

Evolución del crecimiento en salmuera, a bajas temperaturas y diferentes acidulantes, de levaduras aisladas de aceitunas de mesa

Por M.C. Durán Quintana, F. Noé Arroyo, 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

Evolución del crecimiento en salmuera, a bajas temperaturas y diferentes acidulantes, de levaduras aisladas de aceitunas de mesa.

Se ha estudiado la evolución de las principales especies de levaduras relacionadas con las aceitunas de mesa (*Pichia anomala*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida diddensii*, *Candida famata*, y *Debaryomyces hansenii*) a baja temperatura (7 °C) y en diversas condiciones físico-químicas en las salmueras, utilizando el log del crecimiento relativo como respuesta. En general, la concentración de sal tiene un efecto muy limitado, que se aprecia algo más a pH 4, pero sin llegar a ser significativo. Los efectos del tipo de ácido y pH fueron significativos; la presencia de acético disminuye la población con el tiempo, mientras que con el láctico se mantiene e, incluso, se eleva ligeramente. Estos efectos se acentúan a pH 3,5. El comportamiento de cada levadura frente a las diferentes variables ha sido diverso. La población relativa de las especies *Sacch. cerevisiae*, *P. membranaefaciens*, *C. famata* y *Deb. hansenii* disminuyó con el tiempo en presencia del 8% de NaCl. A pH 3,5 disminuye muy sensiblemente la población inicial en todos los casos, siendo tal influencia más destacada en *Sacch. cerevisiae* y *C. famata*. La presencia de acético disminuye de forma importante la población inicial inoculada en la mayoría de los casos y provocó siempre un descenso paulatino en las mismas. No se observó diferencias entre las especies debido al ácido láctico. Estos estudios pueden ser de interés para el desarrollo de presentaciones comerciales de aceitunas de mesa refrigeradas y con reducido nivel de sodio.

PALABRAS-CLAVE: Aceituna de mesa - Bajas temperaturas - Levadura - pH - Sal.

SUMMARY

Growth in brine, at low temperature and different organic acids, of yeasts from table olives.

The evolution of the main yeast species related to table olives (*Pichia anomala*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida diddensii*, *Candida famata*, and *Debaryomyces hansenii*) at low temperature (7°C) and different physico-chemical brine conditions was studied, using the log of the relative growth as response. In general, the NaCl concentration had a reduced effect, which was slightly greater at pH 3.5, although it was never significant. The effects of pH and type of acid were significant: the presence of acetic acid always diminished the yeast population with time; however the population was maintained, or even slightly increased, in the presence of lactic acid. Such effects were higher at pH 3.5 than at pH 4.0. The behavior of the yeast species was diverse. *Sacch. cerevisiae*, *P. membranaefaciens*, *C. famata* y *Deb. hansenii* diminished with time in 8% NaCl. The yeast population markedly decreased at pH 3.5, mainly in the case of *Sacch. cerevisiae* and *C. famata*. The presence of acetic acid decreased the yeast population in most species and always lead to a progressive diminution of it with time. No differences between

species due to lactic acid was observed. These results can be of interest for the development of commercial presentations of table olives to be preserved at low temperature and with a reduced level of sodium.

KEY-WORDS: Low temperature - pH - Salt - Table olives - Yeast.

1. INTRODUCCIÓN

La producción de aceitunas de mesa alcanza una cifra superior al 1.300.000 Tm. Los principales tipos son: aceitunas verdes estilo español o sevillano (alrededor del 50% del total), negras naturales (25-25%) y tipo negras (25-15%) (COI, 2002).

La fermentación de las aceitunas verdes se considera que es eminentemente láctica (Garrido Fernández et al., 1997), pero en las mismas es asimismo habitual la presencia de levaduras. González Cancho (1965) aisló los géneros *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis* y *Saccharomyces* como las más representativas. Su población habitualmente alcanzaba recuentos en tona a 105-106 cfu/ml en los clásicos bocoyes de madera. Las mismas deben contribuir de manera decisiva al característico flavor de este producto.

