

## Efecto de la aireación y la concentración de cloruro sódico en el desarrollo de la flora microbiana y en los parámetros fisicoquímicos en la fermentación de *Olea europaea* L. c.v. Sevillana al estilo negras naturales en la zona de La Yarada-Tacna

Por C. Clavijo Koc<sup>a</sup>, W. Garragate Rospigliosi<sup>a</sup>, M. Gallegos Arata<sup>a</sup>, P. Lanchipa Sepúlveda<sup>a</sup> y C. Villalobos Ochoa<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio CITELAB del Módulo de Servicios Tacna CITE Agroindustrial. Panamericana Sur Km 1303 Ciudadela Zofratacna-Perú, Dirección postal actual n° 331

\* Corresponding autor: [claudiavck@hotmail.com](mailto:claudiavck@hotmail.com)

### RESUMEN

**Efecto de la aireación y la concentración de cloruro sódico en el desarrollo de la flora microbiana y en los parámetros fisicoquímicos en la fermentación de *Olea europaea* L. c.v. Sevillana al estilo negras naturales en la zona de La Yarada-Tacna**

La fermentación aerobia de aceituna variedad Sevillana estilo negra se desarrolló en los parámetros de acidez fija entre de 1.2 a 1.5%, debido a la concentración de cloruros en la salmuera los cuales se mantuvieron por debajo de 6.5% durante el periodo de fermentación en los 9 tratamientos ensayados lo que permitió el desarrollo de bacterias lácticas. No hubo diferencia en la evolución del pH entre la fermentación con aireación o en condiciones anaeróbicas alcanzándose valores menores a 3.5. La aireación tiene un efecto significativo en la purga del CO<sub>2</sub> en la salmuera e incrementó la población de levaduras aerobias; así mismo en los tratamientos con 12% de sal se favoreció el desarrollo de levaduras fermentativas al inicio de la fermentación. La concentración de azúcares reductores en el fruto disminuyó significativamente en los tratamientos con aireación, acelerando el proceso de fermentación con respecto a la fermentación anaerobia.

**PALABRAS CLAVE:** Aceituna – Aireación – Fermentación.

### SUMMARY

**Aeration and Sodium chloride in the development of microflora and phycochemical parameters on the *Olea europaea* L. cv Sevillana fermentation at the natural black style in La Yarada zone-Tacna**

The aerobic fermentation of the table olive variety, Sevillana a black style, was carried out, taking into account the parameters of fermentation of fixed acidity between 1.2 to 1.5% and depended on the chloride concentration in the brine. This concentration was under 6.5% in the 9 treatments assayed, allowing for the lactic bacteria to develop. In the aerobic fermentation there were no differences in the decline of pH in relation to the anaerobic fermentation, which reached values below 3.5. The air effect is of great significance in the purge of the carbon dioxide in the brine. At the same time, the effect of air significantly affects the increase in aerobic yeast. The facultative anaerobic yeasts developed in the

treatments with an initial salt level of 12% at the beginning of fermentation. The reduction of sugar concentration into the fruit decreased significantly in the treatment with air. Aerobic fermentation is more rapid than anaerobic fermentation.

**KEY-WORDS:** Aeration – Fermentation – Olive table.

### 1. INTRODUCCIÓN

En el sur del Perú, se procesa aceituna negra natural, siendo una de las principales zonas La Yarada, ubicada en la región de Tacna. La principal variedad de aceituna que se procesa es la Sevillana (*Olea europaea* L.), esta planta llegó al Perú en la época de la colonización desde España, adaptándose al clima de la zona, la aceituna se cosechan por el método del ordeño con un índice de madurez de 4.5 a 5 entre los meses de Mayo a Agosto y la fermentación se realiza colocándolas en salmuera con concentraciones de sal de 8° a 12° Bé lo cual varía según la metodología de cada productor, por 4 meses en condiciones anaerobias.

La aplicación de aire en el proceso fermentativo, disminuye la concentración del CO<sub>2</sub> producido por la respiración del fruto y por los procesos fermentativos (Sánchez *et al.*, 2006), la flora que se desarrolla es principalmente aerobia. Al final del proceso los frutos siguen tersos y firmes (Fernández *et al.*, 1992).

Si bien se conoce el desarrollo microbiano de aceitunas negras naturales españolas y de otras latitudes, se desconoce el desarrollo microbiano de las aceitunas negras naturales de la variedad Sevillana. La acidez que se produce en la fermentación sugiere un predominante desarrollo de bacterias lácticas. El factor que mayor medida condiciona el desarrollo de bacterias lácticas es la concentración de sal y en menor medida la presencia de oleuropeína y otros polifenoles que inhiben el desarrollo de estos microorganismos, (Duran *et al.*, 1997).

La concentración de azúcares fermentables en la pulpa difiere entre variedades y disminuyen a medida que avanza la fermentación (Garrido *et al.*, 1997). Según lo observado por Fernández *et al.* (1985), el contenido de azúcares reductores es entre 2% y 3%, en aceituna verde, disminuyendo según avance su estado de madurez. El desarrollo de lactobacilos, se ve favorecido por las vitaminas producidas por levaduras del género *Picchia membranaefasciens*, *Lodderomyces elongisporus* y *Saccharomyces cerevisiae* (Durán *et al.*, 1997). La presencia de levaduras durante el proceso fermentativo ocasionando la producción de CO<sub>2</sub> que lleva a la aparición del alambrado y vejigas (gas-pocket) en los frutos (García *et al.*, 1985); además algunas levaduras y la presencia de mohos se asocian al ablandamiento del fruto (Garrido *et al.*, 1979). En aceitunas marroquíes, la fermentación predominante es por *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus pentosaceus*. (Ghabbour *et al.*, 2011), a diferencia, en aceitunas negras naturales de Grecia y España los microorganismos que predominan son las levaduras. (Balatsouras, 1967; Garrido *et al.*, 1997).

