

# ESTANDARIZACIÓN DE UN INOCULO INICIADOR PARA LA FERMENTACIÓN DE ACEITUNAS NEGRAS NATURALES A ESCALA INDUSTRIAL



LÉPORE, César <sup>1</sup>; EDELSTEIN, Andrés <sup>1</sup>; VALDÉS, Benjamín <sup>1</sup>; WINCHEL Daiana <sup>1</sup>; LÓPEZ, Abel <sup>1</sup>

Institución: (1) Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA), Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, UNC.  
Ce: abglopez@efn.uncor.edu



**INTRODUCCIÓN:** Los procesos de fermentación son ampliamente utilizados en la industria alimentaria. Estos presentan una dinámica compleja, no son lineales y multivariados, y su cinética de reacción no es del todo conocida. La elaboración de aceitunas negras naturales es un ejemplo de esa práctica milenaria. Diversas variables pueden influir en el proceso de elaboración de este tipo de aceitunas, y que la interrelación entre ellas ocasiona gran dificultad a la hora de regularlas independientemente. Una de las estrategias para dirigir la fermentación es utilizar microorganismos que colonicen el medio para regular el proceso.

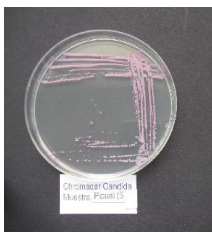
**OBJETIVO:** El objetivo de este trabajo fue elaborar un inóculo a escala industrial, a partir de microorganismos aislados de la fermentación espontánea de aceitunas negras, para ser empleados como iniciadores.

## MATERIALES Y MÉTODOS:

**ASLAMIENTO:** Para el aislamiento primario de las levaduras y la eliminación de la flora bacteriana se inocularon diluciones seriadas de la salmuera en el medio extracto de levadura-extracto de malta (LM) agar, su-plementado con 0,005 % (p/v) de sulfato de gentamicina y oxitetraciclina como agentes inhibidores de bacterias.

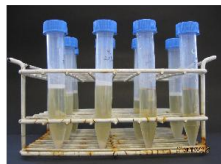
Para el aislamiento de bacterias ácido lácticas se utilizaron los frutos en el caldo MRS y a los desarrollos positivos se les realizó la prueba de la catalasa (inoculación del H202). Los que no tuvieron actividad catalasa fueron inoculados en agar MRS selectivo (con LiCl y propionato de sodio).

**INICIADORES:** Las cepas de bacterias ácido-lácticas (BAL) y *Pichia membranifaciens* fueron activadas de su crioconservación en caldos. Se utilizó MRS y tripticasa de soja (TSB) para las BAL que fueron incubadas 48 h a 32 °C en jarra de anaerobiosis. *P. membranifaciens* fue inoculada en caldo YM e incubada durante 72 h a 28 °C. Los tubos con desarrollo positivo fueron seleccionados para la transferencia a un medio de adaptación a la salmuera (salmuera fresca de aceitunas negras 100 mL, peptona de carne 1,125 g, extracto de levadura 0,25 g, glucosa 1,25 g). El recuento de células se realizó tomando una alícuota de 6 uL del caldo que fue observado en microscopio con cámara de Neubauer (400 x con contraste de fase). Las condiciones de cultivos fueron las mismas que enuncian anteriormente para las BAL y *P. membranifaciens*. Los medios con desarrollo positivo se transfirieron a un bioreactor con 2 L de salmuera fresca estéril y se incubó a 24 °C con agitación a 40 rpm durante 48 horas sin inyección de aire y en oscuridad. Para evaluar la viabilidad de las células del cultivo iniciador se inoculó 500 uL de todos los caldos (salmuera con aditivos y salmuera bioreactor) en agar MRS selectivo (con LiCl y propionato de sodio) a 32 °C durante 48 horas en anaerobiosis y en agar hongos y levaduras durante 72 h a 28 °C. Los tubos con desarrollo positivo fueron seleccionados para la transferencia a un medio de adaptación a la salmuera (salmuera fresca de aceitunas negras 100 mL, peptona de carne 1,125 g, extracto de levadura 0,25 g, glucosa 1,25 g). El recuento de células se realizó tomando una alícuota de 6 uL del caldo que fue observado en microscopio con cámara de Neubauer (400 x con contraste de fase). Las condiciones de cultivos fueron las mismas que enuncian anteriormente para las BAL y *P. membranifaciens*. Los medios con desarrollo positivo se transfirieron a un bioreactor con 2 L de salmuera fresca estéril y se incubó a 24 °C con agitación a 40 rpm durante 48 horas sin inyección de aire y en oscuridad. Para evaluar la viabