabla 1**).

Los 3 iniciadores fueron utilizados en diversas pruebas individualmente. Por otro lado, las cantidades de iniciador añadido en cada prueba estuvieron relacionadas con volumen de preinóculo preparado, por lo tanto, estas son equivalentes, excepto en el caso del peso 3. El peso 3 es mayor que los dos anteriores, pero estas pruebas una mejora en los análisis microbiológicos. La presencia y ausencia de nutrientes (**Tabla 1**) se comprobó para ver la necesidad de estos nutrientes para el crecimiento de las bacterias ácido-lácticas que contiene el iniciador. A lo largo de las pruebas se utilizaron diversas cantidades de nutrientes, o incluso se realizaron pruebas en ausencia de estos. Tras diversas pruebas se cambiaron algunas de las condiciones de preparación del producto para tratar de disminuir la contaminación por levaduras que se estaba produciendo.

Alternar la procedencia de la aceituna permitió comprobar que el funcionamiento del protocolo en aceitunas de diferentes cosechas y productores. La procedencia de la aceituna y sus características físico-químicas iniciales pueden afectar a las características organolépticas y físico-químicas del producto final. La necesidad de las “correcciones” previamente al embolsado proviene de la necesidad de obtener un producto uniforme a pesar de la diferente procedencia de la aceituna verde utilizada en cada muestra. A pesar de las “correcciones” la textura y sabor de la aceituna puede mostrar pequeñas alteraciones en función de la procedencia y cosecha del fruto.

El tiempo de duración del tratamiento térmico determinado se modificó a lo largo de las pruebas. Los dos tiempos fueron utilizados en diversas pruebas, hasta comprobar que los resultados obtenidos utilizando los dos tiempos eran similares.

La planificación de las determinaciones analíticas tiene una gran importancia para observar el progreso del producto a lo largo del tiempo. El día de producción del producto se marcó como el día 0, a partir de este día y durante el siguiente mes se realizaron análisis físico-químicos, microbiológicos y organolépticos (**Figura 3**). Estos análisis permiten observar la progresión del producto a lo largo del mes. La comparación de estos resultados permite la estandarización del proceso de producción de las aceitunas *doypack* sin aditivos.