El objetivo del presente trabajo es conocer el efecto que tiene la aplicación de la aireación en la evolución del proceso fermentativo y en las características finales de aceitunas negras naturales de la variedad Sevillana en el sur del Perú.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materia Prima

Los frutos procesados son de la variedad Sevillana (*Olea europaea* L), recolectados con un índice de madurez de 4.5. (COI, 1985), a inicios del mes de Junio, 2012.

### 2.2. Fermentación

La fermentación se llevó a cabo en la zona de la Yarada a Latitud: 18° 12' 41.3" y Longitud: 70° 31' 25.9"; la temperatura osciló entre 9-24 °C, datos recopilados de Senamhi-estación La Yarada.

Los tanques de fermentación son de fibra de vidrio con una capacidad de 1000 litros y un contenido neto de 700 kg de aceituna, los cuales disponen de un sistema de aireación similar al descrito por García *et al.* (1985).

### 2.3. Análisis Físicoquímicos

El pH se determinó potenciométricamente en un equipo marca Jenway modelo 3510; la acidez total y acidez fija se midió mediante la técnicas descritas por Amelio & De Mauro (2000), la cuantificación de azúcares reductores se realizó por espectrofotometría utilizando la metodología de Smogyi y Nelson (Nelson, 1944) y la concentraciones de cloruro de sodio y CO<sub>2</sub> disuelto en salmuera se midieron según la metodología de Fernández (1985).

### 2.4. Análisis Microbiológico

Para la cuantificación de *Enterobacteriaceas* se utilizó la técnica de la Norma AOAC, (2007); el recuento de bacterias ácido lácticas se realizó utilizando medio de cultivo Agar MRS marca Merck, posteriormente se realizaron pruebas complementarias al 5% de las colonias aisladas: prueba de la catalasa, prueba de la oxidasa y coloración gram para confirmar el desarrollo de *Lactobacillus sp* u otras bacterias lácticas, se utilizó la técnica de recuento en placa por diseminación (ICMSF, 1983). En el aislamiento de levaduras se utilizó el medio OGYE adicionado con oxitetraciclina al 0.2% y se analizó la salmuera mediante la técnica de recuento en placa por diseminación (ICMSF, 1983). Para realizar el recuento de levaduras anaerobias facultativas de metabolismo fermentativo, se utilizaron jarras Gaspar con atmósfera modificada con CO<sub>2</sub>.

La identificación de bacterias lácticas se realizó mediante el sistema API 50 CH y en la identificación de levaduras se utilizó el sistema API 20C AUX (API SYSTEMS, Francia).

### 2.5. Diseño de las experiencias

Se realizó una experimentación Factorial 2<sup>3</sup> (Software Stat Graphic Centurión)

**Factores:** Aireación (L/h/Lc, litros de aire/hora/litro de capacidad), niveles: 0.0-0.1 y 0.2 (es decir 0, 100 y 200 L de aire × hora<sup>-1</sup>), Cloruro de Sodio (%), inicial p/v) niveles: 6-9-12. Se procesaron un total de 18 tanques con 700 kg de aceituna, obteniendo un total de 9 tratamientos (Tabla 1).

**Variables Dependientes:** Recuento de levaduras aerobias (log ufc mL<sup>-1</sup>), recuento de levaduras fermentativas (log ufc mL<sup>-1</sup>), recuento de bacterias lácticas (log ufc mL<sup>-1</sup>), concentración de acidez fija (g ac. láctico 100 mL<sup>-1</sup>), concentración de CO<sub>2</sub> disuelto

**Tabla 1**  
Tratamientos realizados en la experimentación factorial 2<sup>3</sup> y concentración de azúcares reductores en la salmuera a los 30 días de fermentación

Código de los tratamientos	NaCl %	Aireación L h <sup>-1</sup>	Azúcares Reductores
T1	6	0.0	1.16 c*
T2	9	0.0	0.90 b
T3	12	0.0	1.52 d
T4	6	0.1	0.53 ab
T5	9	0.1	0.62 ab
T6	12	0.1	0.54 ab
T7	6	0.2	0.36 ab
T8	9	0.2	0.36 ab
T9	12	0.2	0.52 ab

Nota: \* valores seguidos de las mismas letras indican que son estadísticamente iguales con p < 0.05%

en salmuera ( $\text{mg de CO}_2 \text{ 100 mL}^{-1}$ ), concentración de cloruro de sodio en salmuera ( $\text{g 100 mL}^{-1}$ ), concentración de azúcares reductores en fruto al mes de fermentación ( $\text{g 100g}^{-1}$ ) (Tabla 1) y (Tabla 2).

A la salmuera se le añadió inicialmente el 0.1% de ácido acético de calidad alimentaria, con objeto de corregir el pH inicial a valores menores a 4. La aireación se realiza durante 8 horas diarias y el monitoreo de la salmuera se realizó semanalmente durante 90 días.

## 2.6. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el software Stat Graphic Centurión; utilizando la metodología de correlación entre las variables mediante el análisis de Pearson producto momento y la colección de los datos se realizó por 15 semanas, la correlación fue considerada con una significancia de 95% y se procesaron 1080 datos en to-

tal. Se determinó el efecto de los factores en estudio, concentración de sal y caudal de aire mediante el análisis de Pareto con una significancia de 95%; así mismo se realizó un análisis de varianza a los azúcares reductores en fruto después de un mes de fermentación.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Efecto del caudal de aire y concentración de sal en las características fisicoquímicas de la fermentación

La acidez fija alcanzó valores finales de 1.2-1.5% (Figura 1) y la acidez libre valores entre de 1.5-2%, Fernández (1991), reporta en fermentaciones aerobias de la variedad hojiblanca valores de acidez láctica que no superan el 0.4% debido al desarrollo únicamente de levaduras. Balatsouras (1966), menciona en el proceso de aceitunas negras natu-

Tabla 2  
Determinación del efecto de los factores: caudal de aireación y concentración inicial de cloruro de sodio en la fermentación de aceituna negra natural, mediante el análisis de Pareto

Variable Dependiente	Factor	Efecto	R <sup>2</sup> ajustado	Valor P
Levaduras anaerobias facultativas	Aire	+	84.22	0.0137
	Sal	+		0.0450*
	Aire-Sal	-		0.3439
Acidez fija	Aire	+	34.40	0.0734
	Sal	-		0.4265
	Aire-Sal	-		0.7200
Dióxido de Carbono	Aire	-	97.97	0.0004*
	Sal	+		0.7650
	Aire-Sal	+		0.5900
Azúcares Reductores	Aire	-	72.13	0.0213*
	Sal	+		0.5241
	Aire-Sal	-		0.4200
Levaduras aerobias	Aire	+	64.98	0.0284*
	Sal	-		0.7620
	Aire-Sal	+		0.6520
Cloruros	Aire	-	97.85	0.2646
	Sal	+		0.0003*
	Aire-Sal	-		0.3034
Bacterias Lácticas	Aire	+	79.03	0.0389*
	Sal	-		0.0372
	Aire-Sal	-		0.0810

Nota: \* efecto significativo con una probabilidad del 95%  
efecto (+) aumenta la concentración de la variable dependiente  
efecto (-) disminuye la concentración de la variable dependiente

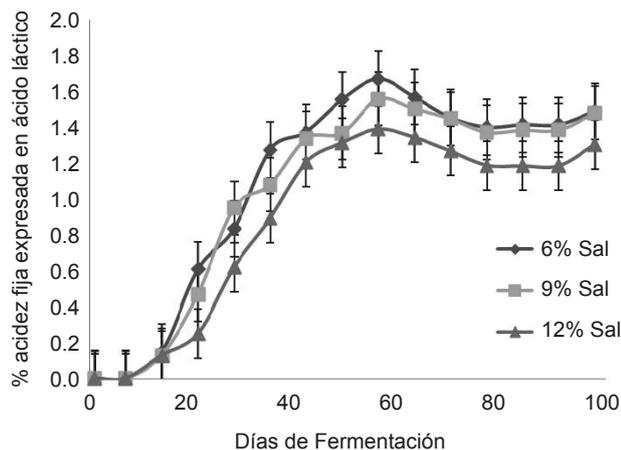


Figura 1

Evolución de acidez fija (expresada en % de ácido láctico, p/v) según la concentración de sal inicial.

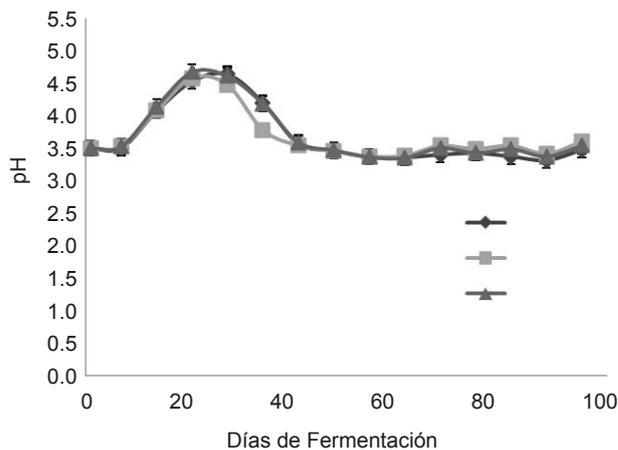


Figura 2

Evolución de pH en relación a la aireación.

rales griegas una acidez entre 0.1% a 0.4%, debido al uso elevado de sal en el proceso. En aceitunas negras naturales de la variedad Taggiasca, la acidez libre no supera el 0.5% y la acidez fija no sobrepasa 0.3% (Amelio y De Mauro, 2000). Romeo *et al.* (2010), observaron en fermentaciones de las variedades Moresca y Giarrafa valores de acidez entre el 0.1% a 0.3%, utilizando concentraciones de sal inicial de 8% y 15%. En las experiencias con aceituna Sevillana, la concentración de acidez está significativamente afectada ( $p < 0.05$ ) por la concentración inicial de sal (Tabla 2); disminuyendo la acidez a mayor concentración de cloruros. Además, hay que tener presente que las levaduras aerobias consumen el ácido láctico, y la acidez final es significativamente menor ( $p < 0.05$ ) a mayor población de levaduras aerobias (Tabla 3). Sin embargo, en todos los tratamientos la acidez producida hace que descienda el pH hasta valores de 3.3-3.4 (Figura 2). En aceitunas negras naturales Jijelianas el pH osciló entre 5.4 y 5.8. Idoui *et al.*, (2009) y Balosturas (1966), reporta en aceitunas griegas un pH superior a 5.0 y en variedades italianas Moresca y Ogliarola el pH se mantuvo en valores superiores a 4.0 (Poiana, Romeo 2006), ello dificulta una adecuada conservación del fruto.

La alta concentración de ácido actúa sobre las antocianinas y convierte el color oscuro de la aceituna en un color violáceo (Durán *et al.*, 1997), el cual es característico de la variedad Sevillana negra natural.