Por su parte, en las aceitunas tipo negras al natural, las levaduras son aún más decisivas, pues representan la flora más significativa de estos productos (Garrido Fernández et al., 1997). Balatsouras (1967) ha aislado los géneros *Trichosporum*, *Candida*, *Pichia*, *Kloeckera*, *Torulopsis* y *Debaryomyces* en variedades griegas. Borcakli et al. (1993) *Debaryomyces* en las turcas. González Cancho et al. (1975) identificaron *Saccharomyces oleaginosus* y *Hansenula anomala* como las más significativas del proceso anaeróbico de fermentación de variedades españolas. *Torulopsis candida*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranaefaciens* y *Hansenula mrakii* fueron las más relevantes del aeróbico (Durán Quintana et al., 1986).

En aceitunas de color cambiante, Pelagatti (1978-1980), Deiana et al. (1992) y Marquina et al. (1992) han aislado los géneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* y *Saccharomyces*.

Las levaduras se encuentran también presentes de forma habitual en las aceitunas envasadas que se conservan solo gracias a las características físico-químicas. Su inhibición mediante conservantes se ha estudiado ampliamente (Rodríguez de la Borbolla y Alcalá et al., 1961; Marsilio y Cichelli, 1972) así como el empleo de otros compuestos (Asehraou et al., 1979). La Norma Cualitativa Aplicable a la Aceituna de Mesa en el Comercio Internacional (COI, 1983) así como las Normas del COI/Codex (Codex Alimentarius Commission, 1973) contemplan el posible uso de los ácidos sórbico y benzoico y sus sales como conservantes. Sin embargo, el empleo de los mismos puede dar lugar a sabores extraños. Por ello, la estabilización sin necesidad de estos productos sería muy interesante.

Por otra parte, también se conoce la capacidad de inhibición de los ácidos láctico y acético para inhibir *Sacch. cerevisiae* (Thomas et al., 2002; Narendranath et al., 2001a y b), otras levaduras que pueden producir alteraciones de los alimentos (Loureiro, 2000), así como patógenos (Samelis et al., 2001; Tienungoon et al., 2000).

A pesar del importante papel jugado por las levaduras en la fermentación y conservación de aceitunas y del empleo habitual en los envasados correspondientes de diferentes ácidos, entre los que predominan láctico y acético, no existen trabajos que hayan estudiado el efecto de los mismos en las diversas levaduras de las aceitunas de mesa. Las bajas temperaturas, a su vez, retrasan todos los procesos biológicos y el crecimiento de un gran número de microorganismos.

El presente trabajo estudia los efectos, a la temperatura de refrigeración, del NaCl, compuesto normal de todos los encurtidos, y de los ácidos láctico y acético a diferentes niveles de pH sobre algunas de las principales levaduras relacionadas con la fermentación o conservación de aceitunas de mesa. Los resultados podrían ser de utilidad para preparar aceitunas de mesa con condiciones físico químicas más ajustadas y mejor adaptadas a las demandas de los consumidores.

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 I). Las mismas se identificaron de acuerdo con los criterios taxonómicos de Lodder (1970), Barnett et al. (1990) y Kurtzman y Fell (1998). La correspondencia entre los nombres originales según Lodder (1970), Kurtzman y Fell (1998) se dan asimismo en la Tabla I.

2.2. Salmueras

Las salmueras utilizadas proceden de una instalación local. La misma se diluyó conveniente hasta conseguir una concentración de NaCl del 5%. A esta salmuera se le añadió ácido acético o láctico (Panreac, Barcelona, España) hasta conseguir pH de 4,0 y 3,5, así como NaCl para conseguir los niveles de sal del 8%. El contenido de ácidos orgánicos y de azúcares residuales se determinó según describe Montaña et al (1993). Sus características se dan en la Tabla II.

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 (Cansado et al., 1989), que se incubó después a 25 °C durante 48 h. Los tubos se centrifugaron y el residuo sólido se lavó dos veces con solución salina (0,9% NaCl, m/v) y después, se resuspendieron en una solución salina hasta conseguir una concentración alrededor de 10⁷ 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 mediante filtración a través de una membrana Millipore de 0,22 m de tamaño de poro.

