



**ESTUDIO DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL PROCESO DE
FERMENTACIÓN DE LAS ACEITUNAS ARBEQUINAS DE MESA**
Albert Hurtado Fernández-Anchuela

ISBN: 978-84-694-0289-4
Dipòsit Legal: T-200-2011

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Albert Hurtado Fernández-Anchuela

**Estudio de la microbiota asociada al proceso de
fermentación de las aceitunas arbequinas de
mesa**

TESIS DOCTORAL

Dirigida por la Dra. Cristina Reguant y el Dr. Nicolas Rozès

Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Enología,

Universitat Rovira i Virgili.

Grupo de Biotecnología Enológica



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TARRAGONA

2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LAS ACEITUNAS ARBEQUINAS DE MESA

Albert Hurtado Fernández-Anchuela

ISBN:978-84-694-0289-4/DL:T-200-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LAS ACEITUNAS ARBEQUINAS DE MESA

Albert Hurtado Fernández-Anchuela

ISBN:978-84-694-0289-4/DL:T-200-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LAS ACEITUNAS ARBEQUINAS DE MESA

Albert Hurtado Fernández-Anchuela

ISBN:978-84-694-0289-4/DL:T-200-2011



Los abajofrimantes,

La Dra. Cristina Reguant, profesora titular de universidad, y el Dr. Nicolas Rozés, profesor titular de universidad, del Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Universidad Rovira i Virgili,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo, titulado:

**Estudio de la microbiota asociada al proceso de fermentación de
las aceitunas arbequinas de mesa**

que presenta Albert Hurtado Fernández-Anchuela para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Rovira i Virgili, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica y Biotecnología de esta Universidad y todos los resultados son fruto del trabajo realizado por el mencionado doctorando. Para su conocimiento y para los efectos que correspondan, firmamos esta certificación.

Dra. Cristina Reguant

Dr. Nicolas Rozès

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LAS ACEITUNAS ARBEQUINAS DE MESA

Albert Hurtado Fernández-Anchuela

ISBN:978-84-694-0289-4/DL:T-200-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LAS ACEITUNAS ARBEQUINAS DE MESA

Albert Hurtado Fernández-Anchuela

ISBN:978-84-694-0289-4/DL:T-200-2011

Para Montse

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LAS ACEITUNAS ARBEQUINAS DE MESA

Albert Hurtado Fernández-Anchuela

ISBN:978-84-694-0289-4/DL:T-200-2011

AGRADECIMIENTOS

Los agradecimientos parecen ser un punto obligado en la redacción de una tesis doctoral. Yo no seré menos. Nadie debiera sentirse más o menos satisfecho por el orden en que aparezca en esta lista o por no aparecer. Todas las personas con quien te relacionas y las situaciones que se plantean en la vida suponen un aprendizaje, así que a todos debo estar agradecido.

Agradezco al Dr. Albert Bordons el haberme brindado la oportunidad de trabajar en el departamento en unos momentos en que no tenía muy claro mi futuro profesional. Sin él yo no estaría redactando esta tesis. Junto a él, los doctores Nicolás Rozès y Cristina Reguant. Nicolás posee una capacidad de generar ideas de trabajo admirable. Gracias al proyecto que él solicitó he podido realizar este trabajo. Recordaré a Cristina por su competencia técnica que tan bien me ha transmitido. A ambos debo agradecer el análisis metódico de cada uno de mis trabajos, capacidad de la que carezco.

A mis compañeros del laboratorio 120. Ordenados según el tiempo que estuvimos trabajando juntos estarían Mireia, Isabel, Nair y Nikos, Mariona, Juan Oriol, Roser, Pere, Meri y las dos Paulas. A Santiago, Rosa y Braulio por facilitar tanto nuestra labor, a los compañeros de los laboratorios 119 y 123, a los miembros del grupo de investigación Biotecnología Enológica, al personal del departamento, y de la finca experimental Mas dels Frares. También al personal de administración y servicios de la facultad pues su trabajo, aunque muchas veces pasa desapercibido, es imprescindible. Gracias al personal de la finca Mas d'en Pou, en especial a Antonio. También a las diversas entamadoras de aceitunas que nos han abierto sus puertas así como a los investigadores de otros centros con los que hemos colaborado.

Aprovecho este espacio para recordar a mi abuela Teresa, a mi madre Teresa y a Carmen, a quien considero un miembro más de mi familia, a mi padre Antonio, a su mujer Isabel, a mi hermana Andreas y al resto de mi corta familia. También a la familia de Montse, que también es la mía. A quienes han fallecido durante estos años, mis bisabuelos Biel y Teresa. A mis amigos.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LAS ACEITUNAS ARBEQUINAS DE MESA

Albert Hurtado Fernández-Anchuela

ISBN:978-84-694-0289-4/DL:T-200-2011

Índice

Índice	11
Hipótesis y objetivos	15
Introducción.....	19
1. La aceituna de mesa, definiciones e importancia económica	21
2. Clasificación de la aceituna de mesa.....	23
2.1. Aceitunas verdes al estilo español	25
2.2. Aceitunas negras oxidadas al estilo californiano	27
2.2. Aceitunas negras al estilo griego	28
3. La aceituna arbequina	29
3.1. Generalidades.....	29
3.2. Elaboración de la aceituna de mesa arbequina.....	30
4. Biotecnología de la fermentación de la aceituna de mesa.....	32
4.1. Aceitunas aderezadas	33
4.2. Aceitunas al natural.....	34
4.3. Cambios físico-químicos durante la fermentación.....	35
4.4. Factores que influyen en la fermentación	36
5. Microorganismos asociados a la fermentación de aceitunas de mesa.....	37
5.1. Levaduras.....	37
5.2. Bacterias lácticas.....	39
5.3. Otros microorganismos	42
6. Selección y uso de cultivos iniciadores.....	42
5. Bibliografía	45
Capítulo 1. Microbial population dynamics during the processing of <i>Arbequina</i> table olives.....	51
Capítulo 2. Influence of fruit ripeness and salt concentration on the microbial processing of <i>Arbequina</i> table olives.....	61
Capítulo 3. Evaluation of a single and combined inoculation of a <i>Lactobacillus pentosus</i> starter for processing cv. <i>Arbequina</i> natural green olives	71
Capítulo 4. Genotyping and technological evaluation of <i>Lactobacillus</i> strains isolated from fermented olives.....	83
Abstract.....	85
1. Introduction.....	86
2. Materials and methods	87
2.1. Lactobacillus strains.....	87
2.2. Poor medium and NaCl tolerance study.....	87
2.3. GTG ₅ rep-PCR typing.....	88
2.4. PCR detection of bacteriocin genes	88
2.5 Statistical analysis.....	89
3. Results.....	89
3.1. Strain genotyping by rep-PCR	89

3.2. Growth with different NaCl concentrations	90
3.3. Screening of the presence of bacteriocin genes	96
3.4 Discriminant analysis of the bacteriocin gene profile	96
4. Discussion	99
5. Conclusions	101
Acknowledgements	101
Bibliografía	102
Capítulo 5. Monitoring <i>Lactobacillus pentosus</i> B96 bacteriocin genes expression under saline stress by real-time PCR	105
Abstract	107
1. Introduction	108
2. Materials and methods	109
2.1. Growing conditions and sampling	109
2.2. Detection of antimicrobial activity	109
2.3. RNA extraction	110
2.4. RT-qPCR primer design	110
2.5. Reverse transcription and real-time qPCR	110
3. Results	111
3.1. Selection of <i>Lactobacillus pentosus</i> B96	111
3.2 Bacteriocin activity	112
3.2 Changes in expression of bacteriocin genes	115
4. Discussion	118
Acknowledgements	120
Bibliografía	121
Discusión general	125
1. El proceso de fermentación de las aceitunas de mesa arbequinas	127
2. Las especies microbianas implicadas en la fermentación	130
3. Desarrollo de cultivos iniciadores	132
4. La cata de aceitunas como herramienta complementaria	135
5. Plantaricinas en las cepas de bacterias lácticas de aceitunas de mesa y su expresión	136
Bibliografía	139
Conclusiones	143
Anexo: materiales y métodos	147
1. Aceitunas, muestreo y preparación de las salmueras de los distintos ensayos	149
2. Medios de cultivo	150
2.1. Medios sólidos para el recuento en placa y procedimiento de siembra	150
2.2. Medios empleados para la preparación de starters	151
2.3. Medios empleados para la conservación de cepas	151
2.4. Medio empleado para estudiar la tolerancia a la sal	151
3. Ensayo de la actividad antimicrobiana	151
3.1. Técnica de la doble capa para la detección de cepas productoras	151
3.2. Medida de la actividad antimicrobiana mediante ensayo de difusión	152

4. Determinaciones analíticas de las salmueras	152
4.1. pH	152
4.2. Determinación de la concentración de oleuropeína	152
4.3. Determinación de ácidos orgánicos	153
5. Identificación de enterobacterias	153
6. Identificación y tipado de microorganismos mediante técnicas de biología molecular....	153
6.1. Micro extracción de ADN.....	154
6.2. Análisis del gen ribosomal 16S: ARDRA. (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)	154
6.3. PCR multiplex con el gen RecA	155
6.4. GTG ₅ rep-PCR.....	156
6.5. Identificación de levaduras mediante PCR-RFLP del fragmento 5.8s de ARN ribosomal más los ITS colindantes.....	157
7. Identificación de genes de bacteriocinas mediante PCR específica.....	157
8. Estudio de la expresión de genes de bacteriocinas mediante RT-qPCR.....	159
8.1. Extracción de ARN.....	160
8.2. Diseño de primers para RT-qPCR	160
8.3. Transcripción reversa y RT q-PCR.....	160
9. Cata de aceitunas de mesa.....	161
Bibliografía	163

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LAS ACEITUNAS ARBEQUINAS DE MESA

Albert Hurtado Fernández-Anchuela

ISBN:978-84-694-0289-4/DL:T-200-2011

Hipótesis y objetivos

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LAS ACEITUNAS ARBEQUINAS DE MESA

Albert Hurtado Fernández-Anchuela

ISBN:978-84-694-0289-4/DL:T-200-2011

A pesar de los grandes avances que ha habido en cuanto al conocimiento del proceso de fermentación que sucede durante la elaboración de aceitunas de mesa y otros encurtidos, aún hoy el proceso sigue ocurriendo de forma espontánea y poco controlada en la mayoría de industrias y el proceso biotecnológico de muchas variedades de aceitunas aún no ha sido descrito. La aceituna arbequina, la principal variedad cultivada en Cataluña, es una de ellas. La aceituna de mesa arbequina es, técnicamente, una aceituna verde al natural. Su fermentación y puesta en el mercado es bastante rápida respecto otras aceitunas verdes al natural de mayor tamaño de fruto así que es posible que su fermentación se asemeje más a la de las aceitunas de color cambiante o a las aceitunas negras que a la de las aceitunas verdes. Tal como sucede en las diferentes variedades de aceitunas de mesa, bacterias lácticas y levaduras deberían ser las especies microbianas responsables del proceso fermentativo.

El principal objetivo que se plantea es profundizar en el conocimiento del proceso de fermentación de la aceituna de mesa arbequina hasta dónde sea posible así como relacionarlo con otras fermentaciones de aceitunas de mesa. Otro objetivo importante se enmarca dentro de los objetivos del propio grupo de investigación, profundizar en el conocimiento de las bacterias lácticas asociadas; en este caso, las bacterias lácticas de las aceitunas de mesa. Dentro de estos objetivos globales se pueden plantear diferentes sub-objetivos:

1. Describir el proceso y caracterizar el nicho ecológico. Se describirán las diferentes especies microbianas presentes en las salmueras de fermentación así como se estudiarán los cambios físico-químicos que se producen en la salmuera y en la aceituna.

2. Aislar representantes de las especies involucradas en la fermentación de la aceituna. De esta manera se intentará mantener y conservar la biodiversidad microbiana así como se estudiará sus características y posibles aplicaciones biotecnológicas.

3. Desarrollar y probar cultivos iniciadores. Con elló se garantizará un desarrollo rápido y controlado de la fermentación de aceitunas arbequinas y de otras variedades de aceituna.

4. Caracterizar factores relevantes en bacterias lácticas aisladas en aceitunas de mesa. Se analizarán factores importantes como la resistencia a la sal, la capacidad de adaptación a un medio pobre, la viabilidad en cocultivos con otras bacterias lácticas y/o levaduras o su potencial como productoras de bacteriocinas.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LAS ACEITUNAS ARBEQUINAS DE MESA

Albert Hurtado Fernández-Anchuela

ISBN:978-84-694-0289-4/DL:T-200-2011

Introducción

1. La aceituna de mesa, definiciones e importancia económica

El cultivo del olivo se origina hacía el norte del Mar Muerto hace unos 6000 años, en gran medida gracias a la facilidad con que la planta se propaga mediante procedimientos sencillos. Desde entonces, el cultivo del olivo se extiende por el Mediterráneo. Se cree que su cultivo se inicia en España con la civilización Fenicia, habiendo evidencias de su implantación en las colonias griegas. Durante el dominio romano de la Península Ibérica, el comercio del aceite con otras regiones del imperio consolida el olivar. Tras el imperio romano, la expansión del olivo por España ha sido constante llegando a ser cultivado en todos los lugares donde las condiciones climáticas y del suelo lo permiten.

Tras la implantación del cultivo del olivo en la península y, a lo largo de la historia, las aceitunas se han venido aliñando de distintas maneras para su consumo más o menos directo así como se han desarrollado adobos para su conservación y posterior consumo durante los meses entre cosecha y cosecha. Gracias a los trabajos de historiadores de la gastronomía como Carlos Azcoytia (<http://www.historiacocina.com>), conocemos las distintas recetas recogidas en las obras de Columela (siglo I), Casiano Baso (s. V), Abúr I-Jayr (s. IX), Arbulí (s. XV), Alonso Herrera (s. XVI) y otros autores que éstos mencionan en sus obras. Este viaje de siglos conduce a la industrialización y el presente estado del arte en cuanto al encurtido de la aceituna de mesa.

Según la Norma Comercial vigente del Consejo Oleícola Internacional (2004), la aceituna de mesa es “el producto preparado a partir de frutos sanos de variedades de olivo cultivado (*Olea europaea L.*), elegidas por producir frutos cuyo volumen, forma, proporción de pulpa respecto al hueso, delicadeza de la pulpa, sabor, firmeza y facilidad para separarse del hueso los hacen particularmente aptos para la elaboración; sometido a tratamientos para eliminar el amargor natural y conservado mediante fermentación natural o tratamiento térmico, con o sin conservantes, y, envasado con o sin líquido de gobierno.” Asimismo, clasifica las aceitunas de mesa según el grado de madurez que presenten durante la recolección en verdes, color cambiante o negras. La reglamentación técnico sanitaria española (BOE, nº 279, 2001) coincide en gran medida con la norma del Consejo Oleícola Internacional (COI).

Según datos del COI, habría plantadas en el mundo unas 10 millones de hectáreas. 1 millón de estas hectáreas sería el destinado a aceituna de mesa. En España, las hectáreas dedicadas a aceituna de mesa estarían alrededor de las 90.000 (ESYRCE, 2008). Andalucía poseería el 77% de estas hectáreas y Extremadura el 22%. Según los datos de COI de las últimas 5 campañas, España produce el 30% de las aceitunas de

mesa del mundo, con un volumen de 518.600 tm. De lejos, le siguen Turquía, Egipto, Siria, Grecia, Marruecos, Estados Unidos, Argentina, Argelia e Italia.

La producción de la campaña 2007/2008 ha sido de 556.160 tm (Agencia para el Aceite de Oliva - AAO). El 79% de la producción nacional se sitúa en Andalucía y un 19% en Extremadura. Sevilla (325.607 tm), Badajoz (59.336 tm), Córdoba (58.738 tm), Cáceres (48.437 tm) y Málaga (46.066 tm) serían las provincias más productivas (AAO). En el año 2009 hay registradas en España 458 entamadoras de aceitunas.

Tanto por el volumen de producción y exportación como por el número de empleos generados, el sector de la aceituna de mesa es de gran importancia dentro de la industria agroalimentaria nacional. Un 22% del PIB de la industria agroalimentaria corresponde al sector de la aceituna de mesa, con un valor de unos 1.000 millones de euros. Supone el empleo directo de 7.500 personas más toda la industria auxiliar asociada (envases de vidrio y hojalata, cartonaje, maquinaria, transporte, etc.), lo que supone el 27% del empleo nacional del sector de conservas y preparados de productos vegetales.

El 40% de la producción nacional se vende en España correspondiendo el 80% al consumo en los hogares y el 20% restante al consumo hotelero. El consumo de aceitunas por cápita se sitúa en torno a 2,35 kg/habitante (Asemesa, 2009). Respecto del consumo mundial, según datos del COI y por bloques, la UE ha consumido el 32,96%, los países árabes el 28,77%, otros países el 15,27%, USA, Puerto Rico y Canadá el 13,45%, Centro y Suramérica el 5,82% y los países del este de Europa el 3,72%. Por países, los mayores consumidores mundiales de aceituna de mesa son España, Estados Unidos, Egipto, Turquía, Italia, Siria, Rusia, Argelia, Brasil, Alemania, Irán, Marruecos, Jordania, Reino Unido y Canadá.

Las exportaciones de España se dirigen principalmente a la UE (45%), a USA, Puerto Rico y Canadá (27%), a Europa del este (12%), a países árabes (7%) y a Centro y Suramérica (3%), correspondiendo el 5% restante al resto del mundo. Por países, son los principales USA con el 24%, Italia con el 11%, Francia con el 8%, Rusia con el 7%, Alemania con el 7%, Portugal 6%, Arabia Saudita 5% y Reino Unido con el 3%.

Las importaciones nunca han sido relevantes pero, según los datos de Asemesa para el 2008, hemos importado unas 9000 tm de aceitunas de mesa procedentes de Portugal, el 38%, Egipto, el 29%, Marruecos, el 13%, y Grecia, el 6%.

Las principales variedades de aceituna según el volumen de producción han sido (AAO, 2009):

- **Manzanilla:** Es la variedad de aceituna de mesa de mayor difusión internacional. Se cultiva en la provincia de Sevilla y se destina fundamentalmente a la elaboración de aceitunas verdes aderezadas en salmuera. Se conoce como aceituna sevillana en España y como aceituna española en el extranjero.
- **Gordal:** También vinculada a la provincia de Sevilla. Es un fruto de gran tamaño algo asimétrico usada para aderezo.
- **Hojiblanca:** Variedad dominante en Málaga y Córdoba, válida para aceite y para mesa, tanto verde como negra. Es muy apreciada para su elaboración como aceitunas negras y aderezadas en salmuera.
- **Cacereña o manzanilla cacereña:** principalmente se elabora como aceituna negra aderezada aunque también es válida como aceituna verde.
- **Carrasqueña:** variedad procedente del injerto de la manzanilla con la morisca. La máxima producción se da en la provincia de Badajoz.
- **Otras:** Morona, Lechín, Aloreña, Picual, Cornicabra, Picudo, Arbequina, etc.

Las principales variedades de aceituna de mesa en distintos países productores son Conservolea y Kalamata en Grecia; Ascolana y Grossa di Spagna en Italia; Picholine y Tanche en Francia; Domat y Gemlik en Turquía, Sigeoise en Argelia, Arauco en Argentina, Picholine Marocaine en Marruecos, Meski en Túnez (Sánchez-Gómez et al., 2006 y Enciclopedia del Olivo TDC-Olive, 2009)

2. Clasificación de la aceituna de mesa

La norma de calidad del COI (2004) clasifica las aceitunas de mesa según el proceso de preparación en:

1) **Aceitunas aderezadas:** aceitunas verdes, de color cambiante o negras sometidas a un tratamiento alcalino y acondicionadas en salmuera, donde sufren una fermentación total o parcial, conservadas con o sin acidificantes.

2) **Aceitunas al natural:** aceitunas verdes, de color cambiante o negras, tratadas directamente con una salmuera, donde sufren una fermentación total o parcial, y

conservadas con o sin acidificantes.

3) **Aceitunas deshidratadas y/o arrugadas:** aceitunas verdes, de color cambiante o negras, sometidas o no a un ligero tratamiento alcalino, conservadas en salmuera o parcialmente deshidratadas con sal seca y/o aplicando calor o cualquier otro proceso tecnológico.

4) **Aceitunas ennegrecidas por oxidación:** aceitunas verdes o de color cambiante conservadas en salmuera, fermentadas o no, ennegrecidas por oxidación en medio alcalino y conservadas en recipientes herméticos mediante esterilización térmica. Su coloración negra es uniforme.

5) **Especialidades:** Las aceitunas podrán prepararse de formas diferentes o complementarias de las antes indicadas. Estas especialidades conservarán la denominación de “aceitunas” siempre que los frutos utilizados respondan a las definiciones generales establecidas en la Norma. Las denominaciones empleadas para estas especialidades deberán ser lo suficientemente explícitas para no suscitar en los compradores o consumidores confusión en cuanto al origen y naturaleza del producto y, en especial, con respecto a las denominaciones establecidas en la Norma.

El peso económico a nivel global de las aceitunas clasificadas como especialidades y las aceitunas deshidratadas/arrugadas es muy pequeño en relación a los otros tipos de preparaciones a pesar de la importancia que puedan tener a nivel local y en sus respectivos mercados.

Respecto a los restantes tres tipos de preparación y de acuerdo al volumen de ventas global, son tres tipos de aceitunas preparadas cada una bajo uno de los citados procesos y asociadas cada una a un país, las que suelen ponerse como ejemplo del proceso tecnológico tanto a nivel coloquial como científico (Garrido Fernández et al., 1997). Estas preparaciones corresponderían, por orden de importancia económica, a:

- 1) aceitunas verdes tratadas - estilo español (aceitunas aderezadas según la Norma del COI)
- 2) aceitunas negras al natural - estilo griego (aceitunas al natural según la Norma del COI)
- 3) aceitunas negras oxidadas - estilo californiano (aceitunas ennegrecidas por oxidación según la Norma del COI)

De forma habitual, cualquier aceituna que se estudie y/o elabore bajo uno de los

tres procesos presentados por la Norma del COI, se compara respecto a uno de estos tres tipos de aceituna.

Los tipos de aceituna dónde la acción microbiana no sólo es deseable, sino esencial para el producto final, son las aceitunas aderezadas y las aceitunas al natural. Estas preparaciones, junto con las aceitunas oxidadas, las trataremos a continuación tomando como ejemplo a su principal representante, la aceituna verde al estilo español, la aceituna negra al estilo californiano y la aceituna negra al estilo griego respectivamente.

En cuanto a los aspectos biotecnológicos detrás de cada proceso de elaboración, en el caso de las especialidades, cada una de ellas debería analizarse individualmente. Por ejemplo, en las aceitunas fritas no existe acción microbiana. Estas aceitunas se recolectan verdes y directamente se fríen, rebozadas o no, en aceite de oliva. En el caso de las aceitunas deshidratadas/arrugadas se han aislado ciertas levaduras (Arroyo-López et al., 2008) aunque su acción no es determinante para el desarrollo del producto. En adelante no se tratará ninguna de estas preparaciones.

2.1. Aceitunas verdes al estilo español

Entre todas las variedades comerciales de aceituna de mesa son las verdes al estilo español las más importantes y la aceituna manzanilla la principal variedad empleada (Garrido Fernández et al., 1997). El esquema general del proceso de elaboración de la aceituna verde al estilo español se muestra en la figura 1.1.

Las aceitunas se recogen en estado de maduración, habiendo alcanzado la talla normal pero presentando un color verde-amarillento. Una vez recolectadas se sumergen en una solución alcalina de hidróxido de sodio de concentración variable (en función de la temperatura, la variedad de aceituna y el grado de madurez de los frutos). Las aceitunas permanecen en la solución alcalina hasta que esta ha penetrado tres cuartas partes del fruto. El hidroxido sódico ejerce tres funciones:

- a) elimina gran parte del amargor de la aceituna al hidrolizar el glucósido oleuropeína (Fernández-Díez et al., 1985)
- b) permeabiliza la piel facilitando la difusión de los nutrientes que se convertirán en sustratos fermentables una vez se introduzcan las aceitunas en salmuera (Papamichael-Balatsouras y Balatsouras, 1988)

- c) c) transforma los compuestos de clorofila acreciendo la coloración final del fruto (Mínguez-Mosquera et al., 1989)

Después de uno o varios lavados para eliminar la sosa residual, las aceitunas se introducen en salmuera dónde sucede la fermentación. Una vez agotados los sustratos fermentables los frutos permanecen en salmuera hasta que son envasados y comercializados. Las aceitunas pueden ser vendidas envasadas o a granel. Se pueden vender en la misma salmuera de fermentación o se puede preparar una salmuera fresca. Adicionalmente se puede eliminar el hueso para venderlas deshuesadas, cortarlas en láminas, o rellenarlas, habitualmente con pimienta, anchoa o pastas preparadas con estos ingredientes (Garrido-Fernández et al., 1997).

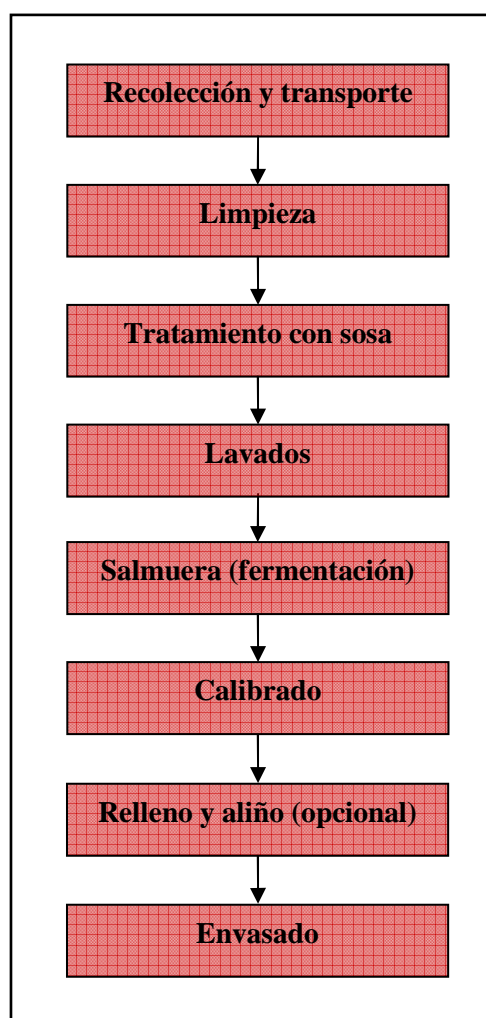


Figura 1.1 Diagrama de flujo del proceso de elaboración de las aceitunas verdes tratadas o aceitunas verdes al estilo español. Adaptado de Garrido Fernández et al., 1997)

2.2. Aceitunas negras oxidadas al estilo californiano

El esquema general del proceso de elaboración de la aceituna negra al estilo griego se muestra en la figura 1.2. Las aceitunas se recolectan cuando los frutos cambian de color verde a negro. Las variedades manzanilla, misión, sevillana y gordal cultivadas en Estados Unidos son los principales exponentes de este proceso. Se consumen directamente como aperitivo o son usadas para preparar terceros productos como panes, pizza o ensaladas (Garrido Fernández et al., 1997).

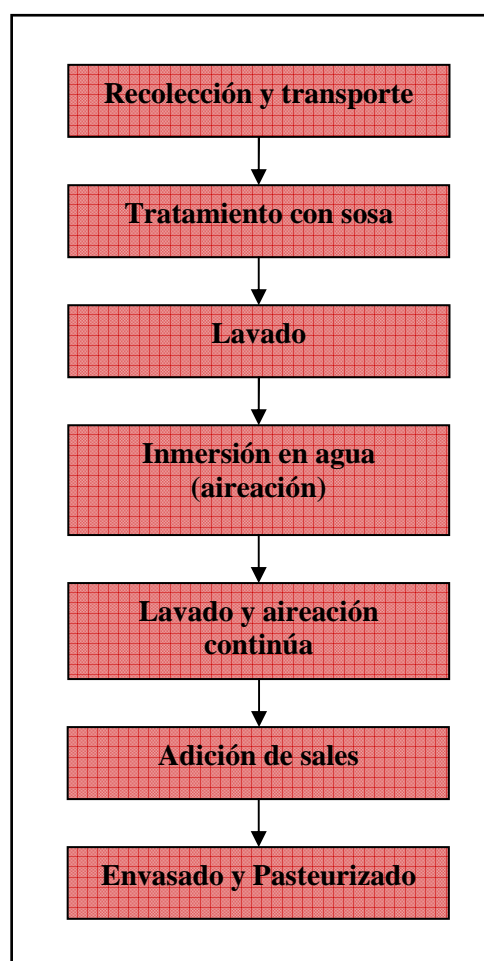


Figura 1.2. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de las aceitunas negras oxidadas al estilo californiano.

El procesado de las aceitunas negras oxidadas al estilo californiano consiste en tres tratamientos consecutivos de los frutos con soluciones alcalinas de hidróxido sódico. Estos tratamientos se llevan a cabo en tres días consecutivos y tienen con objeto que la sosa penetre la pulpa entre 1 y 2 mm. Alternativamente se hacen lavados en agua donde se aplica una corriente de aire. Estos lavados con agua no deben durar más de 10 horas por el riesgo de aparición de bacterias gram-negativas que podrían deteriorar el producto (Garrido Fernández et al., 1997). Las aceitunas ennegrecen progresivamente. Cuando se obtiene color continúan los lavados en agua y la aireación hasta conseguir un pH de 8. Entonces se añaden sales férricas para mejorar el desarrollo del color (Brenes et al., 1995; García et al., 1986). Finalmente las aceitunas se enlatan y esterilizan.

2.2. Aceitunas negras al estilo griego

Para ser procesadas al estilo griego las aceitunas se recogen cuando están plenamente maduras, no pudiendo ser el color superficial un indicador del estado óptimo de recolección. Para conocer el estado óptimo las aceitunas deben cortarse y observar el avance del color desde la pulpa hacia el hueso (Garrido Fernández et al., 1997). Las aceitunas se recogen a mano y son transportadas cuidadosamente hasta la entamadora. Allí se clasifican para eliminar los frutos dañados, se lavan con agua una o diversas veces para eliminar la suciedad superficial y, finalmente, se introducen directamente en salmuera entre el 8 y el 10% de sal (Balatsouras, 1990; Garrido Fernández et al., 1997).

El esquema general del proceso de elaboración de la aceituna negra al estilo griego se muestra en la figura 1.3:

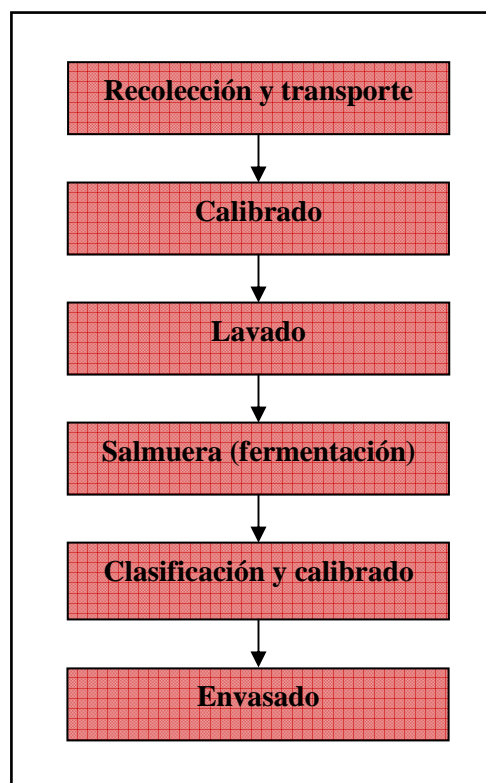


Figura 1.3. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de las aceitunas negras al natural o las aceitunas negras al estilo griego. Adaptado de Garrido Fernández et al., 1997)

3. La aceituna arbequina

3.1. Generalidades

La arbequina es la variedad de olivo principal en Cataluña donde el cultivo llegaría a las 70000 ha. repartidas entre las provincias de Lérida (65%), Tarragona (32%) y Barcelona (3 %). En los últimos años su cultivo se ha extendido a otras regiones españolas, principalmente Andalucía, y a terceros países como Chile, EEUU, Francia, Marruecos y, especialmente, Argentina (Tous et al., 1999). La producción de aceituna arbequina en Cataluña se situaría en torno a 75000 tm., destinándose entre un 5 y un 10 % a la elaboración de aceituna de mesa.

Cuenta la tradición que Jaime I trae la arbequina a Cataluña tras la conquista de Mallorca, a dónde había sido traída de Tierra Santa. El cultivo se expande en el siglo

XVI gracias al señor de Arbeca, localidad de la provincia de Lérida, quien decide implantar la variedad en su dominio debido a las innegables ventajas frente a otros olivos. El noble fomentó el cultivo con ayudas económicas por cada pie plantado. Más adelante fue el gobernador de Lérida quien fomentó la ruptura de tierras yermas con oliveras arbequinas, especialmente en la zona de les Garrigues. La subida del precio del aceite durante principios del siglo XIX fue el último impulso para la expansión del cultivo de esta variedad en Cataluña.

La aceituna arbequina tiene un gran interés por las características sensoriales de su aceite virgen y por las características agronómicas de la planta. Es un árbol rústico muy productivo, que fructifica rápidamente, tiene poca alternancia y un vigor reducido que permite concentrar las plantaciones. Se adapta a terrenos pobres, tolera la salinidad, resiste el frío y es autofértil (Tous y Romero, 1993).

La aceituna arbequina es de tamaño pequeño y de forma esférica con una baja relación pulpa hueso. Su pequeño tamaño dificulta la recolección mecanizada. El rendimiento en aceite se sitúa sobre el 18% (Rallo et al., 2005)

3.2. Elaboración de la aceituna de mesa arbequina

La aceituna de mesa arbequina es, con arreglo a la norma del COI, una aceituna al natural y, técnicamente, una aceituna verde al natural. Las aceitunas se recolectan verdes, justo cuando algunos frutos comienzan a cambiar de color. Una vez recolectadas se limpian de objetos y hojas, se lavan con agua corriente y son clasificadas por talla. Se depositan en los recipientes donde ocurrirá la fermentación y se añade salmuera. Las aceitunas fermentan y permanecen en los recipientes hasta que son consumidas (aceitunas hechas en casa) o envasadas para ser vendidas (industria).

La fecha de recolección varía entre final de septiembre y principios de noviembre, pues las diferencias, sobretodo de altitud, entre las distintas zonas de Cataluña dónde se cultiva, hacen que la maduración cambie. Los envases dónde la aceituna fermenta pueden ir desde un simple bote de cristal o un pequeño bidón de plástico de volumen diverso, si es un pequeño agricultor que prepara aceitunas para consumo propio, a bidones plásticos de 200 litros o depósitos subterráneos de fibra de cristal o cemento usados por las entamadoras.

Las concentraciones de sal de las salmueras empleadas también varían mucho de un productor a otro. Las entamadoras suelen usar concentraciones de sal entre el 4 y el

14 % (peso/volumen). En las preparaciones artesanales se usa un método bastante curioso. Se sumerge un huevo en una olla llena de agua (volumen entre 2 y 8 litros). A esta olla se le va añadiendo sal lentamente para que se vaya disolviendo. Una vez el huevo flota, se usa esa agua para preparar las aceitunas.

El aliño la industria lo realiza al final del proceso y para una preparación casera se prepara al mismo tiempo que se sumergen las aceitunas en salmuera. El aliño varía mucho entre elaboradores. En las entamadoras, una vez la aceituna ha fermentado, se envasan en salmuera fresca que contiene entre un 4 y un 6 % de sal además del aliño. El aliño no sólo sirve para aromatizar la aceituna sino que también se usa a modo de decoración. Este puede ser un diente de ajo, una cebolleta o un gajo de cebolla, un pedacito de corteza de limón, una ramita de albahaca, orégano o romero. También se suelen utilizar esencias, sobretodo la de romero, y ácidos láctico, acético y cítrico, como conservante. En las preparaciones caseras las aceitunas lavadas se introducen en el recipiente dónde fermentarán junto con el ajo, la cebolla, el limón y las hierbas aromáticas aunque alguno de estos aliños puede suponer un inhibidor de la fermentación (Zaika et al., 1983). Finalizada la fermentación se consumen directamente desde el envase donde han fermentado.

El esquema general del proceso de elaboración de la aceituna de mesa arbequina se muestra en la figura 1.3.

Únicamente se preparan aceitunas de mesa arbequinas mediante el procedimiento explicado en Cataluña y Baleares aunque, debido a la implantación de la variedad en otras comunidades, alguna entamadora en estas nuevas tierras prepara aceituna de mesa arbequina siguiendo otros métodos. Las aceitunas arbequinas preparadas fuera de Cataluña y Baleares poseen un sabor y unas características totalmente diferenciadas de las aceitunas arbequinas tradicionales.

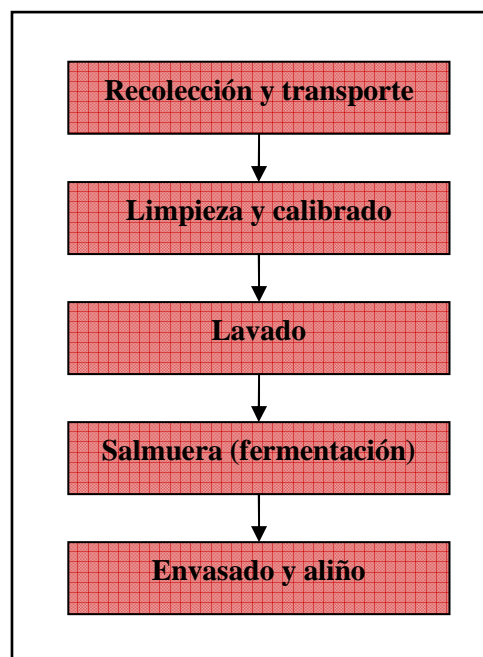


Figura 1.3. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de las aceitunas de mesa arbequinas

Hasta el momento un único estudio se ha llevado a cabo con aceitunas de mesa arbequinas. Se realizó una experiencia a nivel de laboratorio y se comparó una fermentación control con dos fermentaciones inoculadas con una cepa de *L. plantarum* que había sido aislada de aceitunas arbequinas envasadas (de la Torre et al., 1993). Las aceitunas de una de las dos inoculaciones habían sido tratadas térmicamente, técnica que había sido usada con éxito en otras variedades de aceitunas. Al final de la fermentación las aceitunas inoculadas ofrecieron mejores valores de pH y acidez libre que el control pero sus valores no fueron suficientemente aceptables, quedando demostrada la dificultad para preparar aceitunas verdes al natural. El tratamiento térmico tampoco favoreció la fermentación, poniendo de manifiesto las diferencias inherentes a las distintas variedades de aceitunas.

4. Biotecnología de la fermentación de la aceituna de mesa

De forma general se establece que las bacterias lácticas son las responsables de la fermentación de la aceituna aderezada mientras que en la fermentación de aceitunas al natural se establece una competencia entre bacterias lácticas y levaduras, pudiendo estas últimas llegar a ser las responsables únicas de la fermentación (Balatsouras, 1990;

Garrido Fernández et al., 1997; Sánchez et al., 2000; Tassou et al., 2002; Brenes, 2004). En el caso de la aceituna negra oxidada, aunque se han aislado microorganismos durante su conservación (Sánchez et al., 2006) y las aceitunas pueden haber sido previamente fermentadas (Norma del COI, 2004), no es su fermentación el paso determinante para la calidad del producto así que no se tendrán en cuenta en adelante.

Cualquier aceituna verde, color cambiante o negra, podrá ser procesada al natural o mediante aderezo, dependiendo el desarrollo de su fermentación de la variedad de aceituna y de las prácticas agrícolas e industriales empleadas. Aunque existen variedades que admiten ser recolectadas en distintos estados de madurez y/o procesadas bajo ambos métodos, lo más habitual es que cada variedad de aceituna se prepare bajo un único procedimiento con arreglo a las prácticas locales (Garrido Fernández et al., 1997)

4.1. Aceitunas aderezadas

El desarrollo de la fermentación de la aceituna aderezada tiene, por lo general, tres fases, incluso una cuarta si consideramos el posible deterioro microbiano del fruto una vez la fermentación ha finalizado (Garrido Fernández et al., 1997). Estas fases están diferenciadas por diferentes especies microbianas asociadas a ellas así como por los cambios fisico-químicos que ocurren en la salmuera y en la aceituna. La fermentación espontánea de las aceitunas de mesa al estilo español ha sido estudiada por Vaught (1982) y González Cacho (1963).

La primera fase tiene lugar desde que se introducen las aceitunas en salmuera hasta que aparecen poblaciones de lactobacilos. Los microorganismos asociados a esta fase son contaminantes, presentes en las aceitunas, la salmuera, los fermentadores y todo el aparejo industrial. Se han identificado *Bacillus*, *Micrococcus* y muchas bacterias gram-negativas como *Escherichia coli*, o diversos *Flavobacterium* y *Enterobacter* (Garrido Fernández et al., 1997). La presencia de enterobacterias se puede considerar normal pero todas las operaciones deben ir destinadas a inhibir el crecimiento de la microflora alterante así como a favorecer la implantación de las bacterias lácticas.

La segunda fase empieza cuando el pH del medio llega a 6 y está caracterizada por la presencia de especies de *Pediococcus* y *Leuconostoc* (González Cacho y Durán Quintana, 1981). Al final de esta fase los microorganismos alterantes asociados a la primera fase dejan de encontrarse presentes en la salmuera (Garrido Fernández et al.,

1997).

La tercera fase está caracterizada por un crecimiento abundante de especies de *Lactobacillus* y el pH tiende a llegar a 4. Una vez los sustratos fermentables se van agotando también declinan las poblaciones de lactobacilos (Garrido Fernández et al., 1997).

Es con el decrecimiento de las poblaciones de lactobacilos que podemos observar una cuarta fase o fase de deterioro. Durante esta fase únicamente se han aislado cepas del género *Propionibacterium* que es capaz de crecer e incrementar en 0,1 o 0,2 el pH de la salmuera siempre que la concentración en sal de la misma no sea adecuadamente controlada (Garrido Fernández et al., 1997).

Por lo general el papel de las levaduras en las aceitunas de mesa aderezadas se había considerado poco importante. La fermentación de las aceitunas aderezadas es llevada a cabo mayoritariamente por bacterias lácticas, aunque se pueden detectar poblaciones de levaduras entre 10^4 y 10^6 ufc (unidades formadoras de colonias)/ml (Garrido-Fernández et al., 1997). Como veremos más adelante, las levaduras pueden influir tanto negativa como positivamente en la fermentación, así que su control también es importante (Arroyo-López et al., 2008). Por ejemplo, durante fases tempranas de la fermentación las bacterias lácticas pueden obtener nutrientes esenciales para su desarrollo gracias al metabolismo de las levaduras (Ruiz-Barba et al., 1995).

Aunque la recomendación de diversos autores es que se empleen inóculos para fermentar aceitunas aderezadas (Garrido Fernández et al., 1997; Sánchez et al., 1995; Montañó et al., 1993; Balatsouras, 1983; Pelagatti y Brighigna, 1981; Borbolla y Alcalá y Rejano, 1964), a nivel industrial esta práctica continúa no estando muy extendida siendo la mayoría de los procesos espontáneos (Garrido Fernández et al., 1997; Fernández Díez et al., 1985).

4.2. Aceitunas al natural

El ecosistema de fermentación de las aceitunas al natural, igual que sucedía con las aceitunas aderezadas, está compuesto por una mezcla compleja de microorganismos gram-negativos, bacterias lácticas y levaduras (Balatsouras, 1990).

Tal como sucede con las aceitunas aderezadas, se puede dividir el proceso en diversas fases atendiendo a las poblaciones de microorganismos predominantes en cada una, aunque el inicio y el final de cada fase no están tan definidos como en la

fermentación de aceitunas aderezadas. La primera fase estaría marcada por la presencia de un gran número de bacterias gram-negativas, hasta 10^7 - 10^8 ufc/ml (Sánchez-Gómez et al., 2006). El máximo de población de bacterias gram-negativas se alcanza el segundo día tras la introducción de las aceitunas en salmuera, al mismo tiempo que se empiezan a establecer las poblaciones de bacterias lácticas o levaduras, o ambas, que serán las responsables de la fermentación. La desaparición de las bacterias gram-negativas llegará entre el séptimo y el decimoquinto día (Sánchez-Gómez et al., 2006) finalizando así la segunda etapa del proceso. En condiciones óptimas se habría alcanzado un valor de pH en torno a 4 y daría comienzo la tercera fase en la que la población microbiana iría agotando los nutrientes del medio (Garrido Fernández et al., 1997).

Es bastante difícil hablar de manera general de las aceitunas al natural puesto que la variedad de aceituna empleada es uno de los factores que más influye en el desarrollo de la fermentación. A modo de ejemplo, es bastante usual aplicar una corrección inicial de pH en aceitunas de color cambiante para favorecer el establecimiento de poblaciones de bacterias lácticas mientras que en el caso de aceitunas negras la fermentación suele comenzar de manera espontánea (Garrido Fernández et al., 1997).

En función de las prácticas locales, cada variedad de aceituna se recolectará en un determinado estado de madurez variando la cantidad de polifenoles presentes en la pulpa así como en la facilidad de liberación de estos al medio (Amiot et al., 1989). Puesto que las aceitunas al natural se procesan sin un tratamiento con sosa que hidrolice los polifenoles y estos compuestos inhiben el crecimiento de muchas bacterias lácticas, la concentración de polifenoles en la salmuera en los momentos iniciales será clave para el desarrollo de la fermentación (Rodríguez et al., 2009). Procesando las aceitunas al natural no influimos en la permeabilidad de las paredes celulares inherente a cada estado de madurez. La falta de liberación de nutrientes al medio también condiciona el inicio de la fermentación (Sánchez-Gómez et al., 2006).

Otro de los factores determinantes para la implantación de las bacterias lácticas o de las levaduras como población dominante es la concentración inicial de sal de la salmuera de fermentación (Tassou et al., 2002), factor que detallaremos en el punto 4.4.

4.3. Cambios físico-químicos durante la fermentación

Una vez comienza la fermentación se consumen los sustratos fermentables. Desaparece la glucosa y la fructosa, el manitol y los ácidos málico y cítrico habiéndose

generado ácido láctico y gran cantidad de compuestos volátiles que desempeñarán un papel importante en el aroma. Conforme la fermentación avanza el pH de la salmuera desciende. El valor final depende de los valores de acidez libre y acidez combinada. Los polifenoles presentes en el fruto que van siendo liberados al medio se hidrolizan. El ratio pulpa/hueso de la aceituna crece, pierde nitrógeno y gana humedad así como su contenido graso aumenta. El color de las salmueras también evoluciona aunque este factor sólo es importante si la salmuera va a emplearse en el envasado o sucede durante el mismo. El color del fruto también cambia debido a la evolución de los pigmentos cloroplásticos (clorofilas y carotenoides). Por último, hay que destacar los cambios obvios en la textura del fruto, debidos tanto al proceso como, en gran medida, a la elección óptima del momento de recolección y al manipulado de la aceituna hasta llegar a la factoría (Garrido Fernández et al., 1997).

