

## **6. NUEVAS TECNOLOGÍAS EN LA ELABORACIÓN DE LA ACEITUNA DE MESA**

---

*Santiago Ruíz-Moyano Seco de Herrera  
Alberto Martín González  
Alejandro Hernández León  
Rocío Casquete Palencia*

### **1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA PRODUCCIÓN DE ACEITUNA DE MESA**

La aceituna de mesa está considerada como un alimento sano y natural, al que cada día se le atribuyen más efectos beneficiosos, siendo por ello muy apreciada por el consumidor y presentando una elevada tasa de consumo. Este producto es característico de la cuenca mediterránea, donde se produce el 85% del total mundial de aceituna de mesa. Los principales países productores pertenecen a la Unión Europea, destacando entre ellos España, Italia y Grecia. España es el primer productor de aceituna de mesa del mundo, con una producción de 464.500 toneladas en el año 2009, un 17% más de producción que en 2008 (MARM, 2010). La mayor parte de esta producción se dedica a la elaboración de aceitunas verdes. En cuanto a su comercialización, tradicionalmente se ha distribuido mayoritariamente a granel, aunque en los últimos tiempos parece existir una tendencia a disminuir la venta a granel a favor de la venta en envases pequeños, de mayor valor añadido. La mitad de la producción de aceituna de mesa se comercializa para su consumo nacional, mientras que el resto es exportado a una gran cantidad de países.

Por su parte, éste es un producto que tiene una gran importancia económica y social para nuestra región; Extremadura es la segunda Comunidad Autónoma española productora de aceituna de mesa, precedida solamente por Andalucía. La producción del año 2008 fue de 87.210 t; de ellas, 65.010 t en la provincia de Badajoz y 22.200 t en la de Cáceres (MARM, 2009). Del total de aceituna producida, en nuestra región se industrializa el 73,25%. Para ello, Extremadura cuenta con unas 89 industrias de aderezo, 18 de ellas con línea de envasado propia. Al igual que el resto de la industria agroalimentaria española, el de la aceituna de mesa constituye un sector muy atomizado, habiendo un gran nú-

mero de empresas de pequeño y mediano tamaño, cada una de ellas con un procesado propio.

## 2. LOS MICROORGANISMOS Y LA CALIDAD DE LA ACEITUNA DE MESA

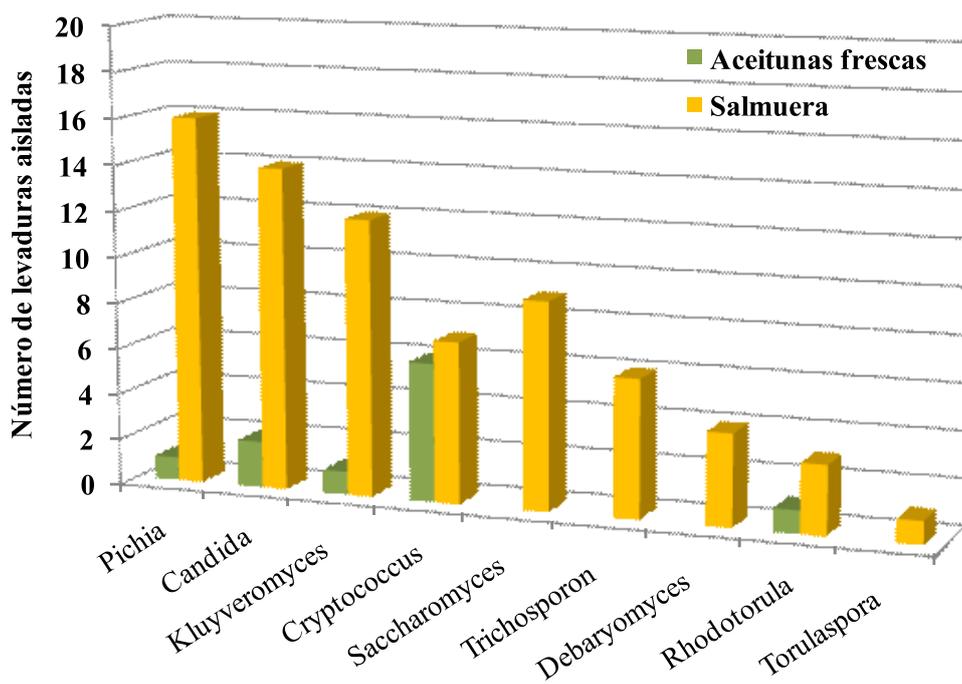
Aunque de forma general, para referirse a este producto se emplea el término *aceituna de mesa*; dentro del mismo se engloban una gran variedad de productos y procesados diferentes. Los procesos básicos de elaboración son los de aderezo, curado en salmuera, oxidación y deshidratación (Real Decreto 1.230/2001, de 8 de noviembre). En buena parte de esos procesados los microorganismos participan de forma activa afectando positivamente a las características finales de las aceitunas, ya que éstas van a sufrir un proceso fermentativo. Esta fermentación se puede subdividir en varias etapas, a lo largo de las cuales se suceden diversos microorganismos que provocan una bajada del pH a valores de 4 unidades o menos, facilitando su conservación a largo plazo. Hay una gran cantidad de estudios recientes encaminados a describir los cambios físico-químicos y microbiológicos que se producen en las salmueras durante el proceso fermentativo (Marquina *et al.*, 1997). Tradicionalmente, los dos tipos de elaboraciones de aceitunas de mesa fermentadas más realizadas en Extremadura, las de estilo español y las fermentadas naturalmente, se han basado en llevar a cabo una fermentación espontánea de las aceitunas en una salmuera. Los principales microorganismos que se desarrollan de forma espontánea en este medio son bacterias ácido-lácticas, especialmente las pertenecientes al género *Lactobacillus* (Vega *et al.*, 2003). Otros microorganismos que pueden tener una gran importancia durante este proceso son las levaduras, habiéndose encontrado que coexisten con las bacterias lácticas en diferentes fases, aislándose incluso al finalizar la fermentación (Marquina *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 2008).