Las aceitunas negras con un índice de madurez de 4.5 (COI, 1985), presentaron una concentración inicial de azúcares reductores de 4.80% (p/p), esto contrasta con los valores de 1-2% encontrados en aceitunas de variedades españolas (Garrido *et al.*, 1985), así como en las variedades italianas Nocellara etnea y San Agostino las cuales reportaron valores de 1.48 y 2.23%, respectivamente (Garrido *et al.*, 1985; Sciancalepore, 1984). La concentración de azúcares reductores en el fruto disminuyó a los 30 de días de fermentación a valores de 1.5% (12% de sal), 0.9% (9% de sal) y 1.2% (6% de sal) en los tratamientos sin aireación; sin embargo los

tratamientos con aireación de  $0.1 \text{ L h}^{-1}$ , la concentración de azúcares fue de 0.53% (12% de sal), 0.66% (9% de sal) y 0.53% (6% de sal) y los tratamientos con  $0.2 \text{ L h}^{-1}$  de aireación los resultados fueron de 0.53% (12% de sal), 0.37% (9% de sal) y 0.52 (6% de sal) (Tabla 1). Fernández *et al.* (1992), indica que la presencia de valores finales del 0.4-0.5% de azúcares reductores en pulpa al final de la fermentación se debe a compuestos reductores con el licor Fehling o que estos azúcares se mantienen formando compuestos más complejos difícilmente hidrolizables. Según ello se puede afirmar que prácticamente se han consumido los azúcares en los tratamientos con aireación, mientras que en el proceso anaerobio queda todavía una cantidad considerable de ellos.

Sánchez *et al.* (2006), indican que el amargor del fruto desaparece más rápidamente en fermentaciones aerobias por a la rápida difusión de los azúcares y compuestos amargos en la salmuera, debido a la recirculación del líquido que lleva consigo la aireación, logrando que el producto esté apto para consumirse en sólo 3 meses.

En la salmuera la concentración de azúcares es muy baja debido a la lenta difusión de azúcares y a su consumo inmediato por los microorganismos (Fernández *et al.*, 1992).

La sal tiende a equilibrarse osmóticamente entre el medio líquido y el fruto (jugo). Concentraciones altas de sal tienden a deshidratar el fruto y acumular cenizas en él, como lo han demostrado en variedades de Garriafa y Moresca de la zona de Sicilia (Romeo *et al.*, 2010); la aireación disminuye la concentración de cloruros en salmuera pero no de manera significativa, esto se debe a la difusión entre el jugo celular y la salmuera. La sal se estabilizó en la salmuera, en un valor promedio de 4.23% para los tanques con concentración inicial del 6%; 5.42% con inicialmente 9% y 6.33% con el 12% (Figura 3).

El  $\text{CO}_2$  producido en la respiración de las aceitunas y en la actividad de los microorganismos se disuelve en la salmuera, en los tanques sin aplicación de aireación, el  $\text{CO}_2$  alcanzó concentraciones de  $140 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$  (Figura 4), estos datos concuer-

**Tabla 3**  
**Probabilidad de correlación entre los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en la fermentación aeróbica**

	Acidez fija (%)	Aireación L h <sup>-1</sup>	Bacterias Lácticas Log ufc mL <sup>-1</sup>	Cloruros %	CO <sub>2</sub> %	Levaduras fermentativas Log ufc mL <sup>-1</sup>	Levaduras aerobias Log ufc mL <sup>-1</sup>
Aireación L h <sup>-1</sup>	0,5434						
Bacterias Lácticas Log ufc mL <sup>-1</sup>	0,6310	0,8954					
Cloruros%	0,0000*	0,2642	0,0002*				
CO <sub>2</sub> %	0,0002*	0,0000*	0,632	0,0105			
Levaduras fermentativas Log ufc mL <sup>-1</sup>	0,0446*	0,3952	0,0297*	0,3984	0,3647		
Levaduras aerobias Log ufc mL <sup>-1</sup>	0,0354*	0,0065*	0,9334	0,0780	0,0001*	0,5421	

Nota: \* efecto significativo con una probabilidad del 95%

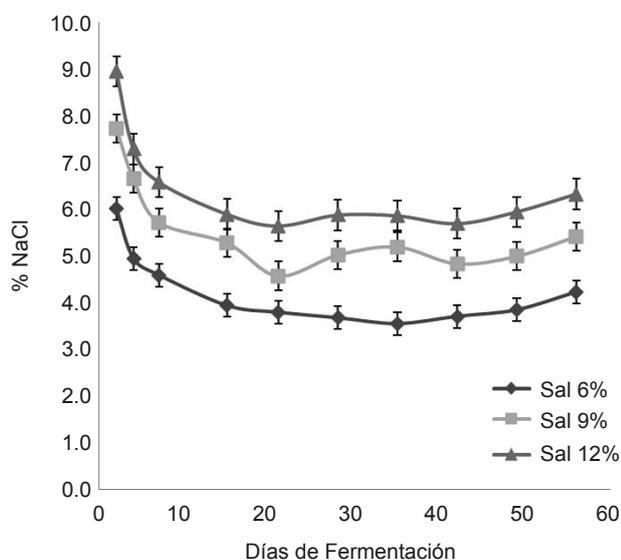


Figura 3

Evolución de la concentración de NaCl en salmuera en relación a la sal inicial.