4.4. Factores que influyen en la fermentación

El objetivo final de una fermentación es tanto preservar las características de la aceituna como mejorar las propiedades del producto final (Panagou y Tassou, 2006). Varios son los factores que influirán en el correcto desarrollo de la fermentación y que se deben evaluar para controlar el ecosistema (Chammen et al., 2004; Tassou et al., 2002; Spyropoulou et al., 2001; Durán Quintana et al., 1999; Spyropoulou y Nynchas, 1999; Rejano y Navarro, 1977):

- a) el pH del fruto; en aceitunas aderezadas hay que tener en cuenta el NaOH residual y los lavados que las aceitunas han sufrido
- b) la cantidad de cloruro de sodio de la salmuera y su influencia sobre la actividad de agua
- c) la temperatura de fermentación
- d) la disponibilidad de nutrientes y su difusión a través de la piel de la aceituna
- e) la aireación

Uno de los parámetros que se controlan de forma rutinaria para evaluar el éxito de una fermentación es la acidez, tanto libre como total (Panagou y Tassou, 2006). Además de los ácidos liberados por las frutas y los generados durante la fermentación, está permitido adicionar, en cualquier momento del proceso, ácido acético, ascórbico,

benzoico, cítrico, láctico y sórbico (Norma del COI, 2004). El empleo de ácido acético en el envasado de aceitunas negras o de ácidos láctico y cítrico en el caso de las verdes sería un buen ejemplo de el uso de esta práctica (de Castro et al., 2007; Rodríguez-Borbolla and González-Pellisó 1972). También se han empleado ácidos para reducir el pH inicial de las salmueras en aceitunas aderezadas y para establecer de inicio un pH óptimo para las bacterias lácticas en aceitunas al natural (Panagou y Tassou, 2006).

La concentración de sal de las salmueras es otro de los parámetros más importantes. No sólo se trata de favorecer una correcta fermentación desde el inicio sino que debiera mantenerse una concentración constante y renovarla si fuese preciso (Özay y Borcakli, 1995; Montañó et al., 1993; Bobillo y Marshal, 1991). Tassou et al. (2002) demostraron que una concentración de sal baja favorece el crecimiento de bacterias lácticas mientras que valores elevados estimulan el crecimiento de levaduras. Debido al coste medioambiental que acarrea las salmueras, también se están realizando estudios para desarrollar salmueras con menor concentración de sal sin poner en riesgo la seguridad alimentaria del proceso ni la calidad del producto (Kanavouras et al., 2005).

Tassou et al. (2002) también pusieron de manifiesto la importancia de la temperatura en los procesos de fermentación. El tipo de fermentador que se utilice influirá directamente en la temperatura. Contra más pequeño es el fermentador menos inercia tiene y, por ejemplo, en fermentaciones en barriles de 200 litros se observa un crecimiento muy irregular de la flora así como en un conjunto de barriles, mientras algunos se estropean, otros contienen aceitunas de muy alta calidad (Amelio y De Muro, 2000).

La variedad de aceituna también es determinante, especialmente en aceitunas elaboradas al natural. Por ejemplo, mientras se ha encontrado desarrollo de lactobacillos en aceitunas al natural de las variedades Conservolea, Gordal o Aloreña (Panagou et al., 2003; Durán et al., 1993; García et al., 1992), éstos no han sido capaces de crecer en las variedades Hojiblanca y Manzanilla (Garrido Fernández et al., 1997; Rodríguez-Borbolla et al., 1971).

5. Microorganismos asociados a la fermentación de aceitunas de mesa

5.1. Levaduras

El papel beneficioso de las levaduras en fermentaciones de aceituna de mesa al

natural o aderezadas está fuera de dudas (Kotzekidou et al., 1997; Marquina et al., 1992). Aún así, hay que evaluar cada especie presente en los distintos procesos puesto que algunas especies también son causantes del deterioro del fruto (Asehraou et al., 2000).

Las especies de levaduras identificadas de forma recurrente en diferentes elaboraciones de aceitunas de mesa han sido *Candida boidinii*, *Candida diddensiae*, *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotolura glutinis* y *Saccharomyces cerevisiae* (Arroyo-López et al., 2006; Hernández et al., 2007; Coton et al., 2005; Oliveira et al., 2004). Dentro de los géneros *Candida*, *Debaromyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces* y *Torulaspora* también se han identificado individuos pero o bien de forma minoritaria o bien asociadas a una determinada variedad y/o forma de preparación (Arroyo-López et al., 2008). Gracias al uso de técnicas moleculares la identificación de levaduras es ahora más rápida y precisa que mediante el uso de métodos bioquímicos y se elimina la subjetividad que puede acompañar a la interpretación de estas pruebas (Arroyo-López et al., 2008; Coton et al., 2005).

Uno de los defectos causados en las aceitunas por la acción de levaduras son las deformaciones de la estructura del fruto debido a la formación de bolsas de CO₂. La formación de gas también puede llevar a una fermentación muy tumultuosa con pérdidas de salmuera. *P. anomala* y *S. cerevisiae* se han asociado a este problema (Arroyo-López et al., 2008). También hay algunas especies que poseen actividad poligalacturonasa que contribuye a degradar la pared de los frutos volviéndolos demasiado blandos (Hernández et al., 1997). Diversas especies de *Rhodotolura* asociadas a la piel de la aceituna antes de la recolección han mostrado esta actividad aunque, actuando en las primeras etapas de la fermentación, un pequeño deterioro de la pared celular del fruto favorecería la liberación de nutrientes al medio colaborando con la fermentación (Vaughn et al., 1969). Aunque no se ha podido relacionar con ninguna especie en concreto, es posible que algunas levaduras también sean causantes de producir defectos en el aroma y sabor de la aceituna (Arroyo-López et al., 2008).

Durante la fermentación y el almacenamiento, las levaduras pueden producir etanol, ácidos orgánicos, glicerol, alcoholes superiores, ésteres, y otros compuestos volátiles que contribuirán significativamente a la textura y el aroma y, a su vez, en la aceptación del producto por parte del consumidor (Garrido-Fernández et al., 1997; Montañó et al., 2003; Sabatini et al., 2007). Diversas actividades enzimáticas mostradas por las levaduras pueden ser importantes durante el desarrollo de la fermentación de la aceituna de mesa. Por ejemplo, la actividad β -glucosidasa puede influir en la hidrólisis de la oleuropeína facilitando la implantación de las bacterias lácticas (Psani

and Kotzeidou, 2006). Hernández et al., (2007) estudiaron las actividades estereasa y lipasa en levaduras aisladas de aceitunas de mesa. Las levaduras podrían así incrementar el contenido en ácidos grasos libres en las salmueras de fermentación (Arroyo-López et al., 2008). Las levaduras también sintetizan diversidad de compuestos con propiedades antioxidantes en un entorno estresante como es la salmuera. Hasta ahora *P. anomala* ha mostrado la mayor actividad antioxidante en medio sintético. (Arroyo-López et al., 2008).

Uno de los papeles más relevantes que se otorga a las levaduras es la posibilidad de inhibir el crecimiento de otras levaduras y/o bacterias indeseables gracias a su actividad “killer” y/o micogénica (Psani and Kotzeidou, 2006; Asehrou et al., 2000). *P. anomala*, *Debaromyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* y *P. membranaefaciens* han sido las especies de levaduras que mayor actividad killer han mostrado (Arroyo-López et al., 2008; Hernández et al., 2008; Aserahou et al., 2000).

Únicamente un estudio de inoculación ha sido llevado a cabo con levaduras aunque sus resultados no fueron concluyentes (Garrido Fernández et al., 1997). Panagou et al. (2008) sugirieron una posible competencia entre cepas de bacterias lácticas usadas como inóculos frente a las cepas de levaduras silvestres. En cambio, diversos estudios avalan el uso de levaduras como co-inóculos puesto que, por un lado son capaces de inhibir el crecimiento de otras cepas de levaduras y flora autóctona patógena que podrían alterar las aceitunas y su salubridad (Psani and Kotzekidou, 2006), y por otro, son capaces de mejorar el crecimiento de las bacterias lácticas (Arroyo-López et al., 2008), probablemente gracias a que liberan en el medio nutrientes esenciales para éstas (Ruiz-Barba et al., 1994).

5.2. Bacterias lácticas

Una correcta fermentación se basa en la presencia y el rápido crecimiento de bacterias lácticas (Garrido Fernández et al., 1997). Como hemos visto, aunque hay que tener en cuenta las condiciones iniciales, se establece que las bacterias lácticas aparecen espontáneamente en aceitunas aderezadas mientras que en aceitunas al natural pueden verse desplazadas por las levaduras (Garrido Fernández et al., 1997; Balatsouras, 1995). Las bacterias lácticas son microaerófilas; llevan a cabo la conversión de los carbohidratos en CO₂ y ácido láctico y otros ácidos orgánicos sin necesidad de que haya oxígeno en el medio. De este modo los cambios que realizan no modifican drásticamente la composición de la aceituna. Mientras algunas bacterias son homofermentativas (únicamente producen ácido láctico) otras son

heterofermentativas y producen compuestos volátiles y pequeñas cantidades de etanol además de ácido láctico que serán muy importantes en el sabor y aroma final de las aceitunas (Muriana et al., 1993).

El principal género aislado en aceitunas de mesa es *Lactobacillus*. En menor número se han aislado los géneros *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. Entre los lactobacilos son *L. pentosus* y *L. plantarum* las especies predominantes en la mayoría de fermentaciones pero otros lactobacilos u otros géneros pueden desarrollar un papel destacado o, incluso, pueden ser mayoritarios dependiendo de la variedad de aceituna, el proceso de elaboración y la localización geográfica. La tabla 1.1 presenta las principales especies de bacterias lácticas aisladas en aceitunas de mesa en los últimos años.

Tabla 1.1. Relación de especies de bacterias lácticas identificadas en fermentaciones de aceitunas de distintas variedades y procesadas bajo distintos métodos.

Especies identificadas	Variedad de aceituna y proceso	Referencia
<i>L. plantarum</i> ; <i>Enterococcus</i> sp.	Aceituna verde aderezada (España)	Floriano et al. 1998
<i>L. plantarum</i>	Aceituna verde aderezada (España)	Ruiz-Barba et al. 1991; Ruiz-Barba y Jiménez-Díaz 1994 y 1995
<i>L. plantarum</i> ; <i>L. paracasei</i> ; <i>L. pentosus</i> ; <i>Ln. pentosaceus</i>	Aceituna galega verde al natural (Portugal)	Fernández-Díez 1983; Van Den Berg et al. 1993; Oliveira et al. 2004
<i>L. plantarum</i>	Aceitunas picholine verdes aderezadas (Marruecos)	Asehraou et al. 2002
<i>L. plantarum</i> , <i>Pediococcus</i> sp.	Aceitunas edincik y gemlik negras al natural (Turquía)	Borcakli et al. 1993
<i>L. lactis</i> ; <i>L. plantarum</i> ; <i>E. faecalis</i>	Aceitunas verdes al natural (Algeria)	Kacem et al. 2004
<i>L. plantarum</i> ; <i>L. brevis</i> ; <i>L. lactis</i> ; <i>Ln. Mesenteroides</i> ; <i>P. damnosus</i>	Aceitunas al natural (Turquía)	Korukluoglu et al. 2002
<i>L. plantarum</i>	Aceitunas oblica color cambiante al natural (Croacia)	Kulisic et al., 2004
<i>L. casei</i> ; <i>L. plantarum</i> ; <i>L. brevis</i> ; <i>E. faecium</i>	Aceitunas verdes al natural (Italia)	Randazzo et al. 2004
<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> y <i>E. durans</i> .	Aceitunas sigoise verdes al natural (Algeria)	Mourad et al., 2006
<i>L. plantarum</i> ; <i>Ln. pseudomesenteroides</i> , <i>Ln mesenteroides</i> ; <i>P. pentosaceus</i>	Aceitunas lecino negras (Italia)	Ercolini et al., 2006
<i>L. plantarum</i> ; <i>L. collinoides</i>	Aceitunas al natural (Túnez)	Chamkha et al., 2008
<i>L. pentosus</i>	Aceitunas conservolea negras al natural (Grecia)	Panagou et al. 2008
<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Ln. cremoris</i> y <i>Ln. paramesenteroides</i>	Aceitunas negras al natural Gemlik (Turquía)	Kumral et al., 2009
<i>L. plantarum</i> ; <i>L. brevis</i> ; <i>L. veridesens</i> ; <i>L. curvatus</i> ; <i>L. casei</i> ; <i>ssp tolerens</i> ; <i>Ln. mesenteroides</i>	Aceitunas jijelia negras al natural	Idoui et al., 2009

Durante bastante tiempo se creyó que *L. plantarum* era la especie predominante en la fermentación de aceitunas aderezadas (Fernández-Díez et al., 1985) Pero desde la descripción de *L. pentosus* como nueva especie (Zanoni et al., 1987), muchas cepas *L. plantarum* aisladas de fermentaciones de aceitunas han sido re-identificadas como *L. pentosus* (Montaño et al., 2000).

Aunque nos referimos a este grupo microbiano como bacterias lácticas, las reacciones que producen, tanto por número de sustratos generados como por vías metabólicas, son más complejas de lo que se desprende del nombre del grupo. A pesar de esta complejidad metabólica, la base de la fermentación láctica de la aceituna de mesa se centra en la habilidad del microorganismo, las bacterias lácticas, para producir ácido, reduciendo el pH y aumentando la acidez libre (Battcock and Azam-Ali, 1998). El ácido láctico que producen es efectivo inhibiendo el crecimiento de otras bacterias que podrían descomponer y estropear la aceituna. Mientras *Streptococcus* y *Leuconostoc* son las especies que menos ácido producen, los miembros del grupo *Lactobacillus* son homofermentativos y producen las mayores cantidades de ácido. En un intermedio se sitúan los *Pediococcus* (Battcock and Azam-Ali, 1998).

Otros de los metabolitos producidos por las bacterias lácticas de las aceitunas que más atención despiertan entre los investigadores son las bacteriocinas. Estos compuestos son péptidos ribosomales con un espectro de acción antibiótica que abarca tanto patógenos como *Listeria monocytogenes*, como bacterias gram-positivas que deterioran los alimentos (Yoneyama et al., 2004). Las bacteriocinas también actúan frente a competidores en el nicho ecológico de la propia cepa productora. Por ejemplo, la bacteriocina S, producida por cepas aisladas en fermentaciones de aceituna española, es activa frente a diversos competidores de *L. plantarum* (otras cepas de lactobacilos, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*), así como frente a bacterias que deterioran las aceitunas durante la fermentación, como *Propionibacterium* y *Clostridium* (Jiménez-Díaz et al., 1993). La producción de bacteriocinas suele estar ligada al crecimiento y, tanto la producción como su acción posterior, acostumbran a ser óptimas en las condiciones de fermentación (Delgado et al., 2007). El empleo de cepas productoras de bacteriocinas como starters en fermentaciones de aceitunas es muy interesante puesto que no sólo aumentamos las posibilidades del establecimiento del inóculo, sino que éste, además, incrementará la calidad y la seguridad del producto final (Delgado et al., 2005). La patente española 9900740 depositada por investigadores del CSIC (Jiménez-Díaz et al., 1999) se basa en el uso combinado de dos cepas de *L. plantarum*, una productora de bacteriocinas y otra con una buena tasa de crecimiento.

5.3. Otros microorganismos

El papel que desempeñan otros microorganismos en la fermentación de la aceituna de mesa es siempre perjudicial para el proceso, con la salvedad de las enterobacterias presentes en el inicio de las fermentaciones, hecho considerado habitual. Los tres principales problemas causados por microorganismos son que se vuelvan blandas las aceitunas, las bolsas de aire en su interior o burbujas en la piel debido a la acumulación de gases y las fermentaciones pútridas. Los microorganismos asociados a estos problemas son, respectivamente, *Bacillus*, bacterias gram-negativas (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia* y *Aeromonas*) y *Clostridium*. Por último, la aparición de *Propionibacterium* es causante de aumentos en el pH que permiten el posterior desarrollo de *Clostridium* con los problemas asociados al crecimiento de este otro microorganismo (Garrido Fernández et al., 1997).

6. Selección y uso de cultivos iniciadores

Reutilizar las salmueras de fermentación es la forma más simple de usar un inóculo. El ecosistema de la salmuera está bien adaptado y minimizaría los riesgos de deterioro. Panagou y Tassou (2006) pusieron de manifiesto que de este modo se reduce el tiempo de supervivencia de las enterobacterias.

El uso de cultivos iniciadores no sólo ayudará a disminuir el riesgo de deterioro sino que facilitará una rápida y mayor acidificación de la salmuera así como ayudará a disminuir la energía requerida durante el proceso (Panagou y Tassou, 2006; Spyropoulou et al., 2001; Garrido Fernández et al., 1997; Fernández-Díez et al., 1985).

Se establece que un cultivo iniciador ideal debe: a) tener un crecimiento rápido y predominante; b) metabolismo homofermentativo, tasa de acidificación elevada y un rápido consumo de los sustratos fermentables; c) tolerancia a la sal, los ácidos orgánicos y los polifenoles del medio; d) requisitos nutricionales mínimos; e) capacidad de crecer a baja temperatura; e) que tolere la congelación o el liofilizado en caso de que vaya a ser usado comercialmente (Durán-Quintana et al., 1999; Garrido Fernández et al., 1997; Fernández-Díez et al., 1985).

Del mismo modo el medio de fermentación debe cumplir los requisitos complementarios al cultivo seleccionado (Garrido Fernández et al., 1997):

- disponibilidad de sustratos fermentables
- concentración de sal tolerable
- poseer los requisitos nutricionales mínimos
- pH y temperatura apropiados
- ausencia de sustancias inhibidoras
- variedad de aceituna adecuada

Los estudios de comparación entre fermentaciones espontáneas y fermentaciones inoculadas se han llevado a cabo desde los comienzos de la investigación moderna sobre la aceituna de mesa, durante la década de los 40 del siglo XX (Garrido Fernández et al., 1997). Desde entonces muchos son los autores que recomiendan la inoculación de las salmueras.

Del mismo modo que las especies de lactobacilos se asocian a una variedad de aceituna o a un método de preparación para una variedad, se ha estudiado el uso de diferentes cultivos iniciadores para cada proceso. La mayoría de estudios actuales se han centrado en el uso de *L. pentosus* y *L. plantarum* como principales especies asociadas a los procesos de fermentación de aceitunas de mesa. Se han realizado con éxito inoculaciones con cepas de *L. plantarum* en diversos tipos de aceitunas:

- aceitunas manzanilla verdes aderezadas (Leal-Sánchez et al., 2003)
- aceitunas conservolea verdes previamente desamargadas (Chorianopoulos et al., 2005)
- aceitunas picholine verdes aderezadas (Lamzira et al., 2005)
- aceitunas ascolana ternera verdes aderezadas (Marsilio et al., 2005)
- aceitunas moresca y kalamata negras al natural (Sabatini et al., 2007)

También se ha inoculado *L. pentosus* en aceitunas manzanilla verdes aderezadas (de Castro et al., 2002), aceitunas conservolea verdes al natural (Panagou et al., 2003) y aceitunas lecino negras al natural (Servili et al., 2006).

Sánchez et al. (2001) inocularon con éxito aceitunas manzanilla verdes

aderezadas. En este estudio comparó una cepa de *L. pentosus* con una de *L. plantarum* obteniendo buenos resultados con ambas especies respecto a una fermentación control. También Panagou et al. (2008) inocularon con las dos especies aceitunas conservolea negras al natural observando niveles muy similares de acidificación e implantación de las cepas. Los mismos autores comprobaron en otro estudio que una cepa comercial de *L. pentosus* ofrecía mejores resultados en cuanto a acidificación, reducción del pH y del tiempo de supervivencia de las enterobacterias que una cepa de *L. plantarum* aislada de las propias aceitunas (Panagou et al., 2006). Este estudio se realizó con aceitunas conservolea verdes aderezadas.

También se han inoculado aceitunas con otras especies. Etchells et al. (1966) comparó los perfiles de fermentación de *L. pentosus*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus cerevisiae* y *Leuconostoc mesenteroides* cuando eran inoculados en aceitunas manzanilla verdes. *L. plantarum* fue con diferencia la especie que ofreció mejores valores de pH y acidificación así como dominó cuando fue co-inoculada con otra de las especies mientras que *L. brevis* fue incapaz de establecerse. En el estudio de De Castro et al. (2002) se usó con éxito *Enterococcus casseliflavus* conjuntamente con *L. pentosus* intentando simular el desarrollo de una fermentación espontánea de aceitunas al estilo español. Kumral et al. (2009) inocularon aceitunas negras al natural gemlik con *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc cremoris* y *Leuconostoc paramesenteroides*, además de con una cepa comercial de *L. plantarum*. A temperatura controlada y con una concentración salina baja, fue *L. cremoris* el microorganismo que ofreció mejores perfiles de inoculación.

Una de las más recientes vías de investigación es el uso de inóculos probióticos con el objetivo de formular la aceituna de mesa como alimento probiótico. Se ha observado que *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium bifidum* son capaces de colonizar la piel de la aceituna (Lavermicocca et al., 2005). También se ha usado la cepa propiótica *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 como cultivo iniciador en una fermentación de aceitunas de mesa Bella di Cerignola comprobando que la cepa permanece en la piel de la aceituna al final del proceso de elaboración, actuando al mismo tiempo como starter y como cepa prebiótica (De Bellis et al., 2010).

5. Bibliografía

- Agencia para el Aceite de Oliva, <http://aao.mapa.es>, España
- Amelio, M. and De Muro E., 2000. Naturally fermented black olives of *Taggiasca* variety (*Olea europaea* L.). *Grasas Aceites*, 51, 429-439.
- Amiot, M.J. Fleuriot, A. and Macheix, J.J., 1989. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry*, 28, 67-69.
- Asociación de Exportadoras e Industriales de Aceituna de Mesa (Asemesa), <http://asemesa.org>
- Arroyo-López, F. N., Durán-Quintana, M. C., Ruiz-Barba, J. L., Querol, A., & Garrido-Fernández, A., 2006. Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology*, 23, 791-796.
- Arroyo-López, F. N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., & Garrido-Fernández, A., 2008. Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 189-196.
- Asehraou, A., Peres, C., Brito, D., Faid, M., and Serhrouchni, M., 2000. Characterization of yeast strains isolated from bloaters of fermented green table olives during storage. *Grasas y aceites*, 51, 225-229.
- Asehraou, A., Peres, C., Faid, M. and Brito, D., 2002. Reducing the bloater spoilage incidence in fermented green olives during storage. *Grasas y Aceites*, 53, 330-334.
- Azcoytia, C. recopilación-resumen de distintas obras sobre la historia de la aceituna de mesa en la web <http://www.historiacocina.com>
- Balatsouras, G., Tsibri, A., Dalles, T. And Doutsias, G., 1983. Effects of fermentation and its control on the sensory characteristics of *Conservolea* cultivar green olives. *Applied and Environmental Microbiology*, 46, 68-74.
- Balatsouras, G.D., 1990. Edible olive cultivars, chemical composition of fruit, harvesting, transportation, processing, sorting and packaging, styles of black olives, deterioration, quality standards, chemical analysis, nutritional and biological value of the end product. *Olio d'oliva e olive da tavola: tecnologia e qualità*. Istituto Sperimentale per la Elaiotecnica, Pescara, Italy, 25-28, 291-330.
- Balatsouras, G., 1995. *Table olives: Cultivars, Chemical Composition, Commercial Preparations, Quality Characteristics, Packaging, Marketing* (2nd edn. ed.), Agricultural University, Athens.
- Battcock, M. and Azam-Ali, S., 1998. Bacterial fermentations. In: *Fermented fruits and vegetables. A global perspective*. FAO agricultural services bulletin num. 134.
- Bobillo, M. and Marshall, V.M., 1991. Effect of salt and culture aeration on lactate and acetate production by *Lactobacillus plantarum*. *Food Microbiology*, 8, 153-160.
- Borcakli, M., Ozay, G. and Alperden, I., 1993. Fermentation of Turkish olives with traditional and aerated systems. In: *Food flavours, ingredients, and composition*. Ed., Elsevier Science Publisher, BV, Charalambous, 265-277.
- Brenes, M., Romero, C., García, P., & Garrido, A., 1995. Phenolic compounds related to the black colour formed during the processing of ripe olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67, 35-41.
- Brenes, M., 2004. Olive fermentation and processing: scientific and technological challenges. *Journal of Food Science*, 69, 33-34.
- de la Borbolla y Alcalá, J.M., Fernández Díez, M.J. and González Cancho, F., 1964. Empleo de cultivos puros de lactobacilos en la preparación de aceitunas verdes. *Grasas Aceites*, 15, 6-11.
- de Castro, A., Montañó, A., Casado, F.-J., Sánchez, H. and Rejano, L., 2002. Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiology*, 19, 637-644.

- de Castro, A., García, P., Romero, C., Brenes, M. and Garrido, A., 2007. Industrial implementation of black ripe olive storage under acid conditions. *Journal of Food Engineering*, 80, 1206-1212.
- Chamkha, M., Sayadia, S., Brub, V. and Godon, J.J., 2008. Microbial diversity in Tunisian olive fermentation brine as evaluated by small subunit rRNA - Single strand conformation polymorphism analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 211-215.
- Chammen, N., Kachouri, M., Mejri, M., Peres, C., Boudabous, A. and Hamdi, M., 2005. Combined effect of alkali pretreatment and sodium chloride addition on the olive fermentation process. *Bioresarch Technology*, 96, 1311-1316.
- Chorianopoulos, N.G., Boziaris, I.S., Stamatiou, A., and Nychas, G.J.E., 2005. Microbial association and acidity development of unheated and pasteurized green-table olives fermented using glucose or sucrose supplements at various levels. *Food Microbiology*, 22, 117-124.
- COI/OT/NC nº 1, Diciembre 2004, Norma comercial aplicable a las aceitunas de mesa, Consejo Oleícola Internacional.
- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., and Sohier, D., 2005. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 130-135.
- De Bellis, P., Valerio, F., Sisto, A., Lonigro, S.L. and Lavermicocca, P., 2010. Probiotic table olives: Microbial populations adhering on olive surface in fermentation sets inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 in an industrial plant, *International Journal of Food Microbiology*, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.024
- De la Torre, J.E., Moya, E.R., Bota, E. and Sancho, J., 1993. Estudio físico-químico y microbiológico de la fermentación de aceitunas verdes arbequinas. *Grasas y Aceites* 44, 274-278.
- Delgado A., Brito D., Peres C., Noé-Arroyo F. and Garrido-Fernández A., 2005. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiology*, 22, 521-528.
- Delgado A., Noé-Arroyo F., Brito D., Peres C., Fevereiro, P. and Garrido-Fernández A., 2007. Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. *Journal of Biotechnology*, 130,193-201.
- Durán Quintana, M.C., Barranco, C.R., García, P.G., Balbuena, M.B. and Fernandez, A.G., 1997. Lactic acid bacteria in table olive fermentations. *Grasas y Aceites*, 48, 297-311.
- Durán, M.C., García, P., Brenes, M. and Garrido, A., 1993. *Lactobacillus plantarum* survival during the first days of ripe previous termolivenext term brining. *Systematic Applied Microbiology*, 16, 153-158.
- Durán Quintana, M.C., Garcia Garcia, P. and Garrido Fernandez, A., 1999. Establishment of conditions for green table olive fermentation at low temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 51, 133-143.
- Enciclopedia del Olivo, *Aceitunas, Aceite de Oliva y Dietas Cardiosaludables*, TDC Olive, proyecto europeo FOOD-CP-2004-505524. Disponible online en <http://www.tdcolive.net/references.htm>.
- Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos (ESYRCE), 2008. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, España.
- Ercolini, D. Villania, F. Aponte, M. and Mauriello, G., 2006. Fluorescence in situ hybridisation detection of *Lactobacillus plantarum* group on olives to be used in natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 291-296.
- Etchells, J.L., Borg, A.F., Kittel, I.D., Bell, T.A. and Fleming, H.P., 1966. Pure culture fermentation of green olives. *Applied Microbiology*, 14, 1027-1041.
- Fernández-Díez M.J., 1983. Olives p. 379-397. In G. Reed (ed.), *Food and feed production with microorganisms*. Verlag Chemie, Deerfield Beach, Fla.

- Fernández-Díez, M.J., de Castro, R., Garrido-Fernández, A., González, F., González-Pellissó, F., Nosti, M., Heredia, A., Mínguez, M.I., Rejano, L., Durán-Quintana, M.C., Sánchez, F., García, P. and de Castro, A., 1985. *Biotechnología de la Aceitunas de Mesa*. CSIC, Madrid.
- Floriano, B., Ruiz-Barba, J.L. and Jiménez-Díaz, R., 1998. Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4883-4890.
- García, P., Brenes, M., and Garrido, A., 1986. Use of ferrous lactate in the elaboration of ripe olives. *Grasas y Aceites*, 37, 33-38.
- García, P., Durán, M. C., Brenes, M. and Garrido, A., 1992. Lactic fermentation during the storage of "Aloreña" cultivar untreated green table olives. *Journal of Applied Bacteriology*, 73, 324- 330.
- Garrido-Fernández, A., Fernández Díez, M.J., & Adams, MR., 1997. *Table olives, production and processing*. Chapman and Hall, London.
- González Cacho, F., 1963. Microorganismos que se desarrollan en el aderezo de aceitunas verdes estilo español. Estudio cuantitativo. *Grasas y aceites*, 16, 230-234.
- González Cacho, F. and Durán Quintana, M.C., Bacterias cocáceas del ácido láctico en el aderezo de aceitunas verdes. *Grasas y Aceites*, 32, 373-379.
- Hernández, A., Martín, A. Córdoba, M.G., Benito, M.J., Aranda, E. and Pérez-Nevado, F., 2008. Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 178-188.
- Hernández, A., Martín, A. Córdoba, M.G., Benito, M.J., Aranda, E. and Pérez-Nevado, F., 2007. Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiology*, 24, 346-351.
- Idoui, T., Boudjerda, J. Leghouchia E. and Karam, N.E., 2009. Naturally fermented Jijelian black olives: microbiological characteristics and isolation of lactic acid bacteria. *Grasas y aceites*, 60, 514-518.
- Jiménez-Díaz, R., Ríos-Sánchez, R.M., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J.L., Piard, J.-C., 1993. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1416-1424.
- Jiménez-Díaz, R., Ruiz Barba, J.L., Rejano Navarro, L., Sánchez- Gómez, A.H. y Floriano Pardo, B., 1999. Procedimiento de fermentación de productos vegetales. Patente 9900740. Oficina española de patentes y marcas.
- Lamzira, Z., Asehrou, A., Brito, D., Oliveira, M., Faid, M. and Peres, C., 2005. Bloaters spoilage of green olives. *Food Technology and Biotechnology*, 43, 373-377.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Lonigro, S.L., De Angelis, M., Morelli, L., Callegari, M.L., Rizzello, C.G. and Visconti, A., 2005. Study of adhesion and survival of lactobacilli and bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4233-4240.
- Leal-Sánchez, M.V., Ruiz-Barba, J.L., Sánchez, A.H., Rejano, L. Jiménez-Díaz, R. and Garrido, A., 2003. Fermentation profile and optimization of green olive fermentation using *Lactobacillus plantarum* LPCO10 as a starter culture. *Food Microbiology*, 20, 421-430.
- Kacem, M., Zadi-Karam, H. and Karam, N., 2004. Isolation of lactic acid bacteria for its possible use in the fermentation of green Algerian olives. *Grasas y Aceites*, 55, 385-393.
- Korukluoglu, M., Gurbuz, O. and Sahin, I., 2002. Identification of lactic acid bacteria in fresh olive microflora (Turkish). *Turkish Journal of Biology*, 8, 109-113.
- Kotzekidou, P., 1997. Identification of yeast from black olives in rapid system microtitre plates. *Food Microbiology*, 14, 609-616.

- Kulusic, T. Berkovic, K., Pavic, S and Lustra, A., 2004. The processing of turning colour olives of *Oblica* cultivar. *Agriculturae conspectus scientificus* 69, 103-107.
- Kumral, A., Basoglu, F. and Sahin., 2009. Effect of the use of different lactic starters on the microbiological and physicochemical characteristics of naturally black table olives of gemlike cultivar. *Journal of Food Processing and Preservation* 33, 651-664.
- Marquina, D., Toufani, S., Llorente, P., Santos, A., Peinado, J.M., 1997. Killer activity in yeast isolated from olive brines. *Advances in Food Science*, 19, 41-46.
- Marsilio. V., Seghetti, L., Iannucci, E., Russi, F., Lanza, B., and Felicioni, M., 2005. Use of a lactic acid bacteria starter culture during green olive (*Olea europaea* L. cv *Ascolana* tenera) processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1084-1090.
- Minguez-Mosquera, M.I., Garrido-Fernández, J. and Gandul-Rojas, B., 1989. Pigment changes in olives during fermentation and brine storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 8-11.
- Montaño, A., Sánchez, A.H., and De Castro, A., 2000. Changes in the amino acid composition of green olive brine due to fermentation by pure culture of bacteria. *Food Microbiology and Safety*, 65, 1022-1027.
- Montaño, A., Sánchez, A.H., Casado, F.J., de Castro, A., Rejano, L., 2003. Chemical profile of industrially fermented green olives of different varieties. *Food Chemistry*, 82, 297-302.
- Mourad, K. and Nour-Eddine, K., 2006. Microbiological study of naturally fermented Algerian green olives: isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts along with the effects of brine solutions obtained at the end of olive fermentation on *Lactobacillus plantarum* growth. *Grasas y aceites*, 57, 292-300.
- Muriana, P.M., 1993. Antimicrobial peptides and their relation to food quality. In: A.M. Spanier, H. Okai and M. Tamura (Eds.), *Food Flavor and Safety: Molecular Approach and Design*, American Chemical Society, Washington, DC, Symposium Series No. 528, 303-321.
- Oliveira, M., Brito, D., Catulo, L., Leitao, F., Gomes, L., Silva, S., Vilas-Boas, L., Peito, A., Fernandes, I., Gordo, F., Peres, C., 2004. Biotechnology of olive fermentation of 'Galega' Portuguese variety. *Grasas y Aceites*, 55, 219-226.
- Özay, G and Borcakli, M., 1995. Effect of brine replacement and salt concentration on the fermentation of naturally black olives. *Food Research International*, 28, 553-559.
- Pelagatti, O., Brighigna, A., 1981. Rivitalizzazione e impiego di fermenti lattici essecati per la preparazione delle olive da tavola col sistema Sivigliano. *Industrie Alimentari*, 182-184.
- Panagou, E.Z., Tassou, C.C. and Katsaboxakis, C.Z., 2003. Induced lactic acid fermentation of untreated green olives of the *Conservolea* cultivar by *Lactobacillus pentosus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 667-674.
- Panagou E.Z. and Tassou C.C., 2006. Changes in volatile compounds and related biochemical profile during controlled fermentation of cv. *Conservolea* green olives. *Food Microbiology*, 23, 738-746.
- Panagou, E.Z., Schillinger, U., Franz, and C., Nychas, G.J.E., 2008. Microbiological and biochemical profile of cv. *Conservolea* naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 25, 348-358.
- Papamichael-Balatsouras, V.M. and Balatsouras, G.D., 1988. Utilization of modified spent lye as cover brine of *Conservolea* olives subjected to fermentation as green of spanish style. *Grasas y aceites*, 39, 17-21.
- Psani, M. and Kotzekidou, P., 2006. Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 22, 1329-1336.
- Ralló, L., Barranco, D., Caballero, J.M., del Río, C., Martín, A., Tous, J. and Trujillo, I., 2005. *Varietades del Olivo en España*. Editado por: Junta de Andalucía, Ministerio de Agricultura Pesca

y Alimentación y Ediciones Mundi Presa.

- Randazzo, C.L., Restuccia, C., Romano, A.D. and Caggia, C., 2004. *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 9-14.
- Real Decreto 1230/2001, de 8 de Noviembre de 2001, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y venta de las aceitunas de mesa. (B.O.E. 21.11.2001).
- Rejano Navarro, L., González Cancho, F. and de la Borbolla y Alcalá, J.M.R., 1977. Estudios sobre el aderezo de aceitunas. XXIV. Nuevos ensayos sobre el control de la fermentación. *Grasas Aceites*, 28, 255-265.
- Rodríguez- Borbolla, J.M., González- Pellisó, G. and González-Cancho, F., 1971. Aceitunas verdes y de color cambiante en salmuera. I. *Grasas y Aceites*, 22, 455-460.
- Rodríguez-Borbolla, J.M. and González-Pellisó, F., 1972. Estudios sobre aceitunas envasadas estilo español. XI. La inhibición del sedimento. *Grasas y Aceites*, 23, 107-117.
- Rodríguez, H., Curiel, J.A., Landete, J.M., de las Rivas, B., López de Felipe, F., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J.M. and Muñoz, R., 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 79-90.
- Ruiz-Barba, J.L., Piard, J.C. and Jiménez-Díaz, R., 1991. Plasmid profiles and curing of plasmids in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentation. *Journal of Applied Bacteriology*, 71, 417-421.
- Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Warner, P.J. and Jiménez-Díaz, R., 1994. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in spanish-style green olive fermentations. *Applied and environmental Microbiology*, 60, 2059-2064.
- Ruiz-Barba, J. L., & Jiménez-Díaz, R., 1995. Availability of essential B-group vitamins to *Lactobacillus plantarum* in green olive fermentation brines. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1294-1297.
- Sabatini, N., Mucciarella, M.R. and Marsilio, V., 2008. Volatile compounds in inoculated and inoculated table olives with *Lactobacillus plantarum* (*Olea europaea* L., cv. *Moresca* and *Kalamata*). *Food Science and Technology*, 41, 2017-2022.
- Sánchez, A., García, P., Rejano, L., Brenes, M. and Garrido, A., 1995. The effects of acidification and temperature during washing of Spanish-style green olives on the fermentation process. *Journal of Science and Food Agriculture*, 68, 197-202.
- Sánchez, A.H., de Castro, A., Rejano, L. and Montañó, 2000. Comparative study on chemical changes in olive juice and brine during green olive fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5975-5980.
- Sánchez-Gómez, A.H., García, P. y Rejano, L., 2006. Trends in table olives production, Elaboration of table olives. *Grasas y Aceites*, 57, 86-94.
- Spyropoulou, K. and Nychas, G-J.E., 1999. Addition of fermentable substrates and thiamine during the fermentation of green olives with or without starter cultures. In: Tuijtelaars, A.C.J., Samson, R.A., Rombouts, F.M. and Notermans, S., Editors, 1999. *17th International Symposium of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH)*, Veldhoven, The Netherlands, 13-17 September, 1999, pp. 685-689.
- Spyropoulou, K.E., Chorianopoulos, N.G., Skandamis, P.N. and Nychas, G.-J. E., 2001. Control of *Escherichia coli* O157: H7 during the fermentation of Spanish-style green table olives (*Conservolea* variety) supplemented with different carbon sources. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 3-11.
- Tassou, C. C., Panagou, E. Z., & Katsaboukakis, K. Z., 2002. Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines.

Food Microbiology, 19, 605-615.

Tous, J. Romero A., 1993. *Varietades del olivo, Con especial referencia a Cataluña*. Fundación “La Caixa”-AEDOS. Barcelona.

Tous, J. Romero, A. y Plana, J., 1999. IRTA-i 18, clon de la variedad de olivo ‘Arbequina’. *Olivae*, 77, 50-52.

Van Den Berg, D.J.C., Smits, A., Pot, B., Ledebøer, A.M., Keresters, K., Verbakel, J.M.A. and Verrips, C.T., 1993. Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food, fermentation processes and culture collection. *Food Biotechnology*, 7, 189-205.

Vaughn, R.H., Jakubczyk, T., Macmillan, J.D., Higgins, T.E., Dave, B.A., Crampton, V.M., 1969. Some pink yeasts associated with softening of olives. *Applied Microbiology*, 18, 771-775.

Yoneyama, H., Ando, T. and Katsumata, R., 2004. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria and their use for food preservation. *Tohoku journal of Agricultural Research*, 55, 51-55.

Zaika, L.L., Kissinger, J.C. and Wasserman, A.E., Inhibition of lactic acid bacteria by herbs. *Journal of food science*, 48, 1455-1459.

Zanoni, P., Farrow, J. A.E., Phillips, B.A., & Collins, M.D., 1987. *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson, and Anderson) sp nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37, 339-341.

Capítulo 1. Microbial population dynamics

during the processing of *Arbequina* table

olives

Albert Hurtado, Cristina Reguant, Braulio Esteve-Zaroso, Albert Bordons,
Nicolas Rozès

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat
Rovira i Virgili, Campus Sescelades, c/ Marcel·lí Domingo, s/n, Tarragona 43007,
Spain

Food Research International, 41, 738-744 (2008)



Microbial population dynamics during the processing of *Arbequina* table olives

Albert Hurtado, Cristina Reguant*, Braulio Esteve-Zaroso, Albert Bordons, Nicolas Rozès

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Campus Sescelades, c/ Marcel·lí Domingo, s/n, Tarragona 43007, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 April 2008

Accepted 30 May 2008

Keywords:

Table olives

Arbequina

Brine

Yeast

Lactic acid bacteria

Lactobacillus pentosus

Lactobacillus paraplantarum

Candida boidinii

Candida diddensiae

ABSTRACT

Arbequina table olives are produced according to a traditional process involving a spontaneous fermentation in brine. The aim of this study was to evaluate for the first time the different microorganism populations in brine during the processing of *Arbequina* table olives.

Yeasts were the main organisms involved in fermentation but lactic acid bacteria were important when the olives were being matured before packaging. The main yeast species identified were *Candida boidinii*, *Candida diddensiae*, *Candida membranaefaciens*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia kluyveri*, *Pichia membranaefaciens* and *Rhodotolura glutinis*. *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum* were the species of lactic acid bacteria involved in the process. Some of the microbial species identified in this work have not been previously reported in the fermentation processes of table olives. Moreover, no relevant differences in microbial species diversity were observed at different depths of the vat. Nevertheless, the development of lactic acid bacteria was delayed in deep brine.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Table olives are one of the most important fermented vegetables in the world economy. Table olives are produced as Spanish-style green olives in brine, as naturally black olives in brine, and as ripe olives, according to well-established processes. There are other, innumerable ways of processing table olives according to traditional practices, which do not form part of the international markets but are very important at regional level (Fernández-Díez et al., 1985).

The *Arbequina* cultivar is greatly valued for its high yield. Its oil has low acidity and a fruity flavour and is originally from the village of Arbeca, near Lleida (Catalonia, Spain). *Arbequina* olive cultures are very important in the south of Catalonia but this cultivar has also recently been planted in other regions of Spain and other countries (e.g., Argentina, Tunisia, Morocco), mainly to produce oil.

Arbequina table olives are processed as 'untreated green olives' or 'naturally green olives'. This processing includes harvesting and transportation to the factory, sorting to remove damaged fruits, washing to eliminate superficial dirt and finally brining in 4–6% NaCl (Garrido-Fernández, Fernández-Díez, & Adams, 1997). *Arbequina* table olive processors use different methodologies varying salt concentration, vessel form and materials, and time of olive

maturity in brine. Production methodologies are based on traditional methods and strongly influenced by local practices.

In naturally black olives, yeasts are the responsible for fermentation but in Spanish-style olives this role is played by lactic acid bacteria (LAB) (Garrido-Fernández et al., 1997). In other processing methodologies competition between yeasts and LAB has been reported (Tassou, Panagou, & Katsabokakis, 2002). *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus* are the main LAB involved in table olive fermentation although other LAB species have been isolated (Campaniello et al., 2005; Garrido-Fernández et al., 1997; Oliveira et al., 2004; Randazzo, Restuccia, Romano, & Caggia, 2002). The main yeast species identified in olive fermentations are *Candida boidinii*, *Candida diddensiae*, *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri*, *Pichia membranaefaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* (Arroyo-López, Durán-Quintana, Ruiz-Barba, Querol, & Garrido-Fernández, 2006; Coton, Coton, Levert, Casaregola, & Sohier, 2005; Oliveira et al., 2004).

The microbial ecosystem in brine is influenced by (a) the indigenous microbiota present in olives, (b) intrinsic factors of the fruit such as pH, water activity, diffusion of nutrients from the drupe (depending on the structure of the olive skin) and levels of antimicrobial compounds such as oleuropein, and (c) extrinsic factors such as temperature, oxygen availability and salt concentration in brine (Nychas, Panagou, Parker, Waldron, & Tassou, 2002). Traditionally, table olive industries let the process develop spontaneously without monitoring the microbiota (Spyropoulou, Choriantopoulos, Skandamis, & Nychas, 2001).

Usually the only parameter controlled by producers of *Arbequina* table olives is salt concentration, hence, the process is mainly

* Corresponding author. Tel.: +34 977 558280; fax: +34 977 558232.
E-mail address: cristina.reguant@urv.net (C. Reguant).

spontaneous and uncontrolled. Nowadays there are neither physico-chemical nor microbiological controls to determine objectively the end of fermentation and so the producer decides, according to personal criteria, when olives are “ready to eat”.

The aim of this work was to study the ecology and the population dynamics of yeast and LAB present in brine and to know if the depth of the fermentation tanks affects these dynamics. This knowledge will help to design future experiments in order to control and improve naturally fermented *Arbequina* olives processes.

2. Materials and methods

2.1. Olive brine samples

Samples were provided by the “Mas d'en Pou” olive manufacturer (Vinyols i els Arcs, Tarragona, Spain). They were collected at different depths (2 cm, 20 cm, 1 m and 2 m) from three subterranean vats, and were taken regularly every 3–4 days during the first 3.5 months. Once LAB reached counts over 10^7 ml⁻¹ the samples were taken every 35–40 days. Temperature of the vessel was recorded throughout the process. The pH of samples was determined using a GLP21 pH meter (Crison, Barcelona, Spain). The samples obtained from a single industrial fermentation were taken in duplicate for each depth.

2.2. Cell viability determination

For microbial analysis, brine samples were diluted when necessary in a saline aqueous solution (0.8%, NaCl, w/v) and plated on different culture media using the Whitley Automatic Spiral Plater (DW Scientific, W. Yorkshire, UK). The selective enumeration of LAB was done in MRS (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) agar modified by the addition of 0.6% (w/v) D,L-malic acid, 0.5% (w/v) fructose, nystatin (100 mg/l) and sodium azide (100 mg/l) at pH 5. Yeasts were enumerated in YEPD (Difco) agar supplemented with 100 mg/l chloramphenicol. Violet Red Bile Glucose Agar (Panreac, Barcelona, Spain) was used for the enumeration of enterobacteria and Cetrimide Agar (Panreac) for pseudomonads. Rose Bengal chloramphenicol agar (Panreac) was used to evaluate the effect of moulds in the total count of yeast. MRS plates were incubated for 48 h at 27 °C under a 10% CO₂ atmosphere. The other plates were incubated at 30 °C for 48 h. The ProtoCOL SR/HR software (version 1.27.1664; Synoptics Ltd., Cambridge, UK) was used to count the spirally diluted plates.

2.3. Microbial species identification

2.3.1. Enterobacteriaceae

Ten isolated colonies were randomly picked out from the VRBG agar plates for each sample, when they were present. They were identified as enterobacteriaceae using the Api 20E kit (BioMérieux S.A., Marcy-l'Etoile, France). Complete identification of enterobacteria was achieved by use of the tests in *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt, Krieg, Sneath, Staley, & Williams, 1994).

2.3.2. Yeasts

Thirty isolated yeast colonies were randomly picked out from the YEPD agar plates for each sample. A small-scale DNA extraction from fresh colonies (Ruiz-Barba, Maldonado, & Jiménez-Díaz, 2005) was carried out. One microliter of the extraction was used for specific yeast PCR reaction, followed by RFLP analysis: a fragment of the 5.8S rDNA including the lateral internal transcribed spacers (ITS) was amplified by PCR and digested with the enzymes *CfoI*, *HaeIII* and *HinfI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) as described by Esteve-Zarzoso, Belloch, Uruburu, and Querol

(1999). Restriction patterns and PCR products were compared using a database (www.yeast-id.com, CSIC, Valencia, Spain).

