

Conservación de aceitunas verdes o color cambiante en salmuera

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

Instituto de la Grasa (CSIC). Apartado 1078. Sevilla, España

RESUMEN

Conservación de aceitunas verdes o color cambiante en salmuera

La conservación de aceitunas en salmuera, sin tratamiento previo con una solución de hidróxido sódico, da lugar a una fermentación de características relativamente diversas. El desarrollo de microorganismos depende de la materia prima (variedades), flora adherida a ésta, y condiciones físico-químicas. La presencia de levaduras se observa en todos los casos, aunque sólo algunas especies se encuentran de forma sistemática. El desarrollo de bacterias lácticas (cocos y lactobacilos) está influenciado por la variedad y la concentración de sal (no crecen por encima del 8%). La presencia inicial de bacterias Gram-negativas así como la contaminación con otros gérmenes capaces de causar alteraciones se controla bien mediante la corrección del pH inicial de la salmuera con acético a valores en torno a 4.2 unidades. Cuando la conservación se hace a niveles elevados de acidez acética, láctica o de ambas, el crecimiento de gérmenes prácticamente se inhibe. La aplicación del sistema aeróbico puede ser útil, en ciertos casos, para evitar el arrugado.

PALABRAS-CLAVE: Aceituna de color cambiante – Aceituna de mesa – Aceituna verde – Conservación – Fermentación – Revisión (artículo).

SUMMARY

Preservation in brine of green or turning colour olives

Preservation of olives in brine, without sodium hydroxide treatment, leads to a fermentative process, which characteristics are diverse. The growth of microorganisms depends on the raw material (cultivars), microflora adhered to the exterior olive surface, and physico-chemical conditions. The presence of yeasts is always observed, although only a few species are systematically found. Lactic acid bacteria (cocci and lactobacilli) depends on the cultivar and the NaCl concentration (a level over 8% is inhibitory for them). The presence of Gram-negative bacteria and other spoiling germs are effectively prevented by the initial correction of brines with acetic acid up to a pH level of approx. 4.2. Preservation by high concentrations of acetic, lactic or both acids prevents the growth of practically any microorganism. When preservation is carried set by the aerobic system, shrivelling of fruits is avoided in send sensitive cultivars.

KEY-WORDS: Fermentation – Green olive – Preservation – Review (paper) – Table olive – Turning colour olive.

1. INTRODUCCIÓN

La producción mundial de aceitunas de mesa se encuentra en torno a 1.000.000 Tm. Aproximadamente, el 50% son aceitunas tipo verdes en salmuera, principalmente al estilo español o sevillano, un 20% corresponde a aceitunas tipo negras naturales en salmuera y el resto, alrededor del otro 30%, se elaboran como aceitunas de color cambiante en salmuera. En el caso de los dos primeros, las preparaciones comerciales de aceitunas que incluyen están perfectamente definidas; sin embargo, en el último, las estadísticas del Consejo Oleícola Internacional abarcan una amplia gama de productos tales como las aceitunas tipo negras (por oxidación en medio alcalino), aliñadas, especialidades, etc., aunque todas ellas tienen, no obstante, en común la conservación previa en salmuera. La finalidad de esta etapa es la de mantener a los frutos en las mejores condiciones y no la consecución de una verdadera fermentación, ya que la influencia de la misma apenas llega a observarse en el producto final, como ocurre, por ejemplo, en el caso de las elaboradas como tipo negras. A pesar de ello, durante el tiempo que las aceitunas permanecen en salmuera, generalmente, se produce el desarrollo de una flora microbiana compleja de cuya evolución depende la adecuada conservación o la aparición de alteraciones.

Dada la relativa trascendencia de esta etapa para las características finales de calidad del producto obtenido a partir de estos frutos, dicha conservación ha recibido una limitada atención científica y tecnológica, en comparación con los procesos fermentativos de los otros tipos de aceitunas.

Este trabajo de revisión presenta el estado actual de los conocimientos sobre la conservación de aceitunas colocadas directamente en salmuera, fijando su atención preferentemente en las aceitunas de color cambiante.

2. CONSIDERACIONES SOBRE LA RECOLECCIÓN, TRANSPORTE Y LAVADOS

El grado de madurez que puede encontrarse en estos frutos es bastante amplio y abarca normalmente desde aceitunas verdes a las que presentan una tonalidad rosada en parte o, incluso, la totalidad de la superficie externa. Esta coloración, no obstante, no suele afectar a la pulpa.

Durante la recolección y transporte deben adoptarse las necesarias precauciones para no dañar los frutos, ya que cualquier arañazo, magulladura, etc., puede iniciar un deterioro de los mismos que origine, posteriormente, manchas superficiales, alambrado, ablandamiento, etc. El hecho de que dichas aceitunas vayan a ser posteriormente oxidadas, partidas, etc., no debe servir de excusa para no seguir unos cuidados mínimos durante la manipulación, ya que en muchos casos ello puede evitar pérdidas sensibles en el escogido previo a su posterior preparación y comercialización.

Se procurará que el tiempo que transcurra entre la recolección y la colocación en salmuera sea mínimo para prevenir o minimizar el avance de cualquier proceso degenerativo de la piel o la pulpa. Asimismo, con ello se limitarán los efectos de la respiración y las pérdidas de peso por transpiración, en especial en épocas calurosas y secas.

Debido a que estos frutos se sumergen directamente en salmuera, es recomendable someterlos antes a un lavado para eliminar la mayor parte del polvo adherido, materias extrañas, hojas, etc., que puedan incorporar flora microbiana indeseable a los fermentadores. La misma podría dar lugar, después, a diversas alteraciones. Otros efectos sobre el posible endulzado de los frutos o la adsorción de sal en esta operación no parecen ser importantes. En efecto, Fernández Díez *et al.* (1972) y Durán Quintana *et al.* (1973) estudiaron con detalle la acción de diferentes tipos de lavados estáticos en aceitunas tipo negras naturales, observando que ni la eliminación de polifenoles (endulzamiento) ni la incorporación de sal a la pulpa eran apreciables.