Cada industria tiene su propia forma de elaboración que, en muchos casos, se realiza de una forma artesanal sin llevar un estricto control de muchos de los parámetros que influyen en el producto. Un problema frecuente derivado de lo anterior es la falta de estandarización y homogeneización del producto final, consiguiéndose aceitunas de diferente calidad en cada temporada. Además, si no se lleva a cabo un estricto control durante el procesado y posterior conservación, se pueden producir alteraciones del producto, debido al desarrollo de microorganismos considerados indeseables. Hay estudios que relacionan la presencia de bacterias, muchas de ellas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, con distintas alteraciones de las aceitunas de mesa, como el *alambrado* o *fish eyes* y las *vejigas*, *gas-pocket*, la *zapatería* y otras. La presencia de distintas especies de levaduras durante el proceso fermentativo también se ha asociado a alteraciones del producto final, como el *alambrado* y *vejigas* o *gas-pocket*. Además, algunas levaduras y mohos pueden provocar cambios en las sustancias pécticas produciendo variaciones en la textura de las aceitunas (Garrido-Fernández *et al.*, 1997).

### 3. IMPORTANCIA DE LAS LEVADURAS DURANTE EL PROCESADO DE ACEITUNAS DE MESA

Aunque durante muchos años la presencia de levaduras ha estado relacionada con una pérdida de calidad de las aceitunas, esta idea se ha invertido por los resultados de estudios más recientes que confieren un papel positivo de las levaduras en las características finales de este producto (Garrido-Fernández *et al.*, 1997; Arroyo-López *et al.*, 2008). A este respecto, el Grupo de Investigación de Calidad y Microbiología de los Alimentos ha realizado diversos trabajos que han permitido aislar e identificar especies de levaduras presentes en elaboraciones de aceitunas de industrias radicadas en Extremadura (España), así como otras del Alentejo (Portugal). En esos estudios se encontró que la concentración de levaduras en la materia prima (aceitunas frescas sin fermentar) era de alrededor de 3,0 log UFC/g, mientras que en la salmuera de aceitunas en fermentación, la concentración fue mayor, superior a 4,9 log UFC/ml. A partir de esas muestras se aislaron un total de 83 cepas de levaduras, 11 de materia prima y 72 de salmuera. Dependiendo de la fase de fermentación se observaron diferencias en la distribución de las levaduras por géneros; en las aceitunas frescas *Cryptococcus* fue el género mayoritario, siendo *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces* los predominantes en la salmuera (gráfico 1). Dichas levaduras estaban presentes habitualmente en esas fases de la fermentación de las aceitunas; por ello, nos planteamos analizar su probable influencia positiva sobre las características sensoriales del producto final.

GRÁFICO 1: Géneros de levaduras encontrados en aceitunas frescas y en salmuera en fermentación



### 3.1. Selección de levaduras para su uso como cultivos iniciadores

Para la utilización de levaduras como cultivos iniciadores en la fermentación de aceitunas de mesa es necesario que éstas cumplan una serie de condiciones (crecimiento a altas concentraciones de sal y a distintas temperaturas, baja capacidad alterante o características sensoriales adecuadas). Las elaboraciones de aceitunas fermentadas al estilo español se caracterizan por la adición de porcentajes superiores al 5% de NaCl. Una primera selección de nuestras cepas se realizó en función de la capacidad de crecer a altas concentraciones de NaCl y en un amplio rango de temperaturas. El rango de temperaturas a las que puedan desarrollarse los cultivos iniciadores debe ser amplio, ya que las fermentaciones pueden tener lugar desde los meses de invierno hasta casi entrado el verano. En nuestros estudios, la práctica totalidad de las levaduras aisladas fueron capaces de desarrollarse a concentraciones del 8% de NaCl, además de crecer a temperaturas desde 7°C hasta 35°C. Por lo tanto, estas características no se consideraron determinantes para la selección de potenciales cultivos iniciadores.

Un aspecto fundamental de estos microorganismos es que no produzcan alteraciones del producto. Las levaduras seleccionadas no deben provocar ablandamientos de las aceitunas; para asegurarnos, se estudió su capacidad de degradar polisacáridos de la pared celular como pectinas y xilanos empleando un medio agarizado. Son varias las alteraciones relacionadas con microorganismos capaces de degradar la pared celular de las aceitunas (Garrido-Fernández *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos por nuestro grupo indican que, a diferencia de las levaduras aisladas de aceitunas frescas, la mayoría de las cepas obtenidas de la salmuera tenían una baja actividad sacarolítica (pectinasa y xilanasa). Un porcentaje inferior al 20% de las cepas fueron capaces de utilizar las pectinas o degradar los xilanos de la pared celular de forma significativa (cuadro 1). Por tanto, la mayoría de las cepas de levaduras aisladas serían adecuadas para su utilización como cultivo iniciador en función de la actividad sacarolítica.