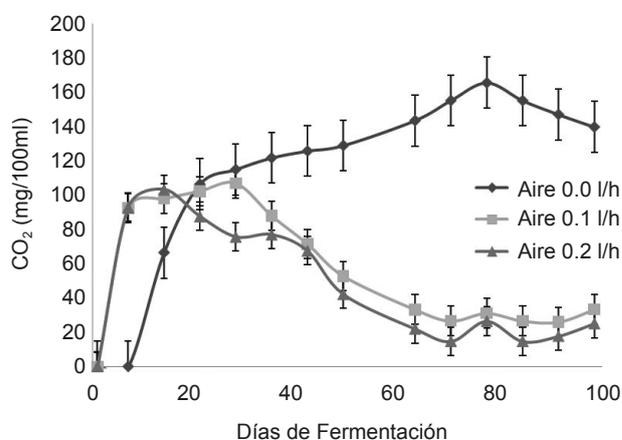


Figura 4

Evolución del CO<sub>2</sub> en salmuera en relación a la aireación.

el caudal de aire no es suficiente para eliminar el CO<sub>2</sub> proveniente del propio metabolismo del fruto y la actividad microbiana (Fernández *et al.*, 1992). Asimismo, la concentración de CO<sub>2</sub> se relacionó directamente con la concentración de cloruros en salmuera (Tabla 2).

### 3.2 Efecto del aire y concentración de sal en la evolución de la flora microbológica en la fermentación

Los gram negativos o *Enterobacteriaceas* se detectan a los 2 días de iniciada la fermentación debido a que el pH inicial fue modificado por la adición de ácido acético, luego el pH se incrementa a valores superiores a 4.5 lo que permite el desarrollo de las enterobacterias, en las experiencias el pH llega a alcanzar valores cercanos a 5 debido a la difusión del jugo celular del fruto en el líquido (Figura 2). La población máxima de gram negativos fue de 1.8 × 10<sup>3</sup> ufc mL<sup>-1</sup> en los tanques con 0.2 L h<sup>-1</sup>

dan con los obtenidos por Fernández *et al.* (1992), reportando niveles de 150 a 200 mg 100 mL<sup>-1</sup> en fermentadores industriales de 16000 L.

Durante el primer mes de fermentación en los tanques aireados con caudales de 0.2 L/h/Lc y 0.1 L/h/Lc, los valores de CO<sub>2</sub> disuelto en salmuera se mantuvieron en 80-50 mg/100 ml; posteriormente descendió hasta niveles de 15-30 mg 100 mL<sup>-1</sup> (Figura 4), posteriormente el CO<sub>2</sub> es eliminado casi completamente, siendo lógicamente el efecto de la aireación estadísticamente significativo (Tabla 2). En fermentaciones de aceitunas var. Hojiblanca con aireación de 0.3 L/h/Lc, la acumulación de CO<sub>2</sub> alcanzó valores de 40-60 mg 100 mL<sup>-1</sup> de salmuera, y luego de los 60 días el CO<sub>2</sub> disminuyó a valores menores a 10 mg 100 mL<sup>-1</sup>, esto se debe a que

de aireación (Figura 5). Se observó una mayor población de las *Enterobacteriaceas* cuando se airea la salmuera. Estos microorganismos deben desaparecer al momento en el que se alcanza un pH de 4.2 que es el límite que permite su desarrollo (Peres *et al.*, 2008). La aireación, en fermentaciones naturales de aceitunas negras Jijileanas reporta una población entre  $1.01$  a  $5 \times 10^5$  ufc mL<sup>-1</sup> de gram negativos (Idoui *et al.*, 2009). Esto indica un menor desarrollo de los gram negativos en nuestro caso, debido a las buenas prácticas de manufactura como lavado, desinfección de los tanques y cloración del agua de fermentación, así mismo la adición de ácido acético al 0.1% que disminuye el desarrollo de estos microorganismos durante la primera semana.

Los mohos solamente se detectaron durante los primeros dos días, posteriormente las levaduras predominan en la fermentación y las levaduras anaerobias facultativas o fermentativas se desarrollaron mejor en los tratamientos con concentraciones mayores de sal, determinando un efecto significativo de esta variable (Tabla 2) predominando la especie *Saccharomyces cerevisiae*, además, se aislaron las especies de *Candida lipolytica* y *Cryptococcus laurenti* en menor concentración (datos no mostrados); las levaduras aerobias del género *Geotrichum klebani*, *Candida culliculosa*, *Candida boidini*, *Candida lipolytica* y *Cryptococcus humicola* se desarrollan mejor en los tratamientos con la aireación (Tabla 2). Sin embargo no sobrepasaron poblaciones de  $10^5$  ufc mL<sup>-1</sup> (Figura 6). La población de levaduras correlaciona con la acidez láctica (Tabla 3), debido a que estos microorganismos consumen el ácido láctico y producen ácido acético, como indican Ruiz-Mollano *et al.* (2009). Las levaduras anaerobias facultativas son principalmente del género *Saccharomyces cerevisiae*, y se detectan en mayor concentración al inicio de la fermentación lo que concuerda con los resultados obtenidos por Kanavouras *et al.* (2005) y Durán *et al.* (2003); estas especies producen el CO<sub>2</sub> que se acumula al inicio de la fermentación y desarrollaron mejor con concentraciones iniciales del 12% de sal (Figura 7); sin embargo la aireación elimina el CO<sub>2</sub> acumulado

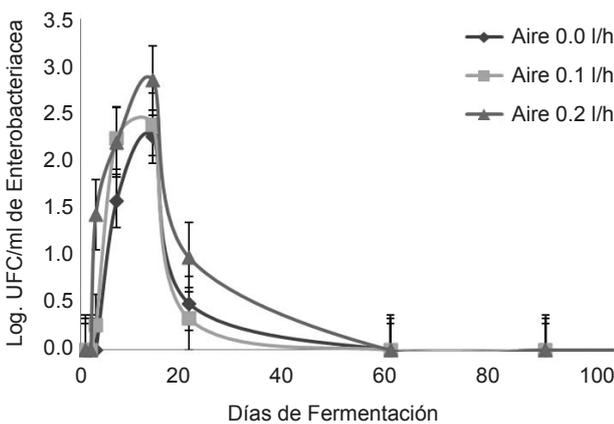


Figura 5

Evolución de *Enterobacteriaceas* en relación a la aireación.