En cambio, se observó en todos los casos el desarrollo de una abundante población de bacilos Gram-negativos, que fue creciendo a medida que se daban sucesivos lavados. La presencia de los mismos se debe indudablemente a la existencia de los mismos ya en la materia prima así como a sus bajos requerimientos nutricionales, muy escasos en las aguas de lavado o primeras horas de la colocación en salmuera. Como consecuencia de esta población microbiana, el pH de las soluciones de lavado suele descender rápidamente hasta valores en torno a 5.0 unidades.

Más recientemente, Torre *et al.* (1993) han estudiado también diferentes formas de lavado de aceitunas verdes (sin tratar con soluciones de NaOH) de la varie-

dad Arbequina, encontrando prácticamente los mismos resultados.

El crecimiento de bacilos Gram-negativos, aparte de la bajada brusca del pH, produce abundante desprendimiento de gases, lo que provoca el rebose de los fermentadores. Además, una parte importante de los mismos pasan a las sucesivas soluciones (aguas de lavado o salmueras de conservación) a través del líquido adherido a las aceitunas o paredes de los recipientes. Ninguno de estos efectos es beneficioso, especialmente el segundo. A estos gérmenes no se les ha relacionado directamente con alteración alguna de estos tipos de aceitunas, pero su clara responsabilidad en la producción de alambrado en las verdes (Borbolla y Alcalá *et al.* 1959 y 1960) ya puede resultar suficiente para no deseárselos, al menos en abundancia.

Por todo ello, parece que lo más conveniente para la eliminación de la suciedad e impurezas iniciales de los frutos es la realización de un lavado dinámico en el que el último contacto con ellos se realice siempre con agua completamente limpia.

3. CONSERVACIÓN EN SALMUERA

3.1. Fermentación tradicional

Este sistema de mantenimiento fue ampliamente utilizado en California para el período transcurrido entre la recolección y el comienzo de la etapa de ennegrecimiento. Las características de la colocación en salmuera están detalladamente descritas por Vaughn (1982). En general, la concentración de las salmueras oscilaba entre el 5 y el 8% en NaCl. Sin embargo, en variedades sensibles al arrugado, tales como Sevillano y Ascolano, la misma se disminuía al 4-5%, nivel que también se utilizaba cuando los frutos se iban a comercializar al estilo siciliano. En algunos casos, las aceitunas se punzaban previamente para facilitar el intercambio osmótico y evitar la aparición de arrugado. Borbolla y Alcalá *et al.* (1971) utilizó concentraciones entre el 3 y 8% para Gordales, Manzanilla y Hojiblanca, sin que en ningún caso notara arrugado por efecto de la sal.

Inmediatamente que las aceitunas se colocan en salmuera, comienza el proceso fermentativo. Sin embargo, el mismo es bastante lento dada la dificultad con que los diferentes substratos alcanzan la salmuera, debido a que en estos frutos la piel y la pulpa permanecen intactas y ofrecen una resistencia elevada a la difusión de dichos compuestos. El abundante desprendimiento de gases inicial no sólo se debe al crecimiento de bacilos Gram-negativos sino también al anhídrico carbónico procedente de la respiración de los frutos, de forma similar a como ocurre en las aceitunas negras naturales en salmuera (García García *et al.*, 1986).

3.1.1. Desarrollo microbiológico

El crecimiento de gérmenes en el transcurso de la fermentación está determinado por la flora original en los frutos, las características de la materia prima, y las condiciones físico-químicas de la fermentación.

a) Gérmenes en la materia prima

Florenzano *et al.* (1973) estudió la flora de microorganismos adherida a los frutos frescos, encontrando que estaba compuesta de una abundante población de bacterias, levaduras y mohos. La misma incluía especies de bacilos Gram negativos, *Bacillus*, *Clostridium*, etc., que no son favorables para el correcto desarrollo posterior a la fermentación, así como de levaduras y bacterias lácticas, en considerable menor proporción. Estos datos vuelven a confirmar la conveniencia de los lavados iniciales anteriormente recomendados.

Pelagatti (1978-80) realizó una investigación detallada de las especies de bacterias lácticas y levaduras presentes en la superficie de 12 variedades italianas, identificando 13 cultivos puros de lactobacilos y 56 de levaduras. Las especies más significativas se recogen en las Tablas I y II respectivamente. Dicho autor considera que, entre las bacterias lácticas, sólo *Lact. plantarum*, *Lact. brevis* y *Lact. fermentum* podían considerarse realmente relacionados con las aceitunas, mientras las otras especies eran sólo huéspedes accidentales debido al terreno, circunstancias climatológicas, etc. Deiana *et al.* (1992) aisló también bacterias lácticas de la superficie de aceitunas, llegando a conclusiones bastante similares, ya que únicamente identificó especies de *Lactobacillus casei* subesp. *casei*, *Lact. plantarum*, *Lact. brevis* y *Streptococcus faecium*. El número de levaduras presentes en todas las variedades fue superior (Tabla II), observándose que el grado de madurez tenía una influencia importante en la selección de las mismas, ya que había especies de levaduras que sólo se encontrarán en las aceitunas maduras. Las mismas pertenecían a los géneros *Pichia* (*P. pinus*, *P. polymorpha*, *P. terricola* y *P. vini* var. *vini*), *Saccharomyces* (*Sacch. fermentati*, *Sacch. globosus*, *Sacch. kluyveri*, *Sacch. oleaceous*, *Sacch. rosei*, *Sacch. rouxii* y *Sacch. ovarum*) y *Torulopsis* (*T. candida*, *T. holmi*, *T. magnoliae* y *stellata*).

Más recientemente, Farris *et al.* (1989) aisló 384 cultivos puros de levaduras pertenecientes a las especies recogidas en la Tabla III.

La influencia de esta flora natural de la materia prima resulta evidente, ya que muchas de las especies tanto de bacterias lácticas como de levaduras se encuentran también habitualmente en las salmueras de fermentación.

b) Las características de la materia prima

La composición de las aceitunas juega un papel fundamental en el tipo de fermentación que pueda establecerse. Borbolla y Alcalá *et al.* (1971) estudió el

Tabla I
Especies más significativas de lactobacilos aisladas de la superficie externa de aceitunas de variedades italianas (Pelagatti, 1978, 80).