El efecto conservador del ácido láctico mediante la bajada del pH a valores cercanos a 4 es uno de los aspectos más importantes para evitar alteraciones en aceitunas fermentadas. Diversos estudios señalan la capacidad de utilizar ácidos orgánicos como fuente de carbono por las levaduras. El consumo del ácido láctico, desdoblándolo en ácidos más débiles como el acético y en otros productos del metabolismo provoca el aumento del pH del medio, favoreciendo de esta manera la colonización de la salmuera por microorganismos indeseables (Marquina *et al.*, 1997). Por tanto, la determinación del tipo de metabolismo y la capacidad de consumo/producción de ácidos orgánicos de las cepas de levaduras es de una gran importancia. Está establecido que las levaduras oxidativas, que forman velos superficiales en los fermentadores, son más consumidoras de ácidos orgánicos que las fermentativas; por este motivo es interesante conocer el tipo de metabolismo de las levaduras que se vaya a usar como cultivo iniciador. Para estos estudios se analizó la capacidad de fermentación de glucosa en medio líquido observándose si las levaduras crecían en velos superficiales oxidando los azúcares y/o fermentándolos. Se estudió igualmente la capacidad de crecer en lactato cálcico como única fuente de carbono en agar, así como la capacidad de degradar/producir diversos ácidos orgánicos realizando para ello un análisis con electroforesis capilar en zona. Los resultados mostraron que todas las levaduras estudiadas crecían en agar con lactato como única fuente de carbono (cuadro 1), aunque algunas cepas crecían muy lentamente. Cuando se estudió la capacidad de fer-

**CUADRO 1: Resultados de la caracterización tecnológica de las especies de levaduras aisladas de la materia prima y de aceitunas fermentadas**

Especie de levadura	Actividad polisacarolítica		Actividad lipolítica		Catalasa	Asimilación lactato
	Pectinas	Xilanos	Lipasa	Esterasa		
<b>Materia prima</b>						
<i>Cryptococcus laurentii</i>	5 <sup>a</sup>	4	1	6		3
<i>Pichia guilliermondii</i>	1	1		1		1
<i>Candida humicola</i>						1
<i>Candida maris</i>	1		1	1		1
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1	1	1	1		1
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1			1		1
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>8</b>
<b>Salmuera</b>						
<i>Pichia anomala</i>	4	5		16	12	14
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	2			12	11	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				9	8	7
<i>Debaryomyces hansenii</i>	4				4	4
<i>Candida maris</i>				5	5	5
<i>Candida rugosa</i>	3		2	2	3	3
<i>Candida humicola</i>				1	1	1
<i>Candida zeylanoides</i>				2		2
<i>Candida inconspicua</i>				1	1	1
<i>Candida parapsilosis</i>				1	1	1
<i>Candida glabrata</i>				1	1	
<i>Trichosporon cutaneum</i>				1	6	6
<i>Torulaspota delbrueckii</i>				1	1	1
<i>Cryptococcus laurentii</i>				7	7	2
<i>Rhodotorula glutinis</i>			2	2	2	
<i>Rhodotorula minuta</i>	1	1		1	1	1
<b>Total cepas</b>	<b>14</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>62</b>	<b>64</b>	<b>54</b>

<sup>a</sup> Número de cepas que muestran crecimiento o actividad.

mentar la glucosa en medio líquido y de consumir/producir ácidos orgánicos, se encontró que un elevado número de cepas crecían formando velos superficiales en medio líquido, consumiendo láctico y produciendo acético (datos no mostrados). Estos resultados apuntan a un metabolismo preferentemente oxidativo de estas cepas, y por ello no serían adecuadas para su selección como cultivo iniciador. Aunque en menor número, se observaron cepas que no disminuían significativamente el contenido en lactato del medio, y no formaban velos superficiales en medio líquido. El metabolismo de estas cepas sería principalmente fermentativo, con una predilección por otras fuentes de carbono antes que por el ácido láctico.

Otras pruebas realizadas estaban dirigidas a seleccionar las cepas que pudieran aportar las mejores características sensoriales durante la fermentación de las aceitunas. La aceituna, en su fracción lipídica, está compuesta principalmente por triglicéridos con un elevado contenido de ácidos grasos insaturados. Gracias a la lipólisis se generan ácidos grasos libres que participan en las características del flavor de las aceitunas. Por lo

tanto, la selección de cepas con una adecuada actividad lipolítica puede mejorar las características sensoriales del producto. Entre las cepas estudiadas, el 5,6% tenían actividad lipasa, aunque el porcentaje se elevó hasta el 86% de las cepas cuando la actividad estudiada fue la esterasa. Otro aspecto interesante desde el punto de vista del aroma de las aceitunas es la capacidad de las levaduras de producir catalasa. Esta enzima evita la acción de los peróxidos sobre las grasas, protegiendo las aceitunas de fenómenos de enranciamiento. Los resultados mostraron que los aislamientos de la materia prima no presentaban actividad catalasa, mientras que la mayoría de las cepas aisladas de la salmuera presentaban esta actividad (cuadro 2).

A partir de los resultados obtenidos en estas pruebas de caracterización tecnológica se seleccionaron varias cepas de levaduras de las especies *P. anomala*, *K. marxianus*, *S. cerevisiae* y *C. maris* por sus adecuadas propiedades mostradas *in vitro*. A pesar de los resultados positivos conseguidos en estos estudios de selección, consideramos necesario completarlos con otros; se pretendía analizar el tipo de interacciones que se producen con otros microorganismos, así como su comportamiento en fermentaciones a escala piloto para comprobar su utilidad a escala industrial.