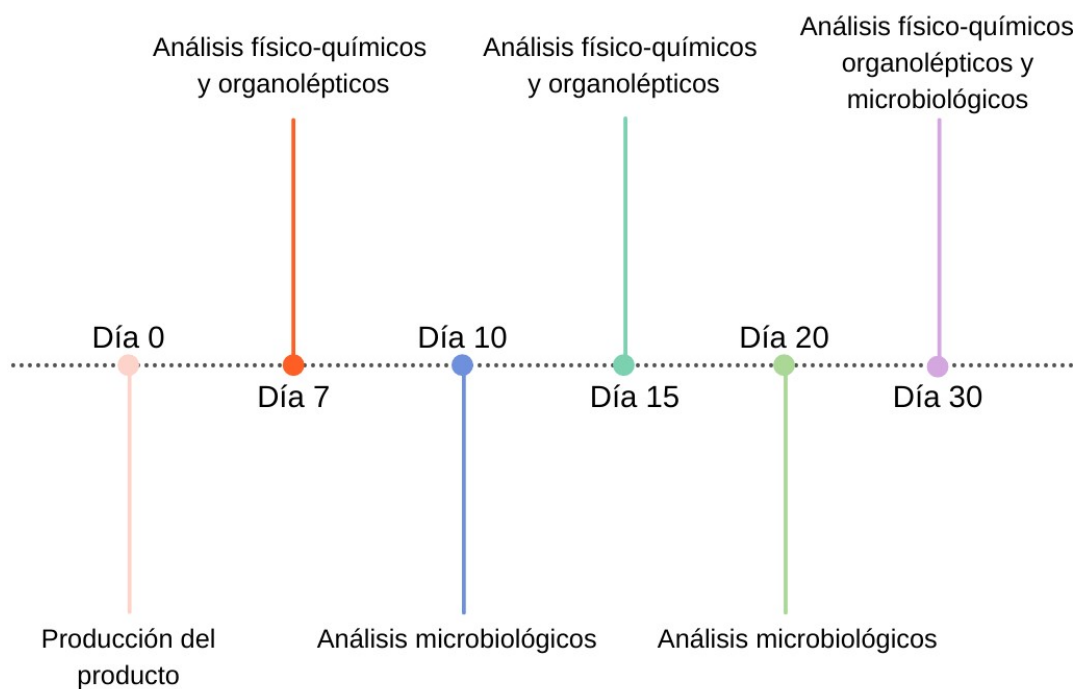


Figura 3. Planificación mensual de las determinaciones analíticas del producto

Tabla 1. Condiciones experimentales testadas durante el proyecto

Pasos de la producción	Parámetros	Posibles condiciones
	Tipo de iniciador	Iniciador 1
		Iniciador 2
		Iniciador 3
	Cantidad de iniciador (g)	Peso 1
		Peso 2
		Peso 3
	Adición nutrientes (mL)	Ausencia
		Volumen 1
		Volumen 2
		Volumen 3
	Presencia de O ₂	Volumen 4
		Factor 1

		Factor 2
		Fermentador 1
		Fermentador 2
Acondicionamiento de la aceituna	Procedencia de la aceituna	Bombona 1
		Bombona 2
		Bombona 3
		Aceituna de producción

Determinaciones analíticas

Los resultados de los análisis físico-químicos y organolépticos de las 26 pruebas a lo largo de un mes fueron adecuados.

Tanto la acidez libre como la concentración de cloruros tiende a aumentar durante los primeros 30 días, para acabar en los valores ideales. Por otra parte, los valores de lejía se mantienen bastante estables durante este periodo de tiempo excepto en algunos casos donde estos aumentan. En cuanto a los valores de pH, en algunas pruebas estos tienden a aumentar, pero sin presentarse cambios drásticos de pH, manteniéndose en valores ácidos tal y como se espera.

En la mayoría de estas pruebas los resultados físico-químicos son satisfactorios ya que cumplen los estándares requeridos por la Norma comercial aplicable a las aceitunas de mesa del Consejo Oleícola Internacional (3). Unos valores adecuados de pH, acidez y concentración de sales evitan el crecimiento de microorganismos contaminantes que puedan provocar un detrimento del producto final. Además, el crecimiento de estos microorganismos contaminantes también puede provocar la producción de fermentaciones indeseadas como la pútrida o butírica (4,5). Por lo tanto, los valores físico-químicos adecuados permiten la conservación del producto.

Los valores físico-químicos tienen una gran importancia en las características organolépticas del producto ya que están directamente relacionados. Por lo tanto, estos valores físico-químicos se ven reflejados en el sabor de las aceitunas de dichas pruebas. Por esta razón, las aceitunas que se encuentran en un líquido de gobierno con baja acidez, no tienen un sabor suficientemente ácido y aquellas con un valor de lejía bajo tienen un sabor mucha más soso y menos intenso que el resto de pruebas.

En cuanto al resto de pruebas tienen las características organolépticas deseadas. Ninguna de ellas presentó un sabor inadecuado por contaminaciones microbiológicas, a pesar del crecimiento de microorganismos no inoculados en el líquido de gobierno de forma deliberada. La mayor problemática en cuanto a las características organolépticas puede ser provocada por fermentaciones secundarias debido a la producción de productos que generan características no deseadas. En este proyecto, la mayoría de las pruebas presentan un sabor adecuado. Además, aquellas que no lo hacen, presentan problemas de acidez o sal, los cuales pueden ser solucionados durante las correcciones posteriores a la fermentación. Estos problemas no son críticos, por lo que los resultados organolépticos obtenidos se consideran satisfactorios. Al igual que con los resultados físico-químicos tras 30 días las características organolépticas se equilibran.