Especie	Observaciones
<i>Lact. plantarum</i>	Prácticamente en todas las variedades
<i>Lact. brevis</i>	Prácticamente en todas las variedades
<i>Lact. delbrueckii</i>	Presente en cuatro variedades
<i>Lact. coryniformis</i>	
subesp. <i>coryniformis</i>	Presente en cuatro variedades
<i>Lact. fermentum</i>	Presente en cuatro variedades
<i>Lact. helveticus</i>	Aislado de dos variedades
<i>Lact. casei</i>	
subesp. <i>alactosus</i>	Aislado de dos variedades
<i>Lact. curvatus</i>	Aislado de dos variedades
<i>Lact. hilgardii</i>	Aislado de dos variedades
<i>Lact. leichmannii</i>	Aislado de una variedad
<i>Lact. acidophilus</i>	Aislado de una variedad
<i>Lact. casei</i>	
subesp. <i>rhamnosus</i>	Aislado de una variedad
<i>Lact. xylosus</i>	Aislado de una variedad

Tabla II
Especies más significativas de levaduras aisladas de la superficie externa de aceitunas de variedades italianas (Pelagatti, 1978, 80).

* <i>Candida utilis</i>
* <i>Hansenula anomala</i> , var. <i>anomala</i>
* <i>Hansenula anomala</i> , var. <i>schneggii</i>
* <i>Kloeckera apiculata</i>
* <i>Metschnikowia pulcherrima</i>
* <i>Pichia</i> , <i>fermentans</i>
* <i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>glutinis</i>
<i>Candida guilliermondii</i>
<i>Candida parasitopsis</i>
<i>Candida parasitopsis</i> var. <i>intermedia</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Pichia membranaefaciens</i>
<i>Saccharomyces bayanus</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>elipsoideus</i>
<i>Saccharomyces italicus</i>
<i>Torulopsis glabrata</i>

* Presente en todas las variedades

Tabla III
**Especies de levaduras aisladas
 de la superficie de aceitunas**
 (Farris *et al.*, 1989).

<i>Candida boidinii</i>
<i>Candida diddensiae</i>
<i>Candida krusei</i>
<i>Cryptococcus melibiosum</i>
<i>Rhodotorula glutinis</i>
<i>Rhodotorula minuta</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Hansenula anomala</i>
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

proceso en las variedades Gordal, Manzanilla, Hojiblanca y Verdial encontrando que en la primera siempre se observaba el crecimiento de bacterias lácticas, mientras que en Manzanilla y Hojiblanca, la producción de láctico dependía de las características físico-químicas iniciales de la salmuera. En el caso de Verdial nunca se observó el crecimiento de bacterias lácticas. Torre *et al.*, (1993) tampoco ha encontrado crecimiento de bacterias lácticas en la fermentación en salmuera de aceitunas de la variedad Arbequina en diferentes condiciones, incluso en presencia de concentraciones bajas de sal y con el uso de los correspondientes inóculos. Por otra parte, Durán Quintana *et al.* (1991) encontró, igualmente, la formación de acidez libre de hasta un 1% en aceitunas Gordales en diferentes condiciones de fermentación, con hasta el 6% de NaCl. De la misma manera, García García *et al.* (1992) ha informado del desarrollo de un proceso láctico en la conservación de aceitunas de la variedad Aloreña en presencia de concentraciones de sal tan altas como el 9% e incluso en presencia de una elevada acidez acética inicial. Por lo que respecta a las variedades americanas, Vaughn (1982) indica que Sevillano es la que alcanza acideces más elevadas, mientras que en el resto se pueden encontrar valores entre 0,2 y 0,7%.

Por todo ello, puede afirmarse que existen determinadas variedades en las que suele conseguirse un proceso láctico espontáneo al ser colocadas directamente en salmuera, como es el caso de Gordal (o Sevillano, como se le denomina en California) y Aloreña. En otras, tales como Manzanilla y, especialmente, Hojiblanca, sin embargo, la fermentación se lleva a cabo con más dificultad. Finalmente, existen aquellas, Verdial y Arbequina, en las que no se ha descrito ningún caso de fermentación láctica. Así,

pues, la variedad es un factor bastante determinante del tipo de proceso que siguen las aceitunas verdes o de color cambiante en salmuera.

Se ha tratado de favorecer el crecimiento de bacterias lácticas en aquellas variedades que presentan dificultad. Fernández González *et al.* (1993) observaron que en la variedad Hojiblanca dichas bacterias únicamente crecían espontáneamente en ausencia de sal, mientras que con el 3 y 6% sólo se desarrollaban levaduras. Basado en ello, se pudo inducir un proceso láctico más seguro mediante la inoculación de un cultivo iniciador de *Lact. plantarum*, siendo, en este caso, mayor la supervivencia cuando no se realizaba corrección inicial del pH con acético (0,3% con relación al volumen), según Durán *et al.* (1994).

Con la misma finalidad, Deiana *et al.* (1992) utilizó un cultivo mixto de bacterias y levaduras. En relación con las primeras, eligió las especies *Lact. plantarum* y *Str. faecium* porque eran las más abundantes, tanto en el fruto fresco como en las salmueras correspondiente, y, con respecto a las segundas, *Sacch. cerevisiae* por su capacidad de producir compuestos aromáticos. Entre las conclusiones interesantes que obtuvieron pueden destacarse un posible efecto sinérgico favorable de *Str. faecium* sobre el crecimiento de *Lact. plantarum* así como el desarrollo de una menor acidez en presencia de *Sacch. cerevisiae*, el cual, por contra, mejoró la textura y el flavor del producto fermentado.

c) Características físico-químicas iniciales
 (y de mantenimiento de las salmueras)

La concentración de sal, dentro de los límites tolerados por las bacterias lácticas, es también un factor decisivo para el tipo de proceso fermentativo que se siga en las variedades (Hojiblanca y Manzanilla) menos favorables para dichas bacterias. Borbolla y Alcalá *et al.* (1971) sólo encontraron la formación de acidez en estas salmueras en los casos de utilización de concentraciones bajas de NaCl; aunque este hecho no se daba de manera sistemática, ya que en muchos otros recipientes preparados simultáneamente en las mismas condiciones no aparecía láctico. Fernández González *et al.* (1993) sólo consiguió el desarrollo de las mismas en total ausencia de sal. Así, pues, cuando las propias características del fruto no son propicias para el desarrollo de bacterias lácticas, la concentración de sal adquiere un papel preponderante para determinar el tipo de proceso que se seguirá.