#### **4. UTILIZACIÓN DE MICROORGANISMOS COMO AGENTE DE BIOCONTROL**

Otro de los aspectos que puede tener una importancia significativa a la hora de utilizar una cepa de levadura como cultivo iniciador sería su capacidad para controlar el desarrollo de microorganismos considerados alterantes, evitando así la utilización de compuestos químicos; es decir su utilidad como agente de biocontrol. En diversos estudios se ha puesto de manifiesto la gran importancia de las levaduras como agentes de biocontrol postcosecha en vegetales (Santos *et al.*, 2004), debido entre otras razones a que pueden crecer rápidamente y colonizar eficientemente la superficie del producto, limitando la accesibilidad de los nutrientes a otros microorganismos patógenos y/o alterantes (Droby *et al.*, 2009). Sin embargo, la identificación, desarrollo y comercialización de un producto de biocontrol basado en microorganismos es un proceso largo y costoso, siendo necesario considerar una gran cantidad de factores como los relacionados con su bioseguridad; su estabilidad genética; que sea compatible con los tratamientos realizados durante el procesado o su efectividad frente a distintos microorganismos (Droby *et al.*, 2009). En nuestro caso nos planteamos estudiar los mecanismos de control que poseen las levaduras aisladas de aceitunas de mesa, frente a otros microorganismos (levaduras, bacterias o mohos) que pueden aparecer durante el procesado o conservación de las aceitunas.

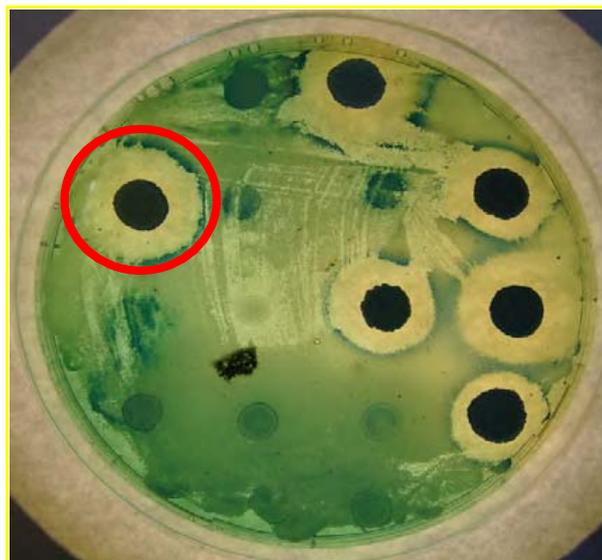
##### **4.1. Estudios de antagonismo entre levaduras aisladas de aceitunas de mesa**

El antagonismo entre levaduras ha sido ampliamente estudiado, habiéndose encontrado diversos mecanismos, como la producción de determinados compuestos antimicrobianos que se engloban dentro del denominado fenotipo *killer*, aunque también

existen otros diferentes como el contacto celular (Schmitt y Breinig, 2002; Nissen y Arneborg, 2003). El fenotipo *killer* fue estudiado por primera vez en 1963 en cepas de *S. cerevisiae*; estas levaduras producen una toxina proteica capaz de matar a otras levaduras, siendo a su vez inmunes frente a ella. Desde entonces, se ha demostrado que una gran variedad de especies producen toxinas *killer*, muchas de ellas involucradas en procesos de fermentación: vinificaciones, fermentaciones de vegetales y de otros productos (Marquina *et al.*, 1997; Regodón *et al.*, 2000; Addis *et al.*, 2001). Además, se han encontrado levaduras *killer* pertenecientes a otros géneros diferentes a *Saccharomyces*, como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Ustilago*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces* (Schmitt y Breinig, 2002).

La amplia difusión del fenotipo *killer* probablemente sea debida a que confiera algún tipo de ventaja competitiva frente a otras cepas sensibles, aspecto que nos planteamos estudiar utilizando nuestras levaduras. Para ello, 51 cepas de levaduras aisladas de aceitunas fermentadas y pertenecientes a los géneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Saccharomyces* fueron caracterizadas en base a su actividad *killer* en distintas condiciones. Para determinar la presencia del factor *killer* se empleó un medio agarizado que se ajustó a diferentes pHs (de 3,5 a 8,5) y concentraciones de NaCl (5, 8 y 10%). El medio se sembró con un césped de una cepa *killer*-sensible sobre el que se inocularon las 51 levaduras problema. Tras 7 días de incubación se analizó la presencia de halo de inhibición alrededor de la cepa problema que sería indicativo de su capacidad *killer* (gráfico 2).

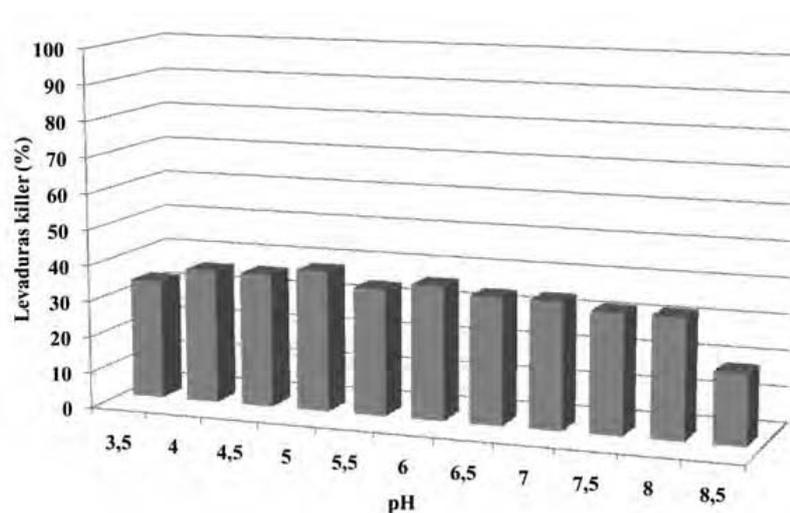
**GRÁFICO 2: Halos de inhibición de levaduras *killer* frente a un césped de una cepa *killer*-sensible**



