Grasas y Aceites
Vol. 54. Fasc. 3 (2003), 264-271

Características del crecimiento de levaduras de aceitunas de mesa a bajas temperaturas

Por **M.C. Durán Quintana, P. García García** y **A. Garrido Fernández***

Departamento de Biotecnología de Alimentos. Instituto de la Grasa (CSIC).
Apartado 1078. 41012. -- Sevilla (Spain). E-mail:garfer@cica.es

RESUMEN

Características del crecimiento de levaduras de aceitunas de mesa a bajas temperaturas.

Se ha estudiado el comportamiento de *Picchia anomala*, *Picchia membranaefaciens*, *Pichia minuta, Saccharomyces cerevisiae, Candida diddensii, Candida famata* y *Debaryomyces hansenii* a bajas temperaturas. La respuesta, crecimiento relativo determinado a diferentes intervalos de tiempo, se ha estudiado mediante el modelo lineal general (GLM) con medidas repetidas, prestándose especial atención a las interacciones. Las levaduras más resistentes en medio YMGP fueron *P. anomala, C. diddensii,* y *Deb. hansenii* que crecieron a 7 ºC incluso al 8% de sal. En salmueras, además de los efectos principales, fueron también significativas las interacciones, concentración de sal-especie de levadura, tiempo-pH, tiempo-especie de levadura, tiempo-sal-pH y tiempo-sal-especie de levadura. *P. membranaefaciens* mostró mayor tolerancia a la sal en la salmuera que en YMGP. *S. cerevisiae, P. membranaefaciens* y *C. famata* se inhibieron a 7ºC tanto a pH 3,5 como 4, con independencia de los niveles de sal. Combinaciones adecuadas de pH y sal pueden inhibir el crecimiento a 7ºC.

PALABRAS-CLAVE: Aceitunas de mesa - Bajas temperaturas - Levaduras - pH - Sal

SUMMARY

Characteristics of the growth of table olive yeasts at low temperature.

The behaviour of *Picchia anomala*, *Picchia membranaefaciens*, *Pichia minuta*, *Saccharomyces cerevisiae, Candida diddensii, Candida famata* y *Debaryomyces hansenii*, isolated form olive fermentations at low temperature was studied. The response, growth rate, at increasing time intervals, was studied by means of a General Linear Model (GLM) repeated measures, paying special attention to interactions. The most vigorous yeasts in YMGP were *P. anomala, C. diddensii,* y *Deb. hansenii*, who were able to grow at 7ºC and 8% salt. In brine, in addition to the main effects, the interactions salt-yeast, time-pH, time-yeast-species were also significant. *P. membranaefaciens* showed greater salt tolerance in brine than in YMPG. *S. cerevisiae, P. minuta* and *C. famata* were inhibited of both pH 3,5 and pH 4 at 7ºC. A sinergistic effect of salt and pH can inhibit yeast growth at 7ºC.

KEY-WORDS: Low temperatures-pH - Salt -Table olives - Yeasts.

1. INTRODUCCIÓN

La producción de aceitunas de mesa fue de 1.200.000 Tm en la campaña 1999/2000, siendo las principales preparaciones verdes (alrededor del 50%), negras naturales (30-35%) y negras por oxidación (15-25%).

La presencia de levaduras durante la fermentación de aceitunas verdes se observa ya desde los primeros estudios que se hicieron sobre esta fermentación. González Cancho (1965), aisló los géneros *Candida, Hansenula, Picchia, Torulopsis,* y *Saccharomyces.* La población de levaduras alcanzó un máximo en torno a los 20 días, de fermentación y después decreció, aunque siempre estuvieron presentes en la salmuera en proporciones en torno a 10^5-10^7 ufc/ml.

Las bacterias lácticas se inhiben parcialmente en las salmueras de las aceitunas verdes de color cambiante colocadas directamente en salmuera (Garrido Fernández et al, 1997). Pelagatti (1978-1980), Deiane et al (1992) y Marquina et al (1992) aislaron de aceitunas colocadas directamente en salmuera levaduras de los géneros *Candida, Debaryomyces, Kluyveromyces, Pichia, Rhodatorua* y *Saccharomyces.* Balatsouras (1967) aisló también de aceitunas griegas maduras colocadas directamente en salmuera los géneros *Trichosporum, Candida, Pichia, Klueker*a, *Torulopsis* y *Debaryomyces.* Borkakli et al (1993) aisló especies de *Debaryomyces* de fermentaciones de aceitunas de variedades turcas. González Cancho et al (1975) identificó a *Saccharomyces oleaginosus* y *Hansenula anomala* como las principales levaduras responsables de la fermentación de aceitunas negras maduras en salmuera de variedades españolas. Cuando las aceitunas se fermentan en medio aeróbico las especies son: *Torulopsis candida, Debaryomyces hansenii, Pichia membranaefaciens* y *hansenula mrakii* (Durán Quintana et al, 1979).