La corrección inicial del pH es una práctica que se está extendiendo también cada vez más. El efecto principal de dicha modificación se manifiesta en la fuerte reducción de la población de bacilos Gram-negativos así como en la prevención del crecimiento de gérmenes del género *Bacillus* durante los primeros días en salmuera. Una vez transcurrido este perío-

odo, suele ocurrir una lenta elevación del pH y la influencia de esta bajada inicial sobre el resto de la flora se reduce.

Cabe, pues, deducir que el proceso fermentativo de estas aceitunas es relativamente complejo y no tan estandarizado como el de las aceitunas verdes o negras naturales. Vaughn (1982) hizo un estudio exhaustivo del mismo durante muchos años en California. Dicho autor reconoce que en los primeros días, la flora es variada (bacilos Gram-negativos y positivos, mohos, etc.). A la semana empiezan ya a aparecer las levaduras fermentativas, que permanecen durante todo el período en que las aceitunas están en salmuera. Algunos de estos gérmenes contribuyen a la formación de una débil acidez. Asimismo, dicho autor encuentra, cuando la concentración de sal no es superior al 5%, el desarrollo de bacterias lácticas desde los cuatro o cinco días de la colocación en salmuera. En este proceso tradicional, las especies encontradas han sido *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus cerevisiae* y *Lactobacillus plantarum*. Sin embargo, el primero nunca llega a dominar, como ocurre en las etapas iniciales de la fermentación de la col (sauerkraut). La población inicial (Gram-negativos, *Bacillus*, mohos, etc.), en cualquier caso, ha desaparecido hacia los 10-14 días de proceso.

Pelagatti (1978-80) observó que esa flora inicial estaba compuesta por los gérmenes indicados en la Tabla IV. Las especies de levaduras identificadas están recogidas igualmente en la Tabla IV. Con respecto al desarrollo de bacterias lácticas, encontró un comportamiento diverso, ya que en el caso de la variedad *Nocellara etnea* se produjo un proceso láctico espontáneo mientras que dichos gérmenes estuvieron, prácticamente, ausentes en las salmueras de *Intesso D'Abruzzo*. Farris *et al.* (1989) hizo, asimismo, un estudio amplio de la flora de levaduras en variedades italianas color cambiante en salmuera, observando que las especies *Saccharomyces cerevisiae* estaba presente en el 9% de las muestras; *Debaryomyces hansenii*, *Candida boidinii* y *Candida krusei* en el 42% y *Hansenula anomala* en el 33%. Las especies de bacterias lácticas en las mismas variedades fueron *Lactobacillus plantarum* (42% de las muestras), *Streptococcus faecium* (33,8), *Lactobacillus casei*, subesp. *casei* y subesp. *pseudoplantarum*, *Lactobacillus brevis* y *Leuconostoc paramesenteroides*, con aproximadamente el 5% cada uno, así como *Leuconostoc mesenteroides* (2,3%).

Finalmente, Marquina *et al.* (1992) ha encontrado en aceitunas en salmueras portuguesas las especies detalladas en la Tabla V.

En general, pues, parece que existe una mayor uniformidad en cuanto a las especies de bacterias lácticas encontradas, cuando las mismas se desarrollan, que en lo que respecta a las levaduras, cuyas

especies parecen depender fuertemente de las variedades, regiones de cultivo, lugar de la fermentación, etc.

Tabla IV
Flora microbiana en el proceso fermentativo de aceitunas de las variedades *Nocellara etnea* e *Intasso D'Abruzzo* colocadas directamente en salmuera (Pelagatti, 1978, 80).

Microorganismos aeróbicos	Mohos
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Geotrichum</i> sp
<i>Micrococcus</i> sp	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Penicillium</i> sp
<i>Sarcina aurantiaca</i>	
<i>Flavobacterium diffusum</i>	
<i>Achromobacter superficialis</i>	
LEVADURAS	
<i>Nocellara</i>	<i>Intosso D'Abruzzo</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Pichia membranaefaciens</i>
<i>Pichia fermentans</i>	<i>Torulopsis holmi</i>
<i>Torulopsis glabrata</i>	<i>Debaryomyces micotianae</i>
<i>Candida valida</i>	<i>Trichosporon</i> sp
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	

Tabla V
Especies de levaduras aisladas por Marquina *et al.* (1992) de salmueras de aceitunas portuguesas colocadas directamente en salmuera

<i>Candida boidinii</i>
<i>Candida hellenica</i>
<i>Candida oleophila</i>
<i>Candida parasitopsis</i>
<i>Candida rugosa</i>
<i>Candida tenuis</i>
<i>Candida valida</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>Pichia anomala</i>
<i>Pichia membranaefaciens</i>
<i>Pichia pseudocactophila</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

3.1.2. Cambios físico-químicos

Son de relativo interés, ya que el producto final normalmente sufre un proceso de preparación antes de ofrecerse al consumidor (oxidación, aliñado, etc.) En general, los azúcares (principalmente glucosa), así como otros substratos fermentables (manitol, ácido málico, etc.) pasan lentamente a la salmuera, sin que se produzca una acumulación de los mismos.

El pH desciende progresivamente hasta valores en torno a 4.0-4.2 unidades y, en el caso de desarrollo de bacterias lácticas, a valores alrededor de 3,6-3,8. La acidez producida es débil en los procesos con presencia de sólo levaduras, 0,2-0,5%, y puede llegar al 1% o más en aquellos en los que crecen lactobacilos.

En cuanto al endulzamiento del fruto, la finalidad principal de la colocación en salmuera en el caso de las aceitunas aliñadas, se produce una lenta difusión de la oleuropeína (principio amargo y fenol mayoritario de la pulpa) hacia la solución. Sin embargo, la misma no se acumula en el líquido, ya que se hidroliza a hidroxitirosol. Este es, por consiguiente, el componente fenólico de mayor concentración en las salmueras de las aceitunas de color cambiante y, posiblemente, el responsable de la inhibición que presentan las mismas (Ruiz Barba *et al.*, 1993).

Los compuestos finales del proceso fermentativo lo constituyen el ácido láctico (en caso de crecimiento de bacterias lácticas), acético, etanol y metanol (en proporciones muy bajas) (Garrido Fernández *et al.*, 1993).