Tabla I

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

Especie de levadura		Abreviatura	Variedad aceitunas
Lodder	Kurtzman y Fell		
<i>Hansenula anomala</i>	<i>Pichia anomala</i>	Pa	L, H, V*
<i>Pichia membranaefaciens</i>	<i>Pichia membranaefaciens</i>	Pf	L, H, V
<i>Saccharomyces oleaginosus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sc	L, H, V
<i>Candida diddensii</i>	<i>Candida diddensii</i>	Cd	L, H, V
<i>Torulopsis candida</i>	<i>Candida famata</i> **	Cf	L, H, V
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	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

Ácidos orgánicos	mg/L	Azúcares	mg/L
Fórmico	30	Glucosa	181
Láctico	5760	Fructosa	109
Acético	480	Manitol	63
Cítrico	380	Sacarosa	179
Succínico	120		
Málico	n.d.		

Nota: n.d. = no detectado.

Alícuotas de 5 ml se colocaron en tubos de 20 ml, que se inocularon con 0,1 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 tipo de ácido sobre el crecimiento de levaduras a la temperatura de refrigeración (7 °C) se realizó mediante un diseño factorial completo a dos niveles.

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 ($\log_{10} N/No = \log_{10} N - \log_{10} No$). Los tratamientos se repitieron para cada una de las especies.

Los resultados (crecimiento relativo) se analizaron mediante el módulo Modelos Lineales Generalizados (GLM) con medidas repetidas de Statistica (Stat Soft, 1998).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En general, las salmueras acondicionadas no son un buen medio de cultivo para las levaduras. No existen prácticamente en las mismas azúcares asimilables (Tabla II) y tanto la sal como el bajo pH y los ácidos añaden nuevos factores que dificultan su crecimiento. Para el estudio de la evolución de las mismas se ha utilizado como respuesta el crecimiento relativo (McMeekin et al., 1993). Tiene la ventaja de ajustar los recuentos en función del tamaño del inóculo inicial y de ser de fácil interpretación, ya que la línea que pasa por el origen divide el espacio de los gráficos en dos zonas. La superior en la que se sitúa

la grafica en caso de crecimiento y la inferior cuando tiene lugar un efecto inhibitor. Desde el punto de vista cuantitativo, los resultados se han analizado mediante el módulo de Modelos Lineales Generalizados con medidas repetidas, ya aplicado también por Charoen et al. (1998).

El análisis de varianza para medidas repetidas de los resultados indicó que eran significativos (p) los efectos del pH y del ácido así como la interacción tiempo*ácido. Probabilidades también cercanas a la significación tuvieron la interacción sal*pH*ácido*especie ($p=0,0567$) y ácido*especie ($p=0,087$). Esto último indica que, presumiblemente, existen diferencias en el comportamiento de las diversas especies ensayadas según los niveles de las otras variables.

El estudio de todos estos efectos simples e interacciones se realiza mejor mediante las correspondientes gráficas. En la Fig. 1 puede apreciarse la evolución con el tiempo del crecimiento relativo en función del tipo de ácido utilizado, para el 5 y 8% de sal. En el caso del acético, se aprecia un importante descenso inicial, seguido de una progresiva disminución de la población inoculada. Sin embargo, cuando se utiliza láctico existe un ligero incremento (no sig-

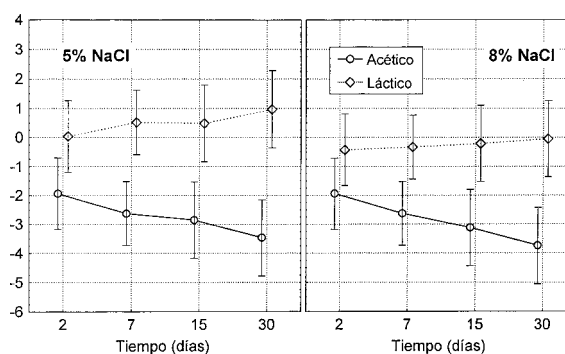


Figura 1
Crecimiento relativo global de levaduras (promedio de todas las especies) a lo largo del tiempo (días) en función del tipo de ácido, según el nivel de sal.