A pesar de ello, las levaduras pueden alterar las aceitunas. Algunas levaduras de color rosado del género *Rhotorula* son responsables de ablandamiento y otras levaduras de metabolismo fermentativo pueden producir ablandamiento y ampollas (Vaughn et al., 1972; Durán Quintana et al., 1979).

La presencia de levaduras puede continuar después del envasado. La utilización de conservantes para inhibir el desarrollo de las mismas en estos casos se ha estudiado por Rodríguez de la Borbolla y Alcalá et al. (1961) y Marsilio y Cichelli (1992). Asheraou et al (1979) propone la utilización de extractos de ajos para inhibirlas durante la fermentación de las

aceitunas verdes y, finalmente, Rodríguez de la Borbolla y González Pellissó (1972) investigaron su inhibición mediante la combinación de determinados niveles de las características físico-químicas de los envasados. Actualmente, están autorizados el uso de los ácidos sórbico y benzoico y sus sales para estabilizar los productos finales de las diversas presentaciones comerciales de aceitunas.

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la concentración de sal, pH y la temperatura en la evolución de la población de levaduras en las salmueras de conservación de los envasados, con objeto de predecir el comportamiento de cada una de ellas en el producto envasado refrigerado.

2. MATERIAS Y MÉTODOS

2.1. Especies de levaduras

Las especies de levaduras utilizadas en este trabajo proceden de salmueras de aceitunas de diversas variedades (Tabla 1). Las mismas se identificaron de acuerdo con los criterios taxonómicos de Lodder (1970), Barnet et al (1990) y Kurtzan y Fell (1998). La correspondencia entre los nombres originales según Lodder (1970), Kurtzan y Fell (1998) se dan asimismo en la Tabla 1).

2.2. Salmueras

Las salmueras utilizadas proceden de una instalación local. La misma se diluyó conveniente hasta conseguir una concentración de NaCl del 3%. A esta salmuera se le añadió HCl o NaOH, para conseguir un pH de 3,5 y 4,0, así como NaCl para conseguir los niveles de sal requeridos en las experiencias. El contenido de ácidos orgánicos y de azúcares residuales se determinó según describe Montaño et al (1993). Sus características se dan en la Tabla 2.

2.3. Preparación de los inóculos

Los inóculos se prepararon tomando una colonia de cultivo puro de cada especie que se inoculó en 5 ml de medio YMGP (1989), que se incubó después a 25^{o}C durante 48 h. Los tubos se centrifugaron y el residuo sólido se lavó dos veces con solución salina (0,9% NaCl, P/v) y después, se resuspendieron en una solución salina hasta conseguir una concentración alrededor de 10^{7} ufc/ml.

2.4. Inoculación

Las salmueras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 minutos, se les ajustó el pH y la concentración de sal, según el diseño y se esterilizaron

Tabla I

Levaduras ensayadas, nombres tradicionales (Lodder) y sus equivalentes en la literatura reciente (Kurtzman y Fell), abreviaturas utilizadas en las grafías y variedades de las que se han aislado

Especie de levadura Lodder	Kurtzman and Fell	Abreviatura	Variedad aceitunas
Hansenula anomala	*Pichia anomala*	Pa	L, H, V*
Pichia membranaefaciens	*Pichia membranaefaciens*	Pf	L, H, V
Saccharomyces oleaginosus	*Saccharomyces cerevisiae*	Sc	L, H, V
Candida diddensii	*Candida diddensii*	Cd	L, H, V
Pichia minuta	*Pichia minuta*	Pm	Cacereña
Torulopsis candida	*Candida famata***	Cf	L, H, V
Debaryomyces hansenii	*Debaryomyces hansenii*	Dh	L, H, V

* L = Lechín, H = Hojiblanca, V = Verdial ** estado anamorfo de *Deb. hansenii.*

Tabla II

Características químicas iniciales de las salmueras utilizadas en los ensayos

Acidos orgánicos	mg/L	Azucares	mg/L
Fórmico	30	Glucosa	181
Láctico	5760	Fructosa	109
Acético	480	Manitol	63
Cítrico	380	Sacarosa	179
Succínico	120		
Málico	0		

mediante filtración a través de una membrana Millipore de 0,22 m de tamaño de poro.

Alícuotas de 5 ml se colocaron en tubos de 20 ml. Se procedió de la misma manera cuando el medio fue YMGP, solo que en este caso la esterilización se realizó calentando los tubos a 115°C durante 10 minutos.