3.2. Fermentación en condiciones aeróbicas

3.2.1. Características del proceso

La aplicación del proceso tradicional de conservación a las aceitunas verdes y de color cambiante presentan algunas dificultades:

a) La acumulación de CO₂ en las salmueras y en el interior de los frutos da lugar a arrugado superficial, que es irreversible en muchos casos.

b) Los frutos más maduros, coloreados superficialmente, presentan, en la práctica la totalidad de las variedades, una gran tendencia al «alambrado».

c) En muchos casos, no se alcanzan unas características de pH y acidez adecuadas para la conservación del producto.

Para eliminar estos inconvenientes se ha aplicado a este tipo de frutos el proceso en medio aerobio, desarrollado para las aceitunas negras naturales (Garrido *et al.*, 1985) procurando, al mismo tiempo, el desarrollo de bacterias lácticas para obtener una mayor acidez. El proceso es aplicable principalmente en el caso de frutos que vayan a ser oxidados con posterioridad o a aquellos otros a los que el ligero oscurecimiento producido por el paso de aire no represente ningún inconveniente para su preparación

final. Dado que la utilización de dicho sistema está ampliamente discutida en el caso de las negras naturales (Garrido Fernández *et al.*, 1985, Durán Quintana *et al.*, 1986, García García *et al.*, 1985, etc.), no se entrará aquí en detalles tecnológicos sobre su empleo.

3.2.2. Desarrollo microbiológico

La presencia de aire, en las cantidades suministradas en este sistema, en el caso de la variedad Gordal, favoreció el crecimiento de bacterias lácticas con respecto al proceso tradicional, posiblemente porque la continua agitación que se consigue en este proceso facilita la difusión de los substratos fermentables al medio (Durán Quintana, *et al.*, 1991). Los lactobacilos iniciaron su crecimiento a los 7-8 días de la colocación en salmuera y llegaron a un máximo alrededor de los 90 días. Al mismo tiempo, se observa también la presencia de cocos lácticos, aunque en número inferior al de los lactobacilos.

Fernández González *et al.* (1993) estudió comparativamente el proceso fermentativo aeróbico espontáneo en aceitunas de la variedad Hojiblanca colocada directamente en salmuera, en presencia de 0,3 y 6% de NaCl. Los resultados fueron similares, tanto en condiciones aerobias como anaerobias, a los encontrados por Borbolla y Alcalá *et al.* (1971), ya que sólo detectaron crecimiento de bacterias lácticas en el caso de no utilizar sal en el líquido inicial. En estas condiciones, *Lact. plantarum* apareció a los 5 días de la colocación en salmuera y alcanzó el máximo hacia los 100-120 días, aproximadamente, las mismas fechas que se han mencionado para la variedad Gordal. En cambio, los cocos lácticos no aparecieron hasta los treinta días. Al principio tuvieron un crecimiento rápido y alcanzaron el máximo incluso antes que los lactobacilos, a los 70-80 días. Su población desde entonces siempre se matuvo por encima de la de *Lact. plantarum*. La única especie encontrada fue *Pediococcus inopinatus*. En la mayoría de las fermentaciones de vegetales (incluyendo las aceitunas negras) la secuencia de aparición normal de bacterias lácticas es, precisamente, la opuesta. Primero se desarrollan los cocos, que desaparecen progresivamente a medida que el pH baja, puesto que, teóricamente, son poco tolerantes a la acidez. Después, crecen los lactobacilos, que son más resistentes a los bajos valores de pH. Por ello, habitualmente, es *Lact. plantarum* el que termina el proceso fermentativo de la práctica totalidad de los vegetales, por su extraordinaria capacidad de supervivencia en medios ácidos. La alteración del orden de aparición en las aceitunas colocadas directamente en salmuera puede ser debido a la corrección inicial del pH hasta 4,1-4,2 con ácido acético así como a la posible adaptación de los cocos a condiciones más extremas, cuando encuentran los nutrientes adecuados.

A la vista de lo anteriormente expuesto, se ha procurado inducir la fermentación láctica, además de

aplicar el proceso aeróbico (Durán *et al.*, 1994). La inoculación con cultivos puros de *Lact. plantarum*, en ausencia de sal, dio lugar a un crecimiento abundante de este organismo durante todo el período de fermentación, desarrollo que fue siempre mayor en presencia de aire.

Esta inoculación masiva de lactobacilos, sin embargo, no evitó la presencia de cocos lácticos en las mismas condiciones y especie mencionadas anteriormente. Los mismos, no obstante, no llegaron a predominar sobre los lactobacilos, en este caso, hasta pasados los 60 días de la colocación en salmuera.

El momento de la inoculación parece tener una influencia importante en la implantación del cultivo iniciador. Durán *et al.* (1993) estudiaron con detalle el efecto de diferentes fechas y concentraciones de sal y adición de glucosa en las variedades Hojiblanca y Cacereña. Los resultados indicaron que, en presencia del 3% de sal, no se observaba la supervivencia parcial (50%) del cultivo iniciador hasta el 5.º día de la colocación en salmuera. En cambio, cuando no se utilizaba sal, a los 3 días ya había una supervivencia importante. Esta fue siempre sensiblemente menor en Cacereña que en Hojiblanca. La adición de glucosa tuvo un efecto bastante limitado en Hojiblanca mientras que fue más destacado y favorable en Cacereña. A medida que el período transcurrido para la inoculación aumentó no se apreció ningún efecto negativo en Hojiblanca, mientras que en Cacereña los porcentajes de supervivencia siempre fueron bajos, especialmente en ausencia de glucosa.