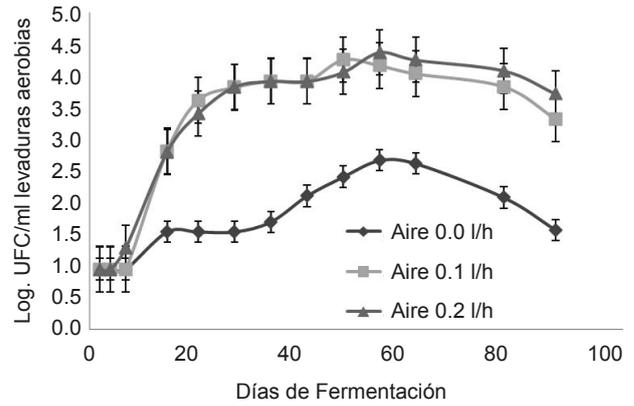


Figura 6

Evolución de levaduras aerobias en relación a la aireación.

por estos microorganismos, (Garrido *et al.*, 1985). Investigaciones desarrolladas por Benites y Carrillo (2004), demostraron la acción antagonica de *Candida boidini* contra cepas de *Penicillium spp.*, de igual manera fue demostrado por Ruiz-Mollano *et al.* (2009), la acción de *Candida boidini* y *Candida colliculosa* contra *Penicillium expansum*, *Aspergillus flavus* y *Penicillium glabrum*, estos hongos tienen actividad pectinolítica ablandando y manchando la aceituna durante la fermentación.

Los recuentos de levaduras fermentativas en los tratamientos con sal inicial del 12% reportaron valores superiores a  $10^5$  ufc mL<sup>-1</sup>, sin embargo en los tanques fermentados con el 6% de sal el desarrollo de las levaduras fermentativas no sobrepasó los valores de  $10^4$  ufc mL<sup>-1</sup> (Figura 7); el desarrollo de levaduras es menor con respecto a fermentaciones negras naturales de Jijilea, en las cuales se reportan valores superiores a  $10^6$  ufc mL<sup>-1</sup> (Idoui *et al.*, 2009). Así mismo en variedades Sicilianas Moresca y Ogliarola la concentración de levaduras supera  $10^5$  ufc mL<sup>-1</sup> tal como lo reportan Poiana y Romeo (2006). La acumulación del CO<sub>2</sub> no tiene una correlación con el desarrollo de las levaduras anaerobias facultativas (Tabla 3), debido a que al inicio de la fermentación el CO<sub>2</sub> que se elimina es producto de la respiración del fruto; García *et al.*

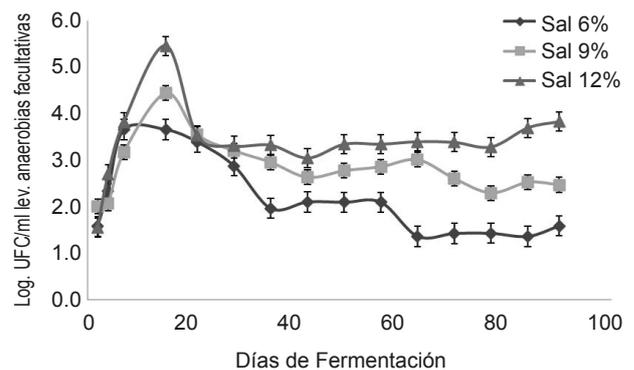


Figura 7

Evolución de levaduras fermentativas en relación a la concentración de sal inicial.

(1995) estudiaron la respiración de aceitunas de las variedades Gordal y Manzanilla encontrando que llegan a producir 60 y 40 mL de CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de fruto respectivamente durante el primer día de la recolección a 20°C.

La presencia de levaduras en la fermentación de aceitunas negras es fuente de controversia, debido al exceso de producción de CO<sub>2</sub> el cual causa alambrado en el fruto, siendo las principales especies *Saccharomyces cereviceae* y *Pichia anomala* tal como indican Durán *et al.* (2005), así mismo en aceitunas españolas las levaduras son los microorganismos que producen las características organolépticas de las aceitunas negras naturales, sin embargo en las aceitunas de la variedad Sevillana también predomina el sabor láctico. El sistema de aireación permite disminuir el CO<sub>2</sub> producido por microorganismos heterofermentativos y la aplicación de aireación a 0.1 y 0.2 L/h/Lc no ha incrementado considerablemente el desarrollo de levaduras, no sobrepasando valores mayores a 10<sup>5</sup> ufc mL<sup>-1</sup>.

