

Flora microbiana en elaborados de aceitunas verdes en la región de Murcia. Evolución cualitativa durante la fermentación

POR

G. Guzmán, L. A. Guevara y J. Laencina

RESUMEN

A lo largo del proceso normal de fermentación en salmuera se estudia en la región de Murcia la flora microbiana de cinco tipos de aceitunas (subvariedades Manzanilla Fina y Carrasqueña, Verdial, Hojiblanca y las variedades Cacereña) sometidas al tratamiento previo de «cocido». La flora heterogénea —que incluye bacterias Gram-negativas, bacterias lácticas y levaduras— con predominio de las poblaciones de bacilos Gram-negativos en los primeros días del proceso fermentativo, evoluciona hasta que éstos desaparecen —entre la primera y segunda semana, según la clase de aceitunas— y aumenta el contenido de bacterias lácticas y levaduras hasta alcanzar el tercer y cuarto mes, donde se aprecia la importancia de las levaduras frente a lactobacilos.

SUMMARY

Throughout of the normal fermentation course of green olives in Murcia (Spain) area the microbiological flora was studied when five olive classes («Fina», «Carrasqueña», «Manzanilla», «Verdial», «Hojiblanca» subvarieties and «Cacereña» varieties) were salt pickled, after the previous «cocido» operation. The heterogeneous flora includes Gram-negatives bacteria, lactic acid bacteria and yeasts. Early the Gram-negative bacilli are found and then, after one or two weeks, these are lost. Furtherly the lactic acid bacteria and yeasts are getting on till the third or fourth month and therefore after this period the yeasts are the predominating ones.



INTRODUCCION

La elaboración de aceitunas de mesa se ha venido realizando tradicionalmente en la Región de Andalucía de modo principal, si bien existe desde hace algún tiempo en la zona de Murcia-Alicante una importante producción de acabados, a partir de materias primas ya fermentadas, en industrias locales de importancia en este sector agroindustrial que actualmente amplían su actividad a la fase industrial de la fermentación, utilizando materia prima de producción autóctona en unos casos y andaluzas o extremeñas en la mayoría.

Si bien se conoce el proceso fermentativo de la aceituna sevillana (6), (9), resultaba de interés el estudio de las peculiaridades en el desenvolvimiento de la microflora durante la fermentación natural realizada en nuestra región, para el conocimiento de su extensión y comportamiento, tanto en el proceso normal como en el caso de posibles anomalías para su adecuado control (2), (3), (4), (8). Dentro de este control se sitúa este primer trabajo, que constituye parte de la tesis doctoral de uno de los autores (5).

La fermentación de aceitunas verdes se lleva a cabo en una salmuera, cuya concentración salina permite la extracción de su jugo celular rico en sustancias fermentables que la convierten en un apropiado medio de cultivo, donde son capaces de desarrollarse una serie de microorganismos que contribuyen a la buena marcha de la fermentación (7).

Una adecuada fermentación es aquella que logra productos de óptima calidad —cuyas características esenciales se definen por color, sabor, olor y textura— y buena conservación de estas características; además, se consigue una cantidad suficiente de ácido láctico, como consecuencia de la serie de transformaciones químicas producto del metabolismo bacteriano, junto a cierta dosis de ácido acético, de tal forma que exista un equilibrio entre ellos capaz de mantener la estabilidad de las salmueras (1), (6).

Muchos autores coinciden en que el proceso fermentativo normal tiene tres etapas sucesivas: la primera, muy importante, ya que la salmuera se transforma —por la presión osmótica establecida— en un apropiado medio de cultivo que determina la menor o mayor extracción de sustancias necesarias para el crecimiento de los microorganismos; en esta fase se aprecia una considerable disminución del pH, encontrándose una flora muy variada, que el aumento de la acidez del medio hace desaparecer gradualmente; su duración alcanza de dos a tres días.

La segunda y tercera fases se entremezclan, encontrándose al inicio mayor cantidad de lactobacilos que levaduras; los lactobacilos empiezan a desarrollarse entre el tercero y quinto días, mientras que las levaduras

hacen su aparición desde el tercer día de fermentación. La segunda etapa se caracteriza por una gran producción de ácido láctico, disminuyendo en la tercera etapa, donde se puede apreciar una flora heterogénea.