nificativo) de la población relativa al 5% y una práctica estabilización al 8% de NaCl. En cuanto al efecto del pH para cada uno de los ácidos (Fig. 2), se observa un efecto inhibitorio de los niveles más bajos de pH (la curva correspondiente a 3,5 está siempre por debajo de la de 4,0). En el caso del acético, la población relativa desciende con el tiempo; mientras que se estabiliza prácticamente con el láctico. Sin embargo, otros autores han encontrado que la presencia (0,43%) de ácido láctico (proveniente de una fermentación previa con bacterias lácticas) en ensaladas preparadas disminuía la presencia de levaduras y alargaba la vida de mercado de las mismas (Bonestroo et al., 1993) o acentuaba el efecto inhibitorio del pH (Tienungoon et al., 2000). El efecto beneficioso del acético en la conservación de alimentos es más ampliamente reconocido. El comportamiento del láctico en estos experimentos se debe sin duda a que los niveles alcanzados fueron en todo momento relativamente bajos. En efecto, se ha demostrado que las concentraciones mínimas inhibitorias de los ácidos acético y láctico en un medio mínimo eran del 0,6% (100 mM) y 2,5% (278 mM) respectivamente (Narendrananth et al., 2001a), habiéndose demostrado recientemente que ese poder inhibitorio no depende del porcentaje de ácido sin disociar sino que es más bien consecuencia de las concentraciones totales de los mismos (Thomas et al., 2002) así como que los mecanismos a través de los que actúan ambos ácidos son diferentes (Narendrananth et al., 2001b). La presencia de ácido acético apenas altera el pH interior de *Sacch. cerevisiae* ni la composición en ácidos grasos de la membrana del mismo; Sin embargo, cuando existen en el medio concentraciones superiores al 0,5% se reduce considerablemente el contenido de ácidos grasos insaturados, en especial palmitoleico y oleico.

Dicho efecto es muy acentuado para el acético y menos para el láctico que no llega nunca a ser significativo. Con el tiempo, se observa la misma evolución, ya comentada anteriormente, de disminución

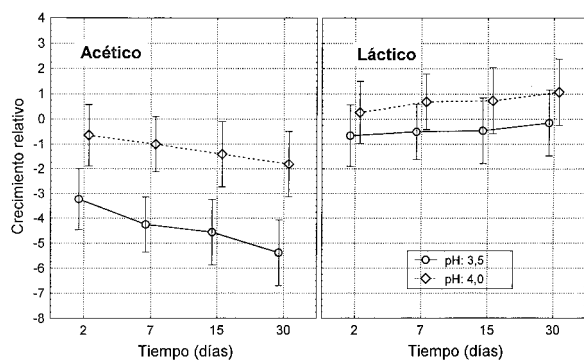


Figura 2

Crecimiento relativo global de levaduras (promedio de todas las especies) a lo largo del tiempo (días) en función del pH, según el tipo de ácido.

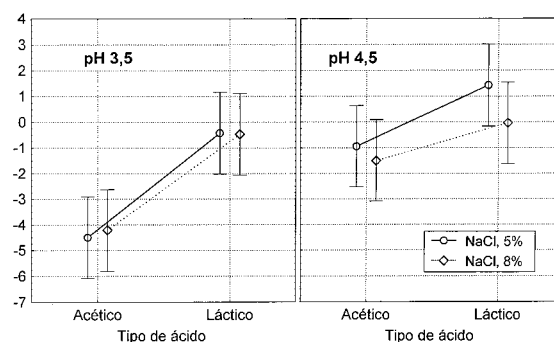


Figura 3

Interacciones de la concentración de sal y tipo de ácido sobre el crecimiento relativo global de levaduras (promedio de todas las especies), según el nivel de pH.

en el caso del acético y de ligero crecimiento con el láctico. De ello se concluye que no basta simplemente la obtención de un determinado pH en el caso del láctico. Con acético puede estabilizarse el producto a cualquiera de los dos pH ensayados.

En la Fig. 3 se ha representado el efecto conjunto (independientemente del tiempo) de la concentración de sal, según el tipo de ácido, tanto a pH 3,5 como a 4,0. En ella se aprecia claramente que la concentración de sal no tiene efecto alguno a pH 3,5 y muy ligero (sin llegar a ser significativo) a pH 4,0 cuando se añade láctico. Esta gráfica pone de manifiesto el efecto que tiene en la disminución de la población de levaduras el empleo de ácido acético cuando los niveles de pH se fijan en 3,5. En otros productos, como el queso azul, concentraciones de sal del 4% tampoco tuvieron efecto inhibitorio por sí sola, sino en combinación con otras condiciones de estrés, reducido porcentaje de oxígeno y elevado nivel de anhídrido carbónico (Tempel y Nielsen, 2000). Sin embargo, en otros casos se ha encontrado que