2.3.3. Lactic acid bacteria

Thirty isolated lactic acid bacteria colonies were randomly picked out from the modified MRS agar plates for each fermentation time. Two microliters of DNA from the micro-extraction (Ruiz-Barba et al., 2005) were used to perform LAB RFLP-PCR analysis (Rodas, Ferrer, & Pardo, 2003). A fragment of the sequence of 16S rDNA was amplified and digested using *BfaI* and *MseI* (New England Biolabs). Formamide 1% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was added to the PCR reaction mix to improve the specificity (Sarkar, Kapelner, & Sommer, 1990). The identification was based on the comparison of the isolate band profiles with the patterns obtained from type culture strains. This methodology did not allow us to distinguish between *L. plantarum* and *L. pentosus*. Those strains that showed these *L. plantarum*–*L. pentosus* profiles were confirmed with the *recA* gene multiplex PCR (Torriani, Felis, & Dellaglio, 2001).

3. Results

The production of *Arbequina* table olives is a traditional process that has not been previously studied. This work has shown how the different microbial populations succeed each other throughout the spontaneous process of fermentation and maturation of *Arbequina* olives.

3.1. Population dynamics

Enterobacteriaceae reached populations between 10^5 and 10^7 cfu/ml at the beginning of the process (first 5 days) in surface samples (Fig. 1c). In the deepest sample enterobacteriaceae were only enumerated the first day. The disappearance of the enterobacteriaceae population was parallel with pH decrease and hypoxia conditions (increasing of depth). No more enterobacteriaceae were detected except at the end of the maturation process (days 190–240), when the population was ca. 10^5 cfu/ml near the surface. During this period the temperature of vat increased from 17 to 24 °C. No pseudomonad colony was found during the process.

Yeasts increased rapidly on the surface and progressively extended to deeper levels contributing to a pH decrease from 5.6 to 4.5 (Fig. 1b). Their numbers were around 10^5 cfu/ml in the first 20-cm of the vat, whereas they reached this number at 1 and 2 m depth after 10 and 60 days, respectively, after the start of the fermentation. Yeasts began to decrease at 60–70 days of fermentation until day 194. The last sample was characterised by a new increase in yeast counts at all depths corresponding to an increase of temperature. During the process a few moulds appeared in YEPD and Rose Bengale plates.

First LAB colonies (ca. 10^4 cfu/ml) appeared about day 15 of fermentation in the first meter of the vat (Fig. 1a). From days 20 to 30, noticeable growth was seen to reach populations of ca. 10^7 cfu/ml at day 40. However, a delay on LAB development was observed from depth to surface. From days 60 to 240, populations became equal at all depths. The last sample (day 240) was characterised by a higher decrease in LAB counts. During the predominance of LAB population, the pH was stable until the end of the process, especially on deeper samples (Fig. 1d). However, on superficial brine we observed a concomitant increase of both pH and enterobacteria and yeast populations.

3.2. Enterobacteriaceae identification

Eighty percent of the isolates of enterobacteriaceae were identified as *Proteus vulgaris* and 20% as *Providencia rettgeri* using the

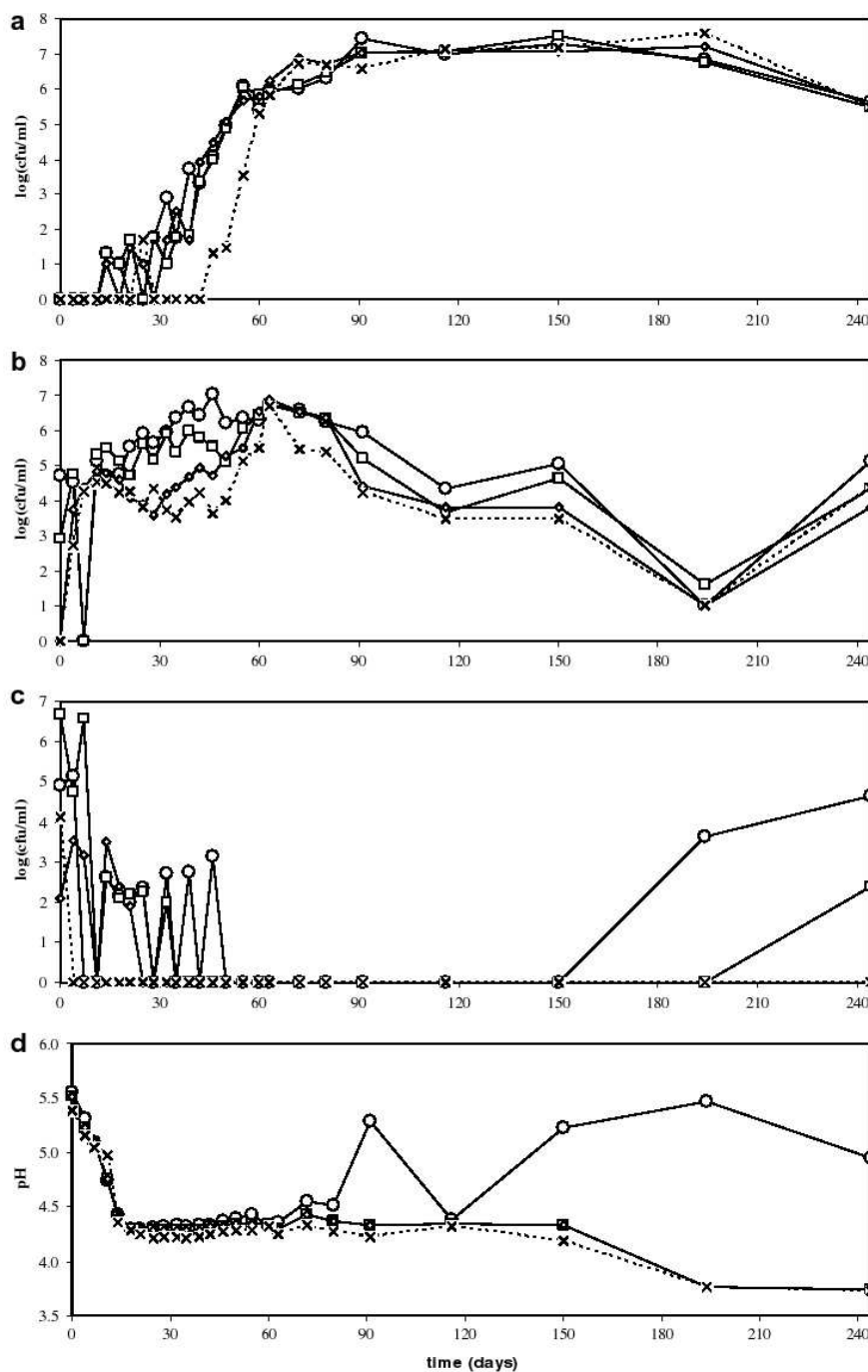


Fig. 1. Population (cfu/ml) of lactic acid bacteria (a), yeasts (b), enterobacteriaceae (c) and pH (d) during fermentation of *Arbequina* olives at different depths: (○) surface, (□) 20 cm, (◇) 1 m and (×) 2 m.

API20E system. The presence of these microorganisms was of very little significance and they were not considered for further study.

3.3. Yeast species identification

Depending on the size of the PCR product and the restriction fragments obtained by RFLP-PCR analysis, 12 patterns were pres-

ent in brine samples (Fig. 3). These patterns were assigned to different species (Table 1) after comparing their profiles in the database. At the beginning of the fermentation *C. diddensiae* was the main yeast species detected in brine, whatever the depth analysed (Fig. 2). The presence of *Rhodotolura glutinis* was also relevant in the first day sample. After the disappearance of *C. diddensiae*, yeast population was mainly composed of *P. kluyveri* and *C. boidi-*

Table 1

Number of isolates of identified yeast and LAB species during the processing of Arbequina table olives

Species	Days							
	4	11	18	28	55	91	194	244
Yeasts								
<i>Candida diddensiae</i>	96	117	98	1				
<i>Candida boidinii</i>			8	57	86	82		14
<i>Pichia kluyveri</i>			12	61	32			
<i>Candida membranaefaciens</i>								41
<i>Pichia membranaefaciens</i>						16	12	57
<i>Rhodotorula glutinis</i>	20							
<i>Pichia anomala</i>				1	2			
<i>Kluyveromyces lactis</i>								8
<i>Pichia rhodanensis</i>	3	3						
<i>Pichia minuta</i>							9	
<i>Candida aasei</i>							3	
<i>Candida parapsilosis</i>			2					
Lactic acid bacteria								
<i>Lactobacillus pentosus</i>			2	5	59	88	70	55
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>				1	1	36	6	25
<i>Lactobacillus plantarum</i>			1	1				

nii. As soon as the LAB population took over the yeast population *P. membranaefaciens* appeared until the end of the process. Then, *C. membranaefaciens* and *Kluyveromyces lactis* were the other species identified. Other yeast species detected at lower levels throughout the process were *P. anomala*, *Pichia rhodanensis*, *Pichia minuta*, *Candida aasei* and *Candida parapsilosis*.

3.4. LAB species identification

LAB analysis by RFLP-PCR revealed two restriction patterns (Fig. 4). These were assigned to *Lactobacillus mali* and *L. pentosus/L. plantarum* species. In order to confirm the identity of these isolates, they were further identified by multiplex PCR assay. It allowed us to distinguish between *L. pentosus* and *L. plantarum* species, showing that *L. pentosus* was the main LAB species detected in brine (Fig. 2). Furthermore, the isolates whose RFLP-PCR pattern was previously assigned to *L. mali* were identified by multiplex PCR as *Lactobacillus paraplantarum*. In terms of relevance, *L. pentosus* was the main LAB species detected in brine, while *L. paraplantarum* appeared to a lesser degree from the third month of the process on. Only a few isolates were identified as *L. plantarum* (Table 1).

4. Discussion

This study reports for the first time microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives. This traditional preparation, widespread in north-eastern Spain (Catalonia) involves the direct brining of green olives without prior treatment with NaOH solution. Generally the “untreated green olives in brine” or “naturally green olives” (Fernández-Díez et al., 1985) undergo a spontaneous fermentation by a mixture of yeasts and LAB with a short initial period where a high risk of spoilage, mainly by enterobacteria, can occur (García-García, Durán-Quintana, Brenes-Balbuena, & Garrido-Fernández, 1992).

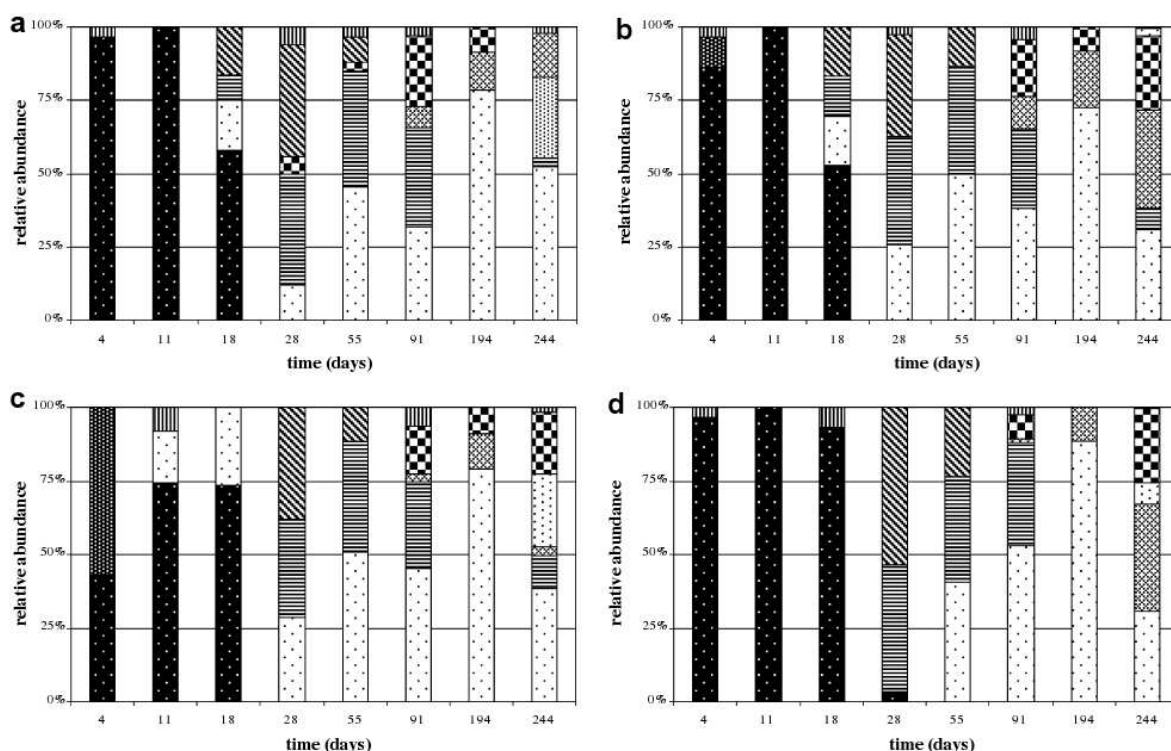


Fig. 2. Relative abundance of the main microorganisms identified during fermentation of Arbequina olives at different depths: (a) surface, (b) 20 cm, (c) 1 m and (d) 2 m. The relative abundance has been calculated multiplying the relative percentage of each species in its plate by the relative percentage of each group (yeast and LAB). Species are: (▨) *Candida boidinii*, (■) *Candida diddensiae*, (□) *Candida membranaefaciens*, (▩) *Lactobacillus paraplantarum*, (◻) *Lactobacillus pentosus*, (▧) *Pichia kluyveri*, (▨) *Pichia membranaefaciens*, (▩) *Rhodotorula glutinis* and (▨) others.

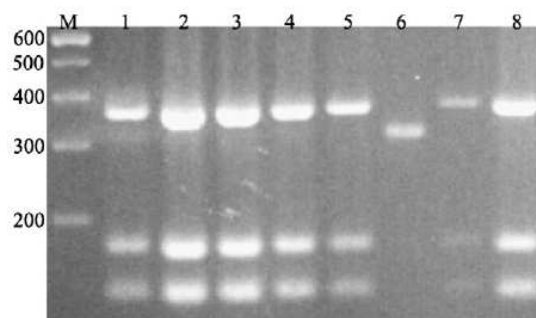


Fig. 3. *HinI* RFLP of 5.8S rDNA and ITS from different yeasts. Lanes 1–5, 7 and 8 are *C. boidinii* and lane 6 is *P. anomala*. Lane M is a ladder DNA of 100 bp of Invitrogen.

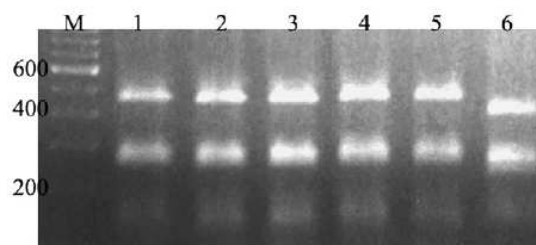


Fig. 4. *MseI* RFLP of 16S rDNA from different LAB. Lanes 1–5: *L. plantarum*/*L. pentosus*; ladder 6: *L. mali*/*L. paraplantarum*. Lane M is a lane DNA of 100 bp of Invitrogen.

The microbial evolution we have observed in the first months of processing of *Arbequina* table olives compared well to previously described elaboration processes of other traditional cultivar olives (Nychas et al., 2002; Oliveira et al., 2004). Under our conditions, without prior debittering of olives and acidification of the brine, enterobacteria only appear at the beginning of the process, as a normal contaminant of all fruits and vegetables, and disappear when pH decreases (Holzapfel, Haberer, Geisen, Bjorkroth, & Schilling, 2001; Nychas et al., 2002). However, at the end of the process, higher temperatures and better oxygen availability on the surface of the vat were probably responsible for higher counts of enterobacteriaceae in the last surface samples. Moreover, it could be observed that certain industrial practices, such as removing surface water, controlling salinity and re-circulating brine, had a positive effect on avoiding propagation of the enterobacteriaceae throughout the vats. On the other hand, of the Gram-negative bacteria isolates, only *P. vulgaris* and *P. rettgeri* have been identified. Although they have been previously described as food and water spoilage bacteria (Kuzina, Peloquin, Vacek, & Miller, 2001; Paarup, Nieto, Peláez, & Reguera, 1999), it is the first time that both Gram-negative bacteria are described as olive contaminants.

The processing of *Arbequina* table olives can be divided into two phases. In the first phase the action of the yeasts contributes to a pH fall. In the second phase LAB species predominate and contribute to the fruit maturation. *Arbequina* table olives are consumed with a residual bitterness. Olives are “ready to eat” as soon as LAB species start dominating the process. From this point, LAB contributes positively not only to increase organoleptic characteristics but also to improve preservation and nutritional characteristics.

Although it might seem that fermentation involves the stable development of yeast and LAB populations, we observed a dynamic succession of species. That is, the disappearance of one species was

followed by the development of another one when different yeast and LAB species shared this same ecosystem. Knowing the chronological order in which each species appears will help us to understand the dynamics of the ecosystem and to control better the process. Each step of the process monitored had different species associated with it.

C. diddensiae seemed to be the yeast species responsible for the pH fall that took place at the beginning of the process. This species has been described as a strong fermentative yeast, well adapted to the first stage of the fermentation (Ruiz-Barba & Jiménez-Díaz, 1995). Another yeast species identified in the first samples was *R. glutinis*, probably proceeding from the olives’ surface. It has been described as a pink yeast related to the softening of olives (Vaughn et al., 1969) and could play a beneficial role in the diffusion of nutrients. Other yeasts, *C. boidinii* and *P. kluyveri* are the main species found between the action of *C. diddensiae* and the establishment of *L. pentosus*. *C. boidinii* is one of the most abundant identified yeast species of table olives (Coton et al., 2005; Marquina, Toufani, Llorente, Santos, & Peinado, 1997) while *P. kluyveri* is well known as killer toxin producing yeast (Llorente, Marquina, Santos, Peinado, & Spencer-Martins, 1997) and has also been isolated from naturally fermented olives by Oliveira et al. (2004).

At the end of the process, the identified species of yeasts were *C. membranaefaciens*, *C. boidinii*, *K. lactis* and *P. membranaefaciens*. Surprisingly, *C. membranaefaciens* and *K. lactis* have never been reported before in olive fermentation processes. The former has been studied in relation to its resistance to NaCl (Khaware, Koul, & Prasad, 1995; Norbeck & Blomberg, 1998) and *K. lactis* has been related to the cheese ecosystem (Kagkli et al., 2006). Nevertheless, *P. membranaefaciens* has been described as a killer yeast (Marquina et al., 1997) and has been widely identified in olives previously (Coton et al., 2005; Duran, Gracia, Brenes, & Garrido, 1997; Oliveira et al., 2004).

Other yeast species found in minor quantities throughout the process were *P. anomala*, *P. minuta*, *P. rhodanensis*, *Candida aaseri* and *C. parapsilosis*. *P. anomala* has been related to olive bloat spoilage (Faid, Akhartouf, & Asehrou, 1994) and *P. minuta* and *C. parapsilosis* has been identified in other studies of table olive fermentation (Hernández, Martín, Aranda, Pérez-Nevado, & Córdoba, 2007). *P. rhodanensis*, *C. aaseri* and *C. parapsilosis* have been isolated in different animal sources (Gründer, Mayser, Redmann, & Kaleta, 2005; Miller, Phaff, & Snyder, 1962). Further work should be done to determine the relationship between the yeast species involved in olive fermentation and the improvement of the quality of the product. These studies might help to classify the herein described species as technological or spoilage yeasts.

The second phase of processing began with the LAB exponential growth, between 30 and 60 days, after the pH dropped in relation to yeast growth. After LAB reached 10^7 cfu/ml (60–80 days), they became the predominant group because yeast population began to fall. Afterwards (90–200 days) there was even a slight increase in their numbers. This could be due to an increase in the available nutrients in the depth of the vat, proceeding from the dead yeast cells. This slight increase in LAB numbers and their fermentation activity could be related to the final decrease of pH observed (150–190 days).

Regarding LAB identification, the addition of formamide proposed by Sarkar et al. (1990) allowed us to improve the PCR specificity for the RFLP-PCR analysis of LAB isolates. The limitation of the method described by Rodas et al. (2003) for identifying closely related species such as *L. plantarum* and *L. pentosus* was solved using the species-specific multiplex PCR of Torriani et al. (2001). The use of the multiplex PCR made evident another limitation of the RFLP-PCR method, because it was shown that *L. mali* and *L. paraplantarum* have an indistinguishable restriction profile.

L. plantarum was believed to be the predominant LAB species in the spontaneous fermentation of Spanish-style olives (Fernández-Díez et al., 1985) and it is well studied as a starter in controlled fermentations (Ruiz-Barba, Cathcart, Warner, & Jiménez-Díaz, 1994). But, since the description of *L. pentosus* as a new species (Zanoni, Farrow, Phillips, & Collins 1987), some *L. plantarum* isolated from olives have been re-identified as *L. pentosus* (Montaño, Sánchez, & De Castro, 2000). *L. pentosus* and *L. plantarum*, previously isolated from olive brine samples, have been selected to inoculate olives in brine (Delgado, Brito, Ferveiro, Peres, & Figueiredo Marques, 2001; Servili et al., 2006). Further work has to be done to determine which of these two species is better adapted to each process or which offers the best technological properties to inoculate brines. *L. paraplantarum* has been previously identified, together with *L. plantarum*, in beer samples (Bringel, Curk, & Hubert, 1996).

A second objective of this work was to evaluate the effect of depth on (a) the population size and (b) the diversity of microorganisms. According to our results, depth does not significantly affect the main microbial groups present in brine although all groups have higher populations in surface samples than in depth samples, especially enterobacteriaceae and yeasts, which is probably due to oxygen diffusion more than salinity. The differences in total counts may also be influenced by pH, since it is about 0.1–0.05 units lower at the deepest levels than it is on the surface of the vat. LAB would be the most affected microbial group, showing a delay of some 15 days before appearing in depth samples.

5. Conclusions

The yeast *C. diddensiae* followed by *C. boidinii* and the LAB *L. pentosus* are the main species involved in the elaboration of Arbequina table olives. The correct development of these microorganisms is necessary to avoid the presence of contaminants such as enterobacteriaceae. The use of yeast and LAB selected strains to inoculate olive brine may ensure the correct development of the fermentation and maturation processes. Further work needs to be done to characterise and select strains to be used as starter cultures.

Acknowledgements

This work has been supported by Grant INIA-RM 2004-00015. Albert Hurtado is grateful to the URV for its doctoral fellowship 2005BRDI/12/13. The authors are grateful to workers of the “Mas d'en Pou” company for providing brine samples and for their full collaboration.

References

- Arroyo-López, F. N., Durán-Quintana, M. C., Ruiz-Barba, J. L., Querol, A., & Garrido-Fernández, A. (2006). Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology*, 23, 791–796.
- Bringel, M. C., Curk, F., & Hubert, J. C. (1996). Characterization of lactobacilli by southern-type hybridization with a *Lactobacillus plantarum* pyrDFE probe. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 588–594.
- Campaniello, D., Bevilacqua, A., D'Amato, D., Corbo, M. R., Altieri, C., & Sinigaglia, M. (2005). Microbial characterization of table olives processed according to Spanish and natural styles. *Food Technology & Biotechnology*, 43, 289–294.
- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., & Sohier, D. (2005). Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 130–135.
- Delgado, A., Brito, D., Ferveiro, P., Peres, C., & Figueiredo Marques, J. (2001). Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum*, isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives. *Lait*, 81, 2003–2215.
- Duran, M. C., Gracia, P., Brenes, M., & Garrido, A. (1997). *Lactobacillus plantarum* survival in aerobic, directly brined olives. *Journal of Food Science*, 59, 1197–1201.
- Esteve-Zaroso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5 S8 rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 329–337.
- Faid, M., Akhartouf, R., & Asehraou, A. (1994). Microorganisms associated with post-harvest green olives deteriorations in Morocco. *Grasas y Aceites*, 45, 313–317.
- Fernández-Díez, M. J., Castro, R., Fernández, A. G., Cancho, F. G., Pellissó, F. G., Vega, M. N., et al. (1985). *Biología de la aceituna de mesa*. Sevilla: CSIC.
- García-García, P., Durán-Quintana, M. C., Brenes-Balbuena, M., & Garrido-Fernández, A. (1992). Lactic fermentation during the storage of Aloreña cultivar untreated green table olives. *Journal of Applied Bacteriology*, 73, 324–330.
- Garrido-Fernández, A., Fernández-Díez, M. J., & Adams, M. R. (1997). *Table olives, production and processing*. London: Chapman and Hall.
- Gründer, S., Mayer, P., Redmann, T., & Kaleta, E. F. (2005). Mycological examinations on the fungal flora of the chicken comb. *Mycoses*, 48, 114–119.
- Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Navado, F., & Córdoba, M. G. (2007). Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiology*, 24, 346–351.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed.). Baltimore, MD: Williams and Wilkins Co..
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(suppl), 365S–373S.
- Kagkli, D. M., Täche, R., Cogan, T. M., Hill, C., Casaregola, S., & Bonnarne, P. (2006). *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*, two potent deacidifying and volatile-sulphur-aroma-producing microorganisms of the cheese ecosystem. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 73, 434–442.
- Khaware, R. K., Koul, A., & Prasad, R. (1995). High membrane fluidity is related to NaCl stress in *Candida membranaefaciens*. *Biochemistry & Molecular Biology International Journal*, 35, 875–880.
- Kuzina, V. L., Peloquin, J. C., Vacek, D. C., & Miller, T. A. (2001). Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Current Microbiology*, 42, 290–294.
- Llorente, P., Marquina, D., Santos, A., Peinado, J. M., & Spencer-Martins, I. (1997). Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. *Applied & Environmental Microbiology*, 63, 1165–1167.
- Marquina, D., Toufani, S., Llorente, P., Santos, A., & Peinado, J. M. (1997). Killer activity in yeast isolates from olive brines. *Advances in Food Science*, 19, 41–46.
- Miller, M. W., Phaff, H. J., & Snyder, H. E. (1962). On the occurrence of various species of yeast in nature. *Mycopathologia*, 16, 1–18.
- Montaño, A., Sánchez, A. H., & De Castro, A. (2000). Changes in the amino acid composition of green olive brine due to fermentation by pure culture of bacteria. *Food Microbiology & Safety*, 65, 1022–1027.
- Norbeck, J., & Blomberg, A. (1998). Amino acid uptake is strongly affected during exponential growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 0.7 M NaCl medium. *FEMS Microbiology Letters*, 158, 121.
- Nychas, G.-J. E., Panagou, E. Z., Parker, M. L., Waldron, K. W., & Tassou, C. C. (2002). Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 173–177.
- Oliveira, M., Brito, D., Catulo, L., Leitao, F., Gomes, L., Silva, S., et al. (2004). Biotechnology of olive fermentation of 'Galega' Portuguese variety. *Grasas y Aceites*, 55, 219–226.
- Paarup, T., Nieto, J. C., Peláez, C., & Reguera, J. I. (1999). Microbiological and physico-chemical characterisation of deep spoilage in Spanish dry-cured hams and characterisation of isolated enterobacteriaceae with regard to salt and temperature tolerance. *European Food Research & Technology*, 209, 366–371.
- Rodas, A. M., Ferrer, S., & Pardo, I. (2003). 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic & Applied Microbiology*, 26, 412–422.
- Randazzo, C., Restuccia, C., Romano, A. D., & Caggia, C. (2002). *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 9–14.
- Ruiz-Barba, J. L., Cathcart, D. P., Warner, P. J., & Jiménez-Díaz, R. (1994). Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture of Spanish-style green olive fermentations. *Applied & Environmental Microbiology*, 60, 2059–2064.
- Ruiz-Barba, J. L., & Jiménez-Díaz, R. (1995). Availability of essential B-group vitamins to *Lactobacillus plantarum* in green olive fermentation brines. *Applied & Environmental Microbiology*, 61, 1294–1297.
- Ruiz-Barba, J. L., Maldonado, A., & Jiménez-Díaz, R. (2005). Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Analytical Biochemistry*, 347, 333–335.
- Sarkar, G., Kapelner, S., & Sommer, S. S. (1990). Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Research*, 18, 7465.
- Servili, M., Settanni, L., Veneziani, G., Esposto, S., Massitti, O., Taticchi, A., et al. (2006). The use of *Lactobacillus pentosus* IMO to shorten the debittering process time of black table olives (Cv *Itrana ans Leccino*): A pilot-scale application. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, 54, 3869–3875.
- Spyropoulou, K. E., Chorianopoulos, N. G., Skandamis, P. N., & Nychas, G.-J. E. (2001). Control of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation of Spanish-style green table olives (*Conservolea* variety) supplemented with different carbon sources. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 3–11.

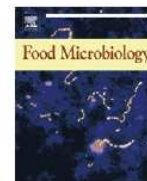
- Tassou, C. C., Panagou, E. Z., & Katsaboxakis, K. Z. (2002). Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology*, 19, 605–615.
- Torriani, S., Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Applied & Environmental Microbiology*, 67, 3450–3454.
- Vaughn, R. H., Jakubczyk, T., Macmillan, J. D., Higgins, T. E., Dave, B. A., & Crampton, V. M. (1969). Some pink yeasts associated with softening of olives. *Applied Microbiology*, 18, 771–775.
- Zanoni, P., Farrow, J. A. E., Phillips, B. A., & Collins, M. D. (1987). *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson, and Anderson) sp nov., nom. rev.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37, 339–341.

Capítulo 2. Influence of fruit ripeness and salt concentration on the microbial processing of Arbequina table olives

Albert Hurtado, Cristina Reguant, Albert Bordons, Nicolas Rozès

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat
Rovira i Virgili, Campus Sescelades, c/ Marcel·lí Domingo s/n, Tarragona 43007, Spain

Food Microbiology, 26, 827-833 (2009)



Influence of fruit ripeness and salt concentration on the microbial processing of *Arbequina* table olives

Albert Hurtado, Cristina Reguant*, Albert Bordons, Nicolas Rozès

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Campus Sescelades, c/ Marcel·lí Domingo s/n, Tarragona 43007, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 December 2008

Received in revised form

13 May 2009

Accepted 18 May 2009

Available online 29 May 2009

Keywords:

Table olives

Sensory test

Brine

Ripeness

Lactobacillus plantarum

Pichia anomala

Candida sorbosa

ABSTRACT

Arbequina table olives are processed as “naturally green olives”, they are directly placed in brine and fermentation starts spontaneously. Olives are harvested just before they change to ‘turning colour’. Different salt concentrations are used depending on the producer. The aim of the study was to evaluate how (i) the ripeness of the olive when it is harvested and (ii) the salt concentration of the brine influence the different microorganism populations in brine during the fermentation of *Arbequina* table olives.

The results showed that the Enterobacteriaceae population lasted longer in black and turning colour olives than in green olives, whereas the growth of lactic acid bacteria was delayed in green olives. A higher salt concentration favoured the elimination of Enterobacteriaceae and hindered yeast growth. The main yeast species identified were *Pichia anomala*, *Candida sorbosa* and *Candida boidinii*, while *Lactobacillus plantarum* was the only lactic acid bacteria species involved in the process. In a sensory test, panellists preferred green olives and were not able to tell the laboratory-scale processed olives from a commercial sample, nor could they distinguish green olives from different brines.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Table olives are one of the most important fermented vegetables in world trade with an annual production of 1.3–1.8 million tonnes depending on the season (Kailis and Harris, 2007). Spanish-style, naturally black olives in brine, and ripe olives are the main processing methods but there are innumerable elaboration methods strongly influenced by cultural practices (Garrido-Fernández et al., 1997).

Lactic acid bacteria (LAB) and yeast are responsible for fermentation in Spanish-style olives and naturally black olives respectively (Garrido-Fernández et al., 1997). Yeast and LAB compete to be the main actors in the fermentation of other olive cultivars prepared according local practices (Tassou et al., 2002). The main LAB species involved in table olive fermentation are lactobacilli, such as *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus* (Garrido-Fernández et al., 1997; Randazzo et al., 2004; Oliveira et al., 2004; Campaniello et al., 2005). The presence of few other LAB species has been reported, such as *Enterococcus faecium* (Randazzo et al., 2004), but always as minority populations. Likewise, *L. pentosus* has been reported as the main LAB species present in the industrial processing of *Arbequina* table olives (Hurtado et al.,

2008). *Candida boidinii*, *Candida diddensiae*, *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri*, *Pichia membranifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* are the main yeast species identified in both naturally black and Spanish-style olive fermentations (Oliveira et al., 2004; Coton et al., 2005; Arroyo-López et al., 2006). Some of these species, *C. diddensiae* and *C. boidinii*, are also the main yeast species isolated in *Arbequina* olive fermentations (Hurtado et al., 2008).

The olive fermentation process is influenced by indigenous microbiota, the diffusion of nutrients from olive to brine and the level of oleuropein and other antimicrobial compounds (Nychas et al., 2002). During olive ripening where the fruit turns from green to black, the sugar content is reduced while lipid content is increased. Furthermore, the main bacteriostatic phenolic compounds are hydrolyzed and the skin becomes softer (Marsilio et al., 2001; Bianchi, 2003). All these transformations associated with the olive's state of maturation may affect the development of the indigenous populations and, therefore, the fermentation process. Furthermore, some phenolic compounds such as oleuropein affect microbiota by inhibiting the growth of LAB, although they do not generally affect that of yeasts (Fleming et al., 1973).

Temperature and salt concentration also affect table olive fermentation (Tassou et al., 2002). The microbial response towards osmotic stress is an important issue in the industry. When lactobacilli grow in a high salt medium, the structural properties of the cell wall change (Piuri et al., 2005). Although the fluidity of the membrane does not change (Machado et al., 2004), transporters

* Corresponding author. Tel.: +34 977 558280; fax: +34 977 558232.
E-mail address: cristina.reguant@urv.cat (C. Reguant).

and other membrane proteins are modified to accumulate betaine and other compatible solutes such as proline or glutamate, thus increasing the cell's ability to accumulate Na^+ and K^+ with the purpose of maintaining the turgor (Glaasker et al., 1996, 1998).

Arbequina table olives are processed as 'untreated green olives' harvested just before they change from green to turning colour. Depending on the weather conditions a large part of the olives can be harvested as change to ripe. Some manufacturers sort the olives and classify them into green and turning colour, wash them with tap water and ferment them in different vats. The salt (NaCl) concentration used by industrial and small processors varies from 4% to 15%. Once finished the elaboration process, olives are placed in fresh brine (4–6%) usually acidified with acetic, citric or lactic acid as preservative. Due to the processing variability, the final commercial *Arbequina* olives are changeable in colour, form and other sensorial aspects. In general terms, their desirable characteristics are: (i) small size and round shape, (ii) green to light brown colour, (iii) firm and creaking texture and (iv), a slight acid and bitter taste. It is worth noting that the distinctive bitter taste of *Arbequina* olives is due to the fact that a certain quantity of oleuropein is still present in the final product.

The aim of this work was to study how the ripeness of the olive affects the ecology and the population dynamics of yeast and LAB present in brine. The effect of salt (NaCl) concentration in brine was also evaluated. Furthermore, a sensorial analysis of processed olives was carried out to provide additional information on possible hitherto unknown sensorial criteria of *Arbequina* olive ripeness. The results could help to determine the optimum time for harvesting *Arbequina* olives and improve fermentation practices.

2. Materials and methods

2.1. Olives processing

Olives from the variety *Arbequina* were harvested using sterile gloves in "Mas dels Freres" (Constantí, Tarragona, Spain). The olives were sorted according to their ripeness, that is, green, turning colour and black, in accordance with the CODEX STAN 66 (FAO/WHO, 1987). The fresh olives were put in screw-capped 1 L glass bottles filled with tap water under sterile conditions. The bottles contained the following quantities according to the type of olive: ca 560 g of green, ca 535 g of turning colour or ca 525 g of black olives. After two days of washing, olives were placed in sterile and freshly prepared brine (5% and 10% (w v⁻¹) NaCl). Therefore, six conditions were tested: 3 ripeness states and 2 salt concentrations in brine for each state. The assays were run in duplicate resulting in a total of 12 fermentation bottles. Fermentation took place at a controlled temperature of 20 °C.

The first sample (day 0) corresponds to the washing water. Then, on the second and the fifth day, a sample of brine was taken from each bottle. The remaining samples were taken every 7 days. Once fermentation ended (i.e. when LAB counts reached over 10⁷ cfu (colony forming units) ml⁻¹ at day 56), the brine of each bottle was replaced with a new sterile 5% NaCl brine containing 1% acetic acid and the olives were stored at 20 °C. 45 days later a last sample was taken (a storage sample) and a sensory test was performed. The samples' pH was determined using a GLP21 pH meter (Crison, Barcelona, Spain).

2.2. Chemical analysis

2.2.1. pH determination

The samples' pH was determined using a GLP21 pH meter (Crison, Barcelona, Spain).

2.2.2. Oleuropein determination

Oleuropein content in brine was determined according to the method of Amiot et al. (1990). Briefly, at different times during the processing of the olives, 1 ml of brine was filtered using a 0.22 µm Millex®-GV membrane (Millipore, Ireland) and then removed and diluted with water to obtain the UV-spectra to a linear range of 0.1–2.5 using a Thermo Spectronic Helios α UV-Vis spectrophotometer (Cambridge, GB). The oleuropein content was calculated using the following equation: Oleuropein (g l⁻¹) = (A₂₈₀ - 0.9A₃₃₀) / 7.5 × F, where A₂₈₀ is absorbance at 280 nm, A₃₃₀ is absorbance at 330 nm and F is the dilution factor.

2.3. Microbiological analysis

For microbial analysis, brine samples were diluted when necessary in a saline aqueous solution (0.8%, w v⁻¹) and plated on different culture media using the Whitley Automatic Spiral Plater (DW Scientific, W. Yorkshire, U.K.). The selective enumeration of LAB was done in MRS agar (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) modified by adding 0.5% (w v⁻¹) malic acid, 0.6% (w v⁻¹) fructose and sodium azide (100 mg l⁻¹) at pH 5. Yeasts were enumerated in YEPD agar (Difco) supplemented with 100 mg l⁻¹ chloramphenicol. Violet Red Bile Glucose Agar (Panreac, Barcelona, Spain) was used to enumerate Enterobacteriaceae. MRS plates were incubated for 48 h at 27 °C under a 10% CO₂ atmosphere. The other plates were incubated at 30 °C for 48 h. The ProtoCOL SR/HR software (version 1.27.1664; Synoptics Ltd, Cambridge, U.K.) was used to count colonies of spirally diluted plates.

2.4. Microbial species identification

Thirty single colonies were isolated from one of the duplicates of each media for further identification. A small-scale DNA extraction from fresh colonies was performed as described by Ruiz-Barba et al. (2005). Briefly, a colony was resuspended into 100 µl of sterile water. Then 100 µl of chloroform/isoamyl alcohol (24:1) was added and the mixture was shaken vigorously. After 24 h of incubation at room temperature the mixture was centrifuged at 13 000 rpm during 5 min. Different volumes of the supernatant were used for PCR reactions as described for each methodology.

2.4.1. Yeasts

One microlitre of the DNA extract was used for the amplification by PCR of the 5.8S rDNA fragment including the lateral internal transcribed spacers (ITS) to perform an RFLP analysis (Esteve-Zaragoza et al., 1999). PCR reactions were carried out in a final volume of 50 µl containing 1× PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 10.5 µM of each primer, and 1 U of Taq polymerase (Ecogen, Barcelona, Spain). The amplification cycle was as follows: 40 repetitions of 94 °C for 0.5 min, 53 °C for 1 min and 72 °C for 1 min. An initial denaturation at 94 °C for 2 min and a final extension at 72 °C for 10 min were included. 10 µl of the PCR product were digested with 1 U of the enzymes CfoI, HaeIII (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) and HinfI (New England Biolabs, Hertfordshire, UK) and the fragments were resolved in 3% agarose gels in TBE buffer (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA) and visualized after staining with ethidium bromide under ultraviolet light. Restriction patterns and PCR products were compared using a database (www.yeast-id.com, CSIC, Valencia, Spain).

2.4.2. Lactic acid bacteria

Lactic acid bacteria isolates were identified by *recA* gene multiplex PCR (Torriani et al., 2001). PCR reactions were carried out in a final volume of 20 µl containing 2 µl of DNA, 1× PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 100 µM dNTPs, 1 µM of primers PentF (5'-CAG TGG

CGC GGT TGA TAT-3'), ParaF (5'-GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC-3') and pREV (5'-TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC-3'), 0,12 μ M of primer PlanF (5'-CCG TTT ATG CCG AAC ACC TA-3'), and 1 U of Taq polymerase (Ecogen, Barcelona, Spain). The amplification program was as follows: 30 cycles of 94 °C for 0,5 min, 56 °C for 10 s and 72 °C for 0,5 min. An initial denaturation at 94 °C for 3 min and a final extension at 72 °C for 5 min were included. PCR reactions were carried out in a GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Norwalk CT, USA). The PCR products were resolved by electrophoresis using 1% agarose gels in TBE buffer and visualized after staining with ethidium bromide under ultraviolet light.

2.5. Sensorial evaluation of processed olives

Because of the large number of samples requiring evaluation and the absence of a trained panel, processed olives were assessed using a descriptive test in which the main quality attributes of *Arbequina* olives were presented. Briefly, panellists indicated their sensorial evaluation for each attribute using a 10-cm line scale

panel ranging from 0 (no perception) to 10 (extreme) (Meilgaard et al., 1991). The main quality attributes were divided into three groups corresponding to (i) the colour (spots, brown and green), (ii) the taste (acid, salty, bitter, sweet and off-flavour) and (iii) the texture and flesh stone (firmness, crispness, soft and pit-flesh detachment).

Sixteen South American and European panellists carried out the sensorial analysis of the olives at room temperature in the tasting room of the Enology Faculty of the Rovira i Virgili University of Tarragona (Catalonia, Spain). These people were aged between 25 and 55 and were perfectly trained according to the method described by AENOR (1997a). Four olives from each batch were tasted to ensure consistency. Between each tasting the panellists ate a little of bread and washed their mouths out with water. The total time of tasting was 1 h. One sample was assessed for each ripeness state in 5% NaCl brine, along with a commercial sample from a similar preparation provided by Mas d'en Pou (www.masdenpou.com, Vinyols i els Arcs, Catalonia, Spain). Moreover, triangle testing (AENOR, 1997b) was applied to determine whether

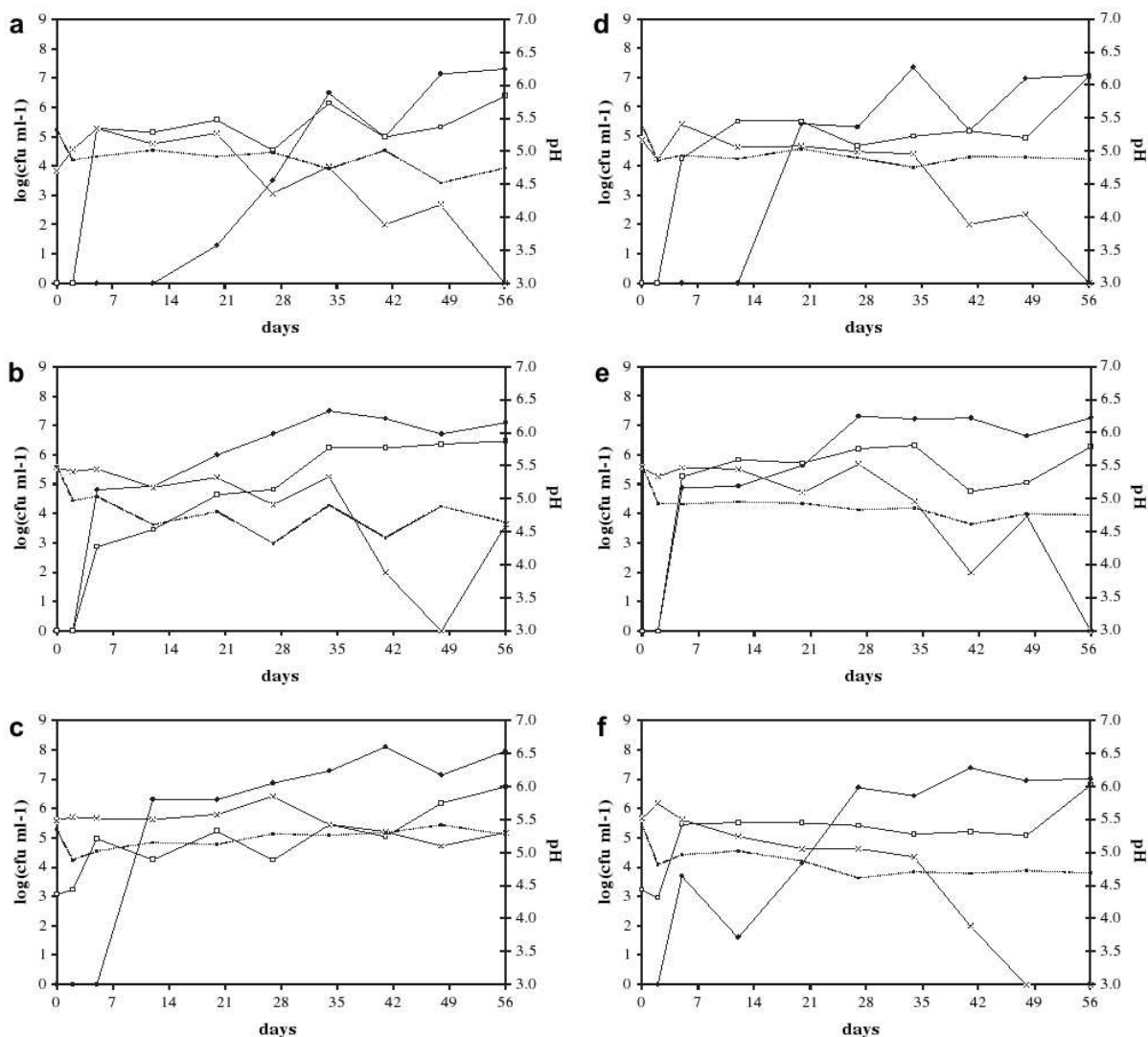


Fig. 1. Microbial dynamics of lactic acid bacteria (●), yeasts (□), and Enterobacteriaceae (×), and pH (■) during fermentation of different *Arbequina* olives harvested at different ripeness states in different brines: a) green, b) turning colour and c) black olives in 5% NaCl brine and d) green, e) turning colour and f) black olives in 10% NaCl brine. Values represent the average of duplicate analysis.

to the size of the PCR product and the restriction fragments obtained by RFLP-PCR analysis (Table 1). It was interesting to note that no yeasts were detected in the washing waters of green or turning colour olives, whereas 7 different yeast species were encountered in samples of black olives. The yeast species detected were *P. anomala*, *Pichia carsonii*, *Pichia guilliermondii*, *Saccharomyces dairensis*, *Candida gropengiesseri*, *Candida glabosa*, and *Cryptococcus flavus*. *P. anomala* was the only yeast species common to all brine samples. Furthermore, *C. boidinii* was detected in the end-of-fermentation sample of each olive type, independently of the brine. Other yeast species identified in fermentation and storage samples included *S. dairensis*, *Pichia kluyverii*, *Candida sorbosa* and *C. glabosa*.