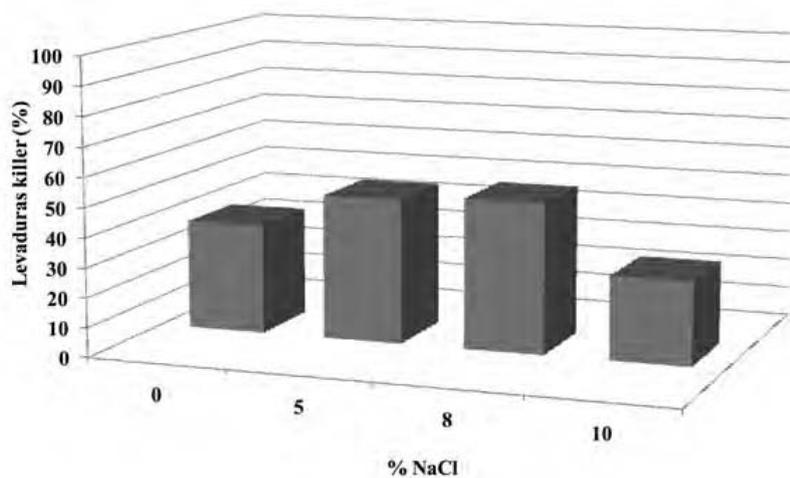
Al analizar el fenotipo *killer* de levaduras aisladas de aceitunas encontramos que un 45% presentaban un fenotipo *killer*. Se encontraron cepas *killer* de todos los géneros estudiados a cada uno de los pH probados, aunque al pH más elevado ensayado (8,5), el

porcentaje de levaduras *killer* fue inferior al resto de pH (gráfico 3). Por otra parte, al analizar la influencia de la sal (gráfico 4) se encontró que concentraciones de 5 a 8% incrementaron el porcentaje de cepas con actividad *killer*, aunque el porcentaje de levaduras *killer* disminuyó en 10% de sal. En ambos estudios se encontraron cepas *killer* pertenecientes a todos los géneros de levaduras analizados, no obstante se observaron grandes diferencias en la actividad *killer* dependiendo de la cepa de levadura estudiada. Según lo anterior, existen diferentes cepas de levaduras que tendrían actividad *killer* en las condiciones de pH y concentración de sal que se dan en las fermentaciones de aceitunas de mesa; esas cepas serían candidatas para su empleo como agentes de biocontrol.

**GRÁFICO 3: Porcentaje de levaduras aisladas de aceitunas que presentaron actividad *killer* a distintos pH**



**GRÁFICO 4: Porcentaje de levaduras aisladas de aceitunas que presentaron actividad *killer* a distintas concentraciones de sal**



Estos estudios se complementaron con otros en los que se analizaron interacciones de inhibición que se producirían entre los aislados y otras levaduras causantes de alteraciones (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilopsis*, *Candida rugosa*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta*, *Trichosporon cutaneum*) (cuadro 2). También en este caso la cepa de levadura parece influir de manera significativa sobre la capacidad *killer* frente a otras levaduras alterantes; se puede observar una gran variabilidad en esta actividad, independiente de la especie a la que pertenecen. Las 9 cepas que tuvieron un espectro de acción más amplio (superior al 50%) frente a levaduras alterantes, pertenecían a *D. hansenii*, *K. marxianus*, *P. anomala*, *P. guilliermondii* y *S. cerevisiae*. Estas levaduras *killer* y sus toxinas podrían ser de utilidad como método de biocontrol para inhibir el desarrollo de levaduras alterantes durante los procesos de fermentación y de conservación de aceitunas de mesa.

**CUADRO 2: Capacidad de inhibición de levaduras aisladas de aceitunas de mesa sobre levaduras causantes de alteraciones**

Levadura seleccionada	Levaduras alterantes	
	% levaduras inhibidas	Especie afectada
<b><i>Candida</i></b>		
<i>C. inconspicua</i>	21,7	<i>C. laurentii</i> , <i>R. glutinis</i> , <i>T. cutaneum</i>
<i>C. lusitaniae</i> )	4,3	<i>C. laurentii</i>
<i>C. maris</i>	0-47,8	<i>C. rugosa</i> , <i>C. albidus</i> , <i>C. laurentii</i> , <i>R. glutinis</i> , <i>R. minuta</i>
<i>C. zeylanoides</i>	4,3-21,7	<i>C. rugosa</i> , <i>C. albidus</i> , <i>R. glutinis</i> , <i>T. cutaneum</i>
<i>C. humicola</i>	13-43,5	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilopsis</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. albidus</i> , <i>C. laurentii</i> , <i>R. glutinis</i> , <i>T. cutaneum</i>
<b><i>Debaryomyces</i></b>		
<i>D. hansenii</i>	4,3-69,6	<i>C. albicans</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. albidus</i> , <i>C. parapsilopsis</i> , <i>C. laurentii</i> , <i>R. glutinis</i> , <i>T. cutaneum</i>
<b><i>Kluyveromyces</i></b>		
<i>K. marxianus</i>	0-87,0	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilopsis</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. albidus</i> , <i>C. laurentii</i> , <i>R. glutinis</i> , <i>T. cutaneum</i>
<b><i>Pichia</i></b>		
<i>P. anomala</i>	0-78,3	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilopsis</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. albidus</i> , <i>C. laurentii</i> , <i>R. glutinis</i> , <i>T. cutaneum</i>
<i>P. guilliermondii</i>	65,2	<i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilopsis</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. albidus</i> , <i>C. laurentii</i>
<b><i>Saccharomyces</i></b>		
<i>S. cerevisiae</i>	0-56,5	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilopsis</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. albidus</i> , <i>C. laurentii</i> , <i>R. glutinis</i> , <i>R. minuta</i> , <i>T. cutaneum</i>