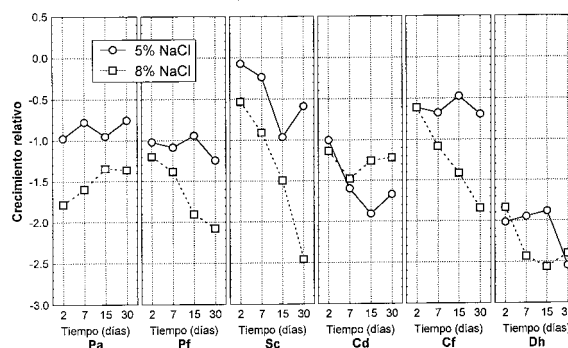


Figura 4

Efecto de la concentración de sal sobre el crecimiento relativo individual de cada una de las especies de levaduras ensayadas en función del tiempo (días). Para facilitar su interpretación se han suprimido los intervalos de confianza. Error típico = 0,20 con 24 grados de libertad. Véase Tabla I para el significado de las abreviaturas.

los niveles inhibidores de sal disminuían con la temperatura (Betts et al., 2000).

A pesar de estos efectos globales descritos, cada especie de levadura tiene una sensibilidad diferente a los factores estudiados. Así, en la Fig. 4 puede apreciarse como *Sacch. cerevisiae* es bastante sensible a la sal, mostrando ya un mayor descenso inicial para los niveles más elevados de esta y decreciendo con el tiempo tanto al 5% como al 8%, siendo en este caso la inhibición especialmente intensa. *P. membranaefaciens* y *C. famata* no muestran al principio apenas diferencias debidas a los diversos porcentajes de sal, pero decrecen asimismo con el tiempo cuando la sal es del 8% mientras que la población se mantiene estable si la concentración es del 5%. *P. anomala*, después de un descenso inicial, se recupera y crece a medida que avanza el tiempo. *C. diddensii* y *Deb. hansenii* son las que se afectan menos por la diferencia en los niveles de sal, aunque el crecimiento relativo de esta última es sensiblemente más bajo que el de la primera. Tolerancias similares a la sal en *P. anomala* en medio sintético han sido asimismo observadas por Bellinger y Larher (1991), quienes informaron de inhibición con el 8% de sal para *P. membranaefaciens*, *Sacch. cerevisiae*, *P. minuta*, y *C. famata*, siendo el descenso especialmente acentuado para *C. famata*. En cambio, todas ellas crecieron al 3 y 5%, con solo pequeñas diferencias entre ellas. Dicho comportamiento puede considerarse similar al encontrado para las salmueras de aceitunas.

Bellinger et al. (1991) encontró casi un 70% de descenso en la población de *Sacch. cerevisiae* cuando la concentración de sal del medio era 1,5 M NaCl. Por otra parte, la tolerancia a la sal de *Deb. hansenii* ha sido reflejada en numerosos trabajos (Almagro et al., 2000; Tempel y Nielsen, 2000; Betts et al., 1999). Debido a ello, esta levadura se considera como una de las principales causas de alteración de los ali-

mentos (Loureiro y Querol, 1999). No obstante, en salmuera se ha observado una fuerte inhibición inicial y un moderado descenso con el tiempo, por lo que, aparentemente, no presenta un riesgo elevado. En muchas ocasiones estas diferencias en la tolerancia a la sal (y también al pH ó ácido) han ido igualmente acompañadas de otros cambios metabólicos.

En general, el pH ha tenido asimismo un efecto muy acusado y variado entre las especies (Fig. 5). A pH 4,0 sólo se ha producido un descenso inicial, seguido de un progresivo decrecimiento en el caso *Deb. hansenii*. Todas las demás especies han mantenido prácticamente su población, excepto *C. famata* que ha tenido una ligera elevación de la población al final del periodo estudiado. A pH 3,5 ha provocado un descenso inicial de la población en *Sach. cerevisiae*, *C. diddensii*, *P. membranaefaciens* y *C. famata*; una disminución posterior con el tiempo fue más acusado en caso de *Sach. cerevisiae* y *C. famata*. También se ha observado inhibición creciente a lo largo del periodo estudiado en el caso de *C. famata*. En *P. anomala* se aprecia un a adaptación de la especie al pH del medio y la población se incrementa ligeramente. Asimismo, en *C. diddensii* se aprecia ese mismo fenómeno, aunque algo después. Finalmente, *Deb. hansenii* ha mantenido una población similar a lo largo del tiempo a pH 3,5, pero siempre manteniendo la fuerte inhibición inicial debida al bajo pH. Este comportamiento en salmuera de dicha levadura contrasta con el encontrado por Betts et al. (1999) quienes consideran al genero *Debaryomyces* como uno de los más resistentes no solo al pH sino también a la sal y a la temperatura.