Los tubos conteniendo YMPG o salmuera se inocularon con 0,1 ml ó 0,05 ml de la suspensión del inóculo, tomándose muestras de los mismos a intervalos predeterminados, según el crecimiento. El recuento de células viables se efectuó mediante siembra en placa de YMGP-agar (Cansado et al, 1989), utilizando un sembrador en espiral (Interscience, Scient Nom La Buteche, Francia). Las placas se incubaron aeróbicamente a 30°C durante 48 h.

2.5. Diseño experimental

El efecto de la concentración de NaCl, pH y temperatura sobre el crecimiento de levaduras se realizó mediante un diseño factorial completo, según se específica en la Tabla 3.

Cada combinación de los niveles de las variables (tratamiento) se inoculó según se ha indicado anteriormente, siguiéndose el crecimiento a lo largo del tiempo mediante los recuentos correspondientes. La respuesta analizada ha sido el logaritmo en base 10 del crecimiento relativo ($\log_{10} Nt/No = \log_{10} Nt - \log_{10} No$). Los tratamientos se repitieron para cada una de las especies.

Los resultados (crecimiento relativo) se analizaron mediante un programa estadístico de modelos lineales generalizados (GLM) con medidas repetidas (Stat Soft, 1998).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La utilización del $\log_{10}$ del crecimiento relativo para la medida de la evolución del crecimiento de las diversas especies tiene la ventaja de ser muy intuitivo, ya que un crecimiento neto se presenta siempre como una cantidad positiva, mientras que la inhibición o muerte de los microorganismos se muestra con valores de cero o negativos. Este mismo sistema, ha sido también utilizado previamente por Charon et al (1998). El análisis de los resultados es muy simple, ya que, entonces, la línea horizontal que pasa por el cero de y (crecimiento relativo) divide al espacio del gráfico en dos regiones. Valores por encima de la misma indican que el crecimiento (alteración) bajo esas condiciones de tratamiento puede tener lugar. Por el contrario, valores por debajo implican inhibición (es decir, estabilización del producto). A pesar de esto, los datos se analizaron asimismo mediante el paquete estadístico de medidas repetidas (cada tubo se fue analizando a lo largo del período de estudio) denominado Modelo Lineal Generalizado (GLM).

3.1. Efecto de las variables utilizando el medio de cultivo YMGP

La respuesta en este medio (óptimo para el desarrollo de las mismas) puede considerarse como la tolerancia intrínseca de cada especie a las diversas condiciones de NaCl, pH y Temperatura. Los efectos de la sal y la temperatura fueron significativos en todas las especies al nivel de $p< 0,05$ (Tabla 4), siendo el crecimiento relativo más elevado a medida que se baja la sal o se aumenta la temperatura. El efecto de interacción de estas dos variables (promediado para todas las especies ensayadas) se puede apreciar claramente en la Figura 1, en la que el tiempo se ha considerado como una variable categórica, al igual que en el resto de los análisis estadísticos (GLM) efectuados. A 7°C, el 3% y 5% de sal dieron resultados similares provocando un crecimiento progresivo, aunque bajo, de todas las especies. El máximo crecimiento se obtuvo hacia los 40 días. Sin embargo, el 8% de sal inhibió completamente el crecimiento.

A 12°C el crecimiento de todas las especies fue rápido cuando la concentración de sal era del 3% y 5% y la población máxima se alcanzó rápidamente, hacia los 7 días. A esta temperatura no hubo disminución de la población cuando se empleó el 8% de sal, como ocurría a 7°C, pero prácticamente se mantuvo en los niveles de inoculación a lo largo de todo el período de estudio.

Efectos de sinergia entre temperatura y NaCl similares a los anteriores se ha observado igualmente por Betts et al (1999) utilizando una mezcla de leva-

Tabla III
Diseño experimental y niveles de las variables, según el medio de cultivo usado

Variable	Niveles de las variables	
	YMGP	Salmueras
NaCl (g/100 ml)	3, 5, 8	5, 8
Temperatura ºC	7, 12	7
PH	6.5	3.5, 4.0
Tamaño inoculo (%)	2	2, 1

Tabla IV
Efectos significativos (p < 0,05) sobre el crecimiento relativo en YMGP y salmuera. Análisis estadístico realizado utilizando el módulo GLM de Statistica para medidas repetidas