En el presente trabajo se ha realizado el análisis microbiológico de las salmueras de diferentes variedades de aceitunas procedentes de las zonas de Andalucía y Extremadura, fermentadas en la región de Murcia.

PARTE EXPERIMENTAL

MUESTRAS.

La materia prima empleada en nuestro estudio ha estado constituida por diversas variedades de aceitunas verdes (*Olea europea L.*), entre ellas las subvariedades de Manzanilla, Fina y Carrasqueña, procedentes de El Arahal (Sevilla), y Verdial y Hojiblanca del término de Cabra (Córdoba) y la variedad Cacereña recolectada en la zona de Extremadura.

ADEREZO.

Todas las aceitunas son tratadas previamente por el procedimiento alcalino («cocido») durante diez horas en NaOH 3,5 % y lavadas energicamente con sucesivas renovaciones de agua; las aceitunas así tratadas se introducen en el fermentador adicionándoles la salmuera de cloruro sódico al 10 %.

Para poder controlar adecuadamente la evolución cualitativa de la microflora, simulando el proceso fermentativo a nivel industrial, se han empleado envases de plástico con capacidad para noventa kilos de aceitunas. Estos envases se colocan en una nave de elaborados de aceitunas con una temperatura ambiente media de 21° C.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

La toma de muestras para el análisis microbiológico se efectúa asépticamente empleando pipetas diseñadas especialmente —de 65 cm de longitud y 1 cm de diámetro— para alcanzar el centro del fermentador. Se inicia un muestreo y análisis diario desde el primer día en que las aceitunas se colocan en la salmuera, y que se prolonga durante las cuatro primeras semanas; posteriormente se realizan análisis en el tercero y cuarto mes.

Para el estudio del desarrollo y diferenciación de los diversos micro-

organismos durante el aderezo de la aceituna verde se han utilizado los siguientes medios de cultivo:

- 1) Agar rojo-violeta-bilis, para bacterias gram-negativas no esporuladas.
- 2) Agar rogosa, para bacterias lácticas (adecuado en el caso de las aceitunas).
- 3) Agar infusión de levadura-glucosa, para levaduras.

El crecimiento de los microorganismos que se desarrollan se verifica por inoculación con pipetas estériles de 0,1 ml de salmuera, por el método de extensión en placa con espátula de Digralsky. El área de crecimiento en la placa se emplea para determinar la extensión de la población, después de incubar a 25-30° C durante 48-72 horas, según el microorganismo de que se trate.

RESULTADOS Y DISCUSION

De los resultados obtenidos del estudio cualitativo de la flora microbiana en las salmueras de aceitunas verdes fermentadas en la región de Murcia, que se recogen en la tabla I, se puede deducir que en la fermentación que experimentan las variedades de aceitunas en estudio se desarrolla una flora muy heterogénea, que incluye bacterias gram-negativas, bacterias lácticas y levaduras.

Desde el primer día de colocarse las aceitunas en salmuera la población de bacilos gram-negativos es muy numerosa, pero a medida que transcurren los días va disminuyendo, aumentando las poblaciones de bacterias lácticas y levaduras. Por los datos obtenidos de nuestra experiencia se aprecia que la permanencia de estos microorganismos es variable; así, tenemos que para la variedad Manzanilla Fina la disminución de gram-negativos se manifiesta a partir de los 7 días, para desaparecer totalmente a los 11 días de fermentación; sin embargo, en otras variedades persisten hasta los 13 días.

Las poblaciones de bacterias lácticas y de levaduras están presentes desde el tercer día de la fermentación, siendo las primeras las que en un principio se van a encontrar en mayor cantidad que las levaduras. Conforme transcurre el proceso de fermentación, la flora de levaduras se equilibra con la de bacterias lácticas.

Las condiciones fisicoquímicas, en general, han resultado las óptimas para establecer un control cualitativo de la flora microbiana, por lo que

no se han apreciado alteraciones que podrían prever una fermentación anómala.

Finalmente, el análisis microbiológico realizado en las mismas salmueras de fermentación a los 90 y 120 días refleja un aumento considerable en la población de levaduras.