Por ultimo, el comportamiento de todas las levaduras ensayadas ha sido muy similar frente a los dos ácidos ensayados (Fig. 6). En presencia de láctico se inhibieron muy ligeramente o no lo hicieron en absoluto y la población relativa fue aumentando paulatinamente con el tiempo. El crecimiento, dada la práctica ausencia de azúcares en estas salmueras se realiza a expensas del láctico (Ruiz Cruz y González Cancho, 1969). Con acético siempre se produjo una mayor inhibición inicial y un descenso bastante parecido en las especies ensayadas, excepto en *P. anomala* en la que la disminución fue muy ligera. Puede, pues, afirmarse que la utilización de acético para la corrección del pH de los envasados es más eficaz que la presencia de láctico para asegurar la estabilidad del producto final. Estos estudios indican igualmente que las aceitunas fermentadas se pueden conservar mejor hasta su acondicionamiento o envasado cuando en la fermentación se haya producido una cierta proporción de acético.

De todo lo anterior se desprende que las condiciones físico-químicas, incluso dentro de un estrecho margen, pueden influir de forma decisiva en la

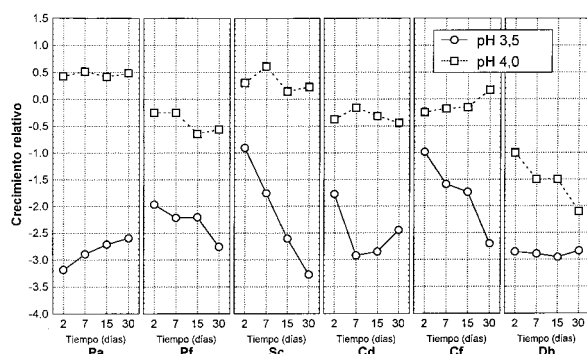


Figura 5

Efecto del pH sobre el crecimiento relativo individual de cada una de las especies ensayadas en función del tiempo (días). Para facilitar su interpretación se han suprimido los intervalos de confianza. Error típico = 0,20 con 24 grados de libertad. Véase Tabla I para el significado de las abreviaturas.

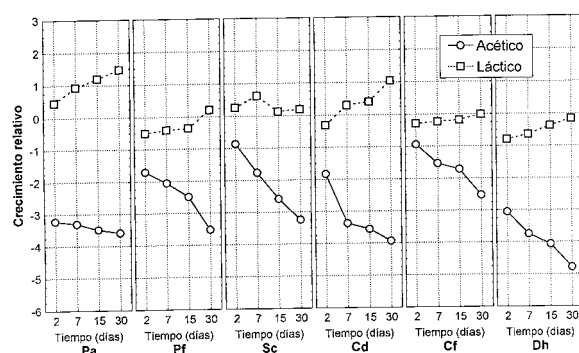


Figura 6

Efecto del tipo de ácido sobre el crecimiento relativo individual de cada una de las especies ensayadas en función del tiempo (días). Para facilitar su interpretación se han suprimido los intervalos de confianza. Error típico = 0,20 con 24 grados de libertad. Véase Tabla I para el significado de las abreviaturas.