Medio de cultivo	Efectos significativos (p < 0,05)
YMGP	Concentración NaCl (sal)
	Temperatura
	Especie de levadura
	Tiempo
	Tiempo concentración NaCl
	Tiempo concentración NaCl x temperatura
Salmuera	Concentración NaCl (sal)
	PH
	Especie levadura
	Concentración NaCl x especie levadura
	Tiempo
	Tiempo x pH
	Tiempo x especie levadura
	Tiempo x concentración NaCl x pH
	Tiempo x concentración NaCl x especie levadura

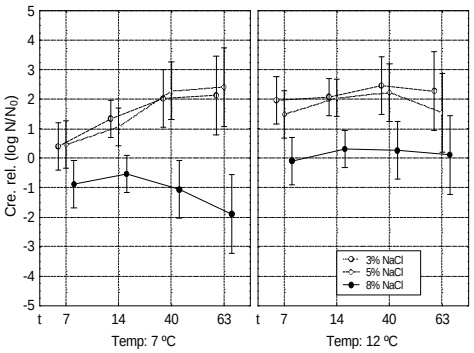

Figura 1
Crecimiento relativo (media para todas las levaduras del estudio) en YMGP, según la temperatura y concentración de NaCl. Tamaño inóculo 2%.

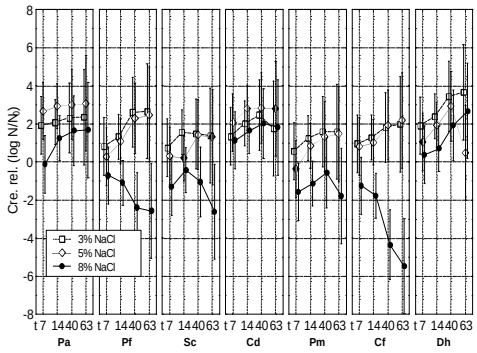

Figura 2
Crecimiento relativo en el medio YMGP, para cada especie de levadura, en función de la temperatura. Tamaño de inóculo 2%. Véase Tabla 3 para el significado de las abreviaturas de las levaduras.

duras, encontrando que solo 10 de las 22 cepas investigadas se desarrollaron a 8°C y que, en cualquier caso, los niveles de sal requeridos para inhibirlas eran más bajos a medida que disminuía la temperatura.

Se han apreciado diferencias significativas (p< 0,05) entre los crecimientos relativos de las diferentes especies. El efecto combinado de la temperatura (Figura 2) y la concentración de sal (Figura 3) mostró un comportamiento diverso. Crecimientos relativos elevados tanto a 7°C como a 12°C, con solo ligeras diferencias entre ellas, se observaron en *P. anomala, C. diddensii,* y *Deb. hansenii* (que mostró el crecimiento relativo más elevado durante todo el período de tiempo de la experiencia).

P. membranaefaciens mostró un menor crecimiento, aunque el mismo casi no se afectó por la temperatura. Sin embargo, la temperatura tuvo un efecto más importante sobre *Sacch. cerevisiae, P. minuta* y *C. famata* que fueron todas inhibidas a 7°C. Este efecto se nota incluso a 12°C en la que solo las dos primeras crecieron de manera clara, mientras que la última (*C. famata)* disminuyó con el tiempo. Este efecto de la temperatura se había ya observado por otros autores (Betts et al 1999, Haaron et al, 1998), aunque las diferencias encontradas entre las especies aisladas de las fermentaciones de aceitunas son muy interesantes para evaluar las posibilidades de cada una de ellas a la hora de provocar alteraciones a bajas temperaturas.

P. anomala, C. diddensii y *Deb. hansenii* apenas se vieron afectadas por la concentración de sal (Figura 3), aunque se aprecia una cierta gradación en

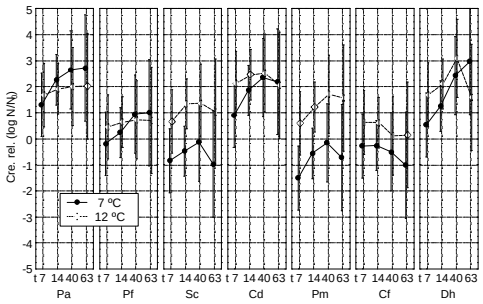

Figura 3
Crecimiento relativo en YMGP, para cada especie de levadura, en función de la concentración de NaCl. Tamaño inóculo 2%. Véase Tabla 3 para el significado de las abreviaturas de las levaduras.