#### 4.2. Interacciones entre levaduras y otros microorganismos aislados de aceitunas de mesa

No tan conocidas como las anteriores son las interacciones entre levaduras y otros microorganismos, como mohos y bacterias, aunque es bastante probable que jueguen un papel importante en el proceso de control microbiano de forma natural. Algunos autores

han propuesto la utilización de levaduras para controlar el desarrollo de otros microorganismos indeseables en diversos alimentos. Santos *et al.* (2004) plantean el empleo de *Pichia membranifaciens* para inhibir el desarrollo de mohos del género *Botrytis* en frutas, permitiendo reducir de este modo el empleo de antifúngicos. Otros estudios realizados en cítricos han empleado con éxito distintas levaduras para controlar el desarrollo de *Penicillium digitatum* (Taqaarort *et al.*, 2008). También se han realizado estudios acerca de las interacciones, tanto positivas como negativas, entre levaduras y bacterias, principalmente bacterias ácido lácticas (Addis *et al.*, 2001; Arnink y Henick-Kling, 2005). Sin embargo, existen pocos estudios acerca de las posibles interacciones entre levaduras y esos microorganismos patógenos y alterantes presentes en aceitunas de mesa fermentadas.

Un análisis en profundidad de este fenómeno tan complejo podría servir para mejorar el control de calidad de las aceitunas de mesa. Para ello, se analizó la interacción en medio sólido entre 12 cepas de levaduras seleccionadas y 12 cepas de mohos alterantes aisladas de aceitunas pertenecientes a las especies *Penicillium expansum*, *Aspergillus flavus*, *Flavobacterium solani*, *Beauveria bassiana*, *Penicillium glabrum*. Todas las levaduras fueron capaces de inhibir más del 23% de los mohos, llegando una de ellas, de la especie *C. inconspicua*, a inhibir al 100% de los mohos ensayados (cuadro 3). Las 5 cepas de levaduras que inhibieron a un mayor número de mohos pertenecían a las especies *P. anomala*, *C. parapsilopsis*, *R. glutinis*, *C. inconspicua* y *D. polymorphus*. Esas cepas serían las mejores para controlar el desarrollo de mohos alterantes. Se observó que levaduras del mismo género y especie presentaban diferente actividad frente a mohos; existe, por tanto, una gran variabilidad en cuanto a la actividad antifúngica de las cepas de levadura ensayadas. Estas cepas podrían utilizarse para controlar el desarrollo de algunos mohos en aceitunas que podría presentar un peligro sanitario, como algunas cepas de *Aspergillus* productoras de Aflatoxina B1, una micotoxina altamente tóxica y carcinogénica (Leontopoulos *et al.*, 2003).

**CUADRO 3: Resultados de interacciones entre cepas de levaduras y otros tipos de hongos aislados de aceitunas**

Levadura seleccionada	Mohos alterantes	
	% mohos inhibidos	Especie afectada
<b><i>Candida</i></b>		
<i>C. boidinii</i>	25,0-41,7	<i>P. expansum</i> ; <i>A. flavus</i> ; <i>B. bassiana</i> ; <i>P. glabrum</i>
<i>C. colliculosa</i>	66,7	<i>P. expansum</i> ; <i>A. flavus</i> ; <i>B. bassiana</i> ; <i>P. glabrum</i>
<i>C. inconspicua</i>	100	<i>P. expansum</i> ; <i>A. flavus</i> ; <i>F. solani</i> ; <i>B. bassiana</i> ; <i>P. glabrum</i>
<i>C. parapsilopsis</i>	66,7	<i>P. expansum</i> ; <i>A. flavus</i> ; <i>B. bassiana</i> ; <i>P. glabrum</i>
<b><i>Debaryomyces</i></b>		
<i>D. polymorphus</i>	75,0	<i>P. expansum</i> ; <i>A. flavus</i> ; <i>F. solani</i> ; <i>B. bassiana</i> ; <i>P. glabrum</i>
<b><i>Kluyveromyces</i></b>		
<i>K. lactis</i>	58,3	<i>P. expansum</i> ; <i>A. flavus</i> ; <i>P. glabrum</i>
<b><i>Pichia</i></b>		
<i>P. anomala</i>	25,0-75,0	<i>P. expansum</i> ; <i>A. flavus</i> ; <i>F. solani</i> ; <i>B. bassiana</i> ; <i>P. glabrum</i>
<b><i>Rhodotorula</i></b>		
<i>R. glutinis</i>	66,7-75,0	<i>P. expansum</i> ; <i>A. flavus</i> ; <i>F. solani</i> ; <i>B. bassiana</i> ; <i>P. glabrum</i>
<b><i>Saccharomyces</i></b>		
<i>S. cerevisiae</i>	58,3	<i>P. expansum</i> ; <i>A. flavus</i> ; <i>B. bassiana</i> ; <i>P. glabrum</i>