evolución de la población de levaduras habitual de las aceitunas de mesa. Precisamente la tolerancia de muchas de especies de estas a la sal, al pH y algunos ácidos, como el láctico, pueden explicar ciertas alteraciones de las aceitunas de mesa tanto durante la fermentación como cuando se envasan sin tratamiento térmico. En efecto, se ha encontrado que *Sacch. cerevisiae* y *P. anomala* están involucrados en la fermentación de aceitunas negras al natural, pero se ha demostrado igualmente que son capaces de producir «alambrado» en las mismas (Vaughn et al., 1972; (Durán Quintana et al., 1979; Garrido Fernández et al., 1997). En el caso de las aceitunas verdes, Balatsouras et al. (1983) observó que solo una inoculación vigorosa de bacterias lácticas era capaz de limitar el crecimiento de las levaduras, que únicamente comenzaron a crecer de manera importante una vez que la presencia de las bacterias disminuía. Aunque se ha sugerido el empleo de determinados compuestos para frenar el crecimiento de levaduras (Asheraou et al., 1979) en esta fase de la elaboración, dicha práctica no es muy habitual. La formación de «alambrado» en las aceitunas de color cambiante colocadas directamente en salmuera y en las negras naturales puede evitarse mediante la aplicación del proceso aeróbico; sin embargo, si el aporte de oxígeno se elimina durante el almacenamiento en los mismos fermentadores, dichos frutos se pueden alterar debido al crecimiento de levaduras fermentativas (Garrido Fernández et al., 1985). A veces, cuando la aireación no es suficientemente intensa es posible encontrar *Sacch. cerevisiae* en el interior de los frutos (Fernández González et al., 1993) donde las condiciones de desarrollo pueden ser más favorables que en la propia salmuera.

En los envasados se encuentra igualmente una flora de levaduras, que únicamente llegará a producir alteraciones en caso de proliferación excesiva (Garrido Fernández et al., 1997). A bajas temperatu-

ras, como se ha demostrado con los resultados anteriores, pueden conseguirse con cierta facilidad condiciones que permitan una mayor estabilidad del producto final incluso con condiciones más suaves de sal. Estas aceitunas de contenido reducido de NaCl podrían ser de interés para determinados sectores de población que requieren ingesta controlada de sodio

AGRADECIMIENTO

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.

BIBLIOGRAFIA

- Almagro, A., Prista, C., Castro, S., Quintas, C., Madeira Lopes, A., Ramos, J., Loureiro-Dias, M.C. 2000. Effects of salt on *Debaryomyces hansenii* y *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, **56**, 191-197.
- Asheraou, A.; Mohieddine, S., Faid, M., Sherhronchni, M. 1979. Use of antifungal principles from garlic for the inhibition of yeasts and molds in fermenting green olives. *Grasas y Aceites*, **48**, 68-73.
- Balatsouras, G., Tsibri, A., Dalles, T., Doutsias, G. 1983. Effects of fermentation and its control on the sensory characteristics of *Conservalea* variety green olives. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 68-74.
- Balatsouras, G.D. 1967. Processing the naturally ripe (black) olives in "Proceedings of the International Olive Oil Seminar", Perugia-Spolete, Italy, pp 491-510.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D. 1990. *Yeasts. Characteristics and identification*, Second edition. Cambridge University Press, pp 1-1002.
- Bellinger, Y., Larher, F. 1991. Salt tolerance and osmolyte composition of the yeast *Hansenula anomala* growth in presence of fermentable or non-fermentable sources of carbon. *Sciences des Aliments*, **11**, 37-48.
- Betts, G.D., Linton, P., Betteridge, R.J. 1999. Food spoilage yeasts: effects of pH, NaCl, and temperature on growth. *Food Control*, **10**, 27-33.
- Betts, G.D., Linton, P., Betteridge, R.J. 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.
- Bonestroo, M.H., de Wit, J.C., Kuster, B.J.M. y Rombouts, F.M. 1993. Inhibition of the growth of yeasts in fermented saladas. *Int. J. Food Microbiol.*, **17**, 311-320.
- Borcakli, M., Ozay, G., Alperden, I., Ozsan, E., Erdek, Y. 1993. Changes in the chemical and microbiological composition of two varieties of olive during fermentation. *Grasas y Aceites*, **44**, 253-260.
- Cansado, J., Longo, E., Agrelo, D. Villa, T. G. 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.
- Codex Alimentarius Commission (FAO/WHO). 1974. Norma Internacional recomendada para las aceitunas de mesa. Rome. Italy.
- Charoen, C., Fleet, G.H., Henschke, P.A. 1998. Effects of temperature, pH, and sugar concentration on the relative growths and cell biomass of wine yeasts. *American J. Enology and Viticulture*, **49**, 283-288.