In our experimental conditions, in which olives had been collected using sterile gloves and fermented in sterile vats and both sterile washing water and brine had been used, only *L. plantarum* was detected throughout the fermentation (Table 1). In previous analysis of the microbiota isolated from *Arbequina* olive brines (Hurtado et al., 2008 and other data not shown), only *Lactobacillus paraplantarum*, *L. pentosus* and *L. plantarum* had been detected. According to these previous results, in this work, the first methodology used for the species identification of lactic acid bacteria (LAB) was the *recA* gene multiplex PCR (Torriani et al., 2001), which differentiates between these three mentioned lactobacilli species. It was planned to use the general LAB identification method based on PCR-RFLP used in a previous study (Hurtado et al., 2008) for those isolates which could not be identified by the *recA* multiplex method. Nevertheless, this was not necessary since all the isolates gave a positive identification by multiplex PCR. In this work, belonging of isolates to *L. plantarum* species was confirmed by typing using rep-PCR (Gevers and Huys, 2001) and phylogenetic analysis of representative strains (data not shown).

3.4. Sensory test results

The sensorial evaluation was done by 16 panellists, who assessed the colour, taste and texture of the olives (Fig. 3a–c). No differences were noticed according to the presence of spots on the skin, but green and brown shades were perfectly differentiated by the tasters (Fig. 3a). Commercial olives scored highest in acidity, saltiness and bitterness, while black olives were the sweetest and presented off-flavours (Fig. 3b). In terms of texture, green and commercial olives were harder and crunchier while turning colour and black olives were softer (Fig. 3c). Moreover, in terms of stone-flesh detachment, the different kinds of olives presented similar separation between stone and pulp. On the other hand 5% NaCl green olives could not be distinguished from 10% NaCl green olives according to the triangle test results and the same occurred with commercial and 10% NaCl olives (data not shown). From the correlation matrix analysis (Table 2), some attributes were negatively or positively related to each other. For example, the firmness and crispness of the olive texture were positively and significantly related to each other (+0.830) but negatively associated to the softness of olives (−0.831 and −0.879, respectively). The olive taste pointed towards a significant negative relation between the bitterness and off-flavour taste (−0.463). It was also interesting to emphasize that the green colour was positively related to acidity and bitterness (taste attributes), and firmness and crispness (texture attributes). These attributes are generally used to describe *Arbequina* table olives.

4. Discussion

The production of *Arbequina* table olives is a traditional domestic process that is still uncontrolled and partially unknown. For the first time, this study describes how the ripeness and salt

concentration in the brine influence the indigenous microbial species responsible for the spontaneous fermentation and the quality of *Arbequina* table olives.

In this work, the fruits were harvested and processed using sterile materials trying to minimize external influence in microbial development. In these conditions *Arbequina* table olives are spontaneously fermented by the action of the indigenous microbiota from the fruit skin. In general terms, the microbial evolution in the brine of the three olive types (green, turning colour and black) coincided with previous results of *Arbequina* and other naturally processed cultivar table olives (Hurtado et al., 2008; Tassou et al., 2002). During the fermentation period the Enterobacteriaceae

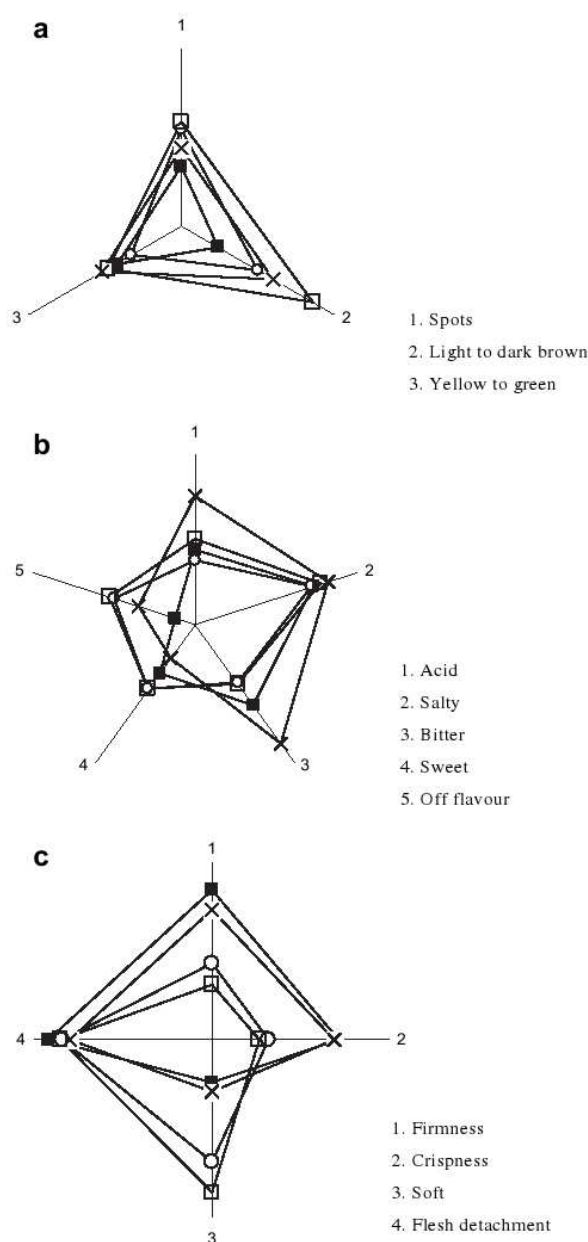


Fig. 3. Sensorial evaluation of processed *Arbequina* table olives. Graphic representation of the line scales questionnaire regarding olive colour (a), taste (b) and texture and flesh stone (c). Olives were: green 5% NaCl brine (■), turning colour 5% NaCl brine (□), black 5% NaCl brine (○) and a commercial sample (×).

Table 2

Matrix of correlation between the 12 attributes used by 16 panellists to describe the four olive samples.

	Spots	Brown	Green	Acid	Salty	Bitter	Sweet	Off-flavour	Firm	Crisp	Soft	Flesh
Spots	1											
Brown	0.515**	1										
Green	-0.226	-0.299*	1									
Acid	-0.103	0.004	0.405**	1								
Salty	-0.016	0.064	0.098	0.336**	1							
Bitter	-0.219	-0.234	0.540**	0.525**	0.259*	1						
Sweet	0.020	0.105	-0.132	-0.404**	-0.252*	-0.390**	1					
Off-flavour	0.574**	0.395**	-0.380**	-0.341**	-0.186	-0.463**	0.067	1				
Firm	-0.507**	-0.432**	0.413**	0.448**	0.115	0.588**	-0.310*	-0.749**	1			
Crisp	-0.568**	-0.434**	0.479**	0.417**	0.084	0.462**	-0.156	-0.758**	0.830**	1		
Soft	0.569**	0.398**	-0.504**	-0.623**	-0.235	-0.657**	0.265*	0.772**	-0.879**	-0.831**	1	
Flesh	-0.274*	-0.131	-0.086	-0.251*	-0.070	-0.136	0.324**	-0.125	0.033	0.125	0.011	1

**Significancy level set at $P \leq 0.01$.*Significancy level set at $P \leq 0.05$.

progressively disappeared while yeast and LAB species colonized the brine. The survival time of Enterobacteriaceae was longer than expected at a fixed mild temperature (20 °C, at least 5° higher than usual fermentor's temperature) and with no significant pH decrease (Holzapfel et al., 2001; Nychas et al., 2002; Oliveira et al., 2004).

Yeasts and lactic acid bacteria grew without problems in the different types of olives. In terms of food safety, the Enterobacteriaceae population increased and lasted longer in the riper olives. The enteric bacteria and yeast content on the olives' surface was possibly influenced by a higher content of damaged fruit and the increased skin permeability in ripe fruits (Vaughn et al., 1969). A higher NaCl content in the brine (10%) prevented the prevalence of Enterobacteriaceae which are other kind of spoilage microorganisms without affecting yeast and LAB evolution.

When *Arbequina* olives were harvested green, as is preferred by manufacturers, LAB growth was delayed in both the salt conditions assayed, compared to the other olive types. This inhibition could be explained by a higher phenolic content in green olive brines than in riper olive samples. Regarding oleuropein content, the method proposed by Amiot et al. (1990) gave identical results for all brines, whatever the ripeness state of olives. According to Amiot's conclusions, this method could be also used to indicate the evolution of the phenolic matter in debittering process of olives. As *Arbequina* olives were not debittered, we thought the rapid estimation of oleuropein concentration in brines was pertinent. Unfortunately this method seems to be invalid in our experimental conditions because not only oleuropein has a maximal 280 nm-absorbance in brines. For example, as mentioned Amiot et al. (1990) in olives treated by soda, a direct product of oleuropein degradation appears. This phenolic compound, dihydroxyphenylethanol, also has a maximal 280 nm-absorbance. It was normally formed from alkaline-treatment of oleuropein in skin fruits but no information mentions its presence in *Arbequina* fermentation. Another possibility which could explain the leveling of oleuropein content along the process whatever the olive ripeness degree, would implicate the contribution of anthocyanin absorbance in black olive brines and/or hydroxytyrosol and tyrosol diffusion in all brines (Romero et al., 2004). It would be interesting to analyze the phenolic matter during the *Arbequina* ripening process to refine the Amiot method and its possible utilization in our experimental conditions. So the monitoring of fermentation olive process by following the phenolic evolution in brines could be envisaged. According to our results, salt content in brines had no effect on oleuropein diffusion, as reported by Brenes et al. (1993).

A wide variety of yeast species was isolated from water used to wash black olives. No yeast population was detected in washing water of other type of olives, suggesting that riper fruits may carry

higher microbial populations. Among the species isolated from black olives washing water in this work, there is *Pichia guilliermondii* which has been previously isolated from green olives (Hernández et al., 2007). It was also identified *C. flavus*, which has been associated with olive softening due to its peptolytic activity (Federici, 1985). Other yeasts isolated from washing water in this study are *C. gropengiesseri* and *Pichia carsoni*, related by other authors to the environment (Barnett et al., 2000; Criseo et al., 1999). Three of the yeast species detected in black olive washing water were also present in different brines. *S. dairensis* and *C. glabrosa* were present in 5% NaCl brine of turning colour olives. This latter yeast species has been previously isolated in other fermented foods (Brocklehurst et al., 1983; Nakase et al., 1977). The third species, *P. anomala*, was the most abundant yeast throughout the fermentation process in all kinds of olives, except for black olives in 5% NaCl brine, where it was present only at the beginning. *P. anomala*, together with *C. boidinii* and *P. kluyveri*, has previously been found in *Arbequina* table olives (Hurtado et al., 2008). Moreover, the relevance of the species *P. anomala* in table olive fermentation has been pointed out by other authors, proposing its use as starter culture (Hernández et al., 2007). Finally, *Candida sorbosa* was also detected in the fermentations of black olives with 5% NaCl and green and turning colour olives with 10% NaCl. The detection of this yeast coincided with higher pH values at the end of the fermentation (Fig. 1 c and d) in some of the stored samples.

L. plantarum was the only LAB species identified. This bacterium has been widely isolated from table olive samples (Durán et al., 1997; Delgado et al., 2001). In a separate study of an industrial fermentation of *Arbequina* table olives (Hurtado et al., 2008), *L. pentosus* was the predominant LAB species and only a few colonies of *L. plantarum* were isolated. The different predominance of species in the present study's laboratory fermentations could be explained by the different geographic origin of olives and processing location. In the industrial fermentation previously reported, better adapted species probably remained in vats and formed biofilms (Ortu et al., 2007) which possibly led to more efficient fermentation where there was a sustained pH decrease throughout the process. Similar conclusions could be extended to the yeast population. In the industrial fermentation, *C. diddensiae* and *C. boidinii*, rather than *P. anomala*, were the main isolated species. Therefore, the development of an autochthonous yeast population may also depend on geographical and technological factors.

The sensorial results of laboratory processed green olives are close to the results from industrially processed olives. Green olives present better sensorial characteristics than riper olives. From a microbiological point of view, a longer ripening of the olives before harvesting increased the prevalence of the Enterobacteriaceae population and spoilage yeast species. The only

advantage observed of using riper olives was a faster LAB development. Traditionally, farmers try to harvest *Arbequina* olives when they are green since their final sensorial properties are better, as shown in this work. However, since fruit ripening is never homogeneous, the harvest includes always a small proportion of turning colour olives. According to our results, the presence of some turning colour fruits should not affect significantly the microbial development in the fermentation process. Nevertheless, the inclusion of a high proportion of riper olives, especially black, involves a risk of prevalence of contaminant bacteria. Higher concentrations of salt in brine decreased the survival of Enterobacteriaceae populations. According to the sensory analysis, the salt concentration used in the fermentation did not affect the quality of the product. Hence, it can be concluded that using more NaCl (10%) in brine guarantees better control of the process in terms of food safety without affecting the sensorial properties.

This study looked at the effects of the main parameters that farmers use to control the traditional elaboration of *Arbequina* table olives, i.e. fruit ripeness and salt concentration in brine. Further studies are needed in order to understand which are the main factors affecting the correct development of olive fermentation and how to improve its control.

Acknowledgements

This work has been supported by grant INIA-RM 2004-00015 from the Spanish Ministry of Education and Science. Albert Hurtado would like to thank the *Rovira i Virgili University* for his doctoral fellowship 2005BRD1/12/13. The authors are grateful to workers of "Mas dels Frares" (*Universitat Rovira i Virgili*, Constantí, Catalonia, Spain) for providing olives and for fully collaborating with them.

References

- AENOR, 1997a. Análisis sensorial. Guía general para la selección, entrenamiento y control de jueces. Parte 1: Catadores (UNE 87024-1:1995; (ISO 8586-1: 1993)). In: Análisis sensorial. Tomo I. Alimentación. Recopilación de Normas UNE. AENOR N.A. Madrid, España, pp. 216–240.
- AENOR, 1997b. Análisis sensorial. Metodología. Prueba triangular (UNE 87006:1992); (ISO 4120: 1983). In: Análisis sensorial. Tomo I. Alimentación. Recopilación de Normas UNE. AENOR N.A. Madrid, España, pp. 82–91.
- Amiot, M.J., Tacchini, M., Fleuriot, A., Macheix, J.J., 1990. Le processus technologique de désamérisation des olives: caractérisation des fruits avant et pendant le traitement alcalin. *Sciences des Aliments* 10, 619–631.
- Arroyo-López, F.N., Durán-Quintana, M.C., Ruiz-Barba, J.L., Querol, A., Garrido-Fernández, A., 2006. Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology* 23, 791–796.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D., 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*, third ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bianchi, G., 2003. Lipids and phenols in table olives. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105, 229–242.
- Brenes, M., García, P., Durán, M.C., Garrido, A., 1993. Concentration of phenolic compounds change in storage brines of ripe olives. *Journal of Food Science* 58, 347–350.
- Brocklehurst, T.F., White, C.A., Dennis, C., 1983. The microflora of stored coleslaw and factors affecting the growth of spoilage yeasts in coleslaw. *Journal of Applied Bacteriology* 55, 57–63.
- Campaniello, D., Bevilacqua, A., D'Amato, D., Corbo, M.R., Altieri, C., Sinigaglia, M., 2005. Microbial characterization of table olives processed according to Spanish and natural styles. *Food Technology Biotechnology* 43, 289–294.
- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., Sohier, D., 2005. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108, 130–135.
- Criseo, G., Gallo, M., Pernice, A., 1999. Killer activity at different pHs against *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype A by environmental yeast isolates. *Mycoses* 42, 601–608.
- Delgado, A., Brito, D., Ferveiro, P., Peres, C., Figueiredo Marques, J., 2001. Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum*, isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives. *Lait* 81, 2003–2215.
- Durán, M.C., Gracia, P., Brenes, M., Garrido, A., 1997. *Lactobacillus plantarum* used in aerobic, directly brined olives. *Journal of Food Science* 59, 1197–1201.
- EC 796/2002, 2002. Commission Regulation amending Regulation, (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-pomace oil and on the relevant methods of analysis and the additional notes in the Annex to Council Regulation, (EEC) No 2658/87 on the tariff and statistical nomenclature and on the Common Customs Tariff, L128, 8–28.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 329–337.
- FAO/WHO, 1987. Codex Standard for Table Olives. Codex Alimentarius Commission, Rome. CODEX STAN 66-1981 (Rev. 1-1987).
- Federici, F., 1985. Production, purification and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 51, 139–150.
- Fleming, H.P., Walter Jr., W.M., Etschell, J.L., 1973. Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. *Applied Microbiology* 14, 1027–1032.
- Garrido-Fernández, A., Fernández Díez, M.J., Adams, M.R., 1997. Table Olives, Production and Processing. Chapman and Hall, London.
- Gevers, D., Huys, G., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205, 31–36.
- Glaasker, E., Konings, W.N., Poolman, B., 1996. Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology* 178, 575–582.
- Glaasker, E., Tjan, F.S.B., Ter Steeg, P.F., Konings, W.N., Poolman, B., 1998. Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress. *Journal of Bacteriology* 180, 4718–4723.
- Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Navado, F., Córdoba, M.G., 2007. Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiology* 24, 346–351.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., Schillinger, U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 365S–373S.
- Hurtado, A., Reguant, C., Esteve-Zarzoso, B., Bordonas, A., Rozès, N., 2008. Microbial population dynamics during the processing of *Arbequina* table olives. *Food Research International* 41, 738–744.
- Kailis, S., Harris, D., 2007. *Producing Table Olives*. Landlinks Press, Collingwood Victoria.
- Machado, M.C., López, C.S., Heras, H., Rivas, E.A., 2004. Osmotic response in *Lactobacillus casei* ATCC 393: biochemical and biophysical characteristics of membrane. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 422, 61–70.
- Marsilio, V., Campestre, C., Lanza, B., De Angelis, M., 2001. Sugar and polyol compositions of some European olive fruit varieties (*Olea europaea* L.) suitable for table olive purposes. *Food Chemistry* 72, 485–490.
- Meilgaard, D., Civille, G.V., Carr, B.T., 1991. *Sensory Evaluation Techniques*. Boca Raton CRC Press.
- Nakae, T., Goto, S., Koyama, Y., Komagata, K., Iizuka, H., 1977. Microbiological studies on cheese (II). Determination of yeasts found in cheese imported from Europe and North America. *Journal of Food Hygiene* 18, 353–361.
- Nychas, G.-J.E., Panagou, E.Z., Parker, M.L., Waldron, K.W., Tassou, C.C., 2002. Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. *Letters in Applied Microbiology* 34, 173–177.
- Oliveira, M., Brito, D., Catulo, L., Leitao, F., Gomes, L., Silva, S., Vilas-Boas, L., Peito, A., Fernandes, I., Gordo, F., Peres, C., 2004. Biotechnology of olive fermentation of 'Galega' Portuguese variety. *Grasas Y Aceites* 55, 219–226.
- Ortu, S., Felisa, G.E., Marzotob, M., Deriua, A., Mollicottia, P., Sechia, L.A., Dellaglio, F., Zanettia, S., 2007. Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and Giocdu, a traditional Sardinian fermented milk. *International Dairy Journal* 17, 1312–1320.
- Piuri, M., Sánchez-Rivas, C., Ruzal, S.M., 2005. Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*. *Journal of Applied Microbiology* 98, 84–95.
- Randazzo, C., Restuccia, C., Romano, A.D., Caggia, C., 2004. *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *International Journal of Food Microbiology* 90, 9–14.
- Romero, C., Brenes, M., García, P., García, A., Garrido, A., 2004. Polyphenol changes during fermentation of naturally black olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 1973–1979.
- Ruiz-Barba, J.L., Maldonado, A., Jimenez-Diaz, R., 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Analytical Biochemistry* 347, 333–335.
- Tassou, C.C., Panagou, E.Z., Katsaboxakis, K.Z., 2002. Microbiological and physico-chemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology* 19, 605–615.
- Torriani, S., Felis, G.E., Dellaglio, F., 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3450–3454.
- Vaughn, R.H., Jakubczyk, T., Macmillan, J.D., Higgins, T.E., Dave, B.A., Crampton, V.M., 1969. Some pink yeasts associated with softening of olives. *Applied Microbiology* 18, 771–775.

Capítulo 3. Evaluation of a single and combined inoculation of a *Lactobacillus pentosus* starter for processing cv. *Arbequina* natural green olives

Albert Hurtado, Cristina Reguant, Albert Bordons, Nicolas Rozès

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat
Rovira i Virgili, Campus Sescelades, c/ Marcel·lí Domingo s/n, Tarragona 43007, Spain

Food Microbiology, 27, 731-740 (2010)



Evaluation of a single and combined inoculation of a *Lactobacillus pentosus* starter for processing cv. *Arbequina* natural green olives

Albert Hurtado, Cristina Reguant*, Albert Bordons, Nicolas Rozès

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Campus Sescelades, c/Marcel·lí Domingo, s/n, Tarragona 43007, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 November 2009
Received in revised form
2 March 2010
Accepted 15 March 2010
Available online 23 March 2010

Keywords:

Naturally green olives
Starter
Fermentation
GTG5 Rep-PCR
Lactobacillus pentosus
Lactobacillus plantarum
Candida diddensiae

ABSTRACT

The production of *Arbequina* naturally green olives is a traditional and spontaneous process in which lactic acid bacteria (LAB) and yeasts are present. To better control the fermentation of olives, strains of LAB and yeasts that had been isolated from brines were used in this study.

A strain of *Lactobacillus pentosus* selected from an industrial olive fermentation was used as a starter culture for the traditional fermentation of *Arbequina* naturally green olives. Three more strains isolated from *Arbequina* olive brines were selected: one yeast, (*Candida diddensiae*), and two *Lactobacillus* (one *L. plantarum* and the other *L. pentosus*). The individual fermentation profile of all the strains and the co-inoculation profile of each one of the three with the first selected *L. pentosus* were studied in pilot-scale fermentations.

The results showed that all the strains used as a starter, and particularly the yeast *C. diddensiae*, reduced the *Enterobacteriaceae* survival period in comparison with the spontaneous process. Only when a *L. pentosus* strain was inoculated were the LAB counts above 10^6 cfu ml⁻¹ throughout the process. The *C. diddensiae* starter failed to colonize the brine until the end of the process and no LAB were detected. Results of rep-PCR using the primer GTG₅ showed that both *L. pentosus* starters were able to colonize the brine by the end of the process but when they were co-inoculated only one strain was dominant. The *L. plantarum* starter failed to colonize the brine. In the control fermentation, various autochthonous strains of *L. pentosus* and *L. plantarum* were detected. The pH only reached desirable levels when a *L. pentosus* strain was inoculated. From the results of the sensory evaluation, panellists found significant differences between the different starters used for fermenting olives.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Most fermentation processes of table olives start spontaneously and are strongly influenced by the olive cultivar itself, its indigenous microbiota (Nychas et al., 2002) and methodological factors such as fermentation temperature and the salt concentration of brines (Tassou et al., 2002). *Arbequina*, the main olive cultivar in Catalonia (Spain), is mainly used to produce olive oil, but it is also used to produce untreated green table olives. In this spontaneous process *Lactobacillus pentosus* is the main lactic acid bacteria while *Candida diddensiae* and *Candida boidinii* are the dominant yeast species (Hurtado et al., 2008).

To better control the process, most authors recommend the inoculation of brine with commercial strains. Depending on the geographical location or the olive production process, different LAB

strains can be used as the starter culture. For instance, LAB preparations consist of *Lactobacillus plantarum* (Ettchells et al., 1966; Leal-Sánchez et al., 2003; Chorianoopoulos et al., 2005; Lamzira et al., 2005; Marsilio et al., 2005; Sabatini et al., 2008), *L. pentosus* (de Castro et al., 2002; Panagou et al., 2003, 2008; Servili et al., 2006) or both (Sánchez et al., 2001; Panagou and Tassou, 2006). Although all these studies observe that the LAB populations increase throughout the fermentation process, they do not show which of the LAB strains used it is dominated by. Only two studies have monitored the inoculated strain using the phenotypic characteristics of the starter in the table olive fermentation process (Sánchez et al., 2001; Leal-Sánchez et al., 2003), although molecular methods have been successfully applied to monitor the progress of starter cultures in vegetable fermentations (Plengvidhya et al., 2004; Seseña et al., 2005).

Most previous studies have been done on Spanish- and Greek-style olives but only two of them focused on naturally green olives (Panagou et al., 2003; Marsilio et al., 2005). In these studies both *Lactobacillus* species—*L. plantarum* and two *L. pentosus* strains—led the fermentation, and they provided good LAB counts, reduced the

* Corresponding author. Tel.: +34 977 558280; fax: +34 977 558232.
E-mail address: cristina.reguant@urv.cat (C. Reguant).

survival time of enterobacteria and decreased the pH to desirable levels.

The purpose of this study was to evaluate the potential of the strain *L. pentosus* 5E3A18 as a starter during *Arbequina* table olive fermentation. It was isolated from *Arbequina* industrial fermentation brines and always dominated the LAB microbiota, which is why we decided to study it in the presence or not of either LAB concurrent strain or the yeast strain. To do so two more LAB starter strains were, inoculated alone or co-inoculated with *L. pentosus* 5E3A18. Because yeasts are always present in the *Arbequina* process, we also inoculated a yeast species to understand their role during the fermentation. Molecular methods allowed us to monitor the evolution of both the LAB strains (rep-PCR) and the yeast species (RFLP of 5.8S rDNA) during the process. The evolution of organic acids during fermentation brines was also determined. The processed olives were then organoleptically evaluated to provide additional information on possible differences induced by the starters.

2. Materials and methods

2.1. Starter strains and inoculation process

The strains used in this study were previously isolated from *Arbequina* olive brines in fermentation during 2005 and 2006 (Hurtado et al., 2008). GTG₅ rep-PCR showed *L. pentosus* 5E3A18 as the dominant strain in our collection of *L. pentosus*. Yeast isolates taken during the first weeks from the same origin were analyzed using the restriction patterns of mitochondrial DNA in accordance with Querol et al. (1992). *C. diddensiae* C6B19 was the dominant yeast strain. *Lactobacillus pentosus* FxMA1 and *L. plantarum* V10A2 were selected from a group of 40 lactobacillus isolated from *Arbequina* olive brines from different origins because they grew best in NaCl medium (data not shown). *L. pentosus* FxMA1 has an industrial origin (Oliflix, Flix) and *L. plantarum* V10A2 was isolated from a laboratory-scale fermentation (olives from Mas dels Frares, Constantí, Tarragona).

All the LAB strains were cultured overnight in a saline modified MRS (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA), (5% NaCl, (w/v); 6 g l⁻¹ malic acid; 5 g l⁻¹ fructose at pH 5) to get appropriate inocula (8–9 log cfu ml⁻¹). Immediately after brining, 5 ml of each culture was added to the fermentation vessels to get an initial population of ca. 3–10 × 10⁶ cfu ml⁻¹ in the brine solutions. Yeast inoculum was similarly prepared using YEDP culture medium (Difco).

2.2. Olive brining procedure

Samples were harvested from an *Arbequina* tree in “Mas dels Frares” (Constantí, Tarragona, Spain) using sterile gloves. A total of 550 g of green olives were placed in sterile tap water in sterile screw-capped 1 l glass bottles. After one day of washing, olives were placed in 500 ml of sterile and freshly prepared brine (8% NaCl, (w/v)). Aseptic conditions will allow comparing the results with previous data obtained by Hurtado et al. (2009) and will avoid possible contamination with lactic acid bacteria of the laboratory environment.

Eight conditions were tested: a spontaneous fermentation (control), four simple inoculated fermentations (*C. diddensiae* C6B19, *L. plantarum* V10A2, *L. pentosus* FxMA1 and *L. pentosus* 5E3A18) and three co-inoculated fermentations (*L. pentosus* 5E3A18 together with *C. diddensiae* C6B19, *L. plantarum* V10A2 or *L. pentosus* FxMA1). The assays were run in duplicate so a total of 16 fermentation bottles were required. Fermentation took place at a controlled temperature of 20 °C.

Once fermentation ended (52 days), the brine from each bottle was replaced with new sterile 5% NaCl (w/v) brine containing 1%

acetic acid (v/v) and olives were stored at 4 °C to stop any possible microbial development. Two months later a sensory test was performed.

2.3. Time course of populations

Samples were collected on the days 0, 3, 7, 10, 14, 17, 24, 31, 37, 45 and 52. Brine samples were diluted in saline solution, when necessary, and the microbial populations were determined by spreading the samples on different culture media using the Whitley Automatic Spiral Plater (DW Scientific, W.Yorkshire, U.K.). The ProtoCOL SR/HR software (version 1.27.1664; Synoptics Ltd, Cambridge, U.K.) was used to count colonies of spirally diluted plates. 100 µl of the samples were manual spread when ProtoCOL values were under the detection limit of the automatic plater. LAB were enumerated on MRS agar modified by the addition of 6 g l⁻¹ malic acid, 5 g l⁻¹ fructose and sodium azide (100 mg l⁻¹) at pH 5 and incubated for 48 h at 27 °C under a 10% CO₂ atmosphere. The yeasts were selectively enumerated on YEPD (Difco) agar supplemented with 100 mg l⁻¹ chloramphenicol. Violet Red Bile Glucose Agar (Panreac, Barcelona, Spain) was used to enumerate *Enterobacteriaceae*. Yeasts and *Enterobacteriaceae* plates were incubated at 30 °C for 48 h.

2.4. Species identification

The samples taken on days 7 (beginning), 24 (middle) and 52 (end) were selected to identify yeast and LAB isolates. Thirty single colonies from all the media of one of the duplicates were randomly isolated for further identification. A small-scale DNA extraction from fresh colonies (Ruiz-Barba et al., 2005) was carried out.

To identify yeast species, one microliter of the DNA micro-extraction was used for the specific yeast PCR reaction, followed by RFLP analysis in accordance with Esteve-Zarzoso et al. (1999). To identify the yeast species, restriction patterns and PCR products were compared using a database (www.yeast-id.com, CSIC, Valencia, Spain).

Two microliters of DNA from the micro-extraction were used to perform the *recA* gene multiplex PCR (Torriani et al., 2001) to differentiate between the *L. plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* species.

2.5. Strain identification by rep-PCR

Primer GTG₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGT-3') was used. DNA amplification was carried out in 50 µl PCR mixture containing 200 µM dNTP, 2 µM of GTG₅ primer, 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 U of Taq polymerase (Invitrogen Technologies) and 2 µl of the DNA micro-extraction. PCR was performed in a GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Each cycle consisted of an initial denaturation time of 5 min at 94 °C followed by 35 cycles of amplification comprising a denaturation step for 30 s at 94 °C, annealing at 40 °C for 1 min, and extension at 65 °C for 8 min. Reactions were completed with 16 min elongation at 65 °C followed by cooling to 4 °C.

A total of 20 µl of the amplification products was analyzed by electrophoresis (70A for 2 h, without cooling) in 1% (w/v) Low EEO agarose (Ecogen, Barcelona, Spain) in 1 × TBE-buffer gels containing 0.5 µg ml⁻¹ of ethidium bromide. Photographs of rep-PCR gels were taken with a KODAK DC290 Zoom Digital Camera (Eastman Kodak Company, Rochester, USA).

2.6. Physicochemical analyses of brines

The pH of the brine samples was determined with a GLP21 pH meter (Crison, Barcelona, Spain). Organic acids were determined by HPLC using an Aminex HPX-87H column (BioRad, Richmond, California, USA) held at 65 °C with 5 mM H₂SO₄ as the mobile phase at a flow rate of 0.7 ml min⁻¹. Detection was carried out at 210 nm. Before analysis, samples were previously diluted two-fold with water, filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA) and 50 µl was injected into the column. Each organic acid detected (tartaric, citric, malic, succinic, lactic and acetic acids) was calculated from a calibration curve of external standards.

2.7. Sensorial evaluation of processed olives

The fermented olives were sensorially evaluated after two months in cold storage (4 °C) by a taste panel of 12 trained experts. A triangular test was performed to determine any differences between the fermented olives in accordance with ISO9120: 1983 (UNE 87006-1992). Only four of the eight different starters used in this study were tested: control (spontaneous fermentation), LAB (*L. pentosus* 5E3A18), LAB/Yeast (*L. pentosus* 5E3A18 with *C. diddensiae*) and yeast (*C. diddensiae*).

2.8. Statistical analysis

The data were statistically analyzed with the SPSS 14 software package (SPSS Inc., Chicago, USA). Analysis of variance (ANOVA, Tukey test) was used to determine differences among different treatments at the statistical level of significance of $P \leq 0.05$.

The experiments described in this study were performed in a research laboratory normalized with the ISO 9001:2000 quality assurance standards.

3. Results

3.1. Population dynamics

The population dynamics of the various microbial groups (LAB, yeast and *Enterobacteriaceae*) detected in brines throughout the processes are shown in Fig. 1. The profiles of the LAB counts depended on the starter culture used (Fig. 1a). A highly irregular LAB population was enumerated in the control fermentation, with populations between 10² and 10⁵ cfu ml⁻¹ only in some of the samples. When the yeast *C. diddensiae* C6B19 was inoculated, no LAB appeared during the process. We observed that the LAB starter cultures had two effects on the LAB population. Firstly, *L. plantarum* V10A2 as a starter led to a loss in LAB cell viability for the first seven days and then a progressive recovery of one *L. pentosus* strain (Fig. 2) to reach ca. 10⁶ cfu ml⁻¹ (day 24). Secondly, when *L. pentosus* FxMA1 or *L. pentosus* 5E3A18 were used, LAB populations between 10⁶ and 10⁷ cfu ml⁻¹ were sustained throughout all the processes. This phenomenon was also observed in brines fermenting with co-starter cultures, *L. pentosus* 5E3A18/*C. diddensiae* C6B19, *L. pentosus* 5E3A18/*L. plantarum* V10A2 and *L. pentosus* 5E3A18/*L. pentosus* FxMA1.

No important differences were found for the yeast populations whatever starter culture was used (Fig. 1b). The yeast population reached ca. 4–7 log cfu ml⁻¹ for all brine vessels during the fermentations.

Three profiles were observed for the *Enterobacteriaceae* populations (Fig. 1c). The first one was when the brine fermentations were carried out in the presence of the indigenous microflora: *Enterobacteriaceae* counts (10⁵–6.3 × 10⁶ cfu ml⁻¹) remained

constant throughout the process. On the other hand, LAB starter cultures led to a decrease in *Enterobacteriaceae* populations. However, this reduction in enterobacteria counts showed a different kinetic depending on the LAB starter. The viability decreased more quickly when *L. pentosus* starters were used than when *L. plantarum* starter was used. Furthermore, a sharp increase in enterobacteria cells (4 × 10³ cfu ml⁻¹) was observed for the last sample of brine inoculated with *L. plantarum*. The third and final profile depicted a rapid and sharp decrease (day 7, no viable cells were detected) in enterobacteria populations not only in the presence of *C. diddensiae*, by itself or co-inoculated with *L. pentosus*, but also when two LAB were used as starter cultures (i.e. when the initial LAB population was *a priori* higher).

The evolution of pH showed a clear difference between the starters used (Fig. 1d). The brines acidified rapidly, from initial pH 5.5 to 4–4.5 on day 3, and then remained constant throughout the fermentation processes when *L. pentosus* was used either by itself or co-inoculated. On the other hand, little variation was observed in uninoculated and inoculated yeast or *L. plantarum* brines. For the spontaneous/uninoculated fermentation the pH was around 5–5.5 units during the process but ca. 4.9 units for the two separate inoculation modes. Nevertheless, the pH decreased to 4.35 units between day 16 and day 45 but increased in the last sample (4.65) in the presence of the starter *L. plantarum* V10A2.

3.2. Monitoring LAB strains

In our experimental conditions, in which olives were collected using sterile gloves and fermented in sterile vats in which both sterile washing water and brine had been used, the LAB strain diversity was relatively poor throughout the fermentations (Fig. 2). For instance, for the uninoculated fermentation (Fig. 2.1), only five strains were characterized: three *L. pentosus*, one *L. plantarum* and one unidentified strain. As the population dynamics show (Fig. 1a), sampling day 24 showed an absence of LAB strains. However at day 52, a strain of *L. pentosus* (pe3) completely dominated the fermented brine, being more than 80% of all the isolates.

When only a *C. diddensiae* yeast strain was used as the starter culture (Fig. 2.2), LAB was not detected, as was also mentioned in population results. On the other hand, the results of LAB strain typification seemed to depend on the origin of the LAB starter culture (Fig. 2.3, 2.4 and 2.5). When a *L. plantarum* strain was used, only a *L. pentosus* (pe4) was identified, which dominated the process from day 24 to the end (Fig. 2.3). The two *L. pentosus* starter cultures gave different results (Fig. 2.4 and 2.5). From the very first sampling day (day 7), the two starters were detected in high proportions (65% and 85% for *L. pentosus* FxMA1 and 5E3A18, respectively) and they dominated the fermentation process despite the presence of other wild *L. pentosus* strains. Furthermore, the wild strain diversity in brines depended on the inoculated strain of *L. pentosus*, although the populations of wild strains were scarcer along the fermentations than the populations of starters. Only two more strains were detected in the presence of 5E3A18 while four were analyzed in brines fermented by the FxMA1 strain.

The effect of co-inoculation—*L. pentosus* 5E3A18 used with *C. diddensiae* C6B19 (Fig. 2.6), *L. plantarum* V10A2 (Fig. 2.7), or *L. pentosus* FxMA1 (Fig. 2.8)—showed similar results. In all cases the LAB starter used dominated (more than 80% of the total LAB population) the fermentations except in the sample on day 52 in which both *L. pentosus* starter strains were present. In this case its percentage was only 60%. Interestingly the brines inoculated by both *L. pentosus* starter strains presented a higher LAB strain diversity than the other two co-inoculation experiments. Indeed five more LAB strains were identified besides the two *L. pentosus* starter strains (Fig. 2.8).

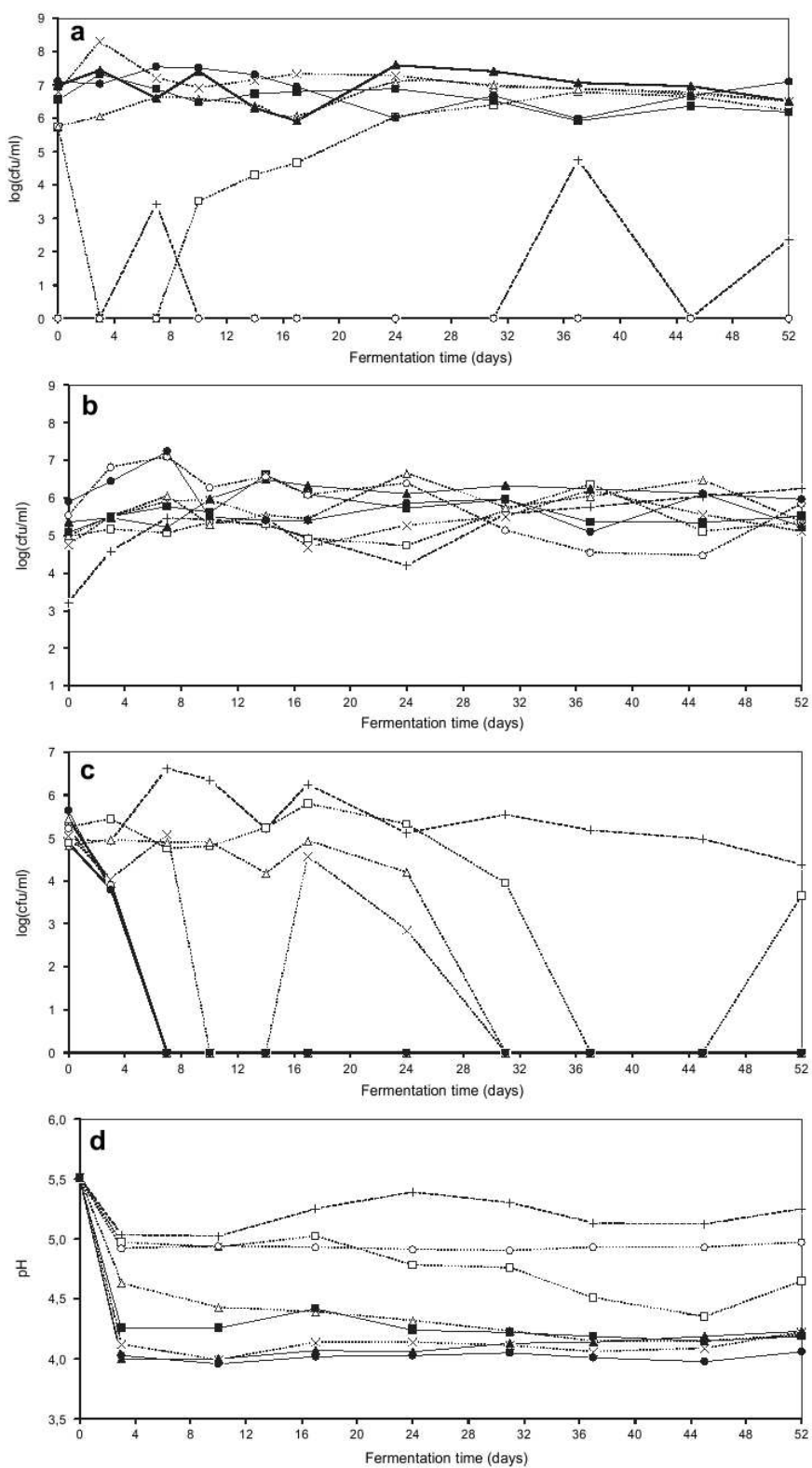


Fig. 1. Time course of populations of a) lactic acid bacteria, b) yeasts, c) *Enterobacteriaceae*, and d) pH during laboratory-scale fermentations of *Arbequina* table olives inoculated with different starter strains: uninoculated control (+); *Candida diddensiae* C6B18 (○), *Lactobacillus plantarum* V10A2 (□), *Lactobacillus pentosus* FxMA1 (△); *Lactobacillus pentosus* 5E3A18 (×); *C. diddC6B18/L. pent5E3A18* (●); *L. plantV10A2/L. pent5E3A18* (■); and *L. pentFxMA1/L. pent5E3A18* (▲).

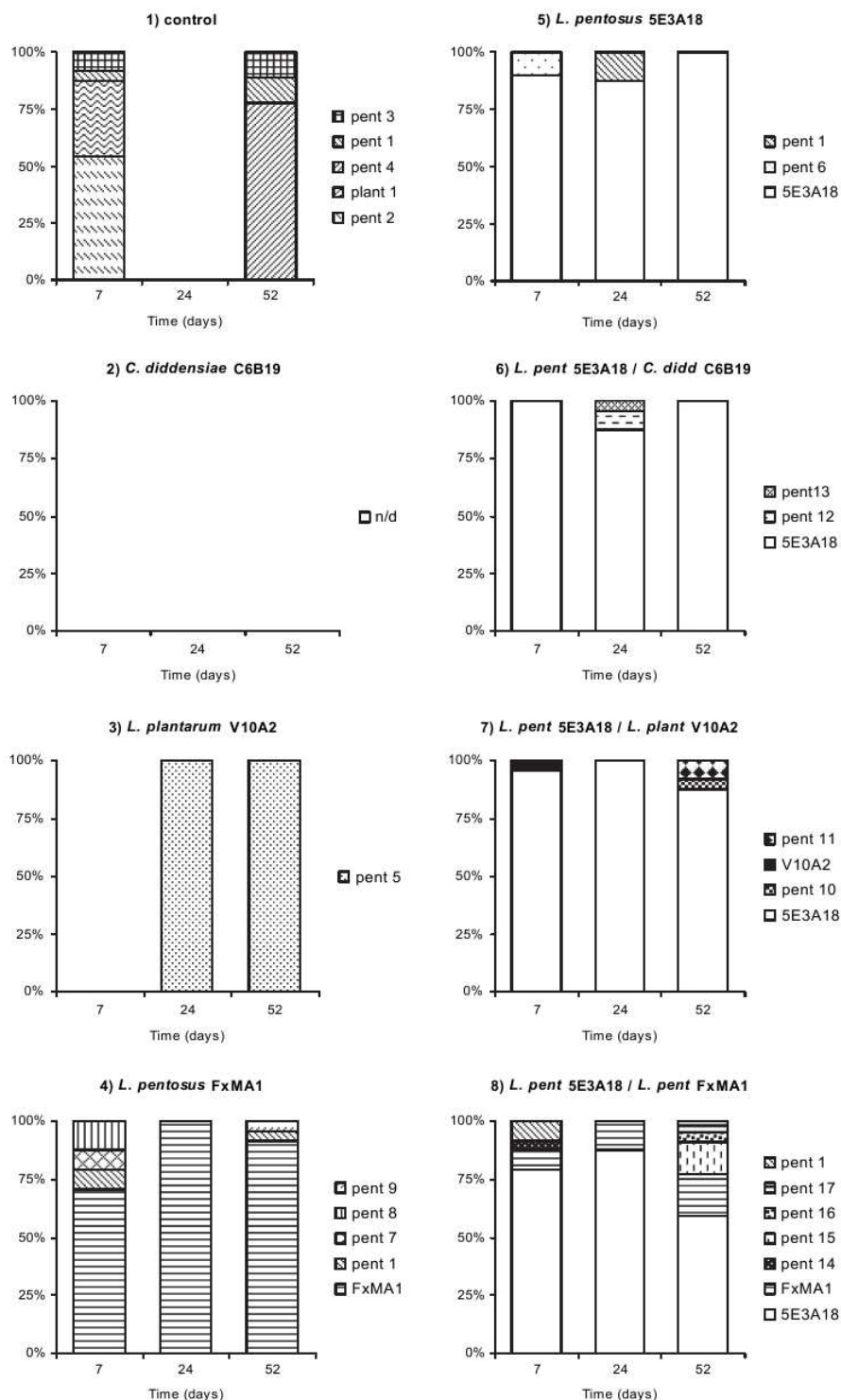


Fig. 2. Relative percentage of lactic acid bacteria strain isolates identified on different fermentation days: 1) control, 2), 3), 4) and 5) simple inoculation with *Candida diddensiae* C6B18, *Lactobacillus plantarum* V10A2, *Lactobacillus pentosus* FxMA1 and *Lactobacillus pentosus* 5E3A18 respectively, 7), 8) and 9) *L. pentosus* 5E3A18 co-inoculated with *C. diddensiae* C6B18, *L. plantarum* V10A2 and *L. pentosus* FxMA1, respectively. Pla and Pe are *L. plantarum* and *L. pentosus* wild strains and "n/d" are non-detected isolates.

3.3. Yeast identification

The identified yeasts were assigned to 11 species by comparing the restriction fragments obtained by RFLP-PCR analysis with the

size of the PCR product in the yeast-id database (Table 1). In uncontrolled fermentation, three yeast species were identified, two of which seemed to colonize the brines throughout the process. In the first days, *Candida glabrata* and *Candida congregata* were

Table 1
Number of yeast isolates identified throughout inoculated or uninoculated pilot-scale fermentations.