Ensayos pilotos para comprobar estos efectos de la inoculación inicial durante el conjunto del proceso (Durán *et al.*, 1994) indicaron que, efectivamente, la fecha de inoculación era decisiva. En el caso de Hojiblanca, la población del *Lact. plantarum* inoculado persistió durante todo el tiempo de estancia en salmuera sólo cuando se partía de una solución inicial exenta de sal y la inoculación se producía al 5.º día de colocación en salmuera. En cambio, en Cacereña únicamente aquellos tratamientos inoculados el primer día tuvieron una supervivencia razonable. En esta experiencia se comprobó, además, que la corrección inicial del pH no tiene ningún efecto en el posterior crecimiento de *Lact. plantarum*. Asimismo, se confirmó la influencia de la concentración de sal, cuanto más baja mejor, y se encontró un efecto negativo importante de la temperatura: a temperatura ambiente (18-20°C) la fermentación transcurría de manera más favorable que cuando se efectuaba a 30-32 °C, valores próximos al óptimo de los lactobacilos. Este hecho está relacionado con el incremento de la difusión de los polifenoles con la temperatura y el consiguiente aumento de su concentración en la salmuera (Brenes *et al.*, 1993). En cualquier caso, el crecimiento de bacterias lácticas en salmueras de Cacereña fue siempre más limitado y tuvo una duración menor que en Hojiblanca.

Por otra parte, el desarrollo espontáneo de microorganismos durante los primeros días de la colocación en medio aeróbico de aceitunas directamente en salmuera (0 y 3% NaCl) y sin corrección inicial de pH, indicó el predominio desde el principio de bacilos Gram negativos en estas etapas (Fernández González, *et al.*, 1993). Sin embargo, en caso de corrección, pueden llegar, incluso, a desaparecer, dependiendo de la intensidad de la misma. En Cacereña se detecta también la presencia de cocos lácticos (*Leuconostoc paramesenteroides*) así como de *Lact. plantarum* (en menor proporción) aunque la viabilidad posterior de éste parece que es siempre muy limitada. En Hojiblanca sólo se ha llegado a observar un crecimiento escaso de la misma especie de cocos lácticos.

La población de levaduras fue la segunda en importancia en Cacereña y estuvo presente desde los 3 días de la colocación en salmuera, mientras que en Hojiblanca las mismas no fueron observadas hasta los 8 días. De todas formas, la presencia de levaduras es una constante en estos procesos.

En general, puede afirmarse que el proceso fermentativo en medio aeróbico de aceitunas en salmuera está caracterizado por el desarrollo de levaduras (fundamentalmente de tipo facultativo u oxidativo, en menor proporción) y la de *Lact. plantarum* así como por las especies de cocos mencionadas anteriormente. El crecimiento de bacilos Gram-negativos, *Bacillus* y otros gérmenes aeróbicos durante los primeros días de la colocación en salmuera se evita con la corrección inicial del pH con ácido acético. Ello no implica ningún efecto negativo para la posterior implantación de las bacterias lácticas en caso de que las demás condiciones para el crecimiento de éstas sean favorables.

Las especies de levaduras aisladas en estos procesos se encuentran recogidas en la Tabla VI.

Tabla VI
Especies de levaduras aisladas en los procesos aeróbicos de aceitunas verdes y de color cambiante en salmuera variedad Hojiblanca (Fernández González *et al.*, 1993)

Variedad Hojiblanca	Variedad Cacereña
<i>Pichia membraeifaciens</i> (44%)	<i>Pichia minuta</i> (47%)
<i>Pichia vini</i> (10,5%)	<i>Pichia fermentans</i> (21%)
<i>Pichia fermentans</i> (9,0%)	<i>Pichia membraeifaciens</i> (17%)
<i>Hansenula Polymorpha</i> (9,0%)	<i>Rhodotorula</i> sp (9%)
<i>Pichia etchelsii</i> (3,0%)	
<i>Hansenula diminiae</i> (3,0%)	
<i>Devaryomyces hansenii</i> (30%)	
<i>Pichia media</i> (3,0%)	
<i>Saccharomyces oleaceus</i> (1,0%)	
<i>Saccharomyces ovarum</i> (1,0%)	
<i>Torulopsis candida</i> (1,0%)	
<i>Candida lambica</i> (1,0%)	

3.2.3. Cambios en las características físico-químicas

La diferencia más destacada con respecto al proceso anaeróbico es la menor concentración de anhídrido carbónico disuelto, que puede situarse en torno a los 130 mg/ml en anaerobiosis y por debajo de 40 mg/ml en aerobiosis (con el flujo de inyección de aire habitualmente utilizado). De la misma forma, todos los compuestos volátiles a que se hizo alusión en la fermentación anaeróbica disminuyen igualmente (Garrido Fernández *et al.*, 1993).

El pH y porcentaje de acidez depende del crecimiento o no de bacterias lácticas. En el primer caso, se puede llegar a niveles de pH por debajo de 4,0 unidades y valores de acidez de hasta el 1%, mientras que en el segundo los mismos pueden quedar alrededor de 4,3-4,5 y 0,2-0,4%, respectivamente. Los substratos fermentables se consumen en estos procesos a un ritmo mayor que en condiciones anaeróbicas.

Finalmente, ha de insistirse en la necesidad de la corrección inicial del pH para controlar el crecimiento de gérmenes causantes de alteraciones cuando se parte de una concentración baja de sal. Asimismo, ha de evitarse la excesiva aireación ya que, en estos casos, la flora de levaduras puede inducirse hacia especies excesivamente oxidativas, que consumen acidez y elevan el pH, con el consiguiente riesgo de procesos fermentativos anormales.

3.3. Otros sistemas de conservación

En California está bastante extendida la conservación en medio ácido (salt free storage) de las aceitunas tipo negras durante la etapa previa a la oxidación. El sistema fue desarrollado por Vaughn *et al.* (1969) para eliminar la contaminación por el sodio procedente de las salmueras clásicas. Estos autores encontraron que la utilización de una solución conteniendo el 0,67% de ácido láctico, el 1,00 de acético y el 0,30% de benzoato y sorbato sódico mantenía bien los frutos y reducía al mismo tiempo de manera muy importante el número de microorganismos en la solución. Aunque había evidencias de un cierto desarrollo, el mismo no podía de ninguna manera compararse con los niveles encontrados en el proceso fermentativo tradicional. Las levaduras fermentativas pectinolíticas se encontraban muy raramente y los coliformes se mantenían siempre muy escasos debido al bajo pH. Además, el nuevo procedimiento tenía la ventaja de no producir arrugado en aquellas variedades sensibles al mismo y de mejorar el sabor del producto final de algunas otras, particularmente Sevillano. Este último hecho, posiblemente esté causado por la eliminación de los productos formados en el desarrollo de las levaduras fermentativas habituales del proceso tradicional.