BIBLIOGRAFIA

1. CRUESS, W. V. (1958), *Comercial fruit and vegetables products*, McGraw-Hill, Inc., New York.
2. GONZÁLEZ CANCHO, F. (1963), «Microorganismos que se desarrollan en el aderezo de aceitunas verdes "estilo español"», *Microbiología Española*, 16, 221-30.
3. GONZÁLEZ CANCHO, F., y FERNÁNDEZ DíEZ, M. J. (1968), «Especies de *Clostridium* aisladas de salmueras de aceitunas aderezadas. Influencia del pH y cloruro sódico sobre el desarrollo», *Microbiología Española*, 21, 129-141.
4. GONZÁLEZ CANCHO, F.; NOSTI, M.; FERNÁNDEZ, M. J., y BUZCU, N. (1970), «Especies de *Propionibacterium* relacionadas con la "zapatería". Factores que influyen en su desarrollo», *Microbiología Española*, 23, 223-53.
5. GUEVARA LEGOAS, L. (1982), *Contribución al conocimiento de la problemática de desarrollo de levaduras en elaborados de aceitunas fermentadas en la región de Murcia*, Ed. C.E.B.A.S., Murcia.
6. RODRÍGUEZ DE LA BORBOLLA y col. (1961), *El aderezo de aceitunas verdes*, Ed. Patronato «Juan de la Cierva», C.S.I.C., Sevilla.
7. RODRÍGUEZ DE LA BORBOLLA y GONZÁLEZ CANCHO, F. (1975), «Preparación de aceitunas verdes», Comunicación presentada a la XI Asamblea de miembros del Instituto de la Grasa y sus Derivados, Sevilla.
8. RUIZ MERINO, J. (1960), *La fermentación acelerada. Nuevos conceptos sobre patología de las fermentaciones de la aceituna de mesa*, Ed. Instituto de Microbiología Industrial, S. A., Madrid, 43 págs.
9. VAUGHN, R. H.; DOUGLAS, H. C., and GILLILAND, J. R. (1953), «Production of spanish-type green olives», *Calif. Agr. Exp. Sta. Bull.*, 678:1.

TABLA I
 FERMENTACION DE ACEITUNAS VERDES EN LA REGION DE MURCIA
 EVOLUCION CUALITATIVA DE LA FLORA MICROBIANA

Análisis microbiológico
Días en salmuera

Aceitunas	1			3			5			7			11		
	G	Lc	L	G	Lc	L	G	Lc	L	G	Lc	L	G	Lc	L
Mz. Fina	+++	—	—	++	++	+	+	+++	+	+	+++	+	—	+++	++
Mz. Fina	+++	+	—	++	+	++	+	+++	+	—	+++	+	—	+++	++
Verdial	+++	—	—	+++	++	+	++	+++	+	+	++	+	+	+++	++
Verdial	+++	—	—	+++	++	+	+++	++	+	+	+++	+	+	+++	++
Carrasqueña	+++	—	—	+++	+	+	++	+++	++	+	+++	+	+	+++	++
Carrasqueña	+++	—	—	++	+	+	+	+++	++	+	+++	+	—	+++	+++
Hojiblanca	+++	—	—	++	++	+	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+
Hojiblanca	+++	—	—	++	++	+	+	+++	+	—	+	+	—	+++	++
Cacereña	++	—	—	+++	++	+	++	++	+	++	++	++	+	+++	++
Cacereña	+++	—	—	+++	++	+	++	++	+	++	+++	+	+	+++	++



Aceitunas	13			17			19			21		
	G	Lc	L	G	Lc	L	G	Lc	L	G	Lc	L
Mz. Fina	-	++	++	-	+++	++	-	+++	+++	-	++	++
Mz. Fina	-	++	++	-	+++	++	-	++	++	-	++	+
Verdial	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	++	-	++	++
Verdial	+	+++	++	-	+++	+++	-	+++	+++	-	++	++
Carrasqueña	-	+++	++	-	+++	++	-	+++	+++	-	+++	++
Carrasqueña	-	+++	+++	-	++	+++	-	++	+++	-	++	++
Hojiblanca... ..	-	+++	++	-	+++	++	-	+++	++	-	+++	+
Hojiblanca... ..	-	+++	++	-	+++	++	-	+++	++	-	+++	+
Cacereña	-	+++	+++	-	+++	+++	-	++	++	-	+++	++
Cacereña	+	+++	+++	-	+++	+++	-	+	+++	-	+++	++

G = gram-negativos; Lc = lactobacilos; L = levaduras

- +++ = abundante desarrollo
- ++ = regular desarrollo
- + = escaso desarrollo
- = sin desarrollo