Batch inoculated with:	Uninoculated control			<i>C. diddensiae</i> C6B18			<i>L. plantarum</i> V10A2			<i>L. pentosus</i> FxMA1			<i>L. pentosus</i> 5E3A18			<i>C. didd</i> C6B1 <i>L. pent</i> 5E3A18			<i>L. plant</i> V10A2 <i>L. pent</i> 5E3A18			<i>L. pent</i> FxMA1 <i>L. pent</i> 5E3A18		
	7	24	52	7	24	52	7	24	52	7	24	52	7	24	52	7	24	52	7	24	52	7	24	52
Yeast species																								
<i>Candida glabrosa</i>	16	6	27				18	4	15	29	30	24	29	21	19				26	28	5	27	19	7
<i>Candida conglobata</i>	14		3				9	22	15	1			5	1					2	1		3		
<i>Candida diddensiae</i>				30	28			4											26	29				
<i>Pichia anomala</i>					2	30											4	1	30					
<i>Candida boidinii</i>							3							9								19		
<i>Candida sorbosa</i>													1							2	1			8
<i>Zygoascus hellenicus</i>																		5				2	3	20
<i>Candida friedrichii</i>																		3				4		
<i>Pichia guilliermondii</i>		24																						
<i>Candida beechii</i>																		3						1
<i>Candida membranifaciens</i>																								2

present in the same proportions but by the end only *C. glabrosa* seemed to play an important role (it was 90% of the thirty colonies analyzed). The yeast diversity was lowest when brine was inoculated or co-inoculated by *C. diddensiae*: only two different species were detected, one of which was the yeast starter culture. Moreover, *Pichia anomala*, the second species, appeared on day 24 and by day 52 dominated in the brine. On the other hand, the use of LAB starter cultures in single or co-inoculation increased the yeast species diversity and this increase seemed to be related to the strain used. The results in Table 1 show that in the presence of *L. pentosus* 5E3A18, yeast variability was no lower than 6. The yeast-id database allowed us to identify *C. glabrosa*, *C. conglobata*, *Candida boidinii*, *Candida sorbosa*, *Candida friedrichii*, *Candida beechii*, *Candida membranifaciens*, *C. diddensiae*, *Zygoascus hellenicus* and *Pichia guilliermondii*. However, among all these species, *C. glabrosa* was 70% of the rest of the isolated yeasts. Besides this, the yeast diversity increased at the end of the process (day 52) and such species as *C. boidinii* and *Z. hellenicus* reached a proportion of 60 and 65% in inoculated brines with two LAB starters (*L. pentosus* 5E3A18 used with *L. plantarum* V10A2 or *L. pentosus* FxMA1, respectively).

3.4. Organic acid production

The metabolic products detected by HPLC in the brine during fermentation were citric, tartaric, malic, succinic, lactic and acetic acids. The total organic acids found in brines depended on the microbial activity of the various inoculation cultures. The lowest organic acid contents at day 52 were encountered in uninoculated and yeast starter brines (34 and 37.2 mM, respectively) whereas in LAB starter cultures the levels ranged from 51.3 to 64.4 mM (data not shown). Lactic acid, the main product of lactic fermentation, increased during the fermentation whatever the starter culture used, ranging from 13.9 mM to 44.6 mM at day 52 (Fig. 3). However, this increase in lactic acid was more marked in the brines inoculated with LAB starter cultures. It should also be pointed out that the maximum lactic acid production rates found in two-strain LAB inoculated brines were almost twice as high (a mean of $0.47 \text{ g l}^{-1} \text{ week}^{-1}$) as in single-LAB or LAB/yeast-inoculated brines (a mean of $0.28 \text{ g l}^{-1} \text{ week}^{-1}$). On the other hand, no significant differences were observed in the succinic acid concentration (1.58–1.93 mM) among the different treatments. The amounts of tartaric acid were around 0.20–0.70 mM for all the brines at day 52 except for the spontaneous and yeast-inoculated brines which were 2.10–2.60 mM, respectively (data not shown). Some differences were observed in the citric, malic and acetic acid contents of brines at day 52 due to the composition of the starter culture (Fig. 4). For instance, the citric acid content was low in spontaneous

fermentation (1.46 mM) and highest in brines in which *C. diddensiae* was used either as a single inoculation or as a co-inoculation with *L. pentosus* 5E3A18 (4.06 and 7.76 mM, respectively). Malic acid content was lowest in uninoculated and yeast-inoculated brines (5.90 and 8.43 mM, respectively), whereas in the other treatments, it was around 11.80 mM. As for acetic acid production, at day 52, no differences were evident among the various starter cultures (ca. 2–5.67 mM) except for brines fermented with indigenous microflora or *L. pentosus* FxMA1 as a single culture (7.17 mM).

3.5. Sensorial evaluation by the triangular test

Some triangular tests were performed with the intention of differentiating the starter culture used. To this end, representative olive samples of brines fermented with spontaneous microbiota, *C. diddensiae* or *L. pentosus* 5E3A18, alone or with *C. diddensiae*, were sensorially evaluated by twelve trained panellists. The forced-choice

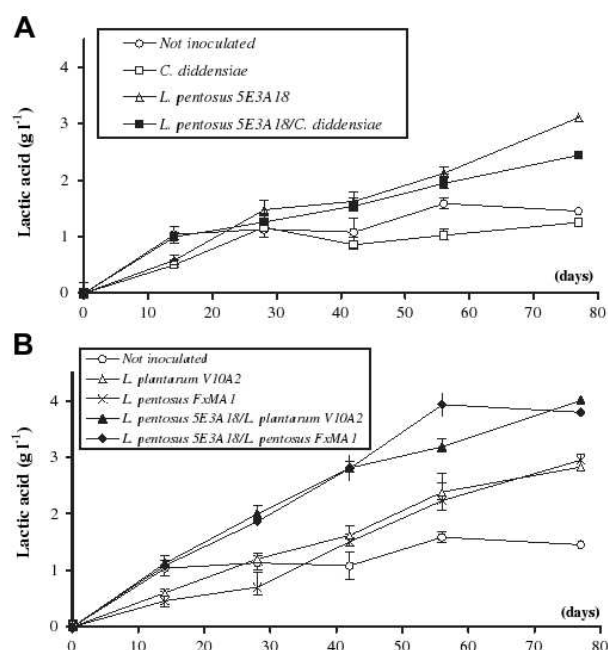


Fig. 3. Effect of inoculated brine on lactic acid production during fermentation of untreated *Arbequina* green olives at 20 °C. Error bars indicate the SD of two independent experiments.

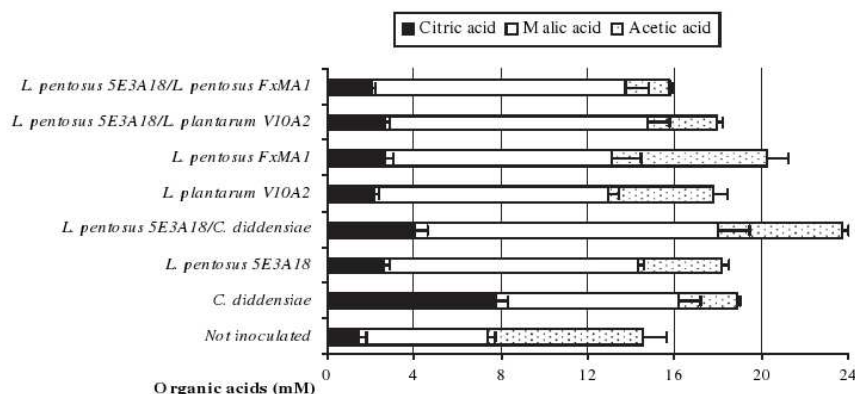


Fig. 4. Citric, malic and acetic acid productions at day 56 in fermented brines of untreated *Arbequina* green olives at 20 °C. Error bars indicate the SD of two independent experiments.

procedure permitted us to evaluate whether or not there was a detectable difference between two samples. As can be seen in Table 2, differences were detected at a significance level of 0.1% for the various associated pairs.

In order to obtain complementary information, a hedonistic sensory analysis was also performed (Depled, 2009) (Table 2). This method allowed us to show which of two samples presented for the triangular test panellists preferred when there was a detectable difference. As can be seen in Table 2, all the trained experts (12) could distinguish between the first three pairs of samples but only eleven detected differences for the last pair. The only significant preference was for the LAB inoculated fermentation olives vs. spontaneous fermentation olives. Panellists also seemed to prefer the LAB inoculated sample to the yeast one, although there was no significant difference, but they also tended to prefer the yeast controlled fermentation to the spontaneous fermentation. The panellist perceived the LAB/yeast and yeast starter cultures to be identical.

4. Discussion

Nowadays, most table olives are produced by spontaneous fermentation (Garrido-Fernández et al., 1997). Although treated olives are mainly fermented by LAB and natural olives by a mixture of yeast and LAB, correct fermentation depends on the suitable LAB development and action (Garrido Fernández et al., 1999; Sánchez et al., 2000; Tassou et al., 2002). In Catalonia, after *Arbequina*

table olives have been harvested they are traditionally sorted to remove damaged and unsized fruits, washed with tap water and brined in 6–10% (w/w) NaCl brine. In this process, the fruits undergo spontaneous fermentation mainly by *L. pentosus* but also by some yeasts (*C. diddensiae* and *C. boidinii*) (Sánchez et al., 2000; Tassou et al., 2002; Hurtado et al., 2008).

To better control the microbiological and organoleptic parameters of the *Arbequina* industrial process, a well-defined starter is required. Because of the presence of two very different fermenting microorganisms, yeast and lactic acid bacteria (Hurtado et al., 2008, 2009), we evaluated the choice between a single or co-inoculated starter of both yeast and LAB. The results of the uninoculated vessel were different from those observed in an industrial fermentation (Hurtado et al. 2008) but consistent with results obtained with spontaneous fermented olives (Hurtado et al. 2009). Biofilms formation in industrial vats used year by year is the main difference between both processes probably favouring the development of well adapted LAB (Ortu et al., 2007). LAB developed little while yeast and *Enterobacteriaceae* populations remained high throughout the fermentation. As a result the lactic acid production from olive flesh sugar was low and the brine pH did not decrease. Furthermore the level of the main organic acids (citric, malic and acetic acids) was the lowest of all the experiments. The fact that the acetic acid level in this brine was higher than in the inoculated brines could be explained not by a shift from the homo- to the hetero-fermentative metabolism of LAB strains but by a sugar metabolism of the yeast species. As was observed in Hurtado et al. (2009), *Arbequina* table olives are poorly fermented by the action of the indigenous microbiota from the fruit skin in sterile laboratory-scale conditions without the use of starter. However, in the present experiment the LAB population of uninoculated brine consisted of *L. plantarum* and *L. pentosus* strains while in the previous experiment it consisted only of *L. plantarum* (Hurtado et al., 2009). The yeast microbiota species were different and not as diverse as in the previous study (3 versus 11 species) (Hurtado et al., 2009) which was carried out in the same experimental conditions and geographical zone but with olives of a different ripeness. Nevertheless, this result confirms not only that geographical and technological factors (Ortu et al., 2007; Hurtado et al., 2008) influence both the LAB and yeast variability but also that the olive harvest can introduce a greater or lesser diversity of microorganisms.

Because of the strong association between yeast and LAB in *Arbequina* industrial fermentations, the use of separate or combined inoculation of both microorganisms was studied. In our conditions it was evident that the LAB population was directly influenced by the presence of the LAB starter by itself or in

Table 2

Results of triangular and preference tests on untreated *Arbequina* green table olives fermented at 20 °C by different starters.

Starter	Number of tests	Responses		Tabulated value
		Yes	No	
Control vs LAB	12	12	0	10 (0.1%)
LAB vs yeast	12	12	0	10 (0.1%)
LAB/yeast vs yeast	12	12	0	10 (0.1%)
Control vs yeast	12	11	1	10 (0.1%)
Preference test (pair test)				
	R^a		R	
Control	3	LAB	9	Significant at 7.5% (prob < 0.073)
LAB	8	Yeast	4	Not significant (prob = 0.194)
LAB/yeast	6	Yeast	6	Not significant (prob = 0.613)
Control	4	Yeast	7	Not significant (prob = 0.274)

Control spontaneous fermentation, LAB (*L. pentosus* 5E3A18), LAB/Yeast (*L. pentosus* 5E3A18 with *C. diddensiae*) and Yeast (*C. diddensiae*).

^a R = number of responses.

combination with yeast from the onset of fermentation. This difference induced a rapid decrease in *Enterobacteriaceae* populations by lowering the pH. The effect of the single yeast starter on the Gram-negative bacteria viability was surprising. In this condition the enterobacteria viability decreased sharply from the beginning to the end of fermentation with no significant decrease in pH. Curiously this only occurred when *C. diddensiae* was present by itself or in combination with LAB in brines. As can be observed in the control data in the present study or reported by Hurtado et al. (2009), the pH decreased only slightly when no *C. diddensiae* was detected in brines so the enterobacteria population remained high throughout the process. This interesting result was complemented by the fact that only the citric acid level was significantly different in the *C. diddensiae*-inoculated brine while no significant changes were observed for the other organic acids. As far as we know, this is the first time that this particular *C. diddensiae*-induced effect, only found in the early stages of industrial fermentation, has been observed. The use of the *C. diddensiae* starter led to less yeast diversity during the fermentation. In 1997, Garrido-Fernández et al. inoculated three wild *Saccharomyces* species into a Spanish-style table olive fermentation but results were unclear. Generally, previous studies show that LAB growth can be improved by the presence of *Debaryomyces hansenii*, inoculated 48 h before in olive juice (Tsapatsaris and Kotzekidou, 2004) or *Saccharomyces cerevisiae* in green table olive solutions (Segovia Bravo et al., 2007). Yeasts in a natural mixed fermentative process can synthesize a considerable number of bioactive compounds which can be toxic for other microorganisms (Abbas, 2006). The formation of these substances can be induced in yeasts grown under stressing conditions or in response to fermentation medium ingredients such as phenolic compounds or additives that are known to be toxic to cells grown aerobically (Cruz et al., 1999). In other words *C. diddensiae* may use an unknown mechanism to induce an inhibitor effect on both the *Enterobacteriaceae* population and the yeast diversity in the initial stage of the *Arbequina* fermentation process.

On the other hand no loss in viability was observed for the various LAB inoculations in the first days, as has been reported in other studies (de Castro et al., 2002; Panagou et al., 2003). This was probably due to the pre-adaptation of the strain starter, which was carried out in saline (4%, w/v) MRS broth in accordance with Sánchez et al. (2001). The absence of a high pH in the brines before inoculation, characteristic of Spanish-style table olive processing, may also be another synergistic and positive parameter. Nevertheless, as observed in single inoculated-*L. plantarum* brine, the LAB population decreased for one week but then increased to normal levels after three weeks. As a result the persistence of high levels of enterobacteria throughout the process could be detrimental to the olive quality. The failure of *L. plantarum* V10A2 to colonize, due to the implantation of a new *L. pentosus* strain (pent5, Fig. 2.3), and carry out the fermentation of *Arbequina* table olives could be explained by the absence of some essential growth requirements for *L. plantarum* in naturally green olives from the onset of fermentation (Ruiz-Barba and Jiménez-Díaz, 1994) or its hypersensitivity to such inhibitory compounds as verbascoside or oleuropein (Panagou et al., 2003). For these reasons it has been proposed that *L. plantarum* is not able to ferment *Arbequina* table olives (Garrido-Fernández et al., 1997). The low or rapid dominance of *L. pentosus* strains in single or combined *L. plantarum*-inoculated starters, respectively (Fig. 1), which was confirmed by the results of the Rep-PCR using the GTG5 primer (Fig. 2.3, 2.7), showed that *L. pentosus* strains are the best LAB for fermenting *Arbequina* brines.

There were some differences, however, between the two *L. pentosus* strains. The results as a whole suggest that the 5E3A18 strain is better adapted to the *Arbequina* brine conditions than the FxMA1 strain. For example the brines in the initial stage of

fermentation were acidified by the first strain faster than the second. This may be related to the fact that the FxMA1 strain had some difficulties in dominating the brine (Figs. 1 and 2). Moreover, less lactic acid was produced in brine by the FxMA1 strain than by the 5E3A18 strain (Fig. 3).

When combined starters were used, the presence of another microorganism—either yeast or LAB—did not seem to affect the growth of the *L. pentosus* 5E3A18 strain or its lactic acid production in brines. The *L. pentosus* starter culture can be considered to be suitable for controlling *Arbequina* fermentation because it dominates the whole process. As has been suggested by several authors (Gevers et al., 2001; Tamang et al., 2005; Panagou et al., 2008), the GTG5 Rep-PCR may be able to distinguish LAB strains isolated from spontaneous olive fermentation. In this study the GTG5 Rep-PCR method was successfully used to compare the different starter cultures and the brine isolate patterns throughout the fermentation process (see Fig. 3).

All the co-inoculations presented a better microbial development profile than the single inoculations, especially when the yeast *C. diddensiae* C6B19 was associated with *L. pentosus* 5E3A18. The fermentation profile confirms that yeasts can be used as adjunct starters to inhibit both undesirable contaminating yeasts and food-borne pathogens (Psani and Kotzekidou, 2006) and to improve LAB development (Arroyo-López et al., 2008). Other yeasts prevalent in table olive processes such as *C. boidinii* or *C. membranifaciens* (Arroyo-López et al., 2006; Hurtado et al., 2008) should be studied as possible co-starter yeasts. Panagou et al. (2008) suggested that LAB starters competed with wild yeasts. In our pilot fermentations neither the courses of yeast populations nor the species diversity were affected by LAB starters. When *C. diddensiae* C6B19 and *L. pentosus* 5E3A18 were co-inoculated they were never affected by each other.

When two lactic acid bacteria are combined to inoculate brines, one LAB strain starter generally dominates from the onset of fermentation. The analysis of the GTG5 Rep-PCR results showed that the strain used could increase the LAB diversity. Of particular interest is the presence of the *L. pentosus* FxMA1 strain in single or combined starter cultures. This strain seems to permit the brine to have a large wild LAB diversity (Fig. 2.4 & 2.8). This particular behaviour could be related to a relatively beneficial effect induced by the FxMA1 strain to favour a longer permanence of other LAB strains in brines. Nevertheless, the combined inoculation of *L. pentosus* strains (FxMA1 and 5E3A18) shows that the 5E3A18 strain may be mainly responsible for lactic acid fermentation even though its percentage of population is the lowest observed in brines when this strain is used as starter culture. Whatever the species or strains used, the combined LAB starters shortened the length of lactic acid production and improved its content in brines. In other terms, doubling the LAB concentration after the onset of fermentation enables the brines to be quickly acidified (lactic acid production is doubled) which decreases the possible risk of *Enterobacteriaceae* spoilage and reduces the LAB lag phase and consequently the total time of the fermentation process. It should also be pointed out that one strain—*L. pentosus* pent 1—appeared at different moments and in various brines, which might mean that this strain is of future interest.

The main organic acids detected by HPLC in the brines were citric, tartaric, malic, succinic, lactic and acetic acids. Generally these results are in agreement with those of previous research carried out on untreated green table olive fermentations when LAB starters are used (García García et al., 1992; Panagou et al., 2003; Panagou et al., 2008). However, in our conditions (i.e. using *Arbequina* cultivar as raw material), lactic acid production in uncontrolled fermentations is low not only because of the low sugar content of olives (Marsilio et al., 2001) but also because of the weak growth of LAB.

The sensorial analysis (triangular and preference tests) also underline the importance of using a starter to produce *Arbequina* table olives. In all the aspects studied the origin of the starter culture can directly influence the organoleptic characteristics of table olives. Nevertheless, the panellists' preference is for the olives fermented by the LAB strain. It is unclear if the presence of *C. diddensiae* can be beneficial for the sensorial properties of *Arbequina* table olives. Further research is necessary to determine whether or not the use of a LAB/yeast starter culture can be justified for promoting more reproducible and typical sensorial characteristics of *Arbequina* table olives.

In conclusion the results obtained in the present study show that using *L. pentosus* as a starter culture, associated or not with *C. diddensiae* yeast, may be a rapid and suitable method for fermenting *Arbequina* table olives. In addition, and as far as we know, this is the first report to consider the imposition of both the inoculated LAB and yeast strain during olive fermentations.

However, some aspects of controlled fermentation by a LAB starter culture may be improved. As industrial practices use new 200-l plastic vessels every year to ferment *Arbequina* table olives, the behaviour of these starters must be studied. According to our results, the *L. plantarum* starter seems unsuitable for controlling *Arbequina* table olive fermentation. On the other hand, the use of *L. pentosus* strains associated or not with *C. diddensiae* rapidly reduces *Enterobacteriaceae* survival during the first stage of fermentation and modifies the organoleptic sensorial quality of olives. Further research is required to determine whether *Arbequina* table olive are really ready for commercialization after the *C. diddensiae* population has disappeared from brine (i.e. whether olives have acquired the typical sensorial quality of *Arbequina* table olive). As table olive flavours play an important role in their being accepted by customers (Sabatini et al., 2008), it is of great interest to be able to control the diversity of wild yeasts.

Acknowledgements

This work has been supported by grant INIA-RM 2004-00015 from the Spanish Ministry of Education and Science. Albert Hurtado is grateful to the Rovira i Virgili University for his doctoral fellowship 2005BRDI/12/13. The authors are grateful to the workers of "Mas dels Freres" (Rovira i Virgili University, Constantí, Catalonia, Spain) for providing olives and total collaboration.

References

- Abbas, C.A., 2006. Production of antioxidants, aromas, colours, flavours, and vitamins by yeasts. In: Querol, A., Fleet, H. (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 285–334.
- Arroyo-López, F.N., Durán-Quintana, M.C., Ruiz-Barba, J.L., Querol, A., Garrido-Fernández, A., 2006. Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology* 23, 791–796.
- Arroyo-López, F.N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A., 2008. Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology* 128, 189–196.
- de Castro, A., Montaña, A., Casado, F.-J., Sánchez, H., Rejano, L., 2002. Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiology* 19, 637–644.
- Chorianopoulos, N.G., Boziaris, I.S., Stamatou, A., Nychas, G.J.E., 2005. Microbial association and acidity development of unheated and pasteurized green-table olives fermented using glucose or sucrose supplements at various levels. *Food Microbiology* 22, 117–124.
- Cruz, J.M., Domínguez, J.M., Domínguez, H., Parajo, J.C., 1999. Solvent extraction of hemicellulosic wood hydrolysates: a procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity. *Food Chemistry* 67, 147–153.
- Depled, F., 2009. In: TEC, DOC (Eds.), *Évaluation sensorielle*. Manuel méthodologique. Lavoisier, Paris, p. 524.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of System Bacteriology* 49, 329–337.
- Etchells, J.L., Borg, A.F., Kittel, I.D., Bell, T.A., Fleming, H.P., 1966. Pure culture fermentation of green olives. *Applied Microbiology* 14, 1027–1041.
- García-García, P., Durán-Quintana, M.C., Brenes-Balbuena, M., Garrido-Fernández, A., 1992. Lactic fermentation during the storage of *Alorena* cultivar untreated green table olives. *Journal of Applied Bacteriology* 73, 324–330.
- Garrido-Fernández, A., Fernández Díez, M.J., Adams, M.R., 1997. In: *Table Olives: Production and Processing*. Chapman and Hall, London, p. 464.
- Gevers, D., Huys, G., Swings, J., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205, 31–36.
- Hurtado, A., Reguant, C., Esteve-Zarzoso, B., Bordons, A., Rozès, N., 2008. Microbial population dynamics during the processing of *Arbequina* table olives. *Food Research International* 41, 738–744.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., Rozès, N., 2009. Influence of fruit ripeness and salt concentration on the microbial processing of *Arbequina* table olives. *Food Microbiology* 26, 827–833.
- Lamzira, Z., Asehraou, A., Brito, D., Oliveira, M., Faid, M., Peres, C., 2005. Blander spoilage of green olives. *Food Technology and Biotechnology* 43, 373–377.
- Leal-Sánchez, M.V., Ruiz-Barba, J.L., Sánchez, A.H., Rejano, L., Jiménez-Díaz, R., Garrido, A., 2003. Fermentation profile and optimization of green olive fermentation using *Lactobacillus plantarum* LPCO10 as a starter culture. *Food Microbiology* 20, 421–430.
- Marsilio, V., Campestre, C., Lanza, B., De Angelis, M., 2001. Sugar and polyol compositions of some European olive fruit varieties (*Olea europaea* L.) suitable for table olive purposes. *Food Chemistry* 72, 485–490.
- Marsilio, V., Seghetti, L., Iannucci, E., Russi, F., Lanza, B., Felicioni, M., 2005. Use of a lactic acid bacteria starter culture during green olive (*Olea europaea* L cv *Ascolana tenera*) processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 1084–1090.
- Nychas, G.-J.E., Panagou, E.Z., Parker, M.L., Waldron, K.W., Tassou, C.C., 2002. Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. *Letters on Applied Microbiology* 34, 173–177.
- Ortu, S., Felisa, G.E., Marzottob, M., Deriua, A., Moliccotta, P., Secchia, L.A., Dellaglio, F., Zanettia, S., 2007. Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and Gioddu, a traditional Sardinian fermented milk. *International Dairy Journal* 17, 1312–1320.
- Panagou, E.Z., Tassou, C.C., Katsabokakis, C.Z., 2003. Induced lactic acid fermentation of untreated green olives of the *Conservolea* cultivar by *Lactobacillus pentosus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83, 667–674.
- Panagou, E.Z., Tassou, C.C., 2006. Changes in volatile compounds and related biochemical profile during controlled fermentation of cv. *Conservolea* green olives. *Food Microbiology* 23, 738–746.
- Panagou, Z.E., Schillingerb, U., Franz, C., Nychas, G.-J., 2008. Microbiological and biochemical profile of cv. *Conservolea* naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 25, 348–358.
- Plengvidhya, V., Bredt Jr., F., Fleming, H.P., 2004. Use of RAPD-PCR as a method to follow the progress of starter cultures in sauerkraut fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 93, 287–296.
- Psnai, M., Kotzekidou, P., 2006. Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 22, 1329–1336.
- Querol, A., Barrio, E., Ramón, D., 1992. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 439–446.
- Ruiz-Barba, J.L., Jiménez-Díaz, R., 1994. Vitamin and amino acid requirements of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. *Journal of Applied Bacteriology* 76, 350–355.
- Ruiz-Barba, J.L., Maldonado, A., Jimenez-Diaz, R., 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Analytical Biochemistry* 347, 333–335.
- Sabatini, N., Mucciarella, M.R., Marsilio, V., 2008. Volatile compounds in uninoculated and inoculated table olives with *Lactobacillus plantarum* (*Olea europaea* L., cv. *Moresca* and *Kalamata*). *Food Science and Technology* 41, 2017–2022.
- Sánchez, A.H., de Castro, A., Rejano, L., Montaña, 2000. Comparative study on chemical changes in olive juice and brine during green olive fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 5975–5980.
- Sánchez, A.H., Rejano, L., Montaña, A., de Castro, A., 2001. Utilization at high pH of starter cultures of lactobacilli for Spanish-style green olive fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 67, 115–122.
- Segovia Bravo, K.A., Arroyo López, F.N., García García, P., Durán Quintana, M.C., Garrido Fernández, A., 2007. Treatment of green table olives solutions with ozone. Effect on their polyphenol content on *Lactobacillus pentosus* and *Saccharomyces cerevisiae* growth. *International Journal of Food Microbiology* 114, 60–68.
- Servili, M., Settanni, L., Veneziani, G., Esposito, S., Massitti, O., Taticchi, A., Urbani, S., Montedoro, G.F., Corsetti, A., 2006. The use of *Lactobacillus pentosus* 1M0 to shorten the debittering process time of black table olives (Cv. *Itrana* and *Lecicino*): a pilot-scale application. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54, 3869–3875.
- Seseña, S., Sánchez, I., Palop, I., 2005. Characterization of *Lactobacillus* strains and monitoring by RAPD-PCR in controlled fermentations of "Almagro" eggplants. *International Journal of Food Microbiology* 104, 325–335.

- Tamang, J.P., Tamang, B., Schillinger, U., Franz, C., Goresb, M., Holzapfel, W.H., 2005. Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology* 105, 347–356.
- Tassou, C.C., Panagou, E.Z., Katsaboxakis, K.Z., 2002. Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology* 19, 605–615.
- Torriani, S., Felis, G.E., Dellaglio, F., 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3450–3454.
- Tsapatsaris, S., Kotzekidou, P., 2004. Application of central composite design and response surface methodology to the fermentation of olive juice by *Lactobacillus plantarum* and *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology* 95, 157–168.

Capítulo 4. Genotyping and technological evaluation of *Lactobacillus* strains isolated from fermented olives

Albert Hurtado¹, Nada Ben Othman², Nadia Chammem², Moktar Hamdi², Sergi Ferrer³, Cristina Reguant¹, Albert Bordons¹, Nicolas Rozès¹

1) Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Campus Sescelades, c/ Marcel·lí Domingo s/n, Tarragona 43007, Spain

2) LETMI, Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie INSAT, Université 7 Novembre a Carthage, 1 Boulevard de la Terre, 1080 Tunis, Tunisia

3) ENOLAB, Departament de Microbiologia i Ecologia, Universitat de València, C/ Dr. Moliner 50, Burjassot 46100, Valencia, Spain

(Manuscrito en revisión)

Abstract

One hundred strains of *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* from four culture collections and isolated from table olives were studied. Strains were genotyped by rep-PCR. Although the technique failed to differentiate some strains at the species level, it proved a robust and easy procedure that is useful for distinguishing between related strains of *L. paraplantarum*, *L. pentosus* and *L. plantarum* isolates from a large pool of unrelated strains of these species. A screening test was performed in a saline medium imitating table olive brine conditions. Most of the isolates were able to grow in a non-saline control medium while only six of them grew when the medium had 12% NaCl (w/v). A PCR-based screening revealed the presence of the plantaricin encoding genes *plnA*, *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnE*, *plnF*, *plnI*, *plnJ*, *plnK*, *plnG* and *plnN* in most isolates of the three species. The gene for plantaricin W was not found in any isolate, whereas plantaricin S was only found in one strain and plantaricin NC8 was found in six isolates. Sequences of bacteriocin genes present in *L. paraplantarum* and *L. pentosus* were homologous to *L. plantarum* genes. Through a discriminating analysis of the bacteriocin gene profiles, it was possible to establish a relationship between the processing method of table olives and the LAB isolates, regardless of species.

Keywords: GTG₅ rep-PCR, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus paraplantarum*, salt stress, bacteriocin, plantaricin, pentocin, table olives.

1. Introduction

Table olives are one of the most important fermented vegetables traded on the world market. Spanish production of table olives between 2006 and 2009 was about 470,000 Tm per season (Agencia para el Aceite de Oliva, <http://aao.mapa.es>, Spain). Table olives are produced by means of spontaneous and traditional lactic acid fermentation based on an empirical process developed by wild microorganisms present on olives and in the industrial environment (Leal-Sánchez et al., 2003). Although most industrial fermentations are still uncontrolled (Garrido-Fernández et al., 1997), there is growing interest in the use of selected lactic acid bacteria (LAB) strains as starters in table olive processing (de Castro et al., 2002; Leal-Sánchez et al., 2003; Panagou et al., 2006).

The selection of an appropriate LAB strain for table olive fermentation requires critical attention to strain typing. Complementary to classical strain identification methods based on morphological and biochemical characteristics, PCR-based methods offer more options for LAB strain identification, such as molecular typing or monitoring starter cultures (Signh and Ramesh, 2009). RAPD-PCR and rep-PCR have been used as fast and easy techniques to identify and type LAB isolates in fermented foods (Gevers et al., 2001; Plengvidhya et al., 2004; Tamang et al., 2005). In previous works rep-PCR has been used to control the starter imposition in table olive processes (Panagou et al., 2008; Hurtado et al., 2010).

Low nutrient requirements, salt tolerance and rapid and predominant growth are essential factors in considering a LAB strain suitable for use as a starter for table olive fermentations (Duran Quintana et al., 1999). Beyond the acidification of the medium, there is interest for found or develop new starters offering functionalities such as bacteriocin production (De Vuyst et al., 2007). Bacteriocins are small ribosomally synthesised proteins which are able to kill bacteria, including food-borne pathogens. The growth and metabolism of starter strains are influenced by the salt (NaCl) concentration of the brine, including the production of bacteriocins and their degree of bioactivity (Montaño et al., 1993, Delgado et al., 2005).

Bacteriocins produced by *L. plantarum* are known as plantaricins. Plantaricin LAB producers may be desirable starters in table olive fermentations not only as a novel approach to controlling pathogens in foodstuffs but also because they provide an ecological advantage over wild strains (Leal-Sánchez et al., 2003). The genetic determinants for plantaricins are frequently organised into gene clusters (Diep et al., 1994 and 1996). Several studies have been published about *L. plantarum* bacteriocin

genes (Maldonado et al., 2002; Maldonado-Barragán et al., 2003) as well as some about *L. pentosus* bacteriocins (Okkers et al., 1999; Zhang et al., 2010). However, very little research has been done into *L. paraplantarum* bacteriocin genes.

The goal of this study was to characterise *Lactobacillus* strains isolated from different table olive processes and cultivars. For this purpose, the suitability of rep-PCR, using primer GTG₅, as a strain typing technique was assessed. The ability to grow in a saline medium and possession of bacteriocin genes were also determined in order to evaluate their suitability for use as starter strains in table olive processing.

2. Materials and methods

2.1. *Lactobacillus* strains

Ninety-eight strains of *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* species from different collections were used (Tables 1, 2 and 3). They were isolated from different cultivars of table olives processed by means of several different methods, covering most of the processes used in the production of table olives. Two isolates from wine were included too, *Lactobacillus plantarum* Lb445 and Lb453. *Lactobacillus paraplantarum* CNRZ 1885^T and *L. pentosus* CECT 4023^T type strains were also studied.

2.2. Poor medium and NaCl tolerance study

A medium that imitates the poor conditions of olive brine was prepared. The medium consisted of glucose (2 g/l), trisodium citrate dihydrate (0.5 g/l), D,L-malic acid (5 g/l), casaminoacids (1 g/l) and a yeast nitrogen base without amino acids (6.7 g/l) in keeping with the mixture previously described (Rozès and Peres, 1996). A control medium without added salt was used at three different NaCl concentrations: 8, 10 and 12% (w/v). All strains were cultured overnight in MRS (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) to achieve appropriate inoculum populations (2.3-2.6 O.D. 600 nm). 30 µl of each strain was inoculated to 300 µl of fresh poor medium in a 96-micro-well plate to achieve an initial absorbance in the wells of 0.23-0.26. Incubations were performed at 28°C. Absorbance was measured at 0, 12, 24, 36, 48 and 60 hours. Experiments were run in triplicate. The growth rate of 20 randomly selected strains was checked and the

experiment was repeated in a final volume of 200 ml to assure the traceability of the micro-well plates.

2.3. *GTG₅ rep-PCR typing*

Small-scale DNA extraction from fresh colonies was performed as previously described by Ruiz-Barba et al. (2005). Two µl of the extraction were used for PCR reaction. Primer GTG₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') was used. DNA amplification was carried out in 50 µl PCR mixture containing 200 µM dNTP, 2 µM of GTG₅ primer, 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ and 1 U of Taq polymerase (Invitrogen Technologies). PCR was performed in a GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Each cycle consisted of an initial denaturation time of 5 min at 94 °C followed by 35 cycles of amplification comprising a denaturation step for 30 s at 94 °C, annealing at 40 °C for 1 min, and extension at 65 °C for 8 min. Reactions were completed with 16 min elongation at 65 °C followed by cooling to 4°C.

20 µl of the amplification products were analysed by electrophoresis (70A for 2 h,) in 1% (w/v) Low EEO agarose (Ecogen, Barcelona, Spain) in 1X TBE-buffer gels containing 0.5 µg/ml of ethidium bromide. Photographs of rep-PCR gels were taken with a KODAK DC290 Zoom Digital Camera (Eastman Kodak Company, Rochester, USA). The results were analysed with BioNumerics software (Applied Maths, version 6.1, Sint-Martens-Latem, Belgium). Similarities among digitised profiles were calculated using the Pearson correlation, and an average linkage (UPGMA or unweighted pair group method with arithmetic averages) dendrogram was derived from the profiles.

2.4. *PCR detection of bacteriocin genes*

A PCR assay was performed using 2 microlitres of the DNA micro extraction (Ruiz-Barba et al., 2005) of each strain in a GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster City, USA). PCR amplification of 13 *L. plantarum* gene sequences involved in *L. plantarum* plantaricin production was carried out using previously described primers (Ben Omar et al., 2008) with initial denaturation at 94 °C for 3 min and 30 cycles of 94 °C for 1 min, annealing at an appropriate temperature for 1 min, 72 °C for 30 s, and a final extension at 72 °C for 5 min (Ben Omar et al., 2006). PCR products were separated by electrophoresis (70A for 2 h) in 1% (w/v) Low

EEO agarose in 1X TBE-buffer gels containing 0.5 µg/ml of ethidium bromide. According to genomic similarity between *L. plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* the same protocol was followed for both non-sequenced species. PCR products were purified using a QIAquick PCR purification Kit (Quiagen GmbH, Hilden, Germany) and sequenced. The sequences were then submitted for a BLASTN homology search.

2.5 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS Software 15.0, and we applied the discriminant analysis method for classification.

Experiments described in this work were performed in a research lab that meets ISO 9001 standards.

3. Results

3.1. Strain genotyping by rep-PCR

Reproducibility of rep-PCR fingerprinting was evaluated in preliminary experiments using a subset of strains. Under our conditions, primer GTG₅ produced reproducible strain-specific profiles with assayed lactobacilli (data not shown) as reported in previous studies (Gevers et al., 2001; Tamang et al., 2005).

On the basis of a computerised numerical analysis of GTG₅ rep-PCR patterns, strains were grouped into three well defined clusters at a similarity of 57% according to their taxon designation with some exceptions (Fig. 1). Our results showed that one *L. plantarum* isolate grouped with *L. pentosus* and three *L. pentosus* isolates grouped with *L. paraplantarum* (Fig. 1). *L. paraplantarum* CNRZ 1885^T did not group with any other strain (Fig. 1), constituting a separate group from the other three. *L. pentosus* isolates were grouped in two clusters with a homology of 66%. A similar distribution was observed for *L. plantarum* isolates, where they were distributed in two main clusters, showing a homology of 67%. *L. paraplantarum* showed a slightly higher homology among isolates (72%), surprisingly including some *L. pentosus* isolates as mentioned

above. For the mismatched and its nearby isolates species identification was performed using *recA* gene multiplex PCR (Torriani et al., 2001) and GTG₅ profiles were repeated obtaining consistent results. A clear relationship between the GTG₅ fingerprint and the geographical origin of isolation or the production process could not be established (data not shown).

3.2. Growth with different NaCl concentrations

A great number of assayed strains successfully grew in poor medium (Tables 1, 2 and 3). In total, 23 strains were able to grow when the medium was supplemented with 8% (w/v) NaCl and 16 of them grew when NaCl was increased to 10% (w/v). *L. paraplantarum* MR2A28, *L. pentosus* strains 16L4, 5E3A18 and 5E7A15 and *L. plantarum* strains 10L3 and P16 were able to grow when the salt concentration of the medium reached its maximum, 12% (w/v). As can be seen in table 3, *L. pentosus* was the species with the highest percentage (>80%) of representatives showing a good growth rate in poor medium, and >30% of them grew with up to 8% NaCl added. *L. paraplantarum* was the species with the highest number of isolates showing more tolerance to salt (Table 1) with 23% and 7% of strains tolerant to 10 and 12% NaCl respectively.

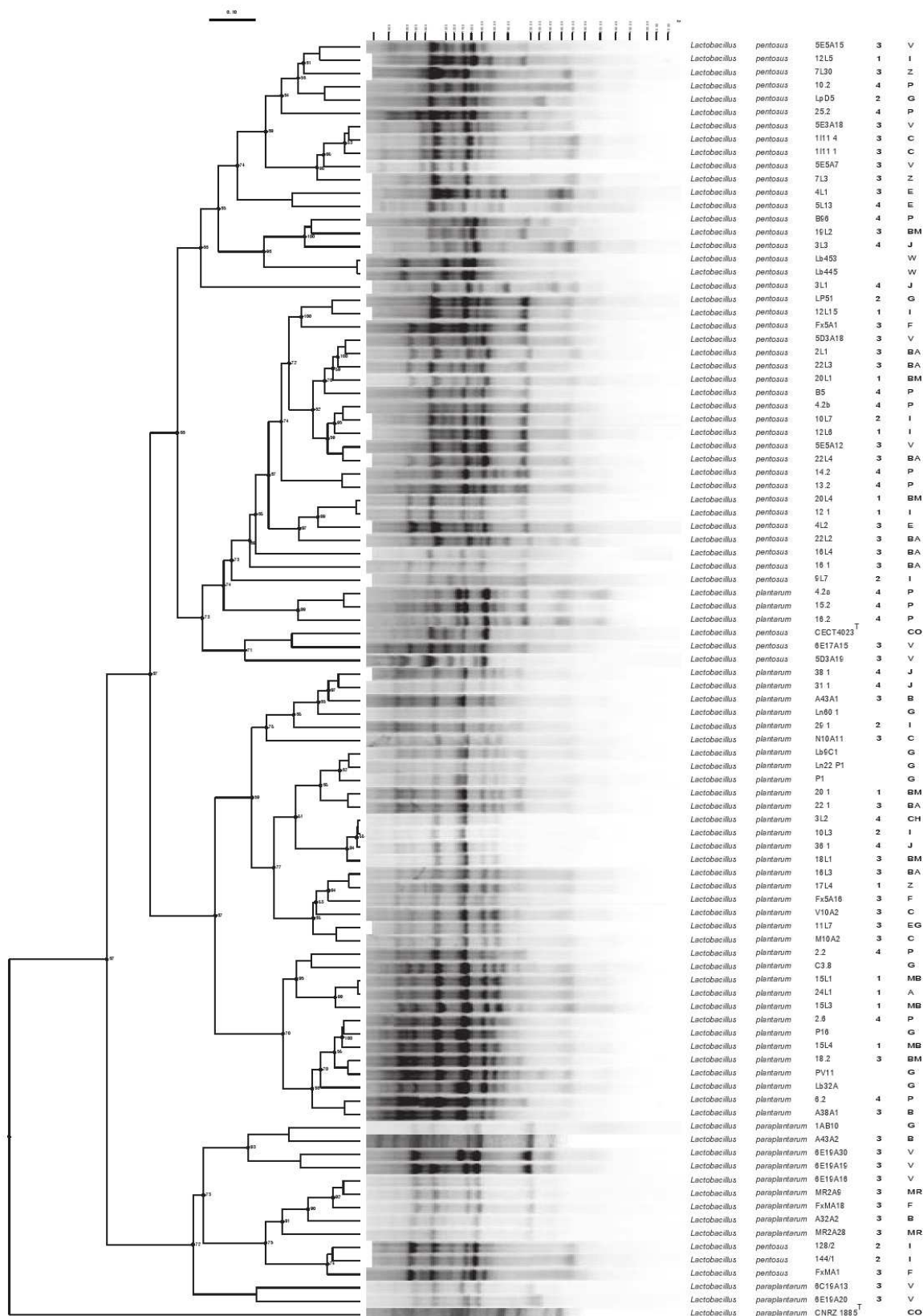


Figure 1. Dendrogram obtained from GTG₅-PCR fingerprints of 98 strains of *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* from different collections. *L. paraplantarum* CNRZ 1885^T and *L. pentosus* CECT 4023^T type strains are included for comparison. Patterns were grouped with the unweighted pair group algorithm with arithmetic averages (UPGM). Numbers and letters represent origin and source (if known) of the strains (see Tables 1, 2 and 3).

Table 1. Relation of *L. paraplantarum* isolates used for the study with their bacteriocin gene mapping and their salt tolerance.

isolate	Olive process ^a	origin ^b	collection ^c	Bacteriocin genes ^c											Salt tolerance ^d						
				A	B	C	D	E	G	I	J	K	N	NC8	S	W	0	8	10	12	
1AB10		G	IG	+	+		+	+	+	+		+						++			
5D3A19	3	V	URV							+											
6C19A13	3	V	URV															+			
6E19A16	3	V	URV	+														+			
6E19A19	3	V	URV																		
6E19A20	3	V	URV					+	+									++	+	+	
6E19A30	3	V	URV												+			++	++	+	
A32A2	3	B	URV															++			
A43A2	3	B	URV	+	+			+					+					++	+	++	+
CNRZ1885 ^T		CO	CNRZ	+	+	+	+	+	+	+			+								
FxMA18	3	F	URV																		
MR2A28	3	MR	URV							+					+			++			
MR2A9	3	MR	URV	+			+					+									
strains presenting attribute				5	3	1	3	4	5	2	1	3	0	2	0	0	0	8	3	3	1
relative abundance (%)				38.5	23.1	7.7	23.1	30.8	38.5	15.4	7.7	23.1	0.0	15.4	0.0	0.0	61.5	23.1	23.1	7.7	

^a 1: turning colour olives, 2: Spanish style green olives, 3: natural green olives, 4: natural black olives

^b Isolates are from Vinyols i els Arcs (V), Les Borges Blanques (B), Flix (F), Mas Roig (M), Mas dels Freres in Constantí (C), Enolab in Valencia (W) and Sevilla (G), in Spain; Tunis (I), Ben Arous (BA), Bannen Monastir (BM), Jbeniana Sfax (J), El Mourouj (E), Bizerte and Zaarour Bizerte (Z), Menzl Bourguiba (MB) and Ariana (A) in Tunis; Portugal (P) and strain collections (CO).

^c Bacteriocin genes are respectively plnA, plnB, plnC, plnD, plnEF, plnI, plnJ, plnK, plnG, plnN, plantaricin W, plantaricin S and plantaricin NC8. + means detected gene.

^d Capacity to grow in a poor saline medium. 0, 8, 10 and 12 is the NaCl % (w/v) in the medium. ΔO.D. respect to the inoculum > 0.15 is represented with a + and ΔO.D. respect to the inoculum > 0.25 is represented by ++.

^e Strain collections are: Biotecnologia Enológica, Facultad de Enología, Universidad Rovira i Virgili, Tarragona, Spain (URV), Centre National de Recherches Zootechniques, Jouy en Josas, France (CNRZ), Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Spain (CECT) Instituto de la Grasa, Sevilla, Spain (IG), Laboratorio de microbiología enológica, Departamento de Microbiología y Ecología. Universidad de Valencia, Valencia, Spain (ENOLAB), Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie, Tunis, Tunisia (INSAT) and Instituto Nacional de Investigação Agraria e das Pescas, Oeiras, Portugal (INIAP).

isolate	Olive process ^a	origin ^b	collection ^c	Bacteriocin genes ^c											Salt tolerance ^d						
				A	B	C	D	E	G	I	J	K	N	NC8	S	W	0	8	10	12	
FxMA1	3	F	URV	+														+			
Lb445		W	INSAT						+									++			
Lb453		W	INSAT											+				++	+	+	+
Lp51	2	G	IG		+																
LpD5	2	G	IG															++	+	+	+
strains presenting attribute				26	9	9	8	13	17	14	7	3	5	3	1	0		36	14	9	3
relative abundance (%)				57.8	20.0	20.0	17.8	28.9	37.8	31.1	15.6	6.7	11.1	6.7	2.2	0.0		80.0	31.1	20.0	6.7

Table 3. Relation of *L. plantarum* isolates used for the study with their bacteriocin gene mapping and their salt tolerance. See footnote to Table 1 for references.

isolate	Olive process ^a	origin ^b	collection ^c	Bacteriocin genes ^c											Salt tolerance ^d						
				A	B	C	D	E	G	I	J	K	N	NC8	S	W	0	8	10	12	
2.2	4	P	INIAP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					++			
2.6	4	P	INIAP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					+			
6.2	4	P	INIAP	+	+	+	+	+	+	+	+	+									
15.2	4	P	INIAP					+	+	+											
16.2	4	P	INIAP	+			+	+	+	+											
10L3	2	I	INSAT						+					+							
10L7	2	I	INSAT						+												
11L7	3	EG	INSAT	+	+	+	+	+		+											
15L1	1	MB	INSAT	+	+	+		+	+	+											
15L3	1	MB	INSAT	+	+	+	+	+	+	+											
15L4	1	MB	INSAT		+	+	+	+	+	+											
16L3	3	BA	INSAT	+	+	+	+	+	+	+								++	+	+	
17 1	1	Z	INSAT	+			+	+	+	+								++			
17L4	1	Z	INSAT	+	+	+	+	+	+	+											
18 2	3	BM	INSAT	+	+			+	+									++			
18L1	3	BM	INSAT	+	+	+	+	+	+	+								++			
20 1	1	BM	INSAT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					++			
22 1	3	BA	INSAT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+								
22L1	3	BA	INSAT	+		+		+	+	+								+			
24L1	1	A	INSAT	+	+	+	+	+	+	+											
29 1	2	I	INSAT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					++			
31 1	4	J	INSAT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+								
36 1	4	J	INSAT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					++	+	++	
38 1	4	J	INSAT	+	+	+	+	+	+	+	+	+						++			

isolate	Olive process ^a	origin ^b	collection ^c	Bacteriocin genes ^c													Salt tolerance ^d				
				A	B	C	D	E	G	I	J	K	N	NC8	S	W	0	8	10	12	
3L2	4	I	INSAT	+					+										++		
4.2a	3	P	INIAP				+	+	+	+											
5L2	4	E	INSAT	+							+										
8L20	4	Z	INSAT											+	+						
A38A1	3	B	URV	+	+	+	+	+	+	+	+	+							++		
A43A1	3	B	URV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						++		
C2 1		G	IG	+	+	+		+		+		+							++		
C3.8		G	IG	+						+	+								++ +		
Fx5A16	3	F	URV	+		+	+	+		+									++ +		
Lb32A		G	IG		+		+	+	+	+	+	+							++		
Lb9C1		G	IG	+		+	+	+	+	+	+	+	+								
Ln22P1		I	INSAT	+	+	+	+	+	+	+	+	+							++		
Ln60 1		I	INSAT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						++ + ++ ++		
M10A4	3	C	URV	+	+	+	+	+	+	+											
P1		G	IG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						++		
P16		G	IG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						++ ++ ++ ++		
PV11		G	IG																++		
V10A2	3	C	URV	+	+	+	+	+	+	+											
strains presenting attribute				34	28	29	30	35	35	35	19	18	14	1	0	0	0	23	6	4	2
relative abundance (%)				81.0	66.7	69.0	71.4	83.3	83.3	83.3	45.2	42.9	33.3	2.4	0.0	0.0	54.8	14.3	9.5	4.8	

3.3. Screening of the presence of bacteriocin genes

PCR products of *L. paraplantarum* and *L. pentosus* bacteriocin genes were sequenced in order to confirm their identity. All the amplicons showed a homology of at least 97% with published sequences for *L. plantarum*.