Los análisis microbiológicos tienen una gran importancia ya que pueden provocar problemas organolépticos provocados por la aparición de sabores no deseados por la producción de productos no habituales en el producto final. Una gran cantidad de pruebas presentan valores fuera de los parámetros adecuados.

La tendencia que muestran todas las pruebas es la misma, a lo largo del mes los recuentos de mohos y levaduras y de bacterias ácido-lácticas disminuyen, aunque esta disminución no siempre es proporcional. En cuanto al recuento de mohos y levaduras, este sigue por encima de lo deseado, a pesar de que 30 días después de la producción en la mayoría de las pruebas los recuentos se encuentran en los valores deseados.

Inicialmente, los resultados obtenidos son parecidos a los de un estudio similar anterior, donde hasta los 80 días no se muestra un equilibrio microbiológico. Además, los resultados de este estudio muestran inicialmente hasta pasados los 40 días una disminución del recuento de bacterias ácido lácticas (menor a 5 log UFC/mL) (32). Estos hechos pueden significar que no se ha alcanzado una estabilidad microbiológica durante los primeros 30 días tras la producción de las bolsas *doypack*.

Durante estas pruebas, aquellas que se prepararon utilizando el iniciador 1 en el preinóculo tienen un mayor recuento de bacterias ácido-lácticas inicial, mientras que otras pruebas durante cuya preparación se utilizaron alguno de los otros dos inóculos presentan recuentos iniciales menores. A pesar de esto, tras 30 días los análisis microbiológicos mostraron que los recuentos de bacterias ácido-lácticas son similares utilizando diferentes iniciadores. Aun observando estos datos el iniciador seleccionado para seguir con el proyecto fue el iniciador 1. Las principales razones fueron que presenta un crecimiento más rápido y mayor, aportando así las características deseadas para la producción de dicho producto. En cuanto a los valores físico-químicos, los 3 iniciadores resultan en valores físico-químicos similares, por lo tanto, estos no tuvieron un papel en la elección del iniciador.

Identificación de puntos de contaminación

La identificación de los principales puntos de contaminación del producto se llevó a cabo en los puntos críticos del protocolo:

Preparación del producto: la identificación de las contaminaciones en este punto se llevó a cabo mediante un estudio microbiológico del recuento bacterias ácido-lácticas y el recuento de mohos y levaduras en el preinóculo.

Tratamiento térmico determinado: la identificación de la eficacia del proceso de tratamiento térmico determinado se comprobó realizando un análisis microbiológico de las aceitunas previamente y posteriormente al proceso.

Embolsado de las aceitunas en la STE-20/FD: las aceitunas se depositaron en la cinta antes de su entrada en la STE-20/FD. Este paso podría contaminar las aceitunas con levaduras de las aceitunas que se estaban embolsando anteriormente en la máquina. Para reducir la contaminación, se pulverizó un volumen de preinóculo en la cinta de la STE-20/FD previamente a la incorporación de las aceitunas pasteurizada.

Los puntos de contaminación se identificaron mediante diversos análisis microbiológicos en diferentes etapas del proceso de producción obteniendo así el recuento de mohos y levaduras en estas etapas.

La identificación de los puntos de contaminación por levaduras es uno de los puntos más críticos del proyecto.

Preparación del producto

Al detectar una gran contaminación en este punto de la producción se implementaron cambios en la metodología de preparación del preinóculo. Finalmente, todas estas adaptaciones del protocolo inicial provocaron una disminución del recuento inicial de levaduras. Las medidas tomadas si han disminuido la contaminación en el preinóculo, aunque estos resultados no se ven reflejados en los recuentos de mohos y levaduras finales en las bolsas *doypack*. Estos resultados muestran que podría haber otro foco de contaminación durante el proceso de producción de nuestro producto.

Tratamiento térmico determinado

La eficacia del tratamiento térmico determinado fue comprobada mediante el análisis microbiológico de aceitunas antes y después de este proceso

Tras la pasteurización no se detectan mohos y levaduras en estas mismas aceitunas mientras que antes de este proceso térmico si se detectaron mohos y levaduras.