las medias desde el 3% al 8%. Todas estas especies, en general, aumentaron su población con el tiempo. Un comportamiento similar frente a la sal, en un medio sintético conteniendo 1,8-2,25 M NaCl, se ha encontrado también en *H. anomala* (Bellinger and Larhor, 1991). Por el contrario, en nuestro caso, *P. membranaefaciens, Sacch. cerevisiae, P. minuta* y *C. famata* se inhibieron claramente y mostraron una población decreciente a lo largo de todo el período de tiempo estudiado. Esta inhibición fue especialmente intensa para *C. famata.* Sin embargo, todas estas especies crecieron bien al 3 y 5% de NaCl con solo pequeñas diferencias entre ellas. Bellinger et al (1991) encontró una disminución del 67% en la biomasa final en presencia de 1,5 M de NaCl, así como otros cambios metabólicos, en el desarrollo de *Sacch. cerevisiae*. Por otra parte, la alta tolerancia a la sal de *Deb. hansenii* ha sido también puesta de manifiesto en otros estudios (Almagro et al, 2000; Tempel et al, 2000; Betts et al, 2000), considerándose que esta especie tiene una capacidad potencial, debido a ello, para alterar diferentes alimentos (Loureiro y Querol, 1999).

En general, *P. anomala, C. diddensii* y *Deb. hansenii*, fueron las especies de levaduras más vigorosas de todas las ensayadas y fueron capaces de crecer en todo el rango de temperaturas estudiado, incluso al 8% de sal. Betts et al (2000) concluyeron, asimismo, que *Debaryomyces* era el género más resistente al efecto combinado de pH, sal y temperatura.

3.2. Efecto sobre el crecimiento de las salmueras

Las experiencias se realizan solo a 7°C, porque, de acuerdo con los resultados encontrados anteriormente, a ella se daba el mayor efecto inhibidor y era la más adecuada para simular la posible conservación refrigerada del producto. Dado que no se encontraron diferencias entre el 3 y 5% de sal, los niveles de este compuesto se redujeron al 5 y 8%. Los niveles de pH se eligieron en esta investigación siguiendo las recomendaciones de Rodríguez de la Borbolla y Alcalá y González Pellissó (1972) para la conservación de aceitunas únicamente por sus características físico-químicas.

En salmueras, fueron significativos los efectos de todas las variables y las de algunas interacciones (Tabla 4). De todos ellos, el más interesante de comentar es la interacción pH-ClNa con el tiempo (considerada como una variable categórica), que, en promedio, para todas las especies, fue claro (Figura 4). El crecimiento con el 5% fue siempre positivo, aunque a pH 3,5 el período de latencia se extendió durante unas dos semanas aproximadamente. La concentración del 8% provocó, tanto a pH 3,5 como 4.0 un descenso inicial de la población inoculada; la

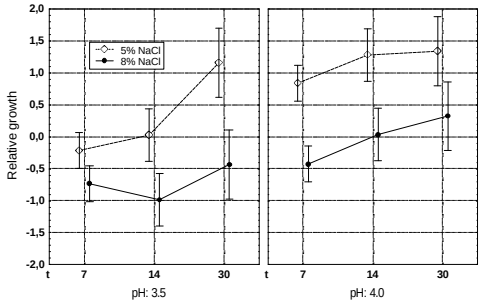

Figura 4
Crecimiento relativo (promedio para todas las levaduras) en salmuera, según pH y concentración NaCl. Tamaño inóculo 2%.

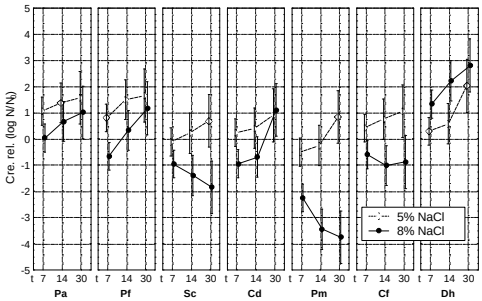

Figura 5
Crecimiento relativo en salmuera para cada levadura, según la concentración de NaCl. Tamaño inóculo 2%. Véase Tabla 3 para el significado de las abreviaturas de las levaduras.

fase de latencia a pH 4 fue de unos 14 días y a pH 3,5 de unos 30 días. Por tanto, al 8% NaCl y pH 3,5 se puede considerar que se consigue una práctica estabilización del producto.

En salmuera, el comportamiento de las diferentes especies con relación a la sal fue también diverso (Figura 5). *Sacch. cerevisiae, C. famata,* y especialmente *P. minuta*, no solo no crecieron sino que disminuyeron sensiblemente la población inoculada con el tiempo, con independencia del pH del medio. *P. membranaefaciens*, que se inhibía en el medio de cultivo de laboratorio, fue más tolerante cuando se inoculaba en las salmueras y, después de un período de latencia de unos 7-14 días, mostró un crecimiento progresivo. El mismo comportamiento se observó también con *C. diddensii*. El máximo crecimiento en las salmueras se observó también con *Deb. hansenii.* En salmuera al 5% de sal y 7^{o} C crecieron todas las especies ensayadas.