El sistema debe ser aplicado bajo una anaerobiosis estricta ya que, de otra forma, crecen en la super-

ficie *Acetobacter*, levaduras oxidativas y mohos que consumen la acidez, bajan el pH y abren el camino a diferentes alteraciones.

La aplicación en España de este método a la variedad Gordal (1,5% acético y 6 y 3% sal) dio lugar al retraso del crecimiento de los diferentes microorganismos del proceso anaeróbico tradicional, pero no a su inhibición. *Lact. plantarum* se desarrolló después de 20 días en salmuera y alcanzó un máximo comparable al alcanzado en otros sistemas de conservación (anaerobio o aerobio), aunque desapareció prácticamente al cabo de los 60-80 días. Más persistente fue la población de cocos lácticos que también apareció sobre la misma fecha, tuvo una evolución similar, aunque con tendencia a disminuir, y se detectó durante todo el tiempo de permanencia de los frutos en salmuera (Durán Quintana, *et al.*, 1991). La población de levaduras surgió también por las mismas fechas que las bacterias lácticas y aunque en medio ácido fue bastante menor que en los sistemas aerobio o anaerobios antes comentados, siempre estuvieron presentes en número importante.

Un comportamiento similar se ha observado en la variedad Aloreña, también muy favorable al crecimiento de bacterias lácticas (García García *et al.*, 1992).

Ello parece indicar que el progresivo enriquecimiento del medio en nutrientes contrarresta el posible efecto inhibitor del bajo pH, permitiendo un crecimiento prácticamente normal al cabo de un cierto tiempo. Los microorganismos más resistentes parecen ser los cocos lácticos (al menos en este caso) y las levaduras, mientras que los lactobacilos desaparecen relativamente pronto. En el caso de las variedades que ofrecen más dificultades al desarrollo de las bacterias lácticas, tal como la Hojiblanca, el desarrollo de las mismas se detiene con una concentración moderada de ácido (0,6%), pero no así el de las levaduras, que tras un período de latencia de unos dos meses crecen y llegan a alcanzar una población importante, que después también disminuye con rapidez. Sin embargo, el sistema así aplicado se mostró satisfactorio para mantener los frutos sin alteraciones y en buenas características tanto para la elaboración de aceitunas tipo negras como de aliñadas. Resultados similares obtuvieron Brenes *et al.* (1986) con aceitunas manzanillas utilizando el 1,2% de acético, láctico o la mezcla de ambos. Los frutos conservados en medio aerobio presentaron, comparativamente una mejor aptitud para la oxidación.

En algunos casos se ha ensayado la posibilidad de favorecer el endulzado de las aceitunas colocadas directamente en salmuera mediante el uso de cultivos iniciadores de levaduras o lactobacilos. Materassi *et al.* (1975) encontraron una serie de levaduras (Tabla VII) que tenían actividad b-glucosidasa y que podían producir la hidrólisis de la oleuropeína. Marquina *et al.* (1992) comprobaron también que algunas de las levaduras habitualmente aisladas de las aceitunas en sal-

muera tenían la misma actividad. Más recientemente, Ciafardini *et al.* (1994) han informado del aislamiento de una cepa de *Lact. plantarum* que también hidroliza la oleuropeína, y consideran que, posiblemente, la desaparición de dicho compuesto de las salmueras podría deberse a este microorganismo.

Tabla VII
Levaduras con actividad glucosidasa

Materassi <i>et al.</i> , 1975	Marquina <i>et al.</i> , 1992
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida hellenica</i>
<i>Candida parasilopsis</i>	<i>Candida oleophila</i>
<i>Candida utilis</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Candida veronae</i>	<i>Pichia anomala</i>
<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>Hansenula anomala</i>	
<i>Lipomyces starkeyi</i>	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	
<i>Trigonopsis variabilis</i>	

Basándose en ello, el proceso tecnológico más desarrollado fue el de Balloni *et al.* (1977), quienes realizaron diversas experiencias con inóculos de levaduras para la obtención de aceitunas verdes sin tratamiento alcalino. Sin embargo, el procedimiento no ha tenido aceptación en la práctica.

4. CONCLUSIÓN

La conservación de aceitunas verdes y de color cambiante en salmuera es un proceso no tan estandarizado como la fermentación de aceitunas tipo verdes estilo español o sevillano o las negras naturales. Para las mismas caben diversas alternativas, cuya elección depende de la materia prima, finalidad de los frutos y tecnología disponible. En cualquier caso, el desarrollo de un proceso láctico que produciría la acidez necesaria para alcanzar unas condiciones físico-químicas que garantizaran la estabilidad del producto durante su permanencia en salmuera sólo se alcanza fácilmente en el caso de algunas variedades (Gordal y Aloreña). En otras su consecución es más incierta, aunque las últimas investigaciones han abierto la posibilidad de conseguirlo en determinadas condiciones.

La aplicación del sistema aeróbico no interfiere la inducción del proceso láctico. Es más, en algún supuesto, incluso, lo acelera. Asimismo disminuye de forma significativa la concentración de anhídrido carbónico disuelto.

La conservación en medio ácido requiere concentraciones elevadas de láctico, acético o ambos y ana-

erobiosis estricta. Aun así, una completa estabilización del producto es problemática, aunque ese limitado desarrollo no es obstáculo para que las aceitunas se conserven perfectamente hasta que se decida su preparación final.