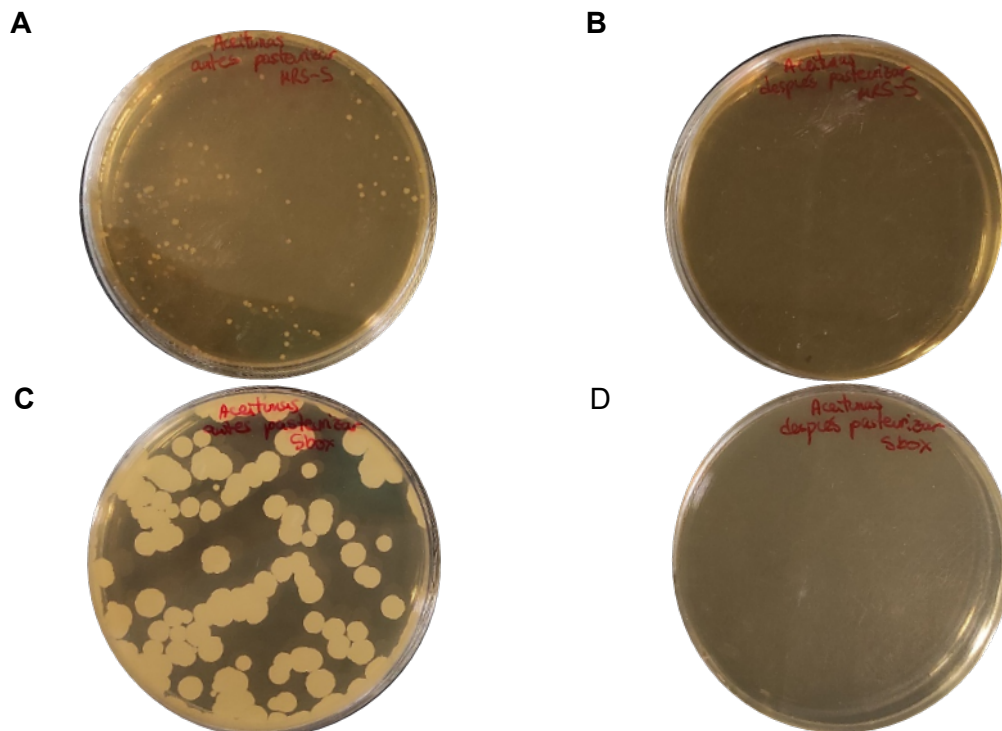


Figura 4. Cultivos microbiológicos de las aceitunas de mesa. (A) Cultivo del microbioma de las aceitunas de mesa previamente a la pasteurización en un medio MRS-S. (B) Cultivo de la microbiota de las aceitunas de mesa posteriormente a la pasteurización en un medio MRS-S. (C) Análisis microbiológico en medio Saboraund de las aceitunas antes de la pasteurización. (D) Análisis microbiológico en medio Saboraund de las aceitunas después de la pasteurización.

La morfología de las colonias que aparece en las placas de MRS presenta un borde irregular y un color rosáceo. Estas colonias son diferentes a las colonias procedentes que normalmente son blancas, lisas y de bordes definidos. Al no detectarse mohos y levaduras tras el proceso se demostró la eficacia del tratamiento térmico. Demostrando que este no es un punto de contaminación por levaduras.

Embolsado

A pesar del cambio de protocolo este aún podría ser un punto de contaminación. Sobre todo, porque según los resultados de los análisis microbiológicos de la preparación del producto este se encuentra contaminado. Por lo tanto, esta podría ser identificada como la segunda fuente de contaminación por mohos y levaduras del proceso de producción.

Identificación de las especies contaminantes

La identificación de las especies contaminantes se realizó finalmente en el caldo YEPD MRS y PD. Solo dos de las muestras presentan una mayor producción de gas,

observada mediante la generación de burbujas (**Figura 5**). Estas levaduras fueron las analizadas en los siguientes ensayos.