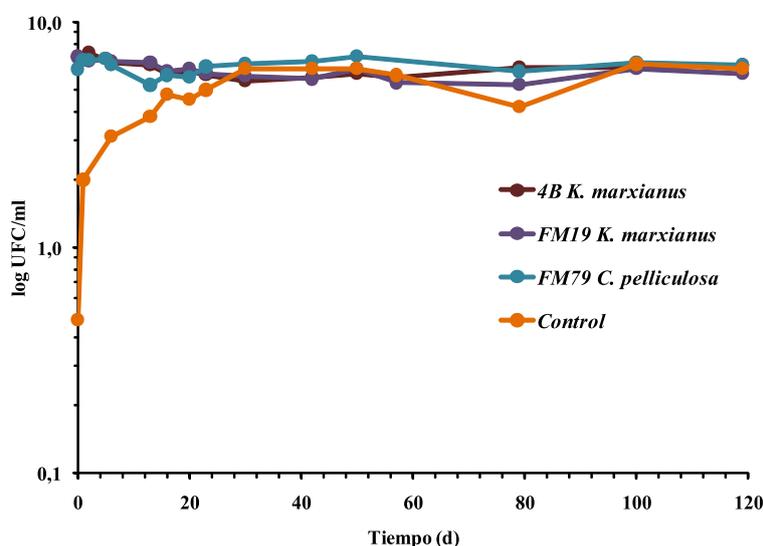
Además, se analizaron las interacciones que se podrían producir entre levaduras seleccionadas aisladas de aceitunas de mesa y diversas bacterias. En una serie de estudios en medio sólido en placa se analizó la influencia de 12 levaduras aisladas de aceitunas de mesa sobre 21 bacterias coliformes y del género *Bacillus*, obtenidas de aceitunas con signos de alteración. Sobre un césped de la bacteria problema se inocularon las levaduras; la presencia de halo de inhibición a los 7-10 días de incubación sería indicativa de la capacidad de la levadura para inhibir el desarrollo de la bacteria. En estos enfrentamientos no se observó que las levaduras afectasen al crecimiento de esas bacterias (datos no mostrados). En otros estudios se analizaron las interacciones en medio líquido entre 17 levaduras seleccionadas y 5 bacterias patógenas de las especies *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Yersinia enterocolitica*. Para ello, las levaduras se crecieron en una salmuera sintética (7% de NaCl a pH 4) a 25°C durante 48 h; tras filtrarlo amicrobicamente, este medio fue inoculado con cada una de las bacterias, analizándose su crecimiento durante 48 h a 25°C, mediante un lector de cinética de crecimiento microbiano (Bioscreen C) que se basa en la medida de la DO de 405nm a 600 nm. En estos estudios no se observó sinergia en el crecimiento entre las levaduras y las bacterias ensayadas, ya que ninguna de las levaduras utilizadas estimulaba el crecimiento de las bacterias patógenas (datos no mostrados), aspecto éste de gran importancia para su empleo en el procesamiento de las aceitunas de mesa fermentadas.

## 5. FERMENTACIONES PILOTO DE ACEITUNAS INOCULADAS CON CULTIVOS INICIADORES DE LEVADURAS

Una vez realizadas las pruebas anteriores, se llevaron a cabo fermentaciones piloto en las que se inocularon 5 levaduras (2 de la especie *P. anomala* y 3 *K. marxianus*), seleccionadas en base a sus adecuadas características *in vitro* para su uso como cultivo iniciador y como método de biocontrol. Para ello, las aceitunas se lavaron 2 veces con agua destilada estéril, se sumergieron en salmuera estéril (NaCl del 6% y pH 4), se inocularon con un cultivo puro de las levaduras seleccionadas y se dejaron fermentar durante 120 días. Como control se realizó una fermentación en las mismas condiciones y sin inocular.

Durante la fermentación se controló la temperatura, que se mantuvo en el rango  $21,2 \pm 1,3^\circ\text{C}$ ; el pH, que se ajustó a valores próximos a 4 con ácido láctico; o la concentración de NaCl, que disminuyó ligeramente durante el proceso situándose en torno al 5%. Además, se realizaron análisis microbiológicos periódicos de la salmuera para controlar el desarrollo de mesófilos totales, *Pseudomonas*, coliformes, enterobacterias, *Lactobacillus* y mohos y levaduras. Al analizar los recuentos encontramos que, como era de esperar, las levaduras dominaron durante la fermentación. En la fermentación control se observó un retraso en el desarrollo de las levaduras; hasta el día 30 de fermentación no se alcanzaron valores similares a los del resto de fermentaciones (gráfico 5). Además, en los primeros 10 días se encontraron enterobacterias en todas las fermentaciones (siempre en concentraciones inferiores a 100 UFC/ml); durante el resto del proceso no se observó un desarrollo significativo de bacterias ni de mohos.

**GRÁFICO 5: Recuentos de levaduras a lo largo de las fermentaciones piloto de aceitunas de mesa**

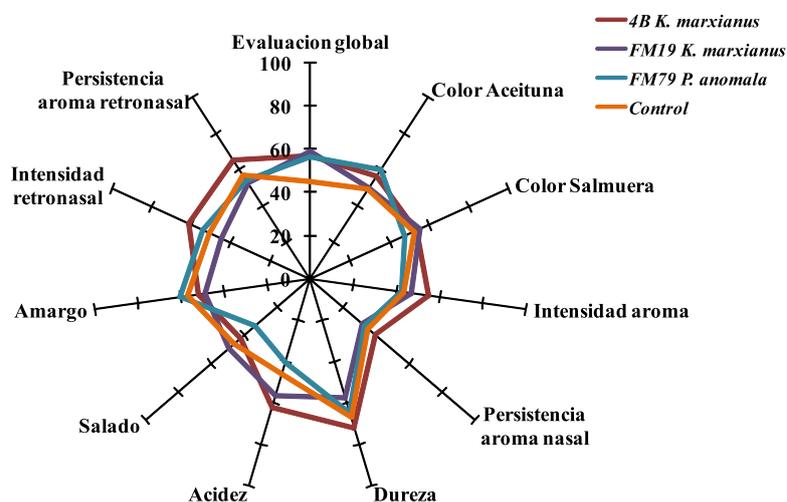


### 5.1. Control de calidad del producto final

Al finalizar la fermentación (día 120), se llevó a cabo un control de calidad del producto final obtenido. Se analizó el contenido de azúcares reductores (mediante el método de Luff-Schoorl); la acidez total (mediante titulación directa con sosa Dornic) y la concentración de NaCl (con el método de Mohr) en la salmuera. Además, se realizó un análisis del color (con un colorímetro portátil Chroma Meter CR-300) y la textura de las aceitunas (utilizando un penetrómetro TAX.T2, Stable Micro System, U.K.); así como un análisis sensorial.