Las bacterias ácido lácticas se han desarrollado normalmente en todos los tratamientos, este tipo de bacterias han sido favorecidas por la aireación al 0.1 L/h/Lc (Figura 8), por lo tanto la aireación tienen efecto positivo en el desarrollo de bacterias lácticas (Tabla 1). Las especies que predominan en la primera semana de fermentación en los tanques con aireación, fueron *Pediococcus* sp y *Leuconostoc* sp, incrementando su población a valores mayores a 10<sup>7</sup> (datos no mostrados), en la fermentación anaerobia se empezaron a desarrollar a la segunda semana. En los tratamientos sin aireación con sal al 12%, el desarrollo de lactobacilos fue más lento, así mismo en los tanques con aireación y concentraciones de sal de 6%, los lactobacilos se desarrollaron más rápidamente y alcanzaron poblaciones mayores a 10<sup>8</sup> ufc mL<sup>-1</sup> (Figura 8), debido a que en todos los tratamientos la concentración de cloruros se mantuvo por debajo de 6%. Se observó una fuerte correlación entre la concentración de cloruros en salmuera, la evolución de lactobacilos y la producción de acidez (Tabla 3), ello también se pone de manifiesto en otras variedades de aceituna como

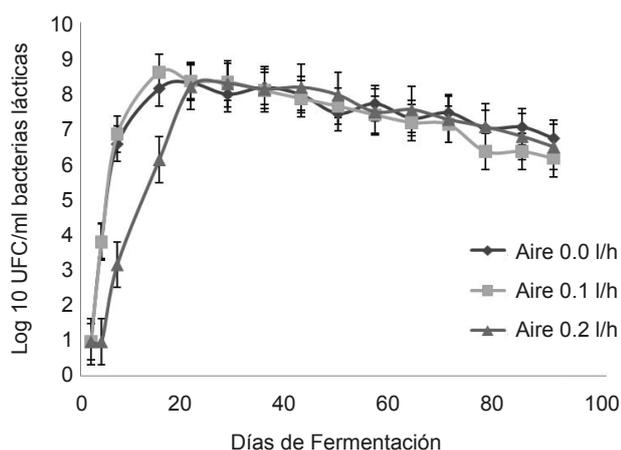


Figura 8  
Evolución de bacterias lácticas en relación a la aireación.

Nocellara del Belice preparadas al natural (Romero *et al.*, 2012). El incremento de acidez ayuda a inhibir el amargo, debido a la degradación de la oleuropeína a otros compuestos fenólicos no amargos principalmente a hidroxitirosol (Ciafardini *et al.*, 1994; Landete *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2009). También actúa la enzima beta-glucosidasa producida por los microorganismos para degradar la oleuropeína, como lo observaron Ghabbour *et al.*, (2011), estas investigaciones también determinaron a los microorganismos que intervienen en este proceso y detectaron principalmente la presencia de *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus plantarum*; en la fermentación de aceituna sevillana predomina *Lactobacillus pentosus* el cual fue identificado utilizando el sistema API 50 CH Biomerux.

El cloruro de sodio se estabilizó en concentraciones menores a 6.5% en todos los tratamientos y esto favoreció el desarrollo de *Lactobacillus pentosus*. Los polifenoles como la oleuropeína tienen un carácter antioxidante (Arslan y Özcan, 2011) e inhibidor in vitro de las bacterias lácticas, esto fue determinado por (Ruiz Barba, 1991; Ruiz Barba *et al.*, 1990 y 1991), sin embargo trabajos realizados por Rozes y Peres (1996), han encontrado que la oleuropeína por sí sola no tiene un efecto inhibitorio contra lactobacilos, en cambio cuando se forma la aglucona, por acción de la beta-glucosidasa si disminuye el recuento de lactobacilos, esto concuerda con los elevados recuentos al inicio de la fermentación donde los polifenoles se encuentran en altas concentraciones, sin embargo el desarrollo de otros microorganismos como las enterobacterias se ve inhibida desde las primeras semanas. Esto nos indica que el desarrollo de los lactobacilos en la aceituna negra natural variedad Sevillana, no se inhiben por la presencia de oleuropeína y que las bacterias lácticas tienen la capacidad de hidrolizar este compuesto.

#### 4. CONCLUSIONES

El efecto de la aireación en la fermentación de aceituna negra natural sevillana, purga el CO<sub>2</sub> producido teniéndose concentraciones menores de 30 mg mL<sup>-1</sup> y favorece el crecimiento de una microflora de metabolismo aerobio. Disminuyendo la concentración de sal se favorece el crecimiento de bacterias lácticas y no hay un efecto negativo con la aplicación de aire, la principal especie que predomina en la fermentación es *Lactobacillus pentosus*. La fermentación con concentraciones iniciales de sal de 6-9% permite una fermentación láctica alcanzando valores de acidez fija de 1.5%, sin embargo a concentraciones de 12% el desarrollo de levaduras fermentativas participan al inicio de la fermentación alcanzando una acidez menor del 1.2%.

#### AGRADECIMIENTOS

Al FINCyT-PITEI 2010. A la empresa Biondi y Cía. de Tacna S.A.C., al Laboratorio CITELAB del

Módulo de Servicios Tacna CITE Agroindustrial, Al Instituto de la Grasa en especial a los Doctores: Manuel Brenes, Pedro García y Antonio de Castro por sus aportes y consejos en el desarrollo de este trabajo.