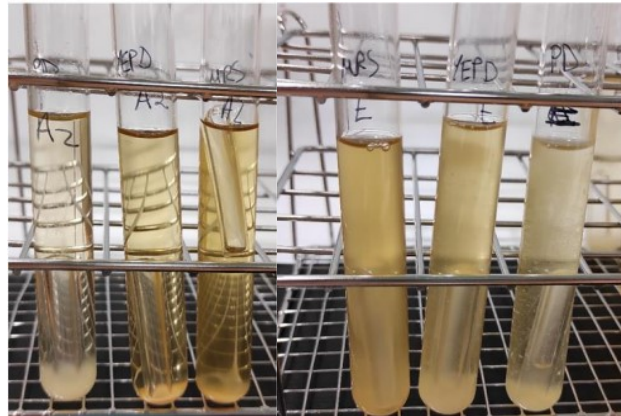


Figura 5. Tubos con caldo YEDP, MRS y PD con campanas Durham de las muestras A2 y E mostrando producción de gas.

Tras el análisis del patrón de restricción específico de dos especies se identificó a la cepa. La morfología observada en el cultivo y la tinción con azul de etileno es la correspondiente a esta levadura (**Figura 6**).

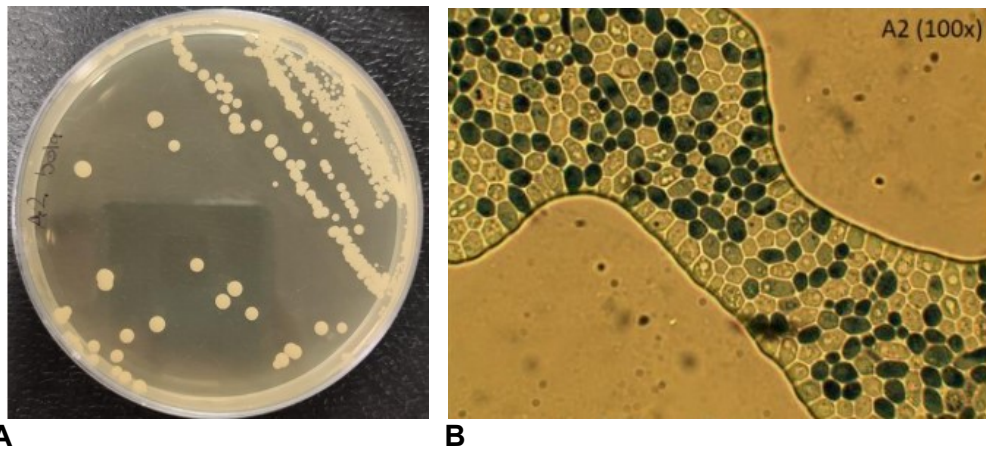


Figura 6. (A) Cultivo en medio Sabouraud de la levadura A2. (B) Tinción de azul de etileno de la levadura A2.

El mismo análisis del patrón de restricción específico se realizó para la otra levadura. Estos resultados permiten identificar la levadura. La morfología observada en el cultivo y la tinción con azul de etileno es la correspondiente a esta cepa (**Figura 7**).