BIBLIOGRAFÍA

- Borbolla y Alcalá, J. M. R. de la; Fernández Díez, M. J. y González Cancho, F. (1959). —«*Estudios sobre el aderezo de aceitunas verdes. XVI. Experiencias sobre el alambrado*».— *Grasas y Aceites* **10**, 221-234.
- Borbolla y Alcalá, J. M. R. de la; Fernández Díez, M. J. y González Cancho, F. (1960). —«*Estudio sobre el aderezo de aceitunas verdes XIX. Nuevas experiencias sobre el alambrado*».— *Grasas y Aceites* **11**, 256-260.
- Borbolla y Alcalá, J. M. R. de la; González Pellissó, F. y González Cancho, F. (1971). —«*Aceitunas verdes y de color cambiante en salmuera*».— *Grasas y Aceites* **22**, 455-460.
- Brenes Balbuena, M., Durán Quintana, M. C. y Garrido Fernández, A. (1993). —«*Concentration of phenolic compounds change in storage brines of ripe olives*».— *J. Food Sci.* **58**, 347-350.
- Brenes Balbuena, M., García García, P., Durán Quintana, M. C. y Garrido Fernández, A. (1986). —«*Estudio comparativo de sistemas de conservación de aceitunas tipo negras*».— *Grasas y Aceites* **37**, 123-128.
- Ciafardini, G., Marsilio, V., Langa, B., y Pozzi, N. (1994). —«*Hydrolysis of oleuropein by Lactobacillus plantarum strains associated with olive fermentations*».— *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4142-4177.
- Deiana, P., Farris, G. A., Catzeddu, P., Madan, G. (1992). —«*Impiego di fermenti lattici e lieviti nella preparazione delle olive da mensa*».— *Industrie Alimentari* **XXXI**, 1011-1023.
- Durán, M. C., García, P., Brenes, M. y Garrido, A. (1994). —«*Induced lactic fermentation during the preservation stage of ripe olives from Hojiblanca cultivar*».— *J. Appl. Bacteriol.* **76**, 377-382.
- Durán, M. C., García, P.; Brenes, M. y Garrido, A. (1995). —«*Lactobacillus plantarum survival in aerobic, directly brined olives*».— *J. Food Sci.* **59**, 1197-1201.
- Durán Quintana, M. C., García García, P. y Garrido Fernández, A. (1986). —«*Fermentación en medio aeróbico de aceitunas negras maduras en salmuera con inyección alternante de aire. Estudio de la influencia de la adición de cloruro cálcico sobre la textura*».— *Grasas y Aceites* **37**, 242-249.
- Durán Quintana, M. C., Brenes Balbuena, M. C., García García, P., Fernández González, M. J. y Garrido Fernández, A. (1991). —«*Aceitunas tipo negras. Estudio comparativo de tres procedimientos para la conservación previa de los frutos de la variedad Gordal (Olea europaea regalis)*».— *Grasas y Aceites* **42**, 106-113.
- Durán Quintana, M. C., Garrido Fernández, A., González Cancho, F. y Fernández Díez (1973). —«*Aceitunas negras maduras en salmuera. III. Estudio físico-químico y microbiológico de la fermentación (Continuación)*».— *Grasas y Aceites* **24**, 149-159.
- Farris, P., Deiana, P. y Budsoni, M. (1989). —«*La microflora blastomicética delle drupe e delle salamoie delle olive da mensa*».— *Industrie alimentari* **XXVIII**, 263-266.
- Fernández González, M. J., García García, P., Garrido Fernández, A. y Durán Quintana, M. C. (1993). —«*Microflora of the aerobic preservation of directly brined green olives from Hojiblanca cultivar*».— *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 226-233.

- Fernández Díez, M. I., Garrido Fernández, A., González Cancho, F., Durán Quintana, M. C. y Cordón Casanueva, J. C. (1972). –«*Elaboración de aceitunas negras de mesa*». – Instituto de la Grasa. Sevilla.
- Florenzano, G., Margheri, M. C. y Pelasi, E. (1973). –«*Recherches sur la microflore des olives, pates grignons et sur l'activité lipolitique d'espèces predominantes*». – Inf. Oleicoles Internationales **60101**, 145-151.
- García García, P., Durán Quintana, M. C. y Garrido Fernández, A. (1986). –«*Fermentación aerobia de aceitunas maduras en salmuera*». – Grasas y Aceites **36**, 14-20.
- García García, P., Durán Quintana, M. C. y Garrido Fernández, A. (1985). –«*Fermentación aeróbica de aceitunas maduras en salmuera*». – Grasas y Aceites **36**, 14-20.
- García García, P., Durán Quintana, M. C., Brenes Balbuena y Garrido Fernández (1992). –«*Lactic fermentation during the storage of Aloreña cultivar untreated green table olives*». – J. Appl. Bact. **73**, 324-330.
- Garrido Fernández, A., García García, P., Sánchez Roldán, F. (1985). –«*Nuevo proceso aeróbico de fermentación de aceitunas negras al natural. Optimización de la columna de aireación*». – Alimentación, Equipos y Tecnología. Mayo-Junio, 73-81.
- Garrido Fernández, A., García García, P., Montaña Asquerino, A., Brenes Balbuena, M. y Durán Quintana, M. C. (1993). –«*Biochemical changes during the preservation stage of ripe olive*». – Processing Die Nahrung **37**, 583-591.
- Marquina, D., Peres, C., Caldas, F. V., Marques, J. F., Peinado, J. M., Spencer-Martins, I. (1992). –«*Characterization of the yeasts population in olive brines*». – Letters in Applied Microbiology **14**, 279-283.
- Materassi, R., Midans, W. and Pelagatti. (1975). –«*Sulla idrolisi della oleuropeina nei lieviti*». – Ann. Ist Esp. Elaiot. **V**, 53-68.
- Pelagatti. (1978-80). –«*Sulla microflora láctica blastomicética associata alla drupe di alcune cultivars di Olea europaea*». – Ann. Ist. Sper. Elaiotec. **VIII**, 195-206.
- Ruiz Barba, J. L., Brenes Balbuena, M., Jiménez Díaz, R., García García, P. y Garrido Fernández, A. (1993). –«*Inhibition of Lactobacillus plantarum by polyphenols extracted from two kind of olive brines*». – J. Appl. Bacteriol. **74**, 15-19.
- Torre, J. E. de la; Moya, E. R., Bota, E. y Sancho, J. (1993). –«*Estudio físico-químico y microbiológico de la fermentación de aceitunas verdes arbequinas*». – Grasas y Aceites **44**, 274-278.
- Vaughn, R. H., (1992). –«*The fermentation of olives*». – Industrial Microbiology. 4.^a Edición, G. Reed (ed.). AVI Publishing Co. Westport, Connecticut, pp. 207-236.
- Vaughn, R. H., Martin, M. H., Stevenson, K. E., Johnson, M. G. y Crampton V. M. (1969). –«*Salt free storage of olives and other produce for future processing*». – Food Technology **23**, 124-126.

Recibido: Octubre 1995
Aceptado: Diciembre 1995