## REFERENCIAS

- Amelio M, De Mauro E. 2000. Naturally fermented black olives of Taggiasca variety (*Olea europea* L.). *Grasas Aceites* **51**, 429-439.
- AOAC 2007. Official Methods of Analysis, 18th Ed., AOAC International
- Arslan, D. Özcan, M.M. 2011. Phenolic prolife and antioxidant activity of olive fruits of the Turkish variety "Sariyak" from different locations. *Grasas Aceites* **62**, 453-461.
- Balatsouras D. 1966. The chemical composition of the brine of stored Greek black olives. *Grasas Aceites* **17**, 83-88.
- Benites M, Carrillo L. 2004. Levaduras inhibidoras de *Penicillium*. *Revista Argentina de Microbiología* **36**, 182-186.
- Ciafardini G, Marsillo V, Lanza B, Pozzi N. 1994. Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation. *Appl Environ. Microbiol.* **60**, 4142-4147.
- CONSEJO OLEICO INTERNACIONAL, C.O.I. 1985. «Las aceitunas de mesa», *OLIVAE* (España) **2**, 18-25.
- Durán C, García P, Garrido A. 2003. Características del crecimiento de levaduras de aceitunas de mesa a bajas temperaturas. *Grasas Aceites* **54**, 264-271.
- Durán C, González F, Garrido A. 1979. Aceitunas negras al natural en salmuera IX. Ensayos de producción del 'alambrado' por incubación de diversos microorganismos aislados de salmuera de fermentación. *Grasas Aceites* **30**, 361-367.
- Durán C, Noé F, García P, Garrido A. 2005. Evolución del crecimiento en salmuera, a bajas temperaturas y diferentes acidulantes, de levaduras aisladas de aceitunas de mesa. *Grasas Aceites* **56**, 9-15.
- Durán C, Romero O, García P, Brenes M, Garrido A. 1997. Bacterias del ácido láctico en la fermentación de aceitunas de mesa. *Grasas Aceites* **48**, 297-311.
- Fernández J, Castro R, Garrido A, Heredia A, Nosti M, Castro A. 1985. «Biotecnología de la aceituna de mesa». Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid-Sevilla.
- Fernández J, Garrido A, García P, Brenes M, Duran C. 1992. Características del proceso fermentativo durante la conservación de aceitunas de la variedad Hojiblanca, destinadas a la elaboración del tipo negras. *Grasas Aceites* **43**, 212-218.
- Fernández M. 1991. Frutos y vegetales aderezados. *Grasas Aceites* **42**, 74-83.
- García P, Brenes M, Romero C, Garrido A. 1995. Respiration and physicochemical changes in harvested olive fruits. *J. Hort. Sci.* **70**, 925-933.
- García P, Durán C, Garrido A. 1985. Fermentación aerobia de aceitunas maduras en salmuera. *Grasas Aceites* **36**, 14-20.
- Garrido A, Fernández M, Adams M. 1997. "Table olive". Chapman & Hall Eds., Publisher London, UK.
- Garrido A, García P, Durán C. 1985. Conservación de aceitunas negras naturales procedentes de fermentación anaeróbica. *Grasas Aceites* **36**, 313-316.
- Ghabbour N, Lamzira Z, Thonart P, Cidalia P, Markaoui M, Asehrou A. 2011. Selection of oleuropein-degrading lactic acid bacteria strains isolated from fermenting Moroccan green olives. *Grasas Aceites* **62**, 84-89.
- ICMSF 1983. "International Commission on Microbiological Specifications for Foods". Microorganismos de los alimentos. Vol. 1. Técnicas de Análisis Microbiológicos. Editorial Acirbia. Zaragoza, España.
- Idoui T, Boudjerda J, Leghouchi E, Karam N. 2009. Naturally fermented Jijelian black olives: microbiological characteristics and isolation of lactic acid bacteria. *Grasas Aceites* **60**, 514-518.
- Kanavouras A, Gazouli M, Tzouveleki L. 2005. Evaluation of black table olives in different brines. *Grasas Aceites* **56**, 106-115.
- Landete M, Curiel A, Rodríguez H, de Las Rivas B, Muñoz R. 2007. High-added-value antioxidants obtained from the degradation of wine phenolics by *Lactobacillus plantarum*. *J. Food Protect.* **70**, 2670-2675.
- Nelson J. 1944. A photometric adaptation of the Smoggy methods for the determination of the glucose. *J. Biol. Chem.* **153**, 375-380.
- Peres C, Catulo L, Brito D, Pintado C. 2008. *Lactobacillus pentosus* DSM 16366 starter added to brine as freeze-dried and as culture in the nutritive media for spanish style green olive production. *Grasas Aceites* **59**, 234-238.
- Poiana M, Romeo F. 2006. Changes in chemical and microbiological parameters of some varieties of Sicily olives during natural fermentation. *Grasas Aceites* **57**, 402-408.
- Ramos I, Bucio A, Bautista C, Aranda E, Izquierdo F. 2009. Aislamiento, Identificación y Caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical. Tabasco, México. *Universidad y Ciencia.* **25**, 159-171.
- Rodríguez H, Curiel A, Landete M, de las Rivas B, de Felipe P, Cordoves G, Mancheno M, Muñoz R. 2009. Food phenolic and lactic bacteria. *Int J. Food Microbiol.* **132**, 79-90.
- Romeo F, Piscopo A, Poiana M. 2010. Effect of acidification and salt concentration on two black brined olives from Sicily (cv moresca and giaraffa). *Grasas Aceites* **61**, 251-260.
- Romero, F.V., Piscopo, A., Mincione, A. Poiana, M. 2012. Quality evaluation of different typical table olive preparations (cv Nocera del Belice). *Grasas Aceites* **63** 19-25.
- Rozes N, Peres C. 1996. Effect of oleuropein and sodium chloride on viability and metabolism of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 839-843.
- Ruiz L, Rios M, Fedraiani C, Olias M, Rios L, Jimenez R. 1990. Bactericidal effect of phenolic compounds from green olives on *Lactobacillus plantarum*. *Syst. Appl. Microbiol.* **13**, 199-205.
- Ruiz-Moyano S, González A, Hernández A, Casquete R. 2009. Nuevas Tecnologías en la elaboración de la aceituna de mesa. *La agricultura y la ganadería Extremeña* 105-119.
- Sánchez H, García P, Rejano L. 2006. Elaboration of table olives. *Grasas Aceites* **57**, 86-94.
- Sciancalepore V. 1984. La temperatura di deamerizzazione nella preparazione delle olive verdi col sistema Sivigliano. *Industria Alimentari* **23**, 941-944.

Recibido: 23/11/12  
Aceptado: 6/2/13