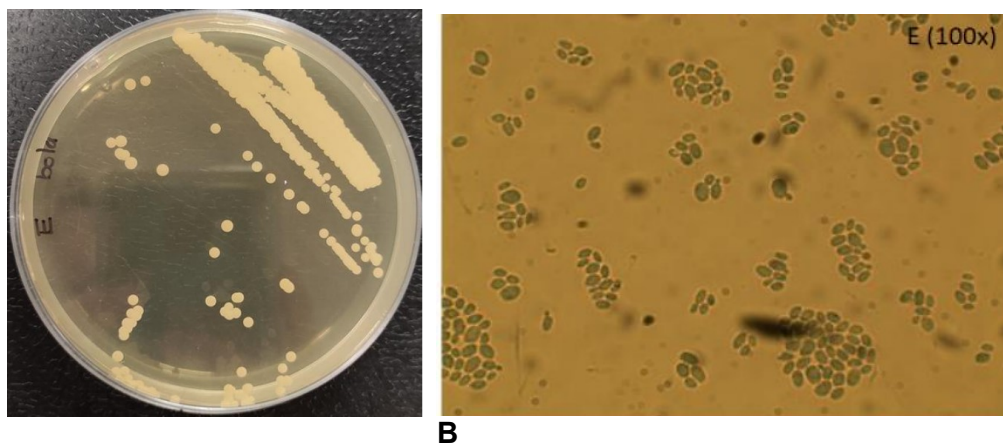


Figura 7. (A) Cultivo en medio Sabouraud de la levadura E. (B) Tinción de azul de etileno de la levadura E.

La identificación de las especies contaminantes productoras de gas nos permitió identificar las cepas. La identificación nos permitió conocer las características de crecimiento de estas levaduras para adaptar el protocolo con la intención de disminuir esta contaminación. Un crecimiento desmesurado de estas levaduras productoras de gas podría provocar el hinchamiento de las bolsas contrariamente a los resultados deseados.

LIMITACIONES

Las limitaciones de este proyecto son la incapacidad de obtener resultados relevantes hasta como mínimo 15 días después de la realización de cada prueba y las contaminaciones en la planta de producción por levaduras.

Al obtener los resultados 15 días después de la realización de la prueba, el tiempo de obtención de los resultados provoca que las mejoras en el protocolo tarden más en realizarse. Además, de la misma manera las posibles condiciones no adecuadas utilizadas tampoco pueden identificarse en una sola prueba.

Las contaminaciones han representado uno de los principales problemas de este proyecto, debido a la ubiquidad y presencia de levaduras en toda la planta de producción la obtención de preinóculos sin levaduras es muy compleja y podría requerir procesos de esterilización que no es posible llevar a cabo en una planta de producción de estas características.

CONCLUSIÓN

Como conclusión se podría afirmar que se han podido comprobar los resultados obtenidos con variaciones del protocolo, obteniendo así cuales serían en principio las condiciones de interés para llevar a cabo la producción del producto a una escala industrial.

FUTURAS PERSPECTIVAS

Este proyecto se ha llevado a cabo en una fase preindustrial, el siguiente paso sería realizar una fase industrial de producción “real” del producto con la maquinaria necesaria.

Antes de poder comenzar esta fase industrial, se debe asegurar la vida útil del producto obtenido en las pruebas preindustriales mediante análisis físico-químicos, organolépticos y microbiológicos a lo largo de aproximadamente 1 año. Otro de los objetivos futuros antes de realizar una fase industrial sería corroborar las conclusiones obtenidas mediante análisis estadísticos de los datos obtenidos.

BIBLIOGRAFIA

1. Información general del sector - asemesa.es [Internet]. [cited 2021 Aug 23]. Available from: <https://asemesa.es/informacion-general-del-sector/>
2. COI. Consejo Oleícola Internacional. Newsletter. 2021;
3. IOOC. International Olive Oil Council (IOOC) Trade standards applying to table olives [Internet]. Document COI/OT/NC No.1 2004. Available from: <http://www.internationaloliveoil.org/>
4. Lanza B. Abnormal fermentations in table-olive processing: Microbial origin and sensory evaluation. *Front Microbiol.* 2013;4:1–7.
5. Departamento Biotecnología de los Alimentos Instituto de la Grasa, (CSIC). Curso elaboración de la aceituna de mesa. Sevilla, España; 2002.
6. Garrido Fernández, A., Heredia-Moreno, A., Minguez-Mosquera, M., Castro-Gomez-Millán, A., Durán-Quitana, M. C., García-García, P. ... & Instituto de la Grasa y sus Derivados. Aceitunas tipo verdes. *Biotecnología de la Aceituna de Mesa*. Sevilla, España: Instituto de la Grasa y sus Derivados; 1985. p. 53–123.
7. Malo PM, Urquhart EA. Fermented Foods: Use of Starter Cultures. 1st ed. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier Ltd.; 2015. 681–685 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00282-8>
8. Hurtado A, Reguant C, Bordons A, Rozès N. Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiol.* 2012 Aug 1;31(1):1–8.
9. Arroyo-López FN, Bautista-Gallego J, Domínguez-Manzano J, Romero-Gil V, Rodríguez-Gómez F, García-García P, et al. Formation of lactic acid bacteria-yeasts communities on the olive surface during Spanish-style Manzanilla fermentations. *Food Microbiol.* 2012;32(2):295–301. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.07.003>
10. Perpetuini G, Prete R, Garcia-Gonzalez N, Khairul Alam M, Corsetti A. Table Olives More than a Fermented Food. *Foods (Basel, Switzerland)*. 2020;9(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32059387/>
11. Bertoluci G, Leroy Y, Olsson A. Exploring the environmental impacts of olive packaging solutions for the European food market. *J Clean Prod.* 2014 Feb 1;64:234–43.
12. Yam KL. *The Wiley encyclopedia of packaging technology*. Vol. 47, Choice