Globally, the percentage of *L. plantarum* isolates containing the analysed genes was much higher than those for *L. paraplantarum* and *L. pentosus*, except for NC8 gene, which was more abundant in *L. paraplantarum* strains (Tables 1, 2 and 3). More than 65% of *L. plantarum* representatives showed the presence of plantaricin A, B, C, D, E, G and I genes, while those genes were present in much fewer strains of *L. pentosus* and *paraplantarum*. Other genes such as *plnJ*, *plnK* and *plnN* were present in a lower proportion in *L. plantarum*, between 32 and 44% of strains, and much lower in the other two species.

In general, the genes *plnA*, *plnG*, *plnE* and *plnI* were the most common bacteriocin genes found in the studied isolates, detected in 65, 57, 52 and 51 isolates respectively (Tables 1, 2 and 3). However, plantaricin S was only detected in *L. pentosus* B96, and the gene plantaricin W was not detected in any isolate. Twenty-four out of 42 *L. plantarum* representatives possessed seven or more bacteriocin genes while only two *L. paraplantarum* and three *L. pentosus* isolates reached this number. On the other hand, there were some isolates that did not show the presence of any of the analysed bacteriocin genes (4 *L. paraplantarum*, 9 *L. pentosus* and 1 *L. plantarum*).

3.4 Discriminant analysis of the bacteriocin gene profile

In spite of the differences found in the proportion of isolates containing bacteriocin genes (Tables 1, 2 and 3), a relationship between the bacteriocin gene profile (presence or absence of the genes) and the bacterial species could not be established by means of a discriminant analysis. As shown in figure 2, the generated discriminant functions did not allow isolates to be differentiated from the three species studied. Furthermore, differentiation according to olive preparation procedure was not possible either (data not shown). However, a relationship was established between the processing method of the olives and the bacteriocin gene profile, regardless of species. Isolates from naturally green olives were chosen for this analysis because they comprised the largest group of isolates (50), including 11 different origins of isolation and, therefore, were the most suitable data group for a statistic analysis. Figure 3 shows

the results of the discriminant analysis of all the isolates from naturally green olives and their distribution in three separate clusters. Cluster I contains isolates from different industrial origins (V, F, M, E, BA and Z). Cluster II contains isolates from industrial origins B and P. Finally, cluster III includes isolates of very different origins from Tunisia, Egypt and Spain, (BM, C and EG). Interestingly, all clusters include representatives of different *Lactobacillus* species. Moreover, all the isolates from the same origin always grouped together in the same cluster, with the only exception being isolates from BA, for which several representatives were grouped in different clusters. Table 4 shows the number of isolates of each cluster that were correctly classified according to the discriminant functions created from the bacteriocin gene profile. For this analysis, each origin of isolation was associated with a single cluster, including the case of BA, which showed more dispersion and was assigned to cluster I. As the table shows, 100% of the isolates in cluster III were correctly predicted, while around 90% of the isolates in clusters I and II were correctly predicted. Similarly, cross-validation analysis showed good group prediction for all clusters since 75 to 80% of the isolates were correctly classified. Discriminant functions generated in this cluster analysis showed a significance of 0.000 (Function 1) and 0.001 (Function 2).

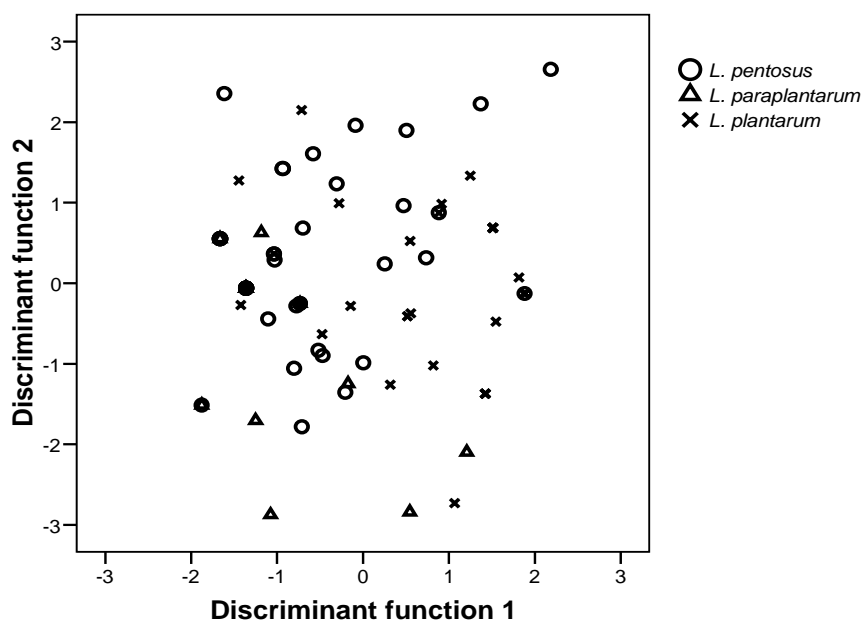


Figure 2. Discriminant analysis of all the isolates according to their species. Variables used for the analysis were bacteriocins genes of each isolate.

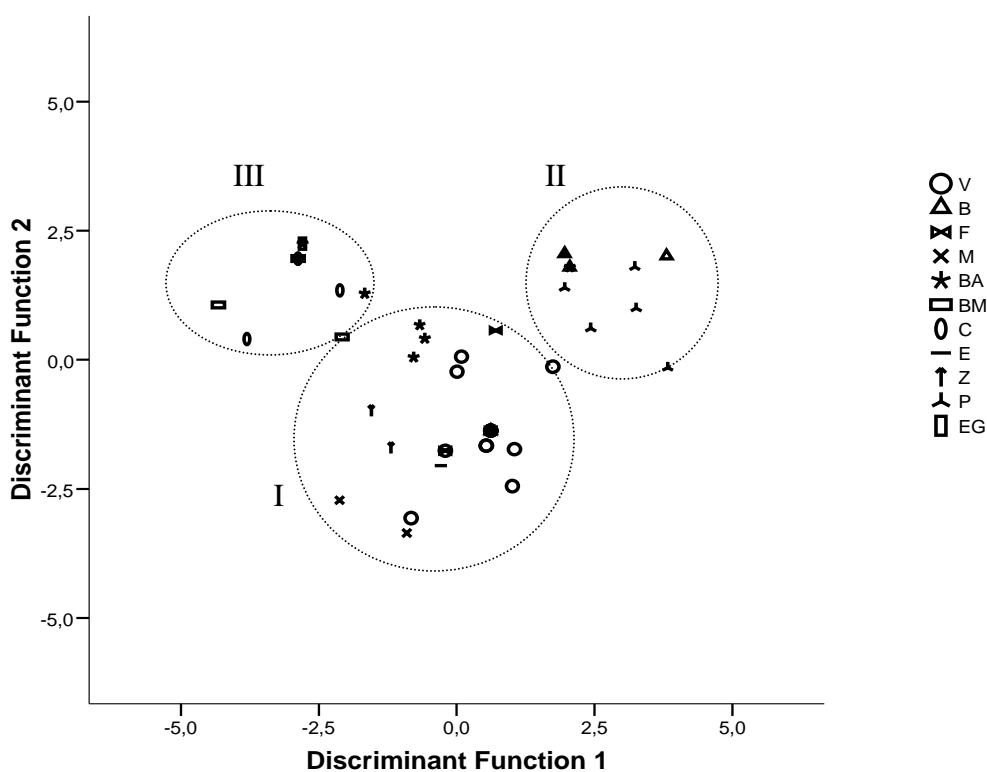


Figure 3. Discriminant analysis of natural green olive isolates according to their origin of isolation. Variables used for the analysis were bacteriocins genes of each isolate. Legend is the origin of the isolates: V)Vinyols i els Arcs, Tarragona, Spain; B)Les Borges Blanques, Lleida, Spain; F)Flix, Tarragona, Spain; M)Mas Roig, Tarragona, Spain; BA)Ben Aarous, Tunisia; BM) Bannen Monastir, Tunisia; C) ; E)El Mourouj, Tunisia; Z)Bizerte, Tunisia ; P)Portugal ; and EG) Egypt.

Table 4. Predictive classification of natural green olive isolates by discriminant analysis according to the three main clusters and cross validation of the method.

Original Cluster	Discriminant Analysis	Predicted Cluster			% correctly predicted cases
		I	II	III	
Discriminant Analysis	I	27	1	2	90.0
	II	1	11	0	91.7
	III	0	0	8	100.0
Cross-validation Analysis*	I	24	2	4	80.0
	II	3	9	0	75.0
	III	2	0	6	75.0

* Cross-validation consists of the classification of each case using the discriminant functions generated from the rest of the cases.

4. Discussion

GTG₅ rep-PCR has been described as a useful technique for differentiating between LAB species (Gevers et al., 2001; Tamang et al., 2005). In the case of the closely related species *L. paraplantarum*, *L. pentosus* and *L. plantarum*, GTG₅ primer generates species-specific patterns and has been described as enough discriminative (Tamang et al., 2005). According our results GTG₅ primer may not be sufficiently discriminating at the species level for a large pool of isolates of closely related species from the same source. The use of the GTG₅ method to identify olive isolates at the species level in some cases may lead to mismatched identifications, but it may still prove useful in distinguishing most *L. paraplantarum*, *L. pentosus* and *L. plantarum* strains or as a first step in a polyphasic study. Before *recA* multiplex PCR was used to differentiate between these species (Torriani et al., 2001), a polyphasic study revealed the difficulty in discriminating between them using only one molecular test (Bringel et al., 2001). The separation obtained by Bringel et al. (2001) is quite similar to that obtained with the GTG₅ technique. It achieves good separation of the species as well as well defined clusters with intra-species groups.

GTG₅ amplification achieves good reproducibility and generates typical DNA fingerprints of several lactobacilli (Gevers et al., 2001), thus the method can be used to follow unmarked starter strains, for which it has been previously applied (Hurtado et al., 2010).

Table olives from different cultivars are fermented in brines containing NaCl levels ranging from 4 to 15% (w/v) (Garrido-Fernandez et al., 1997). Low nutrient availability and salt shock causes a reduction of at least 2 logarithmic units after the inoculation of a starter strain in table olive brines (de Castro et al., 2002; Panagou et al., 2003). Probably the most limiting factor is saline stress. When starter strains are pre-adapting in a saline medium viability losses do not occur (Hurtado et al., 2010). Limiting salt tolerance before selecting a lactobacilli starter strain makes it possible to predict its suitability for use in the processing of each table olive, thus minimising inoculation risks. The salt tolerability of the strains studied was similar between *L. paraplantarum* and *L. pentosus*, while *L. plantarum* was, in general terms, the least resistant species to NaCl. The source at which the different strains were collected cannot explain this difference, as the most resistant strains of the three species came from different olive varieties and processes (data not shown).

Although *L. plantarum* is widespread in fermented foods, *L. pentosus* is an important species in some table olive cultivars (Oliveira et al., 2004; Panagou et al.,

2008; Hurtado et al., 2008). The genetic similarity between the two species and also with *L. paraplantarum* (Torriani et al., 2001) explains the possible presence of plantaricin genes in the three species. *L. pentosus* bacteriocins have been the subject of several studies (Liu et al., 2008; Delgado et al., 2005; Todorov and Dicks, 2005).

In a similar study, Ben Omar et al. (2008) found *plnD*, *plnE*, *plnI*, *plnG* and *plnK* as the most common genes in a group of 28 *L. plantarum*. The abundance of *plnK* is the primary difference between the results of that study and our results. Ben Omar et al. (2008) did not detect plantaricins NC8 and W. In our study, NC8 was only detected in 6 of 98 strains while niche specificity of the gene plantaricin W could explain its absence in fermented vegetables, as it was described in a wine *L. plantarum* strain (Holo et al., 2008).

As far as we know, only plantaricin S has been related to both *L. pentosus* and *L. plantarum* (Stephens et al., 1998; Delgado et al., 2005). The gene plantaricin S has been found in about 20% of *L. plantarum* isolates in two different studies (Maldonado et al., 2002; Ben Omar et al., 2008) but none of the strains studied in this work possessed the gene except *L. pentosus* B96.

Bacteriocin production is frequently associated with mobile genetic elements that may facilitate the transfer of the genes between diverse genera, species and strains sharing the same niche (Dykes, 1995). Ben Omar et al. (2008) found some plantaricin genes in *Lactobacillus fermentum* isolated in the same niche as *L. plantarum*. Studying genotype and phenotype characters, Cai et al. (2007) reported how environment pressure directed evolution and drove the niche specificity of *L. casei*. In our case, the representatives of each geographical origin are clustered in the same group, with only a few exceptions, indicating the predominance of a bacteriocin gene profile in the same microbial niche. It seems reasonable that closely related species must present similar characteristics to survive in the same conditions.

It has been found that many bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB) are only produced in broth cultures when specific growth conditions are achieved (Maldonado-Barragán et al. 2009). The possession of bacteriocin genes and the salt tolerance of a strain may justify choosing to continue working with one strain or another in order to achieve the best technological properties for use as starter in table olive processing. It is also necessary to carefully select and control LAB starter strains to guide table olive processing and at the same time to improve the sensory properties of olives, so as to guard against the undesirable effects brought about by other bacterial strains.

5. Conclusions

GTG₅ rep-PCR is not a suitable technique for identifying at the species level *L. paraplantarum*, *L. pentosus* and *L. plantarum* isolates proceeding from the same source, as occurs in table olive fermentations. Nevertheless, it could be used as a fast and easy procedure for typing strains of these species.

Salt screening testing could be useful in systematic evaluation of candidate strains for starter cultures, helping to isolate and characterise them before use.

L. paraplantarum and *L. pentosus* possess the same bacteriocin genes as *L. plantarum*. The bacteriocin gene profile of these lactobacilli from table olive fermentations showed species independent niche specificity.

Acknowledgements

Albert Hurtado is grateful to Universitat Rovira i Virgili for its doctoral fellowship 2005BRDI/12/13. The authors are grateful to Rufino Fernandez and Cidalia Peres for their valuable collaboration and for providing lactobacillus strains.

Bibliografía

- Ben Omar, N., Abriouel, H., Keleke, S., Sánchez Valenzuela, A., Martínez-Cañamero, M., Lucas López R., Ortega, E. and Gálvez A. 2008. Bacteriocin-producing *Lactobacillus* strains isolated from poto poto, a Congolese fermented maize product, and genetic fingerprinting of their plantaricin operons. *International Journal of Food Microbiology* 127, 18-25.
- Bringel, F., Quéneé, P. and Tailliez, P., 2001. Polyphasic investigation of the diversity within *Lactobacillus plantarum* related strains revealed two *L. plantarum* subgroups. *Systematic and Applied Microbiology* 24, 561-571.
- Cai, H., Rodríguez, B.T., Zhang, W., Broadbent, J.R. and Steele, J.L., 2007. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology* 153, 2655-2665.
- de Castro, A., Montañó, A., Casado, F.-J., Sánchez, H. and Rejano, L. 2002. Utilization of *Enterococcus casselinflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style Green olive fermentation. *Food Microbiology* 19, 637-644.
- Delgado A., Brito D., Peres C., Noé-Arroyo F. and Garrido-Fernández A., 2005. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiology* 22, 521-528.
- De Vuyst, L. and Leroy, F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 13, 194-199.
- Diep, D.B., Havarstein, L.S., Nisen-Meyer, J. and Nes, I.F., 1994. The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the same transcription unit as an Arg-like regulatory system. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 160-166.
- Diep, D.B., Havarstein, L.S. and Nes, I.F., 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *Journal of Bacteriology* 178, 4472-4483.
- Duran Quintana, M.C., Garca Garca P. and Garrido Fernandez, A., 1999. Establishment of conditions for green table olive fermentation at low temperature. *International Journal of Food Microbiology* 51, 133-143.
- Dykes, G.A., 1995. Bacteriocins: ecological and evolutionary significance. *Tree* 10, 186-189.
- Garrido-Fernández, A., Fernández Díez, M.J., & Adams, MR., 1997. Table olives, production and processing. Chapman and Hall, London.
- Gevers, D., Huys, G. and Swings, J., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205, 31-36.
- Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S. and Nes, I.F., 2001. Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics, *Microbiology* 147, 643-651.
- Hurtado, A., Reguant, C., Esteve-Zarzoso, B., Bordons, A. and Rozès, N. 2008. Microbial population dynamics during the processing of *Arbequina* table olives. *Food Research International* 41, 738-744.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A. and Rozès, N. 2010. Evaluation of a single and combined inoculation of a *Lactobacillus pentosus* starter for processing cv. *Arbequina* natural green olives. *Food Microbiology* 27, 731-740.
- Leal-Sánchez, M.V., Ruiz-Barba, J.L., Sánchez, A.H., Rejano, L. Jiménez-Díaz, R. and Garrido, A., 2003. Fermentation profile and optimization of green olive fermentation using *Lactobacillus plantarum* LPCO10 as a starter culture. *Food Microbiology* 20, 421-430.
- Liu, G., Lv., Y. and Li, P. 2008. Pentocin 31-1, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1 isolated from Xuan-Wei Ham, a traditional China fermented meat product. *Food*

Control 19, 353-359.

- Maldonado, A., Ruiz-Barba, J.L., Floriano, B. and Jiménez-Díaz, R., 2002. The locus responsible for production of plantaricin S, a class IIb bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, is widely distributed among wild-type *Lact. plantarum* strains isolated from olive fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 77, 117-124.
- Maldonado-Barragán., A., Ruiz-Barba, J.L. and Jiménez-Díaz, R. 2003. Purification and Genetic Characterization of Plantaricin NC8, a Novel Coculture-Inducible Two-Peptide Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 383-389.
- Maldonado-Barragán., A., Ruiz-Barba, J.L. and Jiménez-Díaz, R. 2009. Knockout of three-component regulatory systems reveals that the apparently constitutive plantaricin-production phenotype shown by *Lactobacillus plantarum* on solid medium is regulated via quorum sensing. *International Journal of Food Microbiology* 130, 35-42.
- Montaño, A., Sánchez, A.H., and De Castro, A., 1993. Controlled fermentation of Spanish-style green olives. *Journal of Food Science* 58, 842-844.
- Okkers, D.J., Dicks, L.M.T., Silvester, M., Joubert, J.J. and Odendaal, H. J., 1999. Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *Journal of Applied Microbiology* 87, 726-734.
- Oliveira, M., Brito, D., Catulo, L., Leitao, F., Gomes, L., Silva, S., et al., 2004. Biotechnology of olive fermentation of 'Galega' Portuguese variety. *Grasas y Aceites* 55, 219-226.
- Plengvidhya, V., Breidt Jr. F., and Fleming, H.P., 2004. Use of RAPD-PCR as a method to follow the progress of starter cultures in sauerkraut fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 93, 287-296.
- Panagou, E.Z., Tassou, C.C. and Katsaboxakis, C.Z., 2003. Induced lactic acid fermentation of untreated Green olives of the *Conservolea* cultivar by *Lactobacillus pentosus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83, 667-674.
- Panagou E.Z. and Tassou C.C., 2006. Changes in volatile compounds and related biochemical profile during controlled fermentation of cv. *Conservolea* green olives. *Food Microbiology* 23, 738-746.
- Panagou, Z.E., Schillingerb, U., Franz, C. and Nychasa, G.-J., 2008. Microbiological and biochemical profile of cv. *Conservolea* naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 25, 348-358.
- Rozès, N. and Peres, C. 1996. Effect of oleuropein and sodium chloride on viability and metabolism of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45, 839-843.
- Ruiz-Barba, J.L., Maldonado, A., Jimenez-Diaz, R., 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Analytical Biochemistry* 347, 333-335.
- Singh, A.K., and Ramesh, A., 2009. Evaluation of a facile method of template DNA preparation for PCR-based detection and typing of lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 26, 504-13.
- Stephens, S., Floriano, B., Cathcart, D.P., Bayley, S.A., Witt, V.F., Jiménez-Díaz, R., Warner, P.J. and Ruiz-Barba, J.L. 1998. Molecular analysis of the locus responsible for production of plantaricin S, a two-peptide bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1871-1877.
- Tamang, J.P., Tamang, B., Schillingerb, U., Franz, C., Goresb, M. and Holzapfelb, W.H., 2005. Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology* 105, 347-356.
- Todorov, S.D. and Dicks, L.M.T., 2004. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST151BR, a strain isolated from beer produced by the fermentation of maize, barley and soy flour. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20, 643-650.
- Torriani, S., Felis, G.E., Dellaglio, F., 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and

L. paraplantarum by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3450-3454.

Zhang, J. Liu, G. Li, P. and Qu, Y., 2010 Pentocin 31-1, a novel meat-borne bacteriocin and its application as biopreservative in chill-stored tray-packaged pork meat. *Food Control* 21, 198-202.

Capítulo 5. Monitoring *Lactobacillus* *pentosus* B96 bacteriocin genes expression under saline stress by real-time PCR

Albert Hurtado, Cristina Reguant, Albert Bordons, Nicolas Rozès

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat
Rovira i Virgili, Campus Sescelades, c/ Marcel·lí Domingo s/n, Tarragona 43007, Spain

(Manuscrito en revisión)

Abstract

Bacteriocin activity of the table olives' isolated *Lactobacillus pentosus* B96 was studied. Strain was cultured in MRS under different NaCl conditions 0, 4, 6 and 8% (w/v). Real-time PCR was used to monitor genetic expression of its bacteriocin genes. In MRS, maximum genetic expression of plantaricin S is observed just 3 hours after inoculation in fresh media and the maximum bacteriocin activity is achieved 9 hours later, coinciding with the over-expression of *plnE* gene. A medium with 4 or 6% NaCl added increases the bioactivity of the strain. 4% NaCl supplementation increases significantly the maximum gene expression of *plsA* respect to control conditions. In this case, *plnE* is over-expressed during the exponential growth and *plnN* during the lag phase. These genes are over-expressed during the stationary and the lag phase when *L. pentosus* B96 is cultured in a 6% NaCl MRS. Both genes and *plsA* are over-expressed only in the stationary phase when 8% NaCl is used to culture the strain. This salinity level reduces total bioactivity of the strain. Relative expression level of *plsA* is 1000-fold higher than *plnE* and *plnN* genes and even *ldhD* constitutive gene. Under our conditions, expression of *plnA*, *plnB*, *plnC*, *plnJ* and *plnK* genes was not observed.

Keywords: RT-qPCR, *Lactobacillus pentosus*; *pln* locus, *pls* locus, salt stress, bacteriocin, table olives

1. Introduction

Several authors consider bacteriocin production as a relevant factor in strain establishment, contributing to increase the quality and the safety of fermented foods (Ruíz-Barba et al., 1994; Leroy and De Vuyst, 1999, Liu et al., 2007). As table olives are one of the most important fermented foods in world trades (Garrido Fernández et al., 1997), there is a great interest on their lactic acid bacteria (LAB) bacteriocin producers (Leal et al., 1998, Delgado et al. 2001).

Bacteriocin titres are influenced by environmental factors (Leal-Sánchez et al., 2002; Delgado et al., 2005). Conditions achieved during natural fermentations, as uncontrolled pH and suboptimal temperatures usually stimulates bacteriocin production (Moretro et al., 2000). Although NaCl and NaNO₃, present in many natural environments, are usually inhibitory for both, growth and bacteriocin production (Leroy and De Vuyst, 1999b; Moretro et al., 2000; Verluyten et al., 2004b), some osmotic stress seems to favour bacteriocin release (Uguen et al., 1999).

Lactobacillus pentosus B96 was isolated from fermenting green olives of Azeiteira cultivar, of Portuguese origin, and prepared according to the Spanish style. *L. pentosus* B96 bacteriocin production is stimulated at suboptimal temperature (22 °C) and by a moderate NaCl stress (0.65 mol l⁻¹) (Delgado et al. 2005). Although bacteriocin activity of *L. pentosus* B96 is presumably due to the action of plantaricin S, the strain possesses, not only plantaricin S operon genes, but the genes *plnA*, *plnB*, *plnC*, *plnE*, *plnJ*, *plnK* and *plnN* (Delgado et al., 2005; see chapter 4).

DNA microarrays technology has been used to study a LAB global transcriptional response of Lactobacilli under determined conditions (Hüfner et al., 2008) but real time qPCR is a suitable technique to study genetic expression levels of a limited number of genes. Real time qPCR has been used to monitor stress related genes in wine LAB species *Oenococcus oeni* (Beltramo et al., 2006 and Olguin et al., 2009). Bacteriocin genes had also been studied by real-time qPCR. Vaughan et al. (2004) studied the transcriptional response of different bacteriocin genes in a *Lactobacillus sakei* and Ramiah et al. (2007) studied the genetic expression of adhesion proteins and one bacteriocin of the probiotic *Lactobacillus plantarum* 423.

The aim of this work was to study the transcriptional response of the bacteriocin genes present in *Lactobacillus pentosus* B96 under the effect of different salt (NaCl) concentrations. The expression of these genes was quantified by means of reverse transcription real-time quantitative polymerase chain reaction (RT- Real-Time qPCR).

The total bacteriocin activity was also monitored to evaluate the correlation with the expression of their related genes.

2. Materials and methods

2.1. Growing conditions and sampling

L. pentosus B96 was propagated in MRS (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA). A control medium without added salt and 3 different NaCl concentrations; 4, 6 and 8% (w/v) were used. *L. pentosus* B96 growth in each medium was measured previously to establish equivalences between each condition growth phases (data not showed). In saline mediums 3 different samples were collected corresponding to lag, exponential and stationary phases.

Strain B96 was cultured overnight in MRS (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) to get an appropriated inoculum (1,9-2,0 absorbance). 1% inoculation was performed in 250ml bottles. An additional sample of each medium was collected 1 hour after inoculation to check loses on viability. The incubation was done at 28 °C under CO₂ atmosphere. All assays were performed in duplicate and the growth was monitored by measuring absorbance at 600 nm and counting plates in MRS medium.

2.2. Detection of antimicrobial activity

4 ml samples were centrifuged at 8500 r.p.m. during 10 minutes. Supernatant was filter-sterilized and conserved at 4 °C until assays were performed. A diffusion assay was used to detect bacteriocin activity. The plates were prepared by pouring 20 ± 1 ml of MRS agar. For the evaluation of inhibitory spectrum 5 µl of each filtered supernatant sample were laid in drops over MRS agar. After 30 minutes, plates were covered with a soft overlay agar (10 ± 0,5 ml) seeded with 100 µl of an overnight culture of the sensitive indicator bacterium. After a suitable incubation (overnight 28 °C, 10% CO₂ pressure), diameter of each inhibition zone was measured twice in perpendicular directions by the use of a calliper of 0.1 mm precision with the plate resting on a colony counter with amplification and illumination. Each assay was performed in duplicate.

2.3. RNA extraction

L. pentosus B96 cells were harvested by centrifugation, frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until RNA extraction. Total RNA extractions were performed using Roche RNeasy kit according to the manufacturer's instruction (Roche, Mannheim, Germany). Purified RNAs were suspended in 50 µl of 0.1% DPC (dimethylpyrocarbonate)-treated water. RNA concentrations were calculated by measuring absorbance at 260 nm using Thermo Spectronic Genesys 10 UV Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Maryland, USA).

2.4. RT-qPCR primer design

From the National Center for Biotechnology Information (NCBI) were obtained nucleotide sequences of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (NC_004567) bacteriocin genes previously detected in *L. pentosus* B96 (see chapter 4). Bacteriocin S (Stephens et al., 1998) *plsA* gene sequence was obtained from *Lactobacillus plantarum* accession number Y15127.1. Primers were designed to be about 18–22 bases long, to contain over 50% G/C and to have a melting temperature (T_m) above 60 °C (see table 1). The length of the PCR products ranged from 92 to 107 bp. Primer3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) was used to select primer sequences. Secondary structures and dimer formation was analyzed with Oligo Analyzer software (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) from Laboratorios Conda (Madrid, Spain). Previously designed *plnC* PCR primers (Diep et al., 1996) were directly used for this gene. *Lactobacillus plantarum* *ldhD* gene, coding for lactate dehydrogenase, was used as internal control, using the primers described by Fiocco et al. (2009).

2.5. Reverse transcription and real-time qPCR

cDNA was synthesized using TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Foster City, USA) as recommended. Absence of chromosomal DNA contamination was confirmed by real-time PCR. Real-time PCR was performed in 25 µl final volume containing 5 µl of cDNA dilution, 1 µl of each primer at appropriate concentration (see Table 2), 5.5 µl of RNase free-water and 12.5 µl of SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA). Amplifications were carried out

using an ABI Prism 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA) with an initial step at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min and 72 °C for 30 s. An additional step starting between 90 and 60 °C was performed to establish a melting curve, and was used to verify the specificity of the real-time PCR reaction for each primer pair. The efficiencies of amplifications were calculated using the formula $E=[10(1/s)-1] \times 100$, where “s” is the slope of standard curve with several dilutions of cDNA (Beltramo et al., 2006). In present study, the threshold value was automatically determined by the instrument. Results were analyzed using the comparative critical threshold ($\Delta\Delta CT$) method in which the amount of target RNA was adjusted to a reference (internal target RNA) as previously described (Livak and Schmittgen, 2001). Measures were taken for each condition from cDNA that had been synthesized from RNA extracted from two independent cultures. They were taken in triplicate for each gene.

Experiments described in this work were performed in a research lab that meets the 9001 ISO regulation.

3. Results

3.1. Selection of *Lactobacillus pentosus* B96

50 *L. pentosus* strains whose bacteriocin gene profile was previously studied (see chapter 4) were confronted to each other (data not showed) using the colony-overlay method (Schillinger and Lücke, 1989). In the best of the cases no more than a 15% of *L. pentosus* strains were inhibited by some strains that showed activity excepting for *L. pentosus* B96 that showed activity against the 90% of the other *L. pentosus* strains. The activity was also detected in culture supernatants of *L. pentosus* B96 while it was not possible to detect any activity in culture supernatants of the other strains in diffusion assays. Therefore, *L. pentosus* B96 was chosen to continue with the study in order to correlate gene expression with direct bacteriocin bioactivity.

3.2 Bacteriocin activity

High NaCl concentration in table olives' brine slows LAB growing although they can reach similar counts (Hurtado et al., 2009). Anyway, saline shock after inoculation in table olive's brine usually represents loss of viability for the inoculums (de Castro et al., 2002; Panagou et al., 2003). Table 1 presents total population and optical density of different samples. It was not observed viability losses after the inoculation. However, the maximum population decreased one-log unit in the presence of NaCl, whatever the concentration. When LAB species are cultured in saline media their optical density and their viability are not directly correlated between growth curves in different salt concentrations (Rao et al. 2004). It explains the lower DO values as salt concentration increases in comparison to total population achieved. Sampling time where selected in order to represent *L. pentosus* B96 growing phases (lag, exponential and stationary) in each medium: 3, 12 and 36 hours for the control (without added NaCl), 3, 24 and 60 hours for 4% NaCl medium, 9, 30 and 72 hours for 6% NaCl medium and 24, 26 and 78 hours for 8% NaCl medium.

As mentioned, most of Lactobacilli strains previously selected as sensitive against *L. pentosus* B96 in a colony overlay test did not show inhibition to filter-sterilized supernatant samples (data not shown). Figure 1 presents the inhibition diameter of *L. pentosus* B96 filtered culture supernatants on most sensitive Lactobacilli checked; the indicator bacteria *Weissella paramesenteroides* DSM20288T and two *Lactobacillus pentosus* 5E5A7 and 7L3. Both *Lactobacillus* strains were isolated from fermenting table olives. Higher bioactivity is observed in samples of 9 and, mainly, 12 hours, corresponding to exponential phase of growth, independently of the indicator strain used (see fig. 1 and table 2). Inhibition, although lower than at 12 hours, is observed in previous and after samples using the strains *Weissella paramesenteroides* DSM20288T and *Lactobacillus pentosus* 7L3 while *Lactobacillus pentosus* 5E5A7 was only inhibited at 9 and 12 hours respectively.

The test was repeated with supernatants of *L. pentosus* B96 cultured in different saline mediums (non saline control, 4, 6 and 8% NaCl MRS) using the most sensitive strain, *L. pentosus* 7L3, as indicator (fig. 2). To discard NaCl influence to bioactivity of supernatants from saline mediums, a 10 µl drop of non inoculated saline medium were laid as control in each assay. *L. pentosus* 7L3 was not inhibited by the saline medium drop.

Table 1. Optical density and total population of *Lactobacillus pentosus* B96 cultured on MRS supplemented with different NaCl (w/v) concentrations. Values corresponding to time 0 were estimated from values of the inoculum, an overnight MRS culture of *L. pentosus* B96 just before the inoculation. Data shown are mean values (n=2).

Time (hours)	Optical density (600 nm)				Total population (log (ufc/ml))			
	MRS	4% NaCl MRS	6% NaCl MRS	8% NaCl MRS	MRS	4% NaCl MRS	6% NaCl MRS	8% NaCl MRS
0	0.020	0.020	0.020	0.020	5.28	5.28	5.28	5.28
1	0.037	0.025	0.033	0.050	5.18	5.13	5.20	5.22
3	0.082	0.013			5.22	5.18		
6	0.359				5.31			
9	1.045		0.102		5.36		5.91	
12	1.547				6.67			
24	2.123	1.768		0.593	8.98	6.06		5.06
30			1.127				8.32	
36	2.109			0.641	9.12			7.91
48	2.158				9.07			
60		2.046				8.16		
72			1.679				8.81	
78				1.280				8.28

4 and 6 % NaCl cultures supernatants showed higher basal inhibition than the non saline culture although. the upper inhibition threshold detected for control samples (non saline culture) of different growing phases was higher than any value reached by different NaCl medium samples. Bioactivity of 8% NaCl MRS supernatants was in all growing phases under the values of the control and the less saline mediums. Comparing stationary and late stationary samples, bioactivity of *L. pentosus* B96 supernatants from non saline control, 4 and 6% NaCl MRS was similar while in the case of 8% NaCl supernatant, bioactivity was increased exceeding the bioactivity of the control (fig. 2).

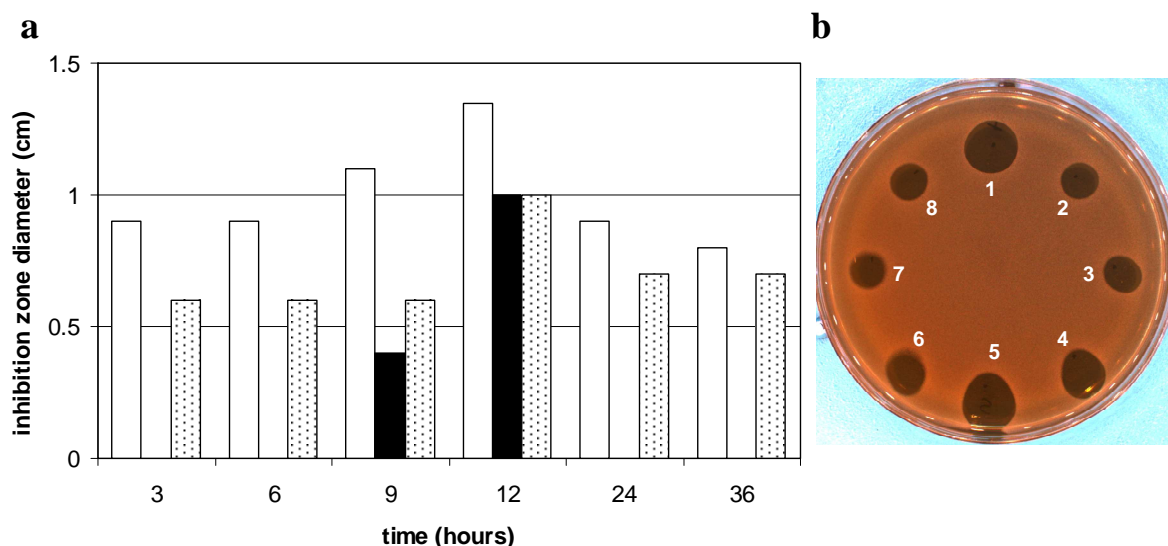


Figure 1. a) Bacteriocin bioactivity in the culture supernatant of *L. pentosus* B96, presented as diameter of the inhibition zone of different sensitive strains: □) *L. pentosus* 7L3, ■) *L. pentosus* 5E3A7 and ▨) *W. paramesenteroides* DSM20288T. b) Image of inhibitory zones observed on MRS agar plates from filter-sterilized culture supernatants of *L. pentosus* B96 cultured in MRS using *L. pentosus* 7L3 as indicator microorganism. Numbers represent supernatant samples collected at different times. 1) the inoculum, an overnight MRS culture of *L. pentosus* B96, just before the inoculation, 2) 3h, 3) 6, 4) 9h, 5) 12h, 6) 24h, 7) 36h and 8) 48h.

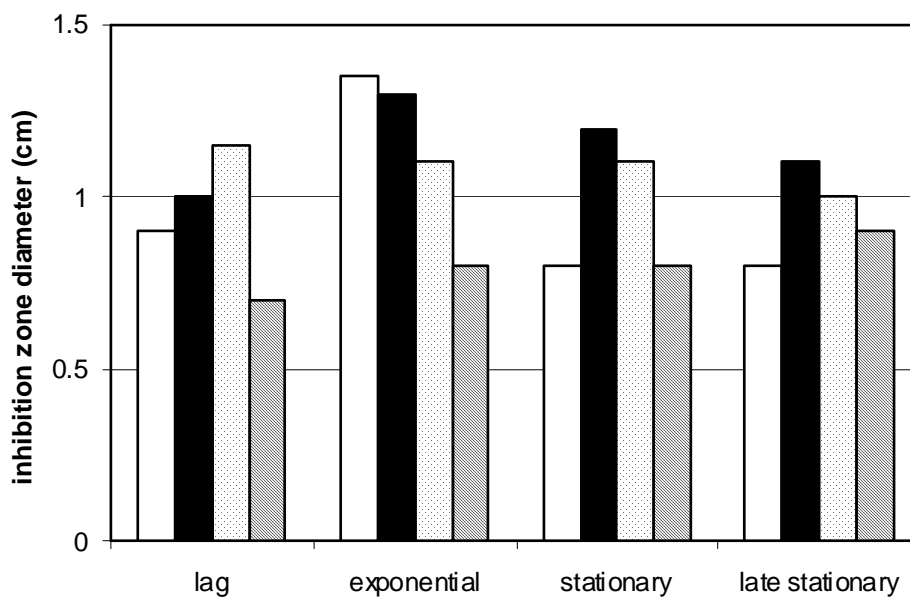


Figure 2. Bacteriocin bioactivity in the culture supernatant of *L. pentosus* B96, presented as diameter of the inhibition zone of *L. pentosus* 7L3. Samples represent different growth phases on MRS supplemented with different NaCl (w/v) concentrations: □) non-saline control, ■) 4%, ▨) 6% and ▩) 8%. A final sample of every medium was taken 12 hours later than the stationary phase sample, named as late stationary.

3.2 Changes in expression of bacteriocin genes

Primers to quantify the expression of different bacteriocin genes were designed in this work (Table 2). Efficiencies for all the primer pairs were close to 100%, making them appropriate for the analysis by the comparative critical threshold method DDCT (Livak and Schmittgen, 2001). As previously determined by Desroche et al. (2005), a gene is over expressed when its RE level is higher than two. For mRNAs that were less abundant than 1, the negative inverse ratio is presented (e.g., a relative abundance of 0.5 is represented as -2). This representation of down-regulated values was proposed by Fernandez et al., (2009).

Table 2. RT-qPCR primer sequences used to determine bacteriocin gene expression.

Target gene	Codified bacteriocin	Primers 5'→3'	Amplicon size (bp)	Concentration used on RT-qPCR (μM)	Reference
ldhD	-	F: ACG CCC AAG CTG ATG TTA TAT C R: AGT GTC CCA CGA GCA AAG TT	107	0,5	Fioco et al., (2009)
<i>plnA</i>	plantaricin A	F: AAA ATT CAA ATT AAA GGT ATG AAG CAA R: CCC CAT CTG CAA AGA ATA CG	108	0,5	This study
<i>plnB</i>	plantaricin B	F: CCA GAG CGG AGA ATT CAG AG R: GTA CAA CTA ACC CGC GCA AT	92	0,3	This study
<i>plnC</i>	plantaricin C	F: AGCAGATGAAATTCGGCAG R: ATAATCCAACGGTGCAATCC	108	0,3	Diep et al. (1996)
<i>plnE</i>	plantaricin E/F (peptide E)	F: GTTTAATCGGGGCGTTAT R: ATACCACGAATGCCTGCAAC	85	0,3	This study
<i>plnJ</i>	plantaricin J/K (peptide E)	F: TAA GTT GAA CGG GGT TGT TG R: TAA CGA CGG ATT GCT CTG C	102	0,3	This study
<i>plnK</i>	plantaricin J/K (peptide E)	F: TTC TGG TAA CCG TCG GAG TC R: ATC CCT TGA ACC ACC AAG C	97	0,3	This study
<i>plnN</i>	peptide <i>plnN</i>	F: GCC GGG TTA GGT ATC GAA AT R: TCC CAG CAA TGT AAG GCT CT	102	0,3	This study
<i>plsA</i>	plantaricin S (peptide A)	F: TCA GCA CCT TAT CGG ACT CTG R: ATG GTT GCC TTA CCA GCG TA	94	0,3	This study

L. pentosus B96 studied genes were *plsA* (part of plantaricin S operon), *plnA*, *plnB*, *plnC*, *plnE*, *plnJ*, *plnK* and *plnN*. The relative expression (RE) level of each gene was calculated for each growing condition (lag, exponential, stationary) in each medium (non saline control, 4, 6 and 8% NaCl MRS) in order to determine the genes responsible of bioactivity. The inoculum, an overnight MRS culture of *L. pentosus* B96 (mean value of $1,9 \cdot 10^7$ ufc/ml) was defined as the calibration condition.

PlsA was the main gene expressed in all saline conditions; 1000 fold higher than

plnE, *plnN* genes or the constitutive *ldhD* gene (data not showed). *PlnA*, *plnB*, *plnC*, *plnJ* and *plnK* gene transcripts were not detected.

Figure 3 presents the expression of *plsA* gene during the growing of *Lactobacillus pentosus* B96 in MRS. *PlsA* gene is over expressed during the first 6 hours of growing while its expression is sustained and lower during the rest of the growing. In presence of salt, *plsA* gene was overexpressed on stationary phase while it was repressed during lag phase (Figure 4). Saline inhibition of *plsA* expression during the lag phase was not observed for 8% NaCl sample probably because the sample could correspond to an early exponential stage, confirmed by the higher viability observed for the sample (see table 2). The maximum threshold change of plantaricin S gene expression detected is 5-fold for 4% NaCl while is between 2 and 3-fold for the control and the other salt conditions.

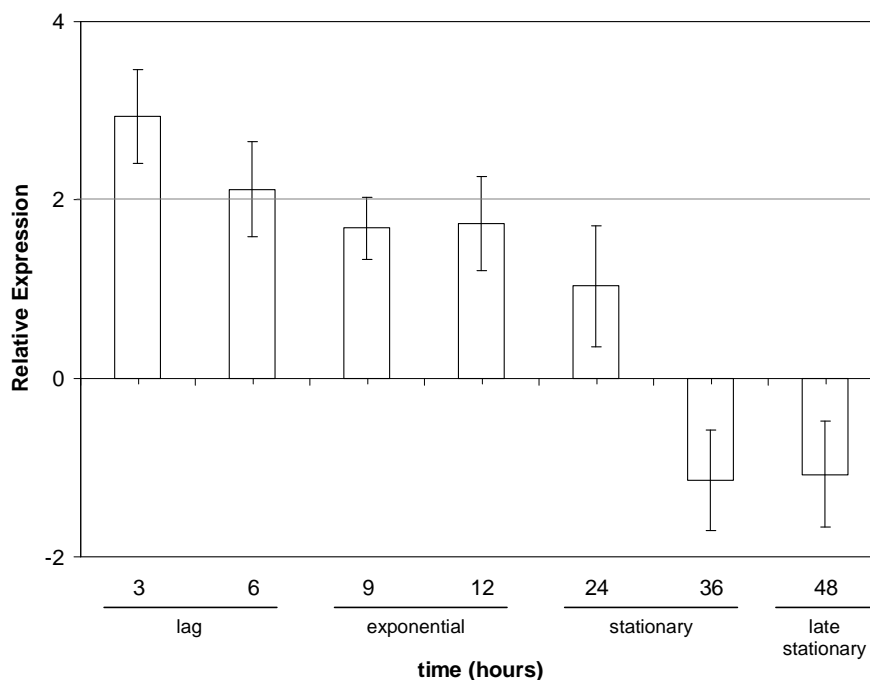


Figure 3. Relative expression (RE) levels of *plsA* gene of *L. pentosus* B96 cultured on MRS along time. The calibrator condition used was the inoculum, an overnight MRS culture of *L. pentosus* B96, just before the inoculation. Data shown are mean values with standard deviations (n=2).

Comparison of the expression of detected bacteriocin genes in different salt conditions are showed in figure 4. *PlsA* gene is over expressed in lag phase in the control non saline medium while it is expressed during the stationary phase when *L. pentosus* B96 grows in saline mediums (fig. 3a). *PlnE* is repressed of the non saline control while it not occurs in salines mediums (fig. 3b). *PlnN* gene showed a different

pattern for each salt condition (fig. 3c). 4% NaCl stimulated gene expression in lag and exponential phases. *PlnN* gene was over expressed on lag phase for 6% NaCl and on exponential phase for 8% NaCl. As occurs with *plsA* gene, *plnE* and *plnN* genes are over-expressed during the stationary phase when *L. pentosus* B96 grows in 8% NaCl MRS (fig 3a and b).