Con relación al pH (Figura 6), a 7^{o}C, las especies *Sacch. cerevisiae* y *C. famata* no se desarrollaron a pH 3,5 ni a pH 4,0 sino que mantuvieron casi constante el número de células viables con el tiempo. Sin embargo, *P. minuta* se inhibió de manera muy destacada a pH 3,5 y ligeramente solo a pH 4,0, siendo, por tanto, la especie más sensible al pH. *C. diddensii* mostró un período de latencia relativamente largo (unos 14 días), pero después del mismo se recuperó rápidamente con un crecimiento relativo similar a pH 3,5 y 4,0. *P. anomala, P. membranaefaciens* y *Deb. hansenii* siempre mostraron crecimientos relativos positivos con solo pequeñas diferencias debidas al pH. Finalmente, *Deb. hansenii* fue también la especie más resistente al pH, utilizando salmuera como medio de cultivo, mostrando el crecimiento más rápido y mayor de todas las especies estudiadas. Estos resultados coinciden con otros previos (Charoen et al, 1998; Rodríguez de la Borbolla y Alcalá et al, 1961) y resaltan la capacidad de esta levadura para producir alteraciones.

Si se tienen en consideración, tanto la tolerancia al pH como a la sal, *Deb. hansenii, P. anomala* y *P. membranaefaciens* pueden considerarse como las especies más vigorosas en salmueras.

Las experiencias utilizando inóculos más bajos (1%) (Figura 7) dieron resultados semejantes a los observados con el 2%, aunque con totales de células viables ligeramente inferiores. El efecto de interacción de sal y pH se observa claramente en la Figura 7. No se encuentra ningún efecto inhibidor a 5% NaCl y pH 4,0 ya que todas las curvas se encuentran por encima de cero, y la mayoría de las especies tampoco tuvieron período de latencia. La misma concentración de sal, fue ya ligeramente más inhibidora para *Sach. cerevisiae* y *P. minuta*, que después de un descenso, estabilizaron sus poblaciones.

El resto de las especies, después de un período de latencia de unos 7 días comenzaron a crecer. Por el contrario, cuando se emplea el 8% de sal y pH 3,5 ninguna especie recuperó la población inicial después de 30 días. A este mismo nivel de sal, pero con el pH a 4,0, *Sacch. cerevisiae, P. minuta* y *C. famata* se inhibieron; el resto, se desarrollaron despues de una fase de latencia de 7 días (*P. anomala*) o de 15 días (las restantes).

Estos resultados, indican que, independientemente de la carga inicial de levaduras, es difícil de asegurar la estabilidad del producto, en relación con las levaduras, incluso cuando se utilizan temperaturas de refrigeración. Ello se consigue únicamente con pH 3,5 y 8% NaCl.

A la vista de estos resultados, se comprende la dificultad de controlar las mismas también durante el proceso fermentativo y el período de almacenamiento. Posiblemente, solo con inóculo numeroso de bacterias lácticas, como ensayó Balatsouras et al

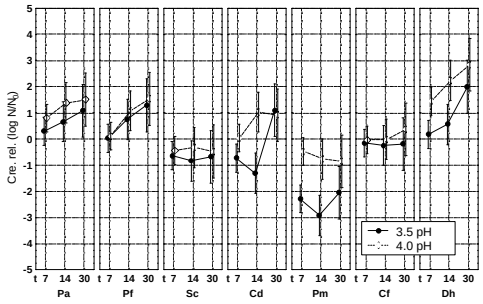

Figura 6
Crecimiento relativo en salmuera para cada levadura, según el pH. Tamaño inóculo 2%. Véase Tabla 3 para el significado de las abreviaturas de las levaduras.

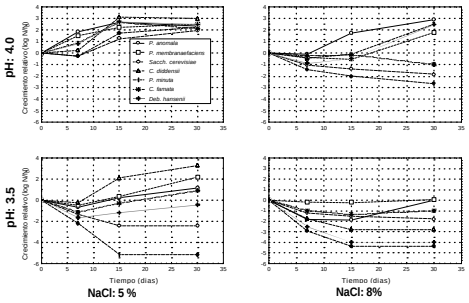

Figura 7
Crecimiento relativo y en salmuera a lo largo del tiempo (X), según el pH y concentración de NaCl para cada levadura ensayada. Tamaño inóculo 1%.

(1983), se pueda controlar el crecimiento de las mismas, aunque este autor observó, igualmente, que en cuanto la población láctica disminuía, aumentaba de nuevo el desarrollo de levaduras.