- Deiana, P., Farris, G.A., Catzedu, P., Madan, G. 1992. Impiego di fermenti lattici e lenti nella preparazione delle olive di mensa. *Industrie Alimentarie*, **XXXI**, 1011-1023.
- Durán Quintana, M.C., García García, P., Garrido Fernández, A. 1986. Fermentación en medio aeróbico de aceitunas negras maduras en salmuera con inyección alternante de aire. *Grasas y Aceites*, **37**, 242-249.
- Durán Quintana, M.C., González Cancho, F., Garrido Fernández, A. 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.
- Farris, G.Z., Deiana, P., Buchoni, M. 1989. La microflora blastomicética delle drupe e delle salamoia delle olive da mensa. *Industrie Alimentarie*, **XXVIII**, 263-266.
- Garrido Fernández, A., Brenes Balbuena, M., García García, P., Durán Quintana, M.C. 1996. Conservación de aceitunas verdes o de color cambiante en salmuera. *Grasas y Aceites*, **47**, 197-206.
- Garrido Fernández, A., Fernández Díez, M.J., Adams, R.M. 1997. Table olives. Production and processing. Chapman and Hall. London.
- Garrido Fernández, A., García García, P., Durán Quintana, M.C. 1985. Conservación de aceitunas negras naturales procedentes de fermentación anaeróbica. *Grasas y Aceites*, **36**, 313-316.
- 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., Nosti Vega, M., Durán Quintana, M.C., Garrido Fernández, A., Fernández Díez, M.J. 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 1999. Jaén.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. 1998. The yeasts, a taxonomic study. Fourth edition. Elsevier. Amsterdam, New York, pp 1-1055.
- Lodder, J. 1970. Criteria and methods used in classification. In *The yeasts. A Taxonomic study*. North-Holland Publishing, Amsterdam, pp 1-1385.
- Loureiro, V., Querol, A. 1999. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends Food Sci. and Technol.*, **10**, 356-365.
- Marquina, D., Peres, C., Caldas, F.V., Marques, J.F., Peinado, J.M., Spencer Martín, J. 1992. Characterization of the yeast population in olive brines. *Letters in Appl. Microbiol.*, **14**, 279-283.
- Marsilio, V., Cichelli, A. 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.
- McKeekin, T.A., Olley, J.N., Ross, T., Ratkowsky, D.A. 1993. Predictive Microbiology: Theory and application. Research studies press Ltd. Taunton, Somerset, England, pg 71.
- Montaño, A., Sánchez, A.H., Castro, A. De. 1993. Controlled fermentation of Spanish-style green olives. *J. Food Sci.*, **58**, 842-844.
- Narendranath, N.V., Thomas, K.C., Ingledew, W.M. 2001. Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms. *J. Am. Brew. Chem.*, **59**, 187-194.
- Narendranath, N.V., Thomas, K.C., Ingledew, W.M. 2001. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *J. of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **26**, 171-177.
- Pelagatti, O. 1978-1980. Sulla microflora lattica e blastomicética 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., Fernández Díez, M.J., González Cancho, F. 1961. El empleo del ácido sórbico, sus sales, en las aceitunas aderezadas. *Grasas y Aceites*, **12**, 10-15.
- Ruiz Cruz, J., González Cancho, F. 1969. Metabolismo de levaduras aisladas de salmueras de aceitunas aderezadas "estilo español". *Grasas y Aceites*, **20**, 6-11.
- Samelis, J., Sofos, J.N., Kain, M.L., Scanga, J.A., Belk, K.E., Smith, G.C. 2001. Organic acids and their salts as dipping solutions to control *Listeria monocytogenes* inocula following processing of sliced pork Bologna stored at 4°C in vacuum packages. *J. Food Protection*, **64**, 1722-1729.
- StatSoft. 1999. Statistica for Windows (computer Programm Manual), Tulsa, OK (USA)
- Tempel, T. van den, Nielsen, M.S. 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.
- Thomas, K.C., Hynes, S.H., Ingledew, W.M. 2002. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. *Appl. Environ. Microbiology*, **68**, 1616-1623.
- Tienungoon, S., Ratkowsky, D.A., McMeekin T.A., y Ross, T. 2000. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. *Appl. Environ. Microbiology*, **66**, 4979-4987.
- Vaughn, R.H., Stevenson, K.E., Dave, B.A., Park, H.C. 1972. Fermenting yeasts associate with softening and gas-pocket formation in olives. *Applied Microbiology*, **23**, 316-320.