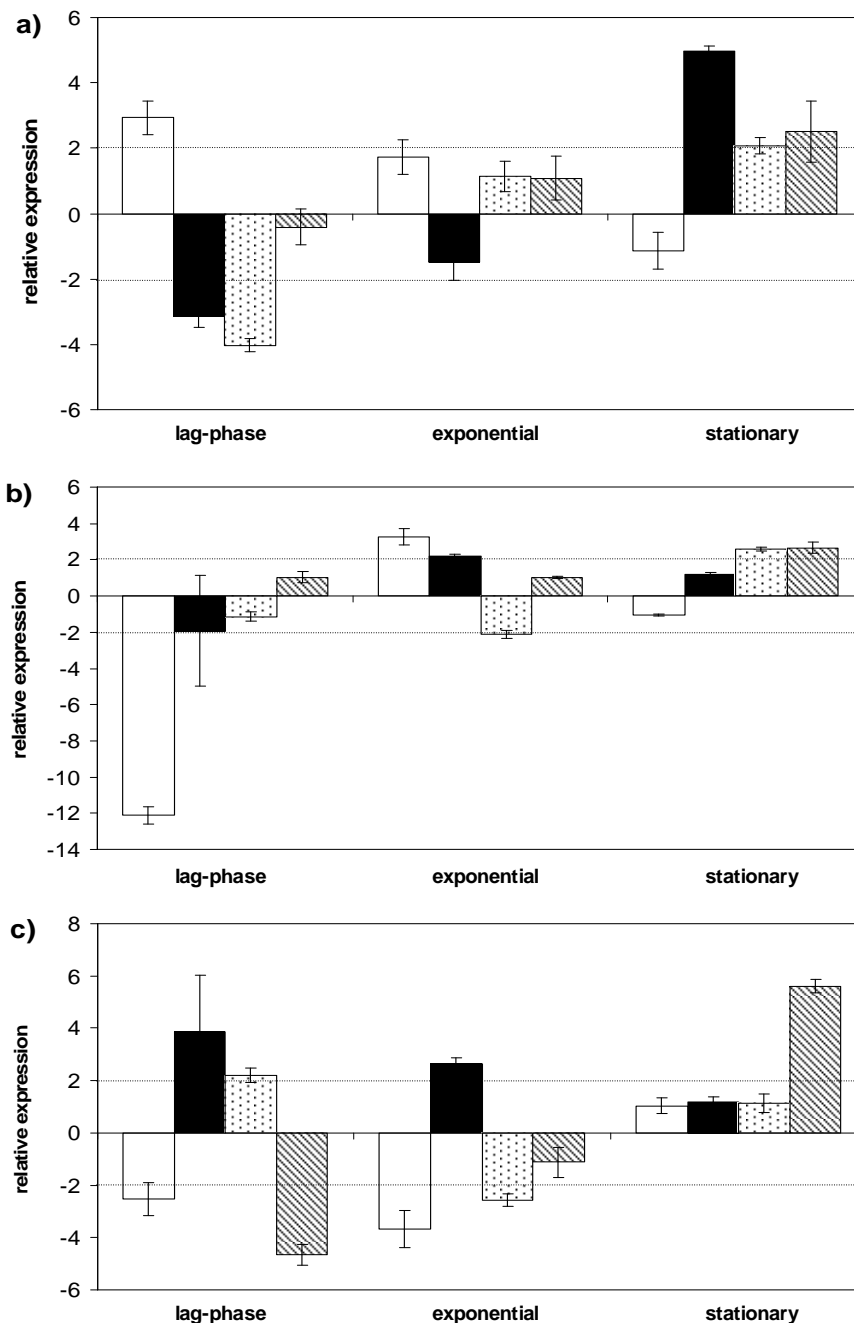


Figure 4. Relative expression (RE) levels of *plsA* (a), *plnE* (b) and *plnN* (c) gene of B96 on different metabolic phases on MRS supplemented with different NaCl (w/v) concentrations: □) non-saline control, ■) 4%, ▨) 6% and ▩) 8%. The calibrator condition used was the inoculum, an overnight MRS culture of *L. pentosus* B96, just before the inoculation. Data shown are mean values with standard deviations (n=2).

4. Discussion

Bacteriocin production starters are of great interest for table olives production (Ruiz-Barba et al., 1994, Leal Sánchez et al., 2002; Delgado et al., 2001). NaCl concentration in brine is one of the main stresses a starter for table olives has to overcome, causing viability losses after inoculation (de Castro et al., 2002; Panagou et al., 2003). Present study monitors different metabolic phases of *L. pentosus* B96 growth in order to better understand how saline stress affects bacteriocin production and bioactivity of the cell. According our results, *L. pentosus* B96 presents bioactivity since it is inoculated on MRS, independently of salt concentration on medium.

During the exponential growth phase *L. pentosus* B96 showed maximum bioactivity as previously reported (Delgado et al., 2005). Although each indicator strain used showed different sensitivity against *L. pentosus* B96 supernatants, the inhibition pattern observed was the same, showing the maximum inhibition during the exponential phase. *L. pentosus* 7L3 was the most sensitive strain, followed by *W. paramesenteroides* DSM20288T and being *L. pentosus* 5E3A7 the most resistant. Sensitivity to bacteriocins is strain dependant factor (Leal-Sanchez et al., 2002) thus the importance of select an appropriate indicator strain. In our case, the minimum inhibitory bacteriocin concentration is present during all the process in the medium for determined strains while others are only affected when the maximum activity is reached (fig. 1). *L. pentosus* 7L3 could be a useful strain in the search of bacteriocin producer strains isolated from different sources.

L. pentosus B96 MRS supernatants bioactivity in front of *L. pentosus* 7L3 was improved with certain osmotic pressure, as predicted before (Delgado et al., 2005). When *L. pentosus* B96 is cultured under a 4% NaCl kinetics of the bioactivity don't changes and its bioactivity is higher than the control, specially during the stationary phase and with the exception of the exponential measure, that is a little bit lower. The same occurs with the bioactivity when a 6% of NaCl is used, despite of the kinetics. In a 6% NaCl medium the bioactivity is higher in the lag phase and decreases slowly during the rest of the growth phases. To culture the strain in a 8% NaCl MRS is the worst condition for the bioactivity. Bioactivity is very low respect the control during the lag and the exponential phase, tepidly grows to equal control values registered during the stationary stage and only is able to overtake the control in a late stationary phase.

Cultured in MRS, *L. pentosus* B96 over-expressed *plsA* during the lag phase while *plnE* and *plnN* are repressed but *plnE* is over-expressed in the exponential growth phase. *PlnE* expression could explain the maximum bacteriocin bioactivity reached in

this phase even upper the saline improved bioactivity for in the case of 4 and 6% mediums. The over-expression of *plnN* during the lag phase for 4 and 6% NaCl supernatants, especially for 4% NaCl, could explain higher bioactivity values of this growth phase. *plnN* is maintained over-expressed for 4% NaCl in the exponential growth phase while is repressed for 6% NaCl, and *plnE* is over-expressed for both saline conditions. It corresponds with the increased bioactivity in the 4% NaCl medium and with the lower bioactivity of 6% NaCl medium obtained for the exponential growth in comparison with the lag phase. For the 8% NaCl cultures, the minimum bioactivity is obtained in the lag phase, where *plnN* gene is repressed and the maximum bioactivity arrives with the stationary growing where all the genes detected are over-expressed, *plsA*, *plnE* and *plnN*.

As expected, it is not possible to establish a proportional relation between genic expression and bioactivity because there are many factors playing a role in the final bioactivity. To be able to correlate bioactivity and genic expression it must know the transcription process of the producer cell for each bacteriocin gene that can include post-transcriptional and/or post-translational modifications (Garneau et al., 2004) and physic and chemical conditionings affecting the inhibition experimented by the indicator strain, even standardising the methodology to measure the bioactivity. But real time qPCR gives us new information about bacteriocin activity and the conditions to favour it as well as allows evaluating the relative importance of each bacteriocin, at least at a transcriptional level. PlnE peptide codified by the gene *plnE* together with *plnF* peptide forms the bacteriocin E/F (Fimland et al., 2008). *L. pentosus* B96 possess and express *plnE* gene without possessing *plnF*, confirming the intra-species diversity of the *pln* locus detected in *L. plantarum* (Rojo-Bezarez et al., 2008). Differences observed in gene expression patterns could imply different bacteriocin activities that are happening at different times in function of environment conditions.

plnA, *plnB*, *plnC*, *plnG*, *plnJ* and *plnK* genes are present in the strain genome but there were not detected by real time qPCR. Probably this group of genes do not contribute to the bioactivity of the strain. According to previous data of *plnE* and *plnN* genes of *L. plantarum*, *plnE* peptide is 10^3 less efficient alone than in combination with *plnF* and *plnN* peptide has not shown bacteriocin activity (Anderssen et al., 1998). These factors, together with the little expression the genes showed in comparison to the expression of *plsA* gene and the absence of expression of other bacteriocin genes, suggest most bioactivity of *L. pentosus* B96 must be caused by plantaricin S. However, all bacteriocin expressed genes, even if at lower levels, such as *plnE* and *plnN*, should be taken into account. Cho et al. (2010) compared two similar *L. plantarum* strains observing much more bioactivity in a strain *plnE/F*, *plnN* and *plnK* positive than in a

only *plnE/F* positive strain. Cho et al. (2010) considered a mutant form of *plnE/F* the reason of bacteriocin bioactivity. May be studying the expression of all the genes, as our results also suggests, less important or less expressed genes can contribute determinately to the total bioactivity explaining the optimization of the bioactivity achieved with different culture conditions.

The expression of plantaricin S on MRS responds to a primary metabolism pattern as many other bacteriocins do (De Vuyst et al., 1998; Sarantinopoulos et al., 2002). Real time qPCR results together with measured bacteriocin bioactivity reveals plantaricin S genes are expressing constitutively. *L. pentosus* B96 showed more bioactivity cultured in 4 and 6% NaCl MRS while 8% NaCl reduces it. In consistency with previous data, certain osmotic stress improves bioactivity of the strain (Leal-Sanchez et al., 2002; Delgado et al., 2005). Minimum bioactivity *L. pentosus* B96 bacteriocins is not overly affected by osmotic stress, but its gene expression patter under saline cultures leaves to correspond to a primary metabolism pattern. Under saline stress cell energy is required to adapt to the new environment (Sleator and Hill, 2002) leaving bacteriocin production in secondary term, at least for plantaricin S, quantitatively the most important gene expressed. Other factors beyond gene expression or growing has to play a role in total bioactivity. Probably it was necessary to do an extensive sampling of saline cultures to get an exact bacteriocin kinetic pattern of both gene expression and bioactivity, out of the objectives of the present work.

The results obtained provide information on the temporal expression of *L. pentosus* B96 bacteriocin genes during growth and under saline stress. This molecular approach enables a better understanding of the overall response of *L. pentosus* B96 to different stresses present in table olives, as low nutrient availability or ecological pressure made by other LAB, yeast and enterobacteriaceae concurring in the same niche. It would be of great interest to continue experiments on gene expression under nutrient restrictions, in co-culture broths and with other bacteriocin producer strains of different cultivars.

Acknowledgements

Albert Hurtado is grateful to Universitat Rovira i Virgili for its doctoral fellowship 2005BRDI/12/13. The authors are grateful to Cidalia Peres for providing *Lactobacillus pentosus* B96 strain.

Bibliografía

- Anderssen, E.L., Diep, D.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G.H. and Nissen-Meyer, J. 2002. Antagonistic Activity of *Lactobacillus plantarum* C11: Two New Two-Peptide Bacteriocins, Plantaricins EF and JK, and the Induction Factor Plantaricin A. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2269-2272.
- Beltramo, C., Desroche, N., Tourdot-Maréchal, R., Grandvalet, C. and Guzzo, J. 2006. Real-time PCR for characterizing the stress response of *Oenococcus oeni* in a wine-like medium *Research in Microbiology* 157, 267-274.
- Cho, G.S., Huch, M., Hanak, A., Holzapfel, W.H. and Franz M.A.P., C., 2010. Genetic analysis of the plantaricin EFI locus of *Lactobacillus plantarum* PCS20 reveals an unusual plantaricin E gene sequence as a result of mutation. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 117-124.
- de Castro, A., Montaña, A., Casado, F.-J., Sánchez, H. and Rejano, L. 2002. Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiology*, 19, 637-644.
- Delgado A., Brito D., Fevereiro, P., Peres C., and Figueiredo Marques, J. 2001. Antimicrobial activity of *L. plantarum*, isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives. *Lait* 81, 203-215.
- Delgado A., Brito D., Peres C., Noé-Arroyo F. and Garrido-Fernández A., 2005. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiology* 22, 521-528.
- Delgado A., Noé-Arroyo F., Brito D., Peres C., Fevereiro, P. and Garrido-Fernández A., 2007. Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. *Journal of Biotechnology* 130,193-201
- Desroche, N., Beltramo, C., Guzzo, J., 2005. Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Journal of Microbiology Methods* 60, 325-333.
- Diep, D.B., Havarstein, L.S. and Nes, I.F., 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *Journal of Bacteriology* 178, 4472-4483.
- Fernandez, A., Ogawa, J. Penaud, S., Boudebouze, S., Ehrlich, D., van de Guchte, M. and Maguin, E., 2009. Rerouting of pyruvate metabolism during acid adaptation in *Lactobacillus bulgaricus*. *Proteomics* 8, 3154-3163.
- Fimland, N., Rogne, P., Fimland, G., Nissen-Meyera, J. and Kristiansen, P.E., 2008. Three-dimensional structure of the two peptides that constitute the two-peptide bacteriocin plantaricin EF. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1784, 1711-1719.
- Fiocco, D., Collins, M., Muscariello, L., Hols, P., Kleerebezem, M., Msadek, T., and Spano, J. 2009. The *Lactobacillus plantarum* *ftsH* Gene is a Novel Member of the *ctsR* stress response regulon. *Journal of Bacteriology* 191, 1688-1694.
- Garneau, S., Martin, N.I. and Vederas, J.C., 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 84, 577-592.
- Garrido-Fernández, A., Fernández Díez, M.J., & Adams, MR., 1997. Table olives, production and processing. Chapman and Hall, London.
- Hüfner, E., Britton, R.A., Roos, S., Jonsson, H. and Hertel, C. 2008. Global transcriptional response of *Lactobacillus reuteri* to the sourdough environment. *Systematic and Applied Microbiology* 31, 323-338.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A. and Rozès, N., 2009. Influence of fruit ripeness and salt concentration on the microbial processing of Arbequina table olives. *Food Microbiology*, 26, 827-833.

- Leal-Sánchez, Jiménez-Díaz, R., Maldonado Barragán, A., Garrido Fernández, A., M.V., Ruiz-Barba, J.L. 2002. Optimization of Bacteriocin Production by Batch Fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4465-4471
- Leroy, F., De Vuyst, L., 1999. Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of antilisterial bacteriocin Sakacin K. *Applied and environmental Microbiology* 65, 974-981.
- Leroy, F., and L. De Vuyst. 1999. The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a potential starter culture for sausage fermentation. *Applied and environmental Microbiology* 65, 5350-5356.
- Liu, G.R., Lv, Y.N., Li, P.L., Zhou, K. and Zhang, J.L. 2008. Pentocin 31-1, an anti-Listeria bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1 isolated from Xuan-Wei Ham, a traditional China fermented meat product. *Food Control* 19, 353-359.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402-408.
- Moretro, T., Aassen, I.M., Storro, I., and Axelsson, L. 2000. Production of sakacin P by *Lactobacillus sakei* in a completely defined medium. *Journal of Applied Microbiology* 88, 536-545.
- Olguin, N., Bordons, A. and Reguant, C. 2009. Influence of ethanol and pH on the gene expression of the citrate pathway in *Oenococcus oeni*. *Food Microbiology* 26, 197-203.
- Panagou, E.Z., Tassou, C.C. and Katsaboukakis, C.Z., 2003. Induced lactic acid fermentation of untreated green olives of the *Conservolea* cultivar by *Lactobacillus pentosus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 667-674.
- Ramiah, K., van Reenen, C.A. and Dicks, L.M.T. 2007. Expression of the mucus adhesion genes Mub and MapA, adhesion-like factor EF-Tu and bacteriocin gene *plaA* of *Lactobacillus plantarum* 423, monitored with real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology* 116, 405-409.
- Rao, M.S., Pintado, J., Stevens, W.F. and Guyot, J.P., 2004. Kinetic growth parameters of different amyolytic and non-amyolytic *Lactobacillus* strains under various salt and pH conditions. *Bioresource Technology* 94, 331-337.
- Rojo-Bezarez, B., Sáenz, Y., Navarro, L., Jiménez-Díaz, R., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., and Torres, C., 2008. Characterization of a new organization of the plantaricin locus in the inducible bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* J23 of grape must origin. *Archives of Microbiology*, 189, 491-499.
- Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Warner, P.J., Jiménez-Díaz, R., 1994. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentations. *Applied and environmental Microbiology* 60, 2059-2064.
- Sarantinopoulos, P., Leroy, F., Leontopoulou, E., Georgalaki, M.D., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., and De Vuyst, L. 2002. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. *International Journal of Food Microbiology* 72, 125-136.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* from meat. *Applied and environmental Microbiology* 55, 1901-1906.
- Sleator, R.D. and Hill, C., 2002. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 49-71.
- Stephens, S., Floriano, B., Cathcart, D.P., Bayley, S.A., Witt, V.F., Jiménez-Díaz, R., Warner, P.J. and Ruiz-Barba, J.L. 1998. Molecular analysis of the locus responsible for production of plantaricin S, a two-peptide bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1871-1877.
- Uguen, P., Hamelin, J., Le Pennec, J.P., and Blanco, C. 1999. Influence of osmolarity and the presence of

an osmoprotectant on *Lactococcus lactis* growth and production of bacteriocin activity. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 291-293.

Vaughan, A., O' Mahony, J., Eijsink, V.G.H., O' Connell-Motherway, M., and van Sinderen, D. 2004. Transcriptional analysis of bacteriocin production by malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. *FEMS Microbiology Letters* 235, 377-384.

Verluyten, J., Messens, W., and De Vuyst, L., 2004. Sodium chloride reduces production of curvacin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* strain LTH1174. *Applied and environmental Microbiology* 70, 2271-2278.

de Vuyst, L., Callewaert, R., and Crabbe, K. 1998. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for situation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology* 142, 817-827.

Discusión general

1. El proceso de fermentación de las aceitunas de mesa arbequinas

Aún hoy la mayoría de variedades de aceitunas de mesa continúan sin haber sido estudiadas y se preparan de forma artesanal siguiendo antiguas recetas. Cualquiera de los procesos puede ser circunscrito a uno de los métodos básicos de elaboración descritos en la norma del COI (Norma COI, 2004). Pero esta gran diversidad de variantes locales de preparación de las aceitunas implica que dos procesos de fermentación idénticos aplicados a dos variedades recolectadas presentando el mismo grado de madurez pueden presentar desarrollos diversos en cualquiera de sus aspectos (microbiológico, temporal, en valores sensoriales, etc...).

La aceituna arbequina de mesa es una de estas variedades elaboradas con arreglo a prácticas locales de tipo tradicional que se encurten en gran parte de Cataluña. Las aceitunas de mesa arbequina son, técnicamente, aceitunas -verdes- al natural (Norma COI, 2004). Después de la recolección, y previo lavado, las aceitunas se introducen directamente en salmuera donde se desarrolla espontáneamente un ecosistema dominado por bacterias lácticas y levaduras. Existe un breve periodo inicial, clave para el establecimiento de las poblaciones microbianas finales, donde tienen una presencia destacable las enterobacterias. Aunque de la Torre et al. (1993) habían seguido a nivel poblacional una inoculación de aceitunas arbequinas, este trabajo presenta por primera vez una dinámica de poblaciones durante el procesado industrial de aceitunas arbequinas.

La evolución microbiana observada en las salmueras de las arbequinas procesadas a escala industrial se corresponde con lo observado en otras variedades de aceitunas al natural (Nychas et al., 2002; Oliveira et al., 2004). Aunque a las arbequinas no se les aplica un tratamiento alcalino previo que además de eliminar el amargor de la aceituna permeabiliza sus paredes y facilita la liberación de nutrientes, de forma espontánea fermentan y, a medida que se reduce el pH del medio, las altas poblaciones de enterobacterias presentes inicialmente en la salmuera -contaminantes normales en la mayoría de frutas y vegetales- desaparecen (Holzapfel et al., 2001; Nychas et al., 2002). Aún así, los riesgos inherentes a un proceso de fermentación espontáneo siguen estando presentes. El tipo de fermentadores empleados así como su instalación (soterrados, aéreos cubiertos o descubiertos, ...) influirán determinadamente en que con la llegada de la primavera y de temperaturas diurnas más elevadas se vea favorecida de nuevo la aparición de enterobacterias y haya un repunte en las poblaciones de levaduras con el desarrollo de nuevas especies distintas a las aparecidas durante la fermentación. Estos grupos microbianos podrán aprovechar el oxígeno disponible en la salmuera filtrado desde las bocas de los fermentadores si están en contacto con el aire y no han sido

provistos de cierres herméticos. Existen prácticas industriales para minimizar riesgos como son la recirculación de la salmuera, el control de la salinidad o la limpieza del agua de la parte superior de los depósitos de fermentación (Garrido Fernández et al., 1997). Con mayor o menor fortuna también se aplican en las distintas entamadoras de Cataluña que procesan aceitunas arbequinas en un intento de evitar en lo posible el riesgo de propagación de las enterobacterias. La falta de estándares y la diversidad de fermentadores y prácticas empleadas hacen fundamental el conocimiento y control de las condiciones de fermentación y las prácticas asociadas encaminadas a garantizar la calidad del producto final. Aunque probablemente haya más diversidad de enterobacterias alterantes, en el presente trabajo únicamente se han podido identificar las especies *Proteus vulgaris* y *Providencia rettgeri*. Son especies asociadas a contaminación en los alimentos pero es la primera vez que se detectan en aceitunas (Kuzina et al., 2001; Paarup et al., 1999). Sin un estudio más profundo de la acción metabólica de levaduras como *Pichia membranaefaciens*, una de las responsables del repunte en las poblaciones de este grupo hacia el final del período observado, no es posible determinar si es signo de deterioro de la aceituna o podría, incluso, ser beneficioso.

En base a los datos obtenidos en los estudios realizados fermentación de las aceitunas arbequinas se puede dividir en dos fases. La primera se prolongaría hasta el establecimiento del pH óptimo de fermentación, alrededor de 4, y la segunda comenzaría cuando los recuentos de bacterias lácticas y levaduras se estabilizan. Una vez las bacterias lácticas han alcanzado poblaciones elevadas -cerca o superiores a 10^8 ufc/ml- se pueden envasar las aceitunas. En la planta estudiada sólo se envasan si hay demanda, permaneciendo en caso contrario en la misma salmuera de fermentación mientras no lleguen órdenes de compra. Una vez listas, las aceitunas deben ser firmes y crujientes además de conservar bastante amargor residual y el momento exacto de envasado lo decide un operario de la industria en base a criterios sensoriales particulares. Si las aceitunas no son envasadas, mientras permanezcan en la salmuera inicial estarán protegidas frente al deterioro microbiano gracias al pH, la sal y a la alta población de bacterias lácticas presentes aunque su metabolismo, junto al de las levaduras, continuarán cambiando las características organolépticas de fruto. Se ha descrito esta fase de permanencia en salmuera más allá del punto mínimo en el cual las aceitunas pueden ser consumidas como fase de maduración. Probablemente las aceitunas avancen durante esta fase hasta un umbral máximo de calidad y, tras un periodo, más o menos prolongado, en que gozarían de un estado para el consumo óptimo (debieran entonces ser envasadas), la calidad caiga progresivamente. Puesto que un criterio sensorial personal que decida el envasado no es en absoluto un método robusto, se hace necesario avanzar en el conocimiento del proceso desde diversos

enfoques -microbiológico, bioquímico/químico y tecnológico- para poder definir claramente la finalización de la fermentación y el logro de las condiciones óptimas previas al envasado.

Posteriormente al estudio realizado sobre la fermentación industrial, se fermentaron aceitunas en el laboratorio usando condiciones de semi-esterilidad (material, agua y salmuera esterilizados antes de ser usados) durante la recogida y el posterior procesado. De este modo se ha podido verificar que los microorganismos que las aceitunas portan son los que se desarrollan en las salmueras durante su fermentación. Cuando las aceitunas son procesadas industrialmente, los microorganismos silvestres deben competir con los microorganismos presentes en la industria. Probablemente, fermentación tras fermentación, los microorganismos formen biofilms que les permitan permanecer en los fermentadores de año a año a pesar de las prácticas de higiene obligatorias en cualquier industria alimentaria (Ortu et al., 2007). Estos microorganismos estarían muy bien adaptados al proceso y su presencia explicaría los óptimos parámetros fermentativos obtenidos en la industria frente a los resultados de los ensayos en el laboratorio. En el caso de industrias que fermenten en bidones plásticos, se perdería el efecto positivo de los “microorganismos de bodega” cada vez que se usase un bidón nuevo, quedando expuesta la fermentación, si cabe, a más aleatoriedad. También hay que tener en cuenta que el menor volumen de estos bidones frente a los grandes fermentadores industriales (1000 litros o más) hace que posean menor inercia frente a posibles alteraciones.

Hemos podido describir como afectan a la fermentación y a la calidad de la aceituna de mesa parámetros básicos y fácilmente controlables; madurez del fruto en el momento de la recogida y concentración salina de la salmuera. De forma general, independientemente del estado de madurez de la fruta, la evolución microbiana observada en estas fermentaciones se ajusta correctamente a la observada en la industria y a las observadas en otras aceitunas al natural (Tassou et al., 2002). La fermentación espontánea, como hemos comentado, ofreció una casi nula reducción del pH. Esto junto con la alta temperatura a la que se realizó la fermentación, establecida a 20°C, unos 5°C por encima de las temperaturas que se alcanzan en las entamadoras, alargó el tiempo de supervivencia de las enterobacterias, como era esperable según estudios previos (Holzapfel et al., 2001; Nychas et al., 2002; Oliveira et al., 2004).

Una salmuera con más NaCl redujo la prevalencia de la enterobacterias sin, aparentemente, influir en el desarrollo de bacterias lácticas y levaduras. Contrariamente, aceitunas recolectadas con un mayor grado de madurez favorecieron una mayor prevalencia de las enterobacterias. Las levaduras crecieron sin problemas independientemente del grado de madurez aunque se observaron mayores

poblaciones iniciales en las aceitunas maduras, probablemente debido a la mayor permeabilidad del endocarpio de la aceituna y a un contenido en frutos dañados mayor (Vaughn et al., 1969). La aparición de bacterias lácticas fue más tardía en las aceitunas verdes que en las de color cambiante o las maduras independientemente de la concentración de sal empleada. El contenido en oleuropeína de las salmueras no explicó el retraso en el crecimiento de las bacterias lácticas en las aceitunas verdes. Los resultados obtenidos mediante el método de Amiot et al. (1990), fueron similares para los distintos grados de madurez. Probablemente sea la menor disponibilidad de nutrientes en la aceituna y, lógicamente, en el medio (también condicionada por una menor permeabilidad de la aceituna) la que explique mejor el retraso en la aparición de bacterias lácticas (Spyropoulou et al., 2001).

Respecto la profundidad de los fermentadores, observamos poblaciones de levaduras y enterobacterias ligeramente superiores en superficie y un retraso en la aparición de las bacterias lácticas en profundidad. La mayor disponibilidad de oxígeno en superficie junto con un pH ligeramente inferior en profundidad favorecerían estas diferencias poblacionales. La liberación de nutrientes tras la lisis de las levaduras podría explicar la mayor facilidad de las bacterias lácticas para desarrollarse rápidamente en superficie, puesto que las levaduras crecerían más en superficie gracias al contenido en oxígeno y al menor pH. Conseguir depósitos completamente estancos y recircular periódicamente la salmuera debería acabar con estas diferencias. También sería interesante poder determinar un contenido en oxígeno óptimo para mantener el metabolismo fermentativo y poder mantener condiciones constantes en los fermentadores.

2. Las especies microbianas implicadas en la fermentación

Si únicamente nos fijásemos en los recuentos microbianos totales parecería que una fermentación es simplemente un desarrollo estable de dos grupos microbianos, bacterias lácticas y levaduras. Al haber identificado y localizado temporalmente las distintas especies implicadas en la fermentación hemos podido observar que realmente existe una sucesión de especies dinámica. Conforme avanza la fermentación nuevas especies reemplazan a las que ya han finalizado su labor. Aunque podemos tratar a los grupos microbianos como conjunto, cada especie tiene requisitos nutricionales y de cultivo diferentes y mostrará un metabolismo determinado. Profundizar en el conocimiento de cada una permitirá un mayor control de la fermentación encaminado a conseguir el producto final deseado. No podemos aún valorar variaciones en

metabolismos de cepas puesto que estamos lejos del estado de conocimiento al que se ha llegado en otros alimentos fermentados como podría ser el vino.

A nivel industrial observamos que *C. diddensiae* es la principal especie detectada durante los 20 primeros días de fermentación tal como ocurre en otras aceitunas de mesa (Ruiz-Barba et al., 1995). Tiene cierta importancia durante las primeras jornadas en salmuera la levadura *R. glutinis*, que podría ayudar a permeabilizar las aceitunas aumentando así la tasa de liberación de nutrientes (Vaughn et al., 1969). A medida que se desarrollan poblaciones importantes de *L. pentosus*, *C. diddensiae* es desplazada por *C. boidinii* y *P. kluyveri*, ambas especies también detectadas previamente en fermentaciones de aceituna de mesa (Coton et al., 2005; Oliveira et al. 2004; Marquina et al., 1997). Al final del proceso aparecen *C. boidinii* y *P. membranaefaciens*, microorganismos habituales en fermentaciones de aceitunas (Coton et al., 2005; Duran et al., 1997; Oliveira et al., 2004) y las levaduras *K. lactis* y *C. membranaefaciens* nunca antes identificadas en aceitunas. También hay una presencia destacada de *L. paraplantarum*, microorganismo asociado a aceitunas de mesa por primera vez.

En las fermentaciones a escala realizadas en el laboratorio *L. plantarum* condujo el proceso aunque no fue capaz de ofrecer una adecuada reducción de pH. *P. anomala* fue la principal levadura detectada. Esta especie también se detectó en la industria pero en mucho menor número y dispersa durante las distintas fases del proceso. Hay cierta controversia sobre esta especie ya que mientras algunos autores la han propuesto como posible inóculo, otros la han asociado al deterioro de algunas variedades de aceitunas. (Hernández et al., 2007; Faid et al., 1994). *S. dairensis*, *C. glabrosa*, aisladas previamente en otros alimentos fermentados (Brocklehurst et al., 1983; Nakase et al., 1977) y *C. sorbosa* tuvieron también una presencia destacable en estas fermentaciones.

Tanto en la fermentación industrial, como en las aguas de lavado de las aceitunas de distinto grado de maduración, así como durante su fermentación y en las fermentaciones dirigidas se aislaron otras especies de levaduras: *P. minuta*, *P. rhodanensis*, *C. aaseri*, *C. beechii*, *C. conglobata*, *C. friedrichii*, *C. gropengiesseri*, *C. parapsilosis*, *C. flavus*, *P. guilliermondi*, *P. rhodanensis* y *Z. hellenicus*. Mientras algunas de estas especies han sido identificadas en otras aceitunas de mesa, otras han sido relacionadas con otros alimentos o se han aislado en ecosistemas medioambientales (Hernández et al., 2007; Gründer et al., 2005; Barnett et al., 2000; Criseo et al., 1999; Federici, 1985; Miller et al., 1962).

Hemos podido aislar y conservar una gran cantidad de especies. Habría que realizar un trabajo más exhaustivo para intentar clasificar las levaduras en cuanto a su

interés tecnológico. Probablemente el uso repetido de los mismos fermentadores influya positivamente en seleccionar las especies más adaptadas y sean las levaduras aisladas en mayor número en la industria -que también se han aislado recurrentemente en diferentes variedades de aceitunas elaboradas según diversos procesos- las más adecuadas para la garantizar la calidad y la seguridad del producto final. Este factor tecnológico sería el conocido en enología como “microbiota de bodega”, mencionado anteriormente y que podría influir en el desarrollo de las fermentaciones espontáneas (Sabaté et al., 2002). El factor geográfico -el origen de las aceitunas- podría estar relacionado con los microorganismos asociados a su piel, pero según lo observado mediante análisis estadístico de los genes de bacteriocinas detectados en cepas de bacterias lácticas de aceitunas, parece que el proceso de elaboración es más determinante sobre las características de las bacterias lácticas que se establecerán durante las fermentaciones que el origen o la variedad de las aceitunas que se emplean.

3. Desarrollo de cultivos iniciadores

La PCR GTG₅ había sido descrita como útil para discriminar entre especies de bacterias lácticas (Gevers et al., 2001; Tamang et al., 2005). Se ha podido comprobar que ante un gran pool de cepas de especies muy similares, *L. paraplantarum*, *L. pentosus* y *L. plantarum*, no es suficientemente discriminante como para diferenciar correctamente el 100% de las cepas. Pero la buena reproducibilidad de la técnica y la especificidad de patrones generados para cada aislado la hacen una técnica útil para seguir inóculos de *L. pentosus* y de *L. plantarum* tanto en aceitunas de mesa como en otros procesos de fermentación en los que intervengan estas especies, tal como se hizo en el tercer capítulo de la presente tesis. También podría ser utilizada para caracterizar cepas silvestres. En ambos casos, tras los resultados obtenidos en el cuarto capítulo de esta tesis, debiéramos asumir que no es posible discriminar entre el 100% de las cepas que se aislen. *L. plantarum* es el microorganismo principal en muchas fermentaciones vegetales, se aísla con frecuencia en productos fermentados derivados de carne y pescado y puede desempeñar un papel tanto beneficioso como perjudicial en el procesado del vino (Spano et al., 2002), la técnica GTG₅ puede ser una herramienta interesante. También es una técnica adecuada como primer paso para estudios polifásicos posteriores en cepas de *L. pentosus* y de *L. plantarum*; en el caso de otras bacterias lácticas, como *L. paraplantarum*, se hace necesario estudiar un número más importante de aislados para poder evaluar el comportamiento de la técnica.

Aunque en las fermentaciones a escala *L. plantarum* creció de forma similar a

como lo hizo *L. pentosus* en la industria, no consiguió rebajar el pH de la salmuera. Se repiten así los resultados de la experiencia con aceitunas arbequinas llevada a cabo por de la Torre et al. (1993). La cepa mayoritaria de *L. plantarum* aislada en el laboratorio (capítulo II) fue empleada como inóculo en una fermentación dirigida (capítulo III), siendo desplazada muy rápidamente por una cepa silvestre de *L. pentosus*. El aumento de la acidez y el descenso del pH se vió muy perjudicado en esta fermentación respecto al resto de fermentaciones que habían sido inoculadas con cepas de *L. pentosus*. Esta especie fue la única aislada o la mayoritaria en el 85% de muestras de aceitunas que se tomaron para aislar bacterias lácticas con fin de realizar el estudio comparativo entre cepas de aceitunas mientras *L. plantarum* sólo fue mayoritaria en un 8% de muestras (los datos de los aislamientos no se muestran en la presente tesis). Entre las cepas pertenecientes a la URV estudiadas en el capítulo IV se incluyó el máximo número posible de representantes diferentes de *L. plantarum* aislados en arbequinas para tener mayor diversidad. La colección posee muchos más representantes distintos de *L. pentosus* -acorde a los porcentajes de aislamientos comentados- pero de esta especie apenas se incluyeron algunos aislados (Tabla 1.1 capítulo IV). Aunque en otras variedades de aceitunas se han usado con éxito cepas de *L. plantarum* como starters (Servili et al., 2006; Delgado et al., 2001) y, asumiendo que debería emplearse alguna otra cepa de esta especie en más experiencias con aceitunas arbequinas, todo parece indicar que *L. plantarum* no es capaz de fermentar correctamente este tipo de aceitunas.

Los resultados no sugieren que sea adecuado emplear dos cepas de *L. pentosus* de similares características para co-inocular aceitunas arbequinas. Aunque al haber inoculado doblemente las aceitunas se ha obtenido rápidamente más ácido láctico y se ha rebajado el pH de forma óptima, se hubiese conseguido el mismo efecto con un inóculo mayor de una sola cepa. La PCR GTG₅ permitió observar la diversidad de bacterias lácticas tras la inoculación así como seguir la cepa inoculada. Al realizar una doble inoculación con *L. pentosus*, la cepa seleccionada como inóculo ideal, *L. pentosus* 5E3A18, no consiguió imponerse como lo había hecho en el caso de la inoculación simple. Situándolo en un supuesto industrial, donde las aceitunas pueden permanecer en salmuera durante largo tiempo, la competencia entre los inóculos podría no ser adecuada ya que una mayor biodiversidad supondría más fragilidad de la estabilidad microbiana en su conjunto. Los trabajos futuros deberían ir encaminados a encontrar inóculos que presentasen características complementarias, tal como se realizó durante el desarrollo de la patente para las aceitunas verdes al estilo español (Jiménez-Díaz et al., 1999). Por poner un ejemplo, podría asociarse un inóculo con un crecimiento rápido y una capacidad fermentativa óptima con una cepa que, bien produjese bacteriocinas que facilitasen la imposición del inóculo o el control de las enterobacterias, bien su metabolismo fuese productor de nuevos aromas y/o sabores, o bien fuese una cepa

probiótica capaz de colonizar las aceitunas permitiendo posicionarlas en otro escalón comercial.

Dado el importante número de levaduras presentes durante la fermentación de la aceituna arbequina, se evaluó el posible uso como inóculo de *C. diddensiae*, especie destacada en la primera fase de la fermentación. De forma general se establece que todas las operaciones que se realizan en la entamadora deben orientarse a favorecer el desarrollo de las bacterias lácticas, ya que serán estas quienes consigan los valores de pH y acidez libre deseados además de que garantizarán estabilidad microbiana. *C. diddensiae* por sí sola no fue capaz de ofrecer la respuesta buscada mediante la inoculación, una bajada rápida del pH hasta niveles óptimos para garantizar una adecuada fermentación y conservación de las aceitunas. Lo que sí consiguió la inoculación de *C. diddensiae* fue mejorar la estabilidad microbiana, puesto que no sólo se observó una menor diversidad en cuanto a especies de levaduras presentes en la salmuera sino que la población de enterobacterias descendió más rápidamente que cuando únicamente se inoculó la cepa de *L. pentosus*. Debido al papel fundamental que las levaduras pueden desempeñar en el aroma y sabor de la aceituna de mesa, es muy interesante el control de la diversidad de las cepas salvajes (Sabatini et al., 2007). Puesto que en nuestro experimento la población de bacterias lácticas observadas estuvo directamente relacionada con las características del inóculo empleado -no se observó población de bacterias lácticas cuando esta especie no fue inoculada- y aunque *C. diddensiae* no influyó en el crecimiento de *L. pentosus*, cabe preguntarse si hubiese podido favorecer el desarrollo de una población autóctona de bacterias lácticas. Habría que estudiar en un entorno industrial -donde se tuviese el efecto de la “microbiota de bodega”- qué sucedería en cuanto al desarrollo de bacterias lácticas si se realizase una inoculación con *C. diddensiae*.

Se ha observado que preadaptando un inóculo cultivándolo en un medio salino, se puede minimizar la pérdida de viabilidad inherente a una inoculación en salmuera de aceitunas de mesa. Esta pérdida no sería sólo fruto de una alta salinidad, sino también porque la salmuera es un medio con baja disponibilidad de nutrientes en sus primeros días (de Castro et al., 2002; Panagou et al., 2003). Las distintas variedades de aceitunas y las diversas entamadoras usan muy variadas concentraciones salinas (niveles de NaCl entre 4 y 15% peso/volumen). Conocer la tolerancia a la sal de un inóculo y su capacidad para desarrollarse en un entorno con limitación de nutrientes debiera ser un criterio de selección para minimizar los riesgos de una inoculación. La tolerancia a la sal de las cepas estudiadas mostró, de forma general, un comportamiento similar entre *L. paraplantarum* y *L. pentosus*, siendo *L. plantarum* la especie menos resistente. Hay que considerar que las cepas aisladas procedían de diversas variedades de aceitunas y

procesos de preparación, además de no conocerse el momento en que se aisló la muestra. Probablemente, haber estudiado la especie *L. paraplantarum* carezca de interés, por el momento, fuera del ámbito de la aceituna arbequina, puesto que únicamente en esta se ha identificado. Por el contrario, dado el gran número de procesos y variedades de aceituna existentes dónde *L. pentosus* y *L. plantarum* son las especies mayoritarias, su comportamiento en un entorno salino y nutricionalmente pobre puede ser de gran interés para investigadores y elaboradores.

4. La cata de aceitunas como herramienta complementaria

El concepto de calidad ha ido evolucionando desde adaptarse a una serie de especificaciones internas hasta a la capacidad de una organización de satisfacer las necesidades, explícitas e implícitas, que el cliente demanda. Así, la satisfacción del cliente cada día se tiene más en cuenta en la industria alimentaria. Bajo esta óptica, la cata es una de las herramientas básicas para poder obtener información referente a parámetros de calidad relacionados con el producto final. El panel de cata desarrollado según las normas vigentes (AENOR 1997a) ha sido muy útil para poder evaluar aceitunas arbequinas de mesa elaboradas según diferentes procesos. También se realizaron test triangulares (AENOR, 1997b) para determinar si el consumidor percibía diferencias sensoriales entre aceitunas preparadas según distintos procesos. De este modo es posible tener más criterios para determinar los procedimientos operacionales más indicados.

Desde el punto de vista microbiológico, el empleo de aceitunas arbequinas maduras incrementa la prevalencia de las enterobacterias y de levaduras contaminantes. La única ventaja que ofrecía el empleo de aceitunas maduras era la mayor velocidad en el desarrollo de las bacterias lácticas. Los resultados sensoriales, además, exigen el empleo de aceitunas verdes preferentemente puesto que presentan un perfil organoléptico preferente a las aceitunas maduras. Un test triangular mostró que no se aprecian diferencias en cuanto a la concentración de sal empleada durante la fermentación, permitiendo ajustar ésta con libertad según criterios técnicos encaminados a mejorar la fermentación y la seguridad alimentaria, sabiendo que no afectará a la calidad percibida por el consumidor. También los test triangulares resaltaron la preferencia por las aceitunas inoculadas frente al control, especialmente a las aceitunas inoculadas con una cepa de *L. pentosus*.

La principal dificultad en los tests de cata es la dispersión de los resultados. Aquí

yace la importancia de conseguir un panel de catadores experimentados para aprovechar al máximo el ensayo, por ejemplo para poder determinar si el empleo de la levadura *C. diddensiae* ha aportado mejoras sensoriales a las aceitunas.

Pero los resultados sensoriales por sí solos podrían conducirnos a conclusiones erróneas, por lo que no debieran desacoplarse de los estudios analíticos. Por ejemplo, se ha comprobado que los resultados sensoriales para aceitunas verdes de laboratorio eran muy similares a los obtenidos en el caso de las aceitunas procedentes de la industria, pero sólo en esta se obtenían unos perfiles de fermentación deseados, un establecimiento de poblaciones importantes de bacterias lácticas y una bajada del pH hasta niveles óptimos.

5. Plantaricinas en las cepas de bacterias lácticas de aceitunas de mesa y su expresión

L. plantarum es la especie presente de forma mayoritaria en alimentos fermentados y ha sido aislada como principal en muchas variedades de aceituna, pero *L. pentosus* también se ha aislado como mayoritaria en algunas variedades de aceitunas (Oliveira et al. 2004; Panagou et al. 2008). La similitud genética entre estas dos especies así como con *L. paraplantarum* (Torriani et al., 2001) indicaban la posible presencia de los genes conocidos de plantaricinas en las tres especies. Siendo *L. pentosus* la especie indicada como inóculo para las aceitunas arbequinas, así como para otras variedades (Oliveira et al. 2004; Panagou et al. 2008; Hurtado et al., 2010), y dada la escasa bibliografía al respecto de bacteriocinas en *L. pentosus* (Liu et al., 2008; Delgado et al., 2005; Todorov and Dicks, 2005), quedaba justificada la búsqueda de bacteriocinas en esta especie. El estudio se extendió a *L. paraplantarum* y a un gran pool de *L. plantarum* para profundizar en el conocimiento de la distribución de los genes de bacteriocinas conocidos y como punto de partida para futuros estudios.

Un estudio previo con 28 aislados de *L. plantarum* (Ben Omar et al., 2008) había mostrado que los genes más frecuentemente presentes eran *plnD*, *plnE*, *plnI*, *plnG* y *plnK* mientras que los genes de la plantaricina W y de la plantaricina NC8 no se habían detectado. Nuestros resultados fueron similares con la salvedad de que no se detectó una abundancia de *plnK*. Detectamos apenas 6 aislados entre un centenar que poseían en gen NC8 y tampoco detectamos el gen de la plantaricina W. A falta de una búsqueda mayor, se podría aventurar que la plantaricina W podría ser específica del vino, alimento del que procede la cepa de *L. plantarum* descrita que la posee (Holo et al., 2008). La

bacteriocina S había sido detectada en ambas especies, *L. pentosus* y *L. plantarum* (Stephens et al., 1998; Delgado et al., 2005). Mientras en dos estudios previos un 20% de individuos en un pool de aislados de *L. plantarum* mostraron presencia del gen (Maldonado et al., 2002; Ben Omar et al., 2008), sólo una de nuestras cepas poseía la bacteriocina S.

El análisis estadístico mostró que existe una correlación entre el patrón génico de bacteriocinas que posee cada aislado estudiado y el tipo de procesado de las aceitunas de dónde fue aislado. Esta especificidad de nicho también la encontró Ben Omar et al. (2008), detectando la presencia de plantaricinas en cepas de *Lactobacillus fermentum* aisladas junto a *L. plantarum*. Parece lógico pensar que, más allá del posible intercambio génico entre especies cercanas que comparten nicho como explicación plausible, la presión del ecosistema conduce a especies cercanas a presentar características génicas similares puesto que deben competir y sobrevivir en un mismo entorno.

El estudio de expresión génica se planteó como un intento de correlacionar datos teóricos de expresión de los genes de bacteriocinas con datos de interés tecnológico, la bioactividad de la cepa productora y la modificación de esta bioactividad y de la expresión génica en condiciones de salinidad similares a las de una salmuera tipo. Conocer en qué estadio metabólico se expresarán los genes y cuando será bioactiva la cepa son datos muy interesantes en el desarrollo de un inóculo. Por ejemplo, de nada servirá que una cepa sea bioactiva bien entrada su fase estacionaria si va a ser coinoculada para favorecer el desarrollo de otro cultivo -resistente a esta, claro-. En este caso la cepa productora debería estar excretando bacteriocinas al medio desde el inicio de la inoculación para garantizar la imposición del otro inóculo. *L. pentosus* B96 sobre-expresa la plantaricina S en cuanto es inoculada en un medio control, siendo su actividad bacteriocinas máxima en la fase exponencial de crecimiento, momento en que también sobre-expresa el gen *plnE*. La bioactividad se reduce cuando la cepa crece en un medio con un 8% de NaCl, y se detecta sobre-expresión de los genes *plsA*, *plnE* y *plnN* en la fase estacionaria. Concentraciones salinas intermedias, 4 y 6% de NaCl, favorecen la bioactividad y, aunque *plsA* no se sobre-expresa hasta la fase estacionaria, se observa sobre-expresión de *plnN* en la fase de adaptación así como de *plnE* y *plnN* en fase exponencial y en un 4% de NaCl y de *plnE* en fase estacionaria y en un 6% de NaCl. Se ha podido observar que los distintos genes muestran un patrón de expresión variable en función de la concentración salina del medio contribuyendo, probablemente, a la bioactividad total de la cepa en cada una de las situaciones. Este trabajo sienta unas bases para futuros estudios conforme se avance en la detección y selección de cepas productoras de bacteriocinas así como en métodos robustos para cuantificar la

bioactividad de las cepas.