En algunos de los análisis realizados, como el de luminosidad o la textura, se observaron diferencias entre las fermentaciones inoculadas y la Control (resultados no mostrados). En el gráfico 6 se muestran los resultados de la cata realizada a las aceitunas con mejor valoración global, que fueron las obtenidas inoculando con tres levaduras (2 *K. marxianus* y 1 *C. pelliculosa*); esas 3 cepas de levaduras se podrían emplear como cultivos iniciadores para la elaboración de aceitunas de mesa a escala industrial. En dicho gráfico se muestran también los resultados de la cata de las aceitunas no inoculadas (fermentación Control), con una valoración global inferior a la de todas las fermentaciones inoculadas.

**GRÁFICO 6: Resultados del análisis sensorial realizado a aceitunas de mesa fermentadas a escala piloto**



## 6. CONSIDERACIONES FINALES SOBRE EL INTERÉS INDUSTRIAL DE LAS LEVADURAS SELECCIONADAS

En los últimos años, las industrias de elaboración de aceituna de mesa no sólo se han preocupado en realizar inversiones para la renovación de los equipos y la mejora de la calidad del producto final; además, estamos asistiendo a una revolución en la comercialización de nuevos productos, como las aceitunas bajas en sal, aceitunas ecológicas, el empleo de nuevos ingredientes para su relleno (queso, almendra, limón, etc.) o la producción de distintos tipos de patés de aceitunas. Los resultados obtenidos en nuestros trabajos aportarían novedades ventajosas para un sector agroalimentario de gran importancia en nuestra región y que, sin embargo, presenta problemas de estandarización y de pérdidas de calidad del producto final debido a alteraciones microbianas. El empleo de levaduras seleccionadas con actividad antimicrobiana frente a otras levaduras, bacterias y mohos, funcionaría como un eficaz método de biocontrol de posibles alteraciones microbianas, al inhibir el desarrollo de microorganismos. Al mismo tiempo, su uso aseguraría la obtención de aceitunas de mesa con unas características propias y de una elevada calidad físico-química y sensorial. Como ya hemos indicado, tres cepas de levaduras, pertenecientes a las especies *K. marxianus* y *C. pelliculosa*, cumplen todas esas condiciones, pudiéndose emplear como cultivos iniciadores para la elaboración de un producto seguro y de elevada calidad sensorial. Para finalizar, es importante indicar que se pretende realizar estudios posteriores a escala industrial para corroborar los resultados obtenidos hasta el momento.

## BIBLIOGRAFÍA

- Addis E., Fleet G.H., Cox J.M., Kolak D. y Leung T. (2001): *The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses*. International Journal of Food Microbiology, 69 (1-2); 25-36.
- Arnink K. y Henick-Kling T. (2005): *Influence of Saccharomyces cerevisiae and Oenococcus oeni strains on successful malolactic conversion in wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 56 (3); 228-237.
- Arroyo-López F.N., Querol A., Bautista-Gallego J. y Garrido-Fernandez A. (2008): *Role of yeasts in table olive production*. International Journal of Food Microbiology, 128 (2); 189-196.
- Droby S., Wisniewski M., Macarasin D. y Wilson Ch. (2009): *Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm?* Postharvest Biology and Technology, 52; 137–145.
- Garrido-Fernández, A., Fernández Diez, M.J. y Adams, M.R. (1997): *Table Olives. Production and Processing*. Chapman & Hall, London, UK, pp. 134–206.
- Leontopoulos D., Siafaka A. y Markaki P. (2003): *Black olives as substrate for Aspergillus parasiticus growth and aflatoxin B1 production*. Food Microbiology, 20; 119-126.
- Marquina D., Toufani S., Llorente P., Santos A., y Peinado J. M. (1997): *Killer activity in yeast isolates from olive brines*. Adv. Food Sci., 19; 41-46.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (2010): *Avances de superficies y producciones de cultivos*.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (2009): *Anuario de Estadística Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino 2008*. Secretaría General Técnica, Subdirección General de Estadística.
- Nissen P. y Arneborg N. (2003): *Characterization of early deaths of non-Saccharomyces yeasts in mixed cultures with Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol., 180; 257-263.
- Pereira A.P., Pereira J.A., Bento A. y Estevinho M.L. (2008): *Microbiological characterization of table olives commercialized in Portugal in respect to safety aspects*. Food and Chemical Toxicology, 46; 2895–2902.
- Real Decreto 1230/2001, de 8 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y venta de las aceitunas de mesa.
- Regodón J.A., Pérez-Nevado F. y Ramírez, M. (2000): *El fenotipo killer en levaduras vínicas de la D.O. Ribera del Guadiana*. Viticultura y Enología Profesional, 68; 47-52.
- Santos A., Sánchez A. y Marquina D. (2004): *Yeasts as biological agents to control Botrytis cinerea*. Microbiological Research, 159; 331-338.
- Schmitt, M. J., y Breinig, F. (2002): *The viral killer system in yeast: from molecular biology to application*. FEMS Microbiol. Rev., 26; 257-276.

- Taqarort N., Echairi A., Chaussod R., Nouaim R., Boubaker H., Benaoumar A.A. y Boudyach E. (2008): *Screening and identification of epiphytic yeasts with potential for biological control of green mold of citrus fruits*. World J Microbiol Biotechnol., 24; 3031–3038.
- Vega M., Ruiz-Barba J.L., Sánchez A.H., Rejano L., Jiménez-Díaz R. y Garrido A. (2003): *Fermentation profile and optimisation of green olive fermentation using Lactobacillus plantarum LPCO10 as a starter culture*. Food Microbiology, 20; 421-430.