De la misma manera, esta tolerancia al pH y sal, explica la existencia de algunas de las alteraciones debidas a algunas de estas levaduras descritas previamente en aceitunas,. Así, *Sacch. cerevisiae* y *P. anomala* se han relacionado con la aparición de ablandamiento y alambrado en las aceitunas en salmuera (Vaughn et al 1972). En efecto, las condiciones normales de fermentación (Garrido Fernández et al 1996), según se ha demostrado, permiten el desarrollo de levaduras y, por consiguiente, la aparición de alteraciones. De hecho, estos microorganismos se han identificados como los principales responsables de la fermentación de aceitunas negras naturales en salmuera (González Cancho et al, 1975).

Por ello, es posible que las mismas hayan alterado en proporciones importantes estas aceitunas fermentadas tanto anaeróbicamente (Durán Quintana et al, 1979) como aeróbicamente (Garrido Fernández et al, 1985), aunque en este caso se debe a la facilidad de crecimiento de *Sacch. cerevisiae* en el interior de la pulpa de las aceitunas (Durán Quintana et al, 1979) en donde encuentra posiblemente unas condiciones ambientales más favorables para el crecimiento.

A pesar de todo ello, la aplicación de estos resultados a la conservación de aceitunas a temperaturas de refrigeración no es fácil. La presencia de levaduras en productos envasados y mantenidos a temperatura ambiente es normal y no hay, hasta ahora, ninguna evidencia de que ello represente ningún riesgo para el consumidor ni ello conduce necesariamente a la alteración del producto excepto cuando el crecimiento llega a alcanzar niveles elevados (Garrido Fernández et al, 1997). Este desarrollo, se realiza utilizando los ácidos orgánicos (láctico y acético, principalmente) (Ruiz Cruz y González Cancho, 1969), ya que los azúcares son normalmente utilizados durante la fermentación.

Los estudios realizados pueden suministrar información sobre las posibilidades de crecimiento de levaduras según las condiciones de envasado, aumentar la información para favorecer la estabilidad del mismo y reducir la presencia de estos microorganismos, ya que existe una preocupación creciente sobre los aspectos higiénico/sanitarios de los mismos y el número de informes relacionando las levaduras con posibles infecciones está creciendo en los últimos tiempos (Lonreiro y Querol, 1999).

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su gratitud a la CICYT (AGL2000-1539-CO2-01) y a la Unión Europea (FAIR-97-9526) por la financiación parcial de esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

Almagro, A., C. Prista, S. Castro, C. Quintas, A. Madeira Lopes, J. Ramos, M.C. Loureiro-Dias (2000). Effects of salt on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *Int. J. Food Microbiol*., **56**, 191-197.

Asehraou, A., S. Mohieddine, M. Faid, M. Sherhronchni (1979). Use of untifungal principles from garlic for the inhibition of yeasts and molds in fermenting green olives. *Grasas y Aceites*, **48**, 68-73.

Balatsouras, G.D. (1967). Processing the naturally ripe (black) olives in *Proceedings of the Internatinal Olive Oil Semina*r, Perugia-Spolete. Italy, 491-510.

Balatsouras, G., A. Tsibri, T. Dalles, G. Doutsias (1983). Effects of fermentation and its control on the sensory characteristics of *Conservalea* variety green olives. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 68-74.

Barnett, J.A., R.W. Payne, D. Yarrow (1990). Yeasts. Characteristics and identification. Second edition, pp 1-1002. Cambridge. University Press.

Bellinger, Y., F. Larher (1991). Salt tolerance and osmolyte composition of the yeast *Hansenula anomala* growth in presence od fermentable or non-fermentable sources of carbon. *Sciences des Aliments*, **11**: 37-48.

Borcakli, M., G. Ozay, I. Alperden, E. Ozsan, Y. Erdek (1993). Changes in the chemical and microbiological composition of two varieties of olive during fermentation. *Grasas y Aceites*, **44**: 253-260.

Betts, , G.D., P. Linton, R.J. Betteridge (1999). Food spoilage yeasts: effects of pH, NaCl, and temperature on growth. *Food Control*, **10**, 27-33.

Betts, , G.D., P. Linton, R.J. Betteridge. (2000). Synergistic effect of sodium chloride, temperature and pH on growth of a cocktail of spoilage yeasts: a research note. *Food Microbiology*, **17**: 47-52.

Cansado, J., E. Longo, D. Agrelo, T. G. Villa (1989). Levaduras asociadas a procesos de fermentación espontánea en vinos de Ribeiro. Análisis del homo/heterotalismo y sistema killer de las cepas de *S. cerevisiae. Microbiología. SEM*., **5**: 79-88.

Charoen, C., G.H. Fleet, P.A. Henschke (1998). Effects of temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. *American J. Enology and Viticulture*, **49,** 283-288.