Czárán et al. (2002) proponen que en un ecosistema dado, podrían coexistir bacterias “killer” (productoras de bacteriocinas y con inmunidad a ellas), bacterias resistentes (no productoras pero con inmunidad) y sensibles (ni productoras de bacteriocinas ni resistentes a ellas). Las proporciones de cada una de las cepas en un nicho dependerían en gran medida de las condiciones iniciales en las que se formará el ecosistema. En ausencia de presión selectiva debida a bacteriocinas en el medio, expresar la resistencia es un costo metabólico que no paga la cepa sensible. Producir la bacteriocinas también es una carga que una cepa resistente no tiene que asumir. Esto nos lleva a un modelo piedra-papel-tijera esquematizado en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Modelo de “guerra química” entre microorganismos, relación entre pares no transitiva con tres elementos implicados, similar al juego piedra-papel-tijera. Tabla adaptada de Riley y Wertz (2002).

Características de la cepa	Ventaja frente a	Referencia
Productora	Sensible	Resistente
Sensible	Resistente	Productora
Resistente	Productora	Sensible

Según este simple modelo es fácil entender que la mera posesión de uno o varios genes de bacteriocinas y que estos sean expresados por parte de una determinada cepa, podrían no ser criterios suficientes para garantizar su éxito como inóculo (asumiendo que la cepa ya cumple otros requisitos imprescindibles para ser tomada en cuenta como cultivo iniciador). De forma general, los datos que aportamos en los estudios presentados en los capítulos 4 y 5, podrían ser empleados para superar las dificultades que el modelo piedra-papel-tijera representa para una cepa starter de interés. Por un lado parece que se podría establecer, entendiéndolo que debería realizarse un muestreo y análisis mayor, una relación entre las bacteriocinas que poseen las bacterias lácticas y un determinado proceso de elaboración, no sólo de aceitunas de mesa, sino de cualquier otro proceso biotecnológico donde las bacteriocinas posean interés tecnológico y/o comercial. Esto permitiría, bien seleccionar cepas resistentes a todas las bacteriocinas que a priori se encontrarían en el medio, bien seleccionar cepas capaces de expresar en el momento adecuado otra bacteriocina diferente a las que las cepas del ecosistema van a ser capaces de resistir, o ambas cosas a la vez en el más complejo de los casos.

Bibliografía

- AENOR, 1997a. Análisis sensorial. Guía general para la selección, entrenamiento y control de jueces. Parte 1: Catadores (UNE 87024-1:1995; (ISO 8586-1: 1993). In: Análisis sensorial. Tomo I. Alimentación. Recopilación de Normas UNE. Ed. AENOR N.A., Madrid, España, pp. 216-240.
- AENOR, 1997b. Análisis sensorial. Metodología. Prueba triangular (UNE 87006:1992; (ISO 4120: 1983). In: Análisis sensorial. Tomo I. Alimentación. Recopilación de Normas UNE. Ed. AENOR N.A., Madrid, España, pp. 82-91.
- Amiot, M.J., Tacchini, M., Fleuriet, A., Macheix, J.J., 1990. Le processus technologique de désamérisation des olives: caractérisation des fruits avant et pendant le traitement alcalin. *Sciences des Aliments* 10, 619-631.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D., 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification, third ed.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Ben Omar, N., Abriouel, H., Keleke, S., Sánchez Valenzuela, A., Martínez-Cañamero, M., Lucas López R., Ortega, E. and Gálvez A. 2008. Bacteriocin-producing *Lactobacillus* strains isolated from poto poto, a Congolese fermented maize product, and genetic fingerprinting of their plantaricin operons. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 18-25.
- Brocklehurst, T.F., White, C.A., Dennis, C., 1983. The microflora of stored coleslaw and factors affecting the growth of spoilage yeasts in coleslaw. *Journal of Applied Bacteriology*, 55, 57-63.
- COI/OT/NC nº 1, Diciembre 2004, Norma comercial aplicable a las aceitunas de mesa, Consejo Oleícola Internacional.
- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., & Sohier, D., 2005. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 130-135.
- Criseo, G., Gallo, M., Pernice, A., 1999. Killer activity at different pHs against *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype A by environmental yeast isolates. *Mycoses*, 42, 601-608.
- Czárán, T.L., Hoekstra, R.F. and Pagie, L., 2002. Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 99, 786-790.
- De la Torre, J.E., Moya, E.R., Bota, E. and Sancho, J., 1993. Estudio físico-químico y microbiológico de la fermentación de aceitunas verdes arbequinas. *Grasas y Aceites* 44, 274-278.
- Delgado, A., Brito, D., Fervereiro, P., Peres, C., Figueiredo Marques, J., 2001. Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum*, isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives. *Lait*, 81, 2003-2215.
- Delgado A., Brito D., Peres C., Noé-Arroyo F. and Garrido-Fernández A., 2005. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiology*, 22, 521-528.
- Duran, M. C., Gracia, P., Brenes, M., & Garrido, A., 1997. *Lactobacillus plantarum* survival in aerobic, directly brined olives. *Journal of Food Science*, 59, 1197-1201.
- Federici, F., 1985. Production, purification and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 51, 139-150.
- Faid, M., Akhartouf, R., & Asehrou, A., 1994. Microorganisms associated with postharvest green olives deteriorations in Morocco. *Grasas y Aceites*, 45, 313-317.
- Garrido-Fernández, A., Fernández Díez, M.J., Adams, M.R., 1997. *Table Olives, Production and Processing*. Chapman and Hall, London.
- Gevers, D., Huys, G., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205, 31-36.

- Gründer, S., Mayser, P., Redmann, T., & Kaleta, E. F., 2005. Mycological examinations on the fungal flora of the chicken comb. *Mycoses*, 48, 114-119.
- Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., & Córdoba, M. G., 2007. Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiology*, 24, 346-351.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., Schillinger, U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 365-373.
- Hurtado, A., Reguant, C., Esteve-Zarzoso, B., Bordons, A., Rozès, N., 2008. Microbial population dynamics during the processing of *Arbequina* table olives. *Food Research International*, 41, 738-744.
- Jiménez-Díaz, R., Ruiz Barba, J.L., Rejano Navarro, L., Sánchez- Gómez, A.H. y Floriano Pardal, B., 1999. Procedimiento de fermentación de productos vegetales. Patente 9900740. Oficina española de patentes y marcas.
- Kuzina, V. L., Peloquin, J. C., Vacek, D. C., & Miller, T. A., 2001. Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Current Microbiology*, 42, 290-294.
- Liu, G., Lv., Y. and Li, P. 2008. Pentocin 31-1, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1 isolated from Xuan-Wei Ham, a traditional China fermented meat product. *Food Control*, 19, 353-359.
- Maldonado, A., Ruiz-Barba, J.L., Floriano, B. and Jiménez-Díaz, R., 2002. The locus responsible for production of plantaricin S, a class IIb bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, is widely distributed among wild-type *Lact. plantarum* strains isolated from olive fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 77, 117-124.
- Marquina, D., Toufani, S., Llorente, P., Santos, A., & Peinado, J. M., 1997. Killer activity in yeast isolates from olive brines. *Advances in Food Science*, 19, 41-46.
- Miller, M. W., Phaff, H. J., & Snyder, H. E., 1962. On the occurrence of various species of yeast in nature. *Mycopathologia*, 16, 1-18.
- Nakase, T., Goto, S., Koyama, Y., Komagata, K., Iizuka, H., 1977. Microbiological studies on cheese (II). Determination of yeasts found in cheese imported from Europe and North America. *Journal of Food Hygiene*, 18, 353-361.
- Nychas, G.-J. E., Panagou, E. Z., Parker, M. L., Waldron, K. W., & Tassou, C. C., 2002. Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 173-177.
- Oliveira, M., Brito, D., Catulo, L., Leitao, F., Gomes, L., Silva, S., Vilas-Boas, L., Peito, A., Fernandes, I., Gordo, F., Peres, C., 2004. Biotechnology of olive fermentation of 'Galega' Portuguese variety. *Grasas y Aceites*, 55, 219-226.
- Ortu, S., Felisa, G.E., Marzottob, M., Deriua, A., Molicottia, P., Sechia, L.A., Dellagliob, F., Zanettia, S., 2007. Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and Gioddu, a traditional Sardinian fermented milk. *International Dairy Journal*, 17, 1312-1320.
- Panagou, E.Z., Schillinger, U., Franz, and C., Nychas, G.J.E., 2008. Microbiological and biochemical profile of cv. *Conservolea* naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 25, 348-358.
- Paarup, T., Nieto, J. C., Peláez, C., & Reguera, J. I., 1999. Microbiological and physicochemical characterisation of deep spoilage in Spanish dry-cured hams and characterisation of isolated enterobacteriaceae with regard to salt and temperature tolerance. *European Food Research & Technology*, 209, 366-371.

- Riley, M.A. and Wertz, J.E., 2002. Bacteriocins: Evolution, Ecology and Application. *Annual Reviews of Microbiology*, 56, 117-137.
- Ruiz-Barba, J. L., & Jiménez-Díaz, R., 1995. Availability of essential B-group vitamins to *Lactobacillus plantarum* in green olive fermentation brines. *Applied & Environmental Microbiology*, 61, 1294-1297.
- Sabaté, J. Cano, J. Esteve-Zarzoso, B. and Guillamón, J.M., 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological Research*, 157, 267-274.
- Sabatini, N., Mucciarella, M.R. and Marsilio, V., 2008. Volatile compounds in inoculated and inoculated table olives with *Lactobacillus plantarum* (*Olea europaea* L., cv. *Moresca* and *Kalamata*). *Food Science and Technology*, 41, 2017-2022.
- Servili, M., Settanni, L., Veneziani, G., Esposito, S., Massitti, O., Taticchi, A., et al. 2006. The use of *Lactobacillus pentosus* IMO to shorten the debittering process time of black table olives (Cv *Itrana* and *Leccino*): A pilot-scale application. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, 54, 3869-3875.
- Spano, G., Beneduce, L., Tarantino, D., Zapparoli, G. and Massa, S., 2002. Characterization of *Lactobacillus plantarum* from wine must by PCR species-specific and RAPD-PCR. *Letters in applied microbiology*, 35, 370-374.
- Spyropoulou, K. E., Chorianopoulos, N. G., Skandamis, P. N., and Nychas, G.-J. E., 2001. Control of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation of Spanish-style green table olives (*Conservolea* variety) supplemented with different carbon sources. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 3-11.
- Stephens, S., Floriano, B., Cathcart, D.P., Bayley, S.A., Witt, V.F., Jiménez-Díaz, R., Warner, P.J. and Ruiz-Barba, J.L. 1998. Molecular analysis of the locus responsible for production of plantaricin S, a two-peptide bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1871-1877.
- Tamang, J.P., Tamang, B., Schillinger, U., Franz, C., Goresb, M. and Holzapfel, W.H., 2005. Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 347-356.
- Tassou, C.C., Panagou, E.Z., Katsabokakis, K.Z., 2002. Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology*, 19, 605-615.
- Todorov, S.D. and Dicks, L.M.T., 2004. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST151BR, a strain isolated from beer produced by the fermentation of maize, barley and soy flour, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 643-650.
- Torriani, S., Felis, G.E., Dellaglio, F., 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3450-3454.
- Vaughn, R.H., Jakubczyk, T., Macmillan, J.D., Higgins, T.E., Dave, B.A., Crampton, V.M., 1969. Some pink yeasts associated with softening of olives. *Applied Microbiology*, 18, 771-775.

Conclusiones

A continuación se presentan las principales conclusiones que se desprenden del presente trabajo sobre la microbiota asociada al proceso de elaboración de la aceituna de mesa arbequina.

1. Por primera vez se ha caracterizado la la dinámica poblacional a nivel de espacios microbianas durante el procesado industrial de la aceituna de mesa arbequina.
2. Tanto durante el procesado industrial como en las fermentaciones a escala siempre se han encontrado asociadas poblaciones de levaduras y bacteris lácticas. Siguiendo una secuencia temporal las principales especies aisladas durante el procesado industrial son:
 - a. Levaduras: *Candida diddensiae*, *Pichia kluyveri*, *Candida boidinii* y *Pichia membranaefaciens*.
 - b. Bacterias lácticas: *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus paraplantarum*.
3. El grupo de las enterobacterias desaparece muy rápidamente tras la introducción de las aceitunas en salmuera. Se han aislado las especies *Proteus vulgaris* y *Providencia rettgeri*.
4. En el proceso industrial se observó que los recuentos microbianos eran algo superiores en la parte superior de los fermentadores, especialmente para las levaduras y las enterobacterias.
5. Se estudiaron a escala piloto otros factores como el efecto de la concentración en sal de la salmuera o el grado de madurez de la aceituna en el momento de la recogida. Las principales conclusiones son:
 - a. Una mayor concentración en sal favorece la desaparición de las enterobacterias sin afectar al desarrollo de las bacterias lácticas.
 - b. Un grado de madurez mayor favorece el desarrollo de las bacterias lácticas.
 - c. No se encontraron bacterias lácticas en el agua de lavado de los frutos mientras que sí se aislaron levaduras en el caso de las aceitunas maduras.
6. Las características organolépticas óptimas de las aceitunas arbequinas son

que sean de color verde, de textura firme y crujiente y que mantengan amargor residual.

7. Se debe escoger preferentemente cepas de *Lactobacillus pentosus* como cultivos iniciadores de la fermentación de aceitunas de mesa arbequinas.
8. La co-inoculación de levaduras junto con BAL parece una opción adecuada para garantizar la estabilidad microbiana y tener mayor control de la fermentación. Paralelamente será necesario avanzar en el conocimiento de las distintas especies asociadas al proceso y realizar estudios de cata para ver como afecta el desarrollo de distintas levaduras a la calidad sensorial del producto final.
9. La técnica GTG₅ es una buena herramienta para seguir inóculos de *L. pentosus* y *L. plantarum* en aceitunas de mesa.
10. Se ha estudiado la presencia de genes de plantaricinas en una colección de aislados de las especies *L. paraplantarum*, *L. pentosus* y *L. plantarum*:
 - a. *L. paraplantarum* y *L. pentosus* poseen los mismos genes de plantaricinas que *L. plantarum*.
 - b. Con independencia de la especie estudiada, existe una relación entre los genes de bacteriocina que posee una cepa y el origen de aislamiento de la misma.
11. Estudios transcripcionales confirman la importancia de la plantaricina S en *L. pentosus* B96.
12. *L. pentosus* B96, aunque en menor grado, también expresa otros genes de bacteriocinas que pueden contribuir a la bioactividad total de la cepa.

Anexo: materiales y métodos

1. Aceitunas, muestreo y preparación de las salmueras de los distintos ensayos

Las muestras de aceitunas empleadas en el estudio presentado en el capítulo 1 se tomaron en la finca Mas d'en Pou (www.masdenpou.com). En esta entamadora las aceitunas fermentan en depósitos subterráneos de 3 metros de profundidad. Las muestras se recogieron a distintas profundidades mediante una pipeta de 2 metros de longitud con abertura accionada por un émbolo. Las muestras se tomaron por duplicado.

Las aceitunas empleadas en el estudio presentado en el capítulo 2 se recolectaron en la finca experimental Mas dels Frares de la Facultad de Enología de la URV, situada en Constantí, Tarragona. Esta finca posee varios olivos de la variedad arbequina. Las aceitunas se recolectaron manualmente usando guantes estériles. Todas las aceitunas se recolectaron de un mismo árbol y se clasificaron según la norma del COI (2004) acorde a su estado de madurez en verdes, color cambiante y negras. Las aceitunas se introdujeron en agua corriente estéril en frascos de vidrio de 1 litro con cierre hermético y previamente esterilizados. Cada botella contenía 560 g de aceitunas verdes, 535 g de aceitunas color cambiante y 525 gramos de aceitunas negras respectivamente. Después de haber permanecido en agua dos días se reemplazó el agua por salmueras esterilizadas. Se usaron dos concentraciones de sal 5 y 10 % (peso / volumen). En total se prepararon 12 botellas correspondientes a 3 estados de maduración, dos concentraciones de sal para cada tipo de aceituna y un duplicado de cada muestra. Las fermentaciones se realizaron a una temperatura controlada de 20 °C.

Las aceitunas que se emplearon en el estudio presentado en el capítulo 3 también fueron recolectadas de un único olivo de la finca experimental Mas dels Frares. Las aceitunas se recolectaron con guantes estériles. 550 g de aceitunas se introdujeron en botellas de cristal de 1 litro con cierre hermético que habían sido esterilizadas y se llenaron con agua corriente esterilizada. Después de un día de lavado, se reemplazó el agua por 500 ml de salmuera estéril con una concentración de cloruro de sodio del 8% (p/v). Se ensayaron 8 condiciones por duplicado, resultando un total de 16 botellas. Las fermentaciones se realizaron a una temperatura controlada de 20 °C.

2. Medios de cultivo

2.1. Medios sólidos para el recuento en placa y procedimiento de siembra

Las muestras de salmueras o de medios de cultivo líquidos se diluyeron cuando fue necesario en solución salina (0,8% NaCl p/v) y se sembraron en medios específicos mediante el sembrador en espiral automático Whitley (DW Scientific). El recuento de viables se realizó mediante el software ProtoCOL SR/HR (versión 1.27.1664; Synoptics Ltd.) asociado al sembrador automático. Mediante este instrumento y el software es posible sembrar directamente en una placa hasta 10^5 UFC. En el caso que la placa tuviese que servir para aislar individuos, la dilución previa de la muestra debía permitir sembrar, como máximo, 10^4 UFC. De otro modo las colonias se presentarían demasiado juntas para poder ser correctamente aisladas.

Los medios empleados para la enumeración selectiva de los distintos grupos microbianos fueron:

- Bacterias lácticas: agar MRS (Difco) modificado mediante la adición de 0.6% (p/v) de ácido málico (D,L), 0.5% (p/v) de fructosa, nistatina (100 mg/l) y azida sódica (100 mg/l) a pH. El agar MRS modificado sólo se empleó en los estudios presentados en los capítulos 1 y 2. En los restantes estudios se usó agar MRS (Difco).
- Levaduras: agar YEPD (Difco) suplementado con cloranfenicol (100 mg/l). En los estudios presentados en los capítulos 1 y 2 se enumeró también las levaduras en agar rosa de bengala suplementado con cloranfenicol (Panreac) para determinar el efecto de los hongos sobre la población total de levaduras detectada con YEPD.
- Enterobacterias: agar bilis rojo neutro violeta cristal con glucosa (Panreac)
- Pseudomonas: agar cetrimida (Panreac). Este medio únicamente se empleó en el estudio presentado en el capítulo 1.

Las placas de MRS se incubaron 48 horas a 27 °C bajo una presión de CO₂ del 10%. El resto de placas se incubaron 48 horas a 30 °C.

2.2. Medios empleados para la preparación de starters

Los inóculos de bacterias lácticas se propagaron en MRS (Difco) suplementado con cloruro de sodio (NaCl) cuando fue necesaria una pre-adaptación a la salmuera. Los inóculos de levaduras se propagaron en YEPD (Difco) también suplementados con NaCl cuando fue necesario. El medio MRS se incubó a 27 °C bajo una presión de CO₂ del 10% mientras que el medio YEPD se incubó a 30 °C.

2.3. Medios empleados para la conservación de cepas

Las cepas de bacterias lácticas y de levaduras se conservaron en MRS (Difco) y YEPD (Difco) respectivamente modificados mediante la adición de un 35% de glicerol. Las cepas de enterobacterias se conservaron en caldo soja triptona, TSB, (Panreac) suplementado con un 35% de glicerol. La temperatura de conservación fue -20 o -80 °C según necesidad.

2.4. Medio empleado para estudiar la tolerancia a la sal

Para estudiar la resistencia a la sal de las distintas cepas se preparó un medio que imita las condiciones de una salmuera de aceitunas de mesa en cuanto a su contenido limitado de nutrientes. Este medio fue propuesto por Rozés y Peres (1999) y consiste en glucosa (2 g/l), citrato trisódico (0,5 g/l), ácido málico (5 g/l), cas-aminoácidos (1 g/l) y base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (6,7 g/l).

3. Ensayo de la actividad antimicrobiana

3.1. Técnica de la doble capa para la detección de cepas productoras

Para detectar cepas de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas activas frente a otras bacterias lácticas se usó la técnica propuesta por Schillinger y Lücke (1989) modificada del siguiente modo. En una placa de agar MRS (Difco) se depositó 5 µl de un cultivo de una noche de la cepa productora. Alternativamente es posible depositar diversas gotas de cultivos de diferentes cepas hasta cubrir una buena

superficie de la placa. Tras media hora se cubrió con una sobrecapa de agar MRS blando (0,7% p/v de agar) inoculado al 0,5% con la cepa sensible. Una vez solidificada la sobrecapa se incubó durante 24 horas a 27 °C bajo una presión de CO₂ del 10% observando entonces la posible aparición de halos de inhibición entorno a las bacterias crecidas en la capa base.

3.2. Medida de la actividad antimicrobiana mediante ensayo de difusión

Muestras de cultivos de cepas productoras recogidas a diferentes tiempos se centrifugaron a 8500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se esterilizó por filtración. Para asegurar la reproducibilidad del método se prepararon placas de agar MRS de 20 ± 1 ml. 5 µl de cada sobrenadante filtrado se depositaron sobre el agar. Después de 30 minutos se depositó una sobrecapa de agar blando de 10 ± 0,5 ml inoculado con 100 µl de un cultivo de una noche de la cepa sensible. Una vez solidificada la sobrecapa se incubó durante 24 horas a 27 °C bajo presión de CO₂ del 10% observando entonces la posible aparición de halos de inhibición entorno a las gotas depositadas en la capa base. Las zonas de inhibición se midieron usando un pie de rey de 0,1 mm de precisión depositando la placa sobre un contador de colonias con retroiluminación. La medida final resultó de la media de 2 medidas perpendiculares del diámetro de inhibición. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

4. Determinaciones analíticas de las salmueras

4.1. pH

El pH de las muestras de salmueras se determinó con un medidor de pH GLP21 pH meter (Crison).

4.2. Determinación de la concentración de oleuropeína

El contenido de oleuropeína en las salmueras fue determinado con el método propuesto por Amiot et al. (1990). Se tomó un mililitro de salmuera y se filtró usando membranas de 0,22 µm Millex® -GV, de Millipore. La muestra se diluyó con agua para

obtener un espectro UV entre 0,1-2,5 nm. Se usó un espectrofotómetro Helios α UV-Vis (Thermo Spectronic). El contenido en oleuropeína se calculó mediante la siguiente ecuación: Oleuropeína (g/l) = $(A_{280} - 0,9A_{330})/7,5 * F$, siendo A_{280} la absorbancia a 280 nm, A_{330} la absorbancia a 330 nm y F el factor de dilución.

4.3. Determinación de ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos se determinaron mediante HPLC con una columna Aminex HPX-87H (Biorad). La temperatura usada fue de 65 °C y la fase móvil H₂SO₄ 5mM con un flujo de 0,7 ml/min. La detección se realizó a 210 nm. Previamente al análisis, las muestras de salmuera filtradas mediante membranas de 0,22 μ m Millex® -GV (Millipore). Se determinaron los ácidos tartárico, cítrico, málico, succínico, acético y propiónico. Para poder determinar el valor de cada ácido en la salmuera se construyeron rectas de calibración con disoluciones patrón.

5. Identificación de enterobacterias

Las enterobacterias aisladas de las salmueras se identificaron primeramente mediante el kit Api 20E (BioMérieux). Para la verificación de las especies identificadas se emplearon los tests descritos en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt et al., 1994).

6. Identificación y tipado de microorganismos mediante técnicas de biología molecular

Las técnicas de PCR (amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa) se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos utilizados fueron suministrados por Applied Biosystems o Invitrogen. La ADN polimerasa usada en todos los casos fue la EcoTaq de Ecogen. Los productos de PCR se resolvieron en geles preparados con la concentración adecuada de agarosa de baja EEO (Ecogen) disuelta en TBE 1x (Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM y EDTA 2 mM a pH 8.0) y con bromuro de etidio (0.5 μ g ml⁻¹). El

marcador de pesos moleculares de ADN usado en todos los casos fue de 100 bp (Invitrogen). Cuando fue necesario para posterior análisis los geles se fotografiaron con una cámara digital KODAK DC290 (Eastman Kodak Company).

6.1. Micro extracción de ADN

La técnica desarrollada por Ruiz-Barba et al. (2005) permite obtener ADN, directamente de colonias o de aislados en placa, de pureza suficiente para ser empleado en una PCR. Se usó siempre para extraer ADN de aislados en placa. Se toma una pequeña porción del aislado y se disuelve en 100 μ l de agua en un eppendorf. Se añaden 100 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) (Panreac) y se agita en un vortex a velocidad máxima durante 10-20 segundos. La mezcla se deja en reposo a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente se centrifuga a 13000 g. durante 5 minutos. La mezcla se separa en dos fases y una interfase. El sobrenadante, constituido por la fase acuosa, contiene el ADN extraído.

6.2. Análisis del gen ribosomal 16S: ARDRA. (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)

Rodas et al., 2003 desarrollaron esta metodología para la identificación de bacterias lácticas mediante el análisis de fragmentos de restricción del gen ribosomal 16s. La mezcla de amplificación para un volumen final de 50 μ l fue la siguiente: 2 μ l de la micro extracción de ADN (Ruiz-Barba et al., 2005); dNTPs 200 μ M, cada primer 1 μ M; MgCl₂ 2 mM; tampón de la Taq polimerasa 1x; Taq polimerasa 1U. Los primers usados fueron 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' (Edwards et al., 1989). A la mezcla de reacción se le añadió un 1% de formamida para aumentar la especificidad (Sarkar et al., 1990). La amplificación consistía en una desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C seguida de 35 ciclos de amplificación que comprendían los pasos de desnaturalización, 30 s a 94°C, de "annealing" a 56°C durante 30 s y de extensión a 72 °C por 1 min, seguido de una extensión final de 5 min a 72 °C y posterior refrigeración a 4°C. Los productos de PCR se comprobaron en un gel con una concentración de agarosa del 1,2%.

La restricción de los productos de PCR se llevó a cabo "overnight" en un baño a 37°C en tubos eppendorf de 1,5 ml. La mezcla de reacción comprendía 5 U de la enzima

correspondiente, *BfaI* o *MseI* (New England Biolabs), 1x del tampón de restricción de la enzima y 10 µl del producto de PCR, en un volumen final de 20 µl. Los fragmentos de restricción se visualizaron en un gel del 2% de agarosa.

Esta técnica se empleó en el estudio presentado en el capítulo 1 para identificar las cepas de bacterias lácticas aisladas de las salmueras de fermentación de aceitunas arbequinas. La identificación se basó en la comparación de los perfiles de restricción de las cepas aisladas frente a cepas tipo. Debido a que la principal cepa detectada correspondía a un perfil de restricción que presentan tanto *Lactobacillus plantarum* como *Lactobacillus pentosus*, fue necesario aplicar una segunda técnica capaz de discriminar entre estas especies.

6.3. PCR multiplex con el gen *RecA*

Para la discriminación entre las especies *L. pentosus* y *L. plantarum* se usó la técnica desarrollada por Torriani et al. (2001). Esta PCR multiplex se basa en las diferencias de secuencia que existen en el gen *RecA* entre las especies *Lactobacillus paraplantarum*, *L. pentosus* y *L. plantarum*. El cebador reverso es común a las tres especies mientras que hay un cebador “forward” para cada una de las especies. En la mezcla de reacción se añaden los 4 primers y sólo existe amplificación cuando un par de primers es capaz de hibridarse selectivamente, obteniéndose productos de PCR de distinto peso molecular para cada especie. Además, la técnica permite identificar selectivamente a estas especies frente a otras bacterias lácticas (Torriani et al., 2001).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl. La mezcla de reacción consistía en 2 µl de DNA procedente de la micro extracción (Ruiz-Barba et al., 2005), tampón de Taq 1x, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 100 µM, primers PentF (5'-CAG TGG CGC GGT TGA TAT-3'), ParaF (5'-GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC-3') y pREV (5'-TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC-3') 1 µM, primer PlanF (5'-CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA-3') 0,12 µM, y 1 U de Taq polimerasa. El programa de amplificación consistía en 30 ciclos de 94 °C durante 30 s, 56 °C 10 s y 72 °C 30 s, junto con una desnaturalización inicial a 94° de 3 min y una extensión final de 72 °C por 5 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles al 1% de agarosa.

6.4. *GTG₅ rep-PCR*

Se empleó el primer *GTG₅* (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') y un protocolo previamente descrito (Gevers et al., 2001; Tamang et al., 2005). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l. La mezcla de reacción consistía en 2 μ l de DNA procedente de la micro extracción (Ruiz-Barba et al., 2005), tampón de Taq 1x, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 200 μ M, primer *GTG₅* 2 μ M, y 1 U de Taq polimerasa. El programa de amplificación consistía en 35 ciclos de 94 °C durante 30 s, 40 °C 1 min y 65 °C 8 min, junto con una desnaturalización inicial a 94° 30 s y una extensión final de 65 °C 16 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles al 1% de agarosa. 20 μ l de los productos de amplificación se analizaron por electroforesis a 70° durante 2 horas en geles del 1% de agarosa.

En el estudio presentado en el capítulo 3 se empleó esta técnica para seguir cepas inoculadas en aceitunas de mesa (ver fig. 1). En el estudio presentado en el capítulo 4 se usó esta técnica para comprar cepas de lactobacilos aislados de aceitunas de mesa previamente identificadas. Para ello se creó un dendograma usando un algoritmo UPGM (coeficiente de Pearson) mediante el análisis de las imágenes de los geles con el software BioNumerics (Applied Maths, version 4.0).

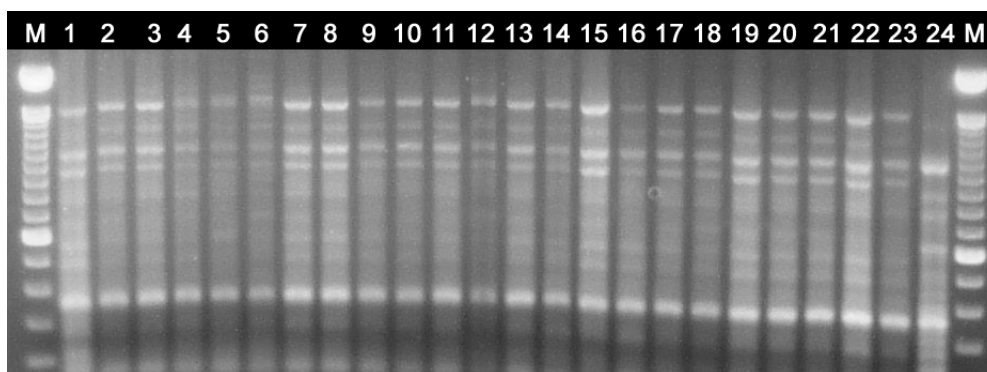


Figura 1. Perfil Rep-PCR *GTG₅* para 24 colonias de bacterias lácticas aisladas a los 7 días de haber inoculado un depósito de aceitunas arbequinas con las cepas *L. plantarum* V10A2 y *L. pentosus* 5E3A18. Las líneas 1-23 corresponden al perfil previamente asignado a la cepa *L. pentosus* 5E3A18, la línea 24 corresponde al perfil previamente asignado a la cepa *L. plantarum* V10A2 y la línea M corresponde al marcador de 100 pb de Invitrogen.

6.5. Identificación de levaduras mediante PCR-RFLP del fragmento 5.8s de ARN ribosomal más los ITS colindantes.

Esteve-Zarzoso et al. (1999) habían puesto a punto esta técnica para la identificación de levaduras vínicas. Recientemente se había aplicado a la identificación de cepas de levaduras aisladas en fermentaciones de aceitunas (Arroyo-López et al., 2006). La mezcla de amplificación usada para un volumen final de 50 µl fue la siguiente: 1 µl de la micro extracción de ADN (Ruiz-Barba et al., 2005); dNTPs 200 µM, cada primer 0,5 µM; MgCl₂ 1,5 mM; tampón de la Taq polimerasa 1x; Taq polimerasa 1U. Los primers usados fueron 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' y 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'. La amplificación consistía en una desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C seguida de 40 ciclos de amplificación que comprendían los pasos de desnaturalización de 30 s a 95°C, de “annealing” a 53°C durante 1 min y de extensión a 72 °C por 1 min, seguido de una extensión final de 10 min a 72 °C y posterior refrigeración a 4°C. Los productos de PCR se resolvieron en un gel con una concentración de agarosa del 1,2%.

La restricción de los productos de PCR se llevó a cabo “overnight” en un baño a 37°C en tubos eppendorf de 1,5 ml. La mezcla de reacción comprendía 1 U de la enzima correspondiente *CfoI*, *HaeI* (Roche Molecular Biochemicals) y *HinfI* (New England Biolabs), 1x del tampón de restricción de la enzima y 10 µl del producto de PCR en un volumen final de 20 µl. Los fragmentos de restricción se visualizaron en un gel del 3% de agarosa. Los perfiles de restricción junto con el producto de la PCR se compararon con los obtenidos de cultivos tipos depositados en la base de datos www.yeast-id.com (CSIC).

7. Identificación de genes de bacteriocinas mediante PCR específica

La mezcla de reacción de PCR consistía en 2 µl de la micro extracción de ADN (Ruiz-Barba et al., 2005); dNTPs 150 µM, cada primer 1 µM; MgCl₂ 2 mM; tampón de la Taq polimerasa 1x; Taq polimerasa 1U. Los primers usados junto con su temperatura de “annealing” se presentan en la tabla 1.

El programa de amplificación consistía en 30 ciclos de 94 °C durante 1 min, la temperatura correspondiente a cada primer °C 1 min y 72 °C 30 s, junto con una desnaturalización inicial a 94° 3 min y una extensión final de 72 °C 5 min. Los

productos de PCR se visualizaron en geles al 1% de agarosa.

Ben Omar et al., (2008) aplicó la técnica para detectar genes de bacteriocinas en aislados de *L. plantarum*. Los primers habían sido diseñados para *L. plantarum* pero dada la proximidad de la especie con *L. paraplantarum* y *L. pentosus*, el estudio se llevó a cabo con las tres especies. Los productos de amplificación de *L. paraplantarum* y de *L. pentosus* se purificaron usando el kit de purificación de ADN QIAquick (Quiagen) y se secuenciaron. Las secuencias fueron sometidas a una búsqueda por gemología BLASTN para verificar que las amplificaciones correspondían al gen deseado.

Tabla 1. Relación de primers usados para la detección de genes de plantaricinas mediante PCR específica.

Diana	Primers 5'→3'	“Annealing” (°C)	Referencia
<i>plnA</i>	F: GTA CAG TAC TAA TGG GAG R: CTT ACG CCA ATC TAT ACG	53	Diep et al. (1996)
<i>plnB</i>	F: TTC AGA GCA AGC CTA AAT GAC R: GCC ACT GTA ACA CCA TGA C	51,5	Diep et al. (1996)
<i>plnC</i>	F: AGC AGA TGA AAT TCG GCA G R: ATA ATC CAA CGG TGC AAT CC	49,5	Diep et al. (1996)
<i>plnD</i>	F: TGA GGA CAA ACA GAC TGG AC R: GCA TCG GAA AAA TTG CGG ATA C	53	Diep et al. (1996)
<i>plnEF</i>	F: GGC ATA GTT AAA ATT CCC CCC R: CAG GTT GCC GCA AAA AAA G	53,2	Diep et al. (1996)
<i>plnG</i>	F: TGC GGT TAT CAG TAT GTC AAA G R: CCT CGA AAC AAT TTC CCC C	52,8	Diep et al. (1996)
<i>plnI</i>	F: CTC GAC GGT GAA ATT AGG TGT AAG R: CGT TTA TCC TAT CCT CTA AGC ATT GG	52,5	Diep et al. (1996)
<i>plnJ</i>	F: TAA CGA CGG ATT GCT CTG R: AAT CAA GGA ATT ATC ACA TTA GTC	51	Diep et al. (1996)
<i>plnK</i>	F: CTG TAA GCA TTG CTA ACC AAT C R: ACT GCT GAC GCT GAA AAG	52,9	Diep et al. (1996)
<i>plnN</i>	F: ATT GCC GGG TTA GGT ATC G R: CCT AAA CCA TGC CAT GCA C	51,9	Diep et al. (1996)
plantaricina NC8	F: GGT CTG CGT ATA AGC ATC GC R: AAA TTG AAC ATA TGG GTG CTT TAA ATT CC	60	Maldonado et al. (2004)
plantaricina S	F: GCC TTA CCA GCG TAA TGC CC R: CTG GTG ATG CAA TCG TTA GTT T	60	Stephens et al. (1998)
plantaricina W	F: TCA CAC GAA ATA TTC CA R: GGC AAG CGT AAG AAA TAA ATG AG	55	Holo et al. (2001)

8. Estudio de la expresión de genes de bacteriocinas mediante RT-qPCR

Con este método se llevó a cabo la detección de la expresión génica de bacteriocinas que se presenta en el capítulo 4. Se diseñaron algunos primers más de los que allí se emplearon (ver tabla 2.2) con previsión de poder realizar futuros estudios con más cepas productoras de plantaricinas.

8.1. Extracción de ARN

El ARN se extrajo mediante el kit RNeasy Kit (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los pellets de cultivos de los que se tenía que extraer ARN se recuperaron mediante centrifugación y se congelaron con nitrógeno líquido. Si la extracción no se llevó a cabo en el mismo momento, las células se conservaron a -80 °C. El RNA purificado se disolvió en 50 µl en agua tratada con 0.1% DPC (dimethylpyrocarbonate). La concentración de ARN se calculó mediante medida de la absorbancia a 260 nm. Para ello se usó un espectrofotómetro Thermospectronic Genesys 10 UV (Thermo Fisher Scientific).

8.2. Diseño de primers para RT-qPCR

Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (NC_004567) del National Center for Biotechnology Information (NCBI). La secuencia del cluster de la bacteriocina S se obtuvo del *Lactobacillus plantarum* depositado en el NCBI con número de acceso Y15127.1 (Stephens et al., 1998). Los primers se diseñaron con una longitud entre 18 y 22 bases, una relación de contenido G/C por encima del 50% y una temperatura T_m sobre 60 °C. La relación de primers diseñados se presenta en la tabla 2. La longitud de los productos de PCR esperados oscilaba entre 83 y 122. Para el diseño de los primers se usó el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). El análisis de estructuras secundarias y de formación de dímeros se realizó con el programa Oligo Analyzer (Laboratorios Conda). Algunos primers previamente usados para la detección específica de genes de bacteriocinas que cumplieran con los requisitos de diseño se utilizaron también (ver tabla 2.2). El gen que codifica para la lactato deshidrogenasa de *Lactobacillus plantarum* se usó como control interno tomando los primers descritos en Fiocco et al. (2009).

8.3. Transcripción reversa y RT q-PCR

El ADN complementario se sintetizó usando el kit de reactivos TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante. La PCR RT qPCR se llevó a cabo en un volumen de 25 µl con una mezcla de 5 µl de cADN, 1 µl de cada primer a la concentración apropiada (ver tabla 2.2), 5,5 µl de agua libre de ARNasas y 12,5 µl de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Las

amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador ABI Prism 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) con un paso inicial a 95 °C de 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C 15 s, 60°C 1 min y 72 °C 30 s. Se añadió un paso adicional entre 90 y 60 ° C para determinar la curva de disociación así como verificar la especificidad de la reacción de PCR a tiempo real para cada par de primers. La eficiencia de las amplificaciones se calcularon con la fórmula $E=[10(1/s)-1] \times 100$, dónde s es la pendiente de la curva estándar creada con los valores de diluciones seriadas de cADN (Beltramo et al., 2006). Los valores umbrales los determinó automáticamente el instrumento. Los resultados se analizaron usando el método de comparación de umbrales críticos ($\Delta\Delta CT$) en que la cantidad de RNA diana se ajusta a un patrón (ARN diana interno) según el método descrito por Livak y Schmittgen (2001).

Tabla 2. Relación de primers usados para determinar la expresión de los genes de bacteriocinas.

Diana	Bacteriocina	Primers 5'→3'	Amplicón (pb)	Concentración en el mix de reacción (μM)	Referencia
ldhD	-	F: ACG CCC AAG CTG ATG TTA TAT C R: AGT GTC CCA CGA GCA AAG TT	107	0,5	Fioco et al., (2009)
<i>plnA</i>	plantaricina A	F: AAA ATT CAA ATT AAA GGT ATG AAG CAA R: CCC CAT CTG CAA AGA ATA CG	108	0,5	Este estudio
<i>plnB</i>	plantaricina B	F: CCA GAG CGG AGA ATT CAG AG R: GTA CAA CTA ACC CGC GCA AT	92	0,3	Este estudio
<i>plnC</i>	plantaricina C	F: AGCAGATGAAATTCGGCAG R: ATAATCCAACGGTGCAATCC	108	0,3	Diep et al. (1996)
<i>plnE</i>	plantaricina E/F (péptido plnE)	F: GTTTTAATCGGGGCGGTTAT R: ATACCACGAATGCCTGCAAC	85	0,3	Este estudio
<i>plnJ</i>	plantaricina J/K (péptido plnJ)	F: TAA GTT GAA CGG GGT TGT TG R: TAA CGA CGG ATT GCT CTG C	102	0,3	Este estudio
<i>plnK</i>	plantaricina J/K (péptido plnK)	F: TTC TGG TAA CCG TCG GAG TC R: ATC CCT TGA ACC ACC AAG C	97	0,3	Este estudio
<i>plnN</i>	péptido plnN	F: GCC GGG TTA GGT ATC GAA AT R: TCC CAG CAA TGT AAG GCT CT	102	0,3	Este estudio
<i>plsA</i>	plantaricina S (péptido plsA)	F: TCA GCA CCT TAT CGG ACT CTG R: ATG GTT GCC TTA CCA GCG TA	94	0,3	Este estudio

9. Cata de aceitunas de mesa

Para realizar la cata de aceitunas que se realizó en el estudio presentado en el capítulo 2, dado que no disponíamos de un panel de catadores entrenados, se preparó un test descriptivo con los principales atributos de la aceituna arbequina. Los panelistas indicaron su percepción sensorial para cada atributo en líneas de 10 cm de longitud,

siendo 0 atributo imperceptible y 10 percepción máxima del atributo (Meilgaard et al., 1991). Los atributos se distribuyeron en 3 grupos: a) color (manchas, marrón y verde), b) sabor (ácido, salado, amargo, dulce y desagradable) y c) textura (firmeza, crujido, dureza y separación pulpa/hueso). Para cada test se proporcionaron 4 aceitunas y entre muestras de aceitunas se dio a los panelistas bastoncitos de pan y agua para poder limpiar la boca del sabor anterior. Previamente se entrenó a los panelistas en la cata de aceitunas según el método descrito en las normas AENOR (1997a).

También se realizaron test triangulares (AENOR, 1997b) para determinar si existían diferencias sensoriales entre aceitunas preparadas según distintos procesos.

Bibliografía

- AENOR, 1997a. Análisis sensorial. Guía general para la selección, entrenamiento y control de jueces. Parte 1: Catadores (UNE 87024-1:1995; (ISO 8586-1: 1993). In: Análisis sensorial. Tomo I. Alimentación. Recopilación de Normas UNE. Ed. AENOR N.A., Madrid, España, pp. 216-240.
- AENOR, 1997b. Análisis sensorial. Metodología. Prueba triangular (UNE 87006:1992; (ISO 4120: 1983). In: Análisis sensorial. Tomo I. Alimentación. Recopilación de Normas UNE. Ed. AENOR N.A., Madrid, España, pp. 82-91.
- Amiot, M.J., Tacchini, M., Fleuriet, A., Macheix, J.J., 1990. Le processus technologique de désamérisation des olives: caractérisation des fruits avant et pendant le traitement alcalin. *Sciences Aliments*, 10, 619-631.
- Arroyo-López, F. N., Durán-Quintana, M. C., Ruiz-Barba, J. L., Querol, A., & Garrido-Fernández, A. (2006). Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology*, 23, 791-796.
- Beltramo, C., Desroche, N., Tourdot-Maréchal, R., Grandvalet, C. and Guzzo, J. 2006. Real-time PCR for characterizing the stress response of *Oenococcus oeni* in a wine-like medium. *Research in Microbiology*, 157, 267-274.
- Ben Omar, N., Abriouel, H., Keleke, S., Sánchez Valenzuela, A., Martínez-Cañamero, M., Lucas López R., Ortega, E. and Gálvez A. 2008. Bacteriocin-producing *Lactobacillus* strains isolated from poto poto, a Congolese fermented maize product, and genetic fingerprinting of their plantaricin operons. *International Journal of Food Microbiology* 127, 18-25.
- COI/OT/NC nº 1, Diciembre 2004, Norma comercial aplicable a las aceitunas de mesa, Consejo Oleícola Internacional
- Diep, D.B., Havarstein, L.S. and Nes, I.F., 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *Journal of Bacteriology*, 178, 4472-4483.
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M. and Böttger, E.C., 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic acids research*, 17, 7843-53.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5 8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 329-337.
- Fiocco, D., Collins, M., Muscariello, L., Hols, P., Kleerebezem, M., Msadek, T., and Spano, J. 2009. The *Lactobacillus plantarum* ftsH gene is a novel member of the ctsR stress response regulon. *Journal of Bacteriology*, 191, 1688-1694.
- Gevers, D., Huys, G. and Swings, J., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205, 31-36.
- Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S. and Nes, I.F., 2001. Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics, *Microbiology* 147, 643-651.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed.). Baltimore, MD: Williams and Wilkins Co.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25, 402-408.
- Maldonado, A., Jimenez-Diaz R. and Ruiz-Barba, J.L., 2004. Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism, *Journal of Bacteriology* 186, 1556-1564.
- Meilgaard, D., Civille, G.V. and Carr, B.T., 1991. *Sensory Evaluation Techniques*. Boca Raton CRC

Press.

- Rodas, A. M., Ferrer, S., & Pardo, I. (2003). 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic & Applied Microbiology*, 26, 412-422.
- Rozés, N. and Peres, C. 1996. Effect of oleuropein and sodium chloride on viability and metabolism of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 839-843.
- Ruiz-Barba, J.L., Maldonado, A., Jimenez-Diaz, R., 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Analytical Biochemistry*, 347, 333-335.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* from meat. *Applied and environmental Microbiology*, 55, 1901-1906.
- Stephens, S., Floriano, B., Cathcart, D.P., Bayley, S.A., Witt, V.F., Jiménez-Díaz, R., Warner, P.J. and Ruiz-Barba, J.L. 1998. Molecular analysis of the locus responsible for production of plantaricin S, a two-peptide bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1871-1877.
- Tamang, J.P., Tamang, B., Schillinger, U., Franz, C., Goresb, M. and Holzapfel, W.H., 2005. Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 347-356.
- Torriani, S., Felis, G.E., Dellaglio, F., 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Applied Environmental Microbiology*, 67, 3450-3454.