- Reviews Online. 2010. 47-6003-47–6003 p.
13. Barker B. A stand-up pack. United Kingdom; 1996.
 14. THIMONNIER created Doypack® [Internet]. [cited 2021 Aug 23]. Available from: <https://www.thimonnier.com/news/thimonnier-created-doypackr/3/>
 15. Food Additive - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [cited 2021 Aug 23]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/food-science/food-additive>
 16. Madrid Vicente A. Los aditivos en los alimentos y bebidas. In: Ciencia y tecnología de los alimentos. AMV Edicio. 2013. p. 103–19.
 17. Garrido Fernández A, Romero Barranco C. Calidad de las aceitunas de mesa. *Grasas y Aceites*. 1999;50(3):225–30.
 18. Weddig LM, Balestrini CG, Shafer BD. Canned foods : principles of thermal process control, acidification and container closure evaluation. 193 p. Available from: https://books.google.com/books/about/Canned_Foods.html?hl=es&id=tumQwAACAAJ
 19. Argyri AA, Nisiotou AA, Mallouchos A, Panagou EZ, Tassou CC. Performance of two potential probiotic *Lactobacillus* strains from the olive microbiota as starters in the fermentation of heat shocked green olives. *Int J Food Microbiol*. 2014;171:68–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.003>
 20. Bonatsou S, Tassou CC, Panagou EZ, Nychas G-JE. Table Olive Fermentation Using Starter Cultures with Multifunctional Potential. *Microorganisms*. 2017 Jun 1;5(2). Available from: </pmc/articles/PMC5488101/>
 21. Gandul-Rojas B, Gallardo-Guerrero L. Characterization and Processing of Table Olives: A Special Issue. *Foods*. 2020 Oct 15;9(10). Available from: </pmc/articles/PMC7602591/>
 22. Bautista-Gallego J, Botta C, Campus M, De N, Comunian R. Technologies and Trends to Improve Table Olive Quality and Safety. *Front Microbiol* | www.frontiersin.org [Internet]. 2018;1:617. Available from: www.frontiersin.org
 23. *Lactiplantibacillus plantarum* 17-5 | DSM 20205, ATCC 8014, CCM 1904, NCDO 82, NCIB 6376 | BacDiveID:6499 [Internet]. [cited 2021 Aug 23]. Available from: <https://bacdive.dsmz.de/strain/6499>