Codex Alimentarious Commission (FAO/WHO). (1974). Norma Internacional recomendada para las aceitunas de mesa. Rome. Italy.

Deiana, P., G.A. Farris, P. Catzedu, G. Madan. (1992). Impriego di fermenti lattici e lienti nella preparazione delle oliva di mensa. *Industrie Alimentarie*, **XXXI**, 1011-1023.

Durán Quintana, M.C., F. González Cancho, A. Garrido Fernández. (1979). Aceitunas negras al natural en salmuera. IX. Ensayos de producción de “alambrado” por inoculación de diversos microorganismos aislados de salmueras de fermentación. *Grasas y Aceites*, **30,** 361-367.

Durán Quintana, M.C.; P. García García, A. Garrido Fernández. (1986). Fermentación en medio aerobico de aceitunas negras maduras en salmuera con inyección alternante de aire. *Grasas y Aceites*, **37,** 242-249.

Farris, G.Z., P. Deiana, M. Buchoni. (1989). La microflora blastomicetica delle drupe e delle salamoia delle olive da mensa. *Industrie Alimentari*, **XXVIII**, 263-266.

Garrido Fernández, A., P. García García, M.C. Durán Quintana. (1985). Conservación de aceitunas negras naturales procedentes de fermentación anaeróbica. *Grasas y Aceites*, **36**, 313-316.

Garrido Fernández, A., M. Brenes Balbuena, P. García García, M.C. Durán Quintana (1996). Conservación de aceitunas verdes o de color cambiante en salmuera. *Grasas y Aceites*, **47**, 197-206.

Garrido Fernández, A.; M.J. Fernández Díez, R.M. Adams (1997). Table olives. Production and processing. Chapman and Hall. London.

González Cancho, F. (1965). Levaduras en la fermentación de aceitunas verdes "estilo español" y su estudio cuantitativo. *Grasas y Aceites*, **16**, 230-234.

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

IOOC (International Olive Oil Council) (1999) World Table Olive Balances. COT/R.61. November. Jaén.

Kurtzman, C.P., J.W. Fell (1998). The yeasts, a taxonomic study. Fourth edition, pp 1-1055. Elsevier. Amsterdam, New York.

Lodder, J. (1970). Criteria and methods used in classification in *The yeasts. A Taxonomic study*. Pp 1-1385. North-Holland Publishing, Amsterdam.

Loureiro, V., A. Querol (1999) The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends Food Sci. and Technol.*, **10**, 356-365.

Marquina, D., C. Peres, F.V. Caldas, J.F. Marques, J.M. Peinado, J. Spencer Martin (1992). Characterization of the yeast population in olive brines. *Letters in Appl. Microbiol.*, **14**, 279-283.

Marsilio, V., A. Cichelli (1992). Influencia del sorbato potásico y del benzoato sódico sobre la estabilidad de las aceitunas de mesa en salmuera. *Grasas y Aceites*, **43**, 66-74.

Montaño, A.; A.H. Sánchez, A. de Castro (1993). Controlled fermentation of Spanish-style green olives. *J. Food Sci.*, **58**, 842-844.

Pelagatti, O. (1978-1980). Sulla microflora lactica e blastomicetica associata alle drupe di alcune cultivars di Olea europae L. *Ann. Ist. Sper. Elaiot.*, **VIII**, 177-192.

Rodríguez de la Borbolla y Alcalá, J.M., M.J. Fernández Díez, F. González Cancho (1961). El empleo del ácido sórbico y sus sales en las aceitunas aderezadas. *Grasas y Aceites*, **12**, 10-15.

Rodríguez de la Borbolla y Alcalá, J.M., F. González Pellissó (1972). Estudios sobre aceitunas envasadas estilo español XI. La inhibición del sedimento. *Grasas y Aceites*, **23**, 107-117.

Ruiz Cruz, J., F. González Cancho (1969). Metabolismo de levaduras aisladas de salmueras de aceitunas aderezadas "estilo español". *Grasas y Aceites*, **20**, 6-11.

StatSoft. (1999). Statistica for Windows (computer Programm Manual), Tulsa,OK (USA)

Tempel, T. van den, M.S. Nielsen (2000). Effects of atmospheric conditions, NaCl, and pH on growth and interactions between moulds and yeasts related to blue cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, **57**, 193-199.

Vaughn, R.H., K.E. Stevenson, B.A. Dave, H.C. Park (1972). Fermenting yeasts associate with softening and gas-pocket formation in olives. *Applied Microbiology*, **23**, 316-320.

Recibido: Diciembre 2002
Aceptado: Diciembre 2002