24. *Lactiplantibacillus plantarum* ITQB M 32 A | DSM 10492 | BacDiveID:6496 [Internet]. [cited 2021 Aug 23]. Available from: <https://bacdiver.dsmz.de/strain/6496>
25. *Lactiplantibacillus plantarum* Lp 39, No. 39 | Type strain | DSM 20174, ATCC 14917, NCDO 1752, WDCM 00104, CCUG 30503, IAM 12477 | BacDiveID:6629 [Internet]. [cited 2021 Aug 23]. Available from: <https://bacdiver.dsmz.de/strain/6629>
26. *Lactiplantibacillus pentosus* 124-2 | Type strain | DSM 20314, ATCC 8041, DSM 43, NCDO 363, NCIB 8026, CCUG 33455, NCIMB 8026, LMG 10755 | BacDiveID:6492 [Internet]. [cited 2021 Aug 23]. Available from: <https://bacdiver.dsmz.de/strain/6492>
27. Rodríguez-Gómez F, Romero-Gil V, Bautista-Gallego J, García-García P, Garrido-Fernández A, Arroyo-López FN. Production of potential probiotic Spanish-style green table olives at pilot plant scale using multifunctional starters. *Food Microbiol.* 2014;44:278–87.
28. Taxonomy browser (*Saccharomyces cerevisiae*) [Internet]. [cited 2021 Aug 23]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=4932&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
29. Abriouel H, Benomar N, Lucas R, Gálvez A. Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally-fermented Aloreña green table olives. *Int J Food Microbiol.* 2011 Jan 5;144(3):487–96.
30. UNE-EN ISO 6887-4:2017 Microbiología de la cadena alimentaria. 2017.
31. Argyri AA, Nisiotou AA, Pramateftaki P, Doulgeraki AI, Panagou EZ, Tassou CC. Preservation of green table olives fermented with lactic acid bacteria with probiotic potential under modified atmosphere packaging. *LWT - Food Sci Technol.* 2015;62(1):783–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.046>
32. Rodríguez-Gómez F, Romero-Gil V, García-García P, Garrido-Fernández A, Arroyo-López FN. Fortification of table olive packing with the potential probiotic bacteria *Lactobacillus pentosus* TOMC-LAB2. *Front Microbiol.* 2014;5:1–9.

AUTOEVALUACIÓN

Esta autoevaluación recoge los datos de las prácticas en Cándido Miró S.A. y el Trabajo de Fin de Grado. En primer lugar, me gustaría agradecer la confianza depositada en mí por parte de la empresa para ayudar en este proyecto. Las prácticas en la empresa Cándido Miró S.A. me han permitido conocer el funcionamiento diario de una empresa de alimentación y de su laboratorio. La organización y el trabajo interdepartamental es esencial en la empresa no solo para llevar a cabo el proyecto en el que he estado involucrada si no para el trabajo diario. El trabajo en equipo tanto del laboratorio como de otros departamentos me han permitido llevar a cabo con éxito este proyecto, ya que mis conocimientos sobre la maquinaria y técnicas necesarias para la producción de la aceituna inicialmente eran mínimos, y una parte esencial de estas prácticas ha sido mi proceso de aprendizaje sobre el funcionamiento en general del proceso de producción de la aceituna de mesa. Esta experiencia me ha proporcionado la oportunidad de aprender a solucionar los problemas diarios que pueden surgir durante las pruebas de un nuevo producto, y analizar las implicaciones de estos en los resultados. Por otro lado, me han permitido poner en práctica algunos de mis conocimientos teóricos sobre microbiología y tecnología de los alimentos, aplicando estos conocimientos tanto para la preparación del preinóculo mediante iniciadores como para el análisis de los resultados obtenidos pude aprender cómo aplicar mis conocimientos teóricos a la práctica en el proyecto. Quería agradecer a la empresa la confianza depositada en mí y mis conocimientos para llevar a cabo las tareas diarias del proyecto, al igual que la ayuda prestada por muchos de los empleados para que pudiera llevar a cabo estas tareas. Esta ayuda me ha permitido no solo aprender sobre tareas en el laboratorio sino sobre aprender el trabajo que realizan el resto de trabajadores diariamente para que la empresa funcione adecuadamente.

La redacción del Trabajo de Final de Grado me ha permitido desarrollar mis habilidades de razonamiento y comparación de datos con tal de obtener conclusiones de los datos obtenidos a lo largo del proyecto. Siendo capaz de extraer conclusiones y obtener un protocolo estandarizado gracias a la comparación de estos datos. También he podido conocer más extensamente y científicamente el proceso de producción de las aceitunas y los últimos avances biotecnológicos en materia de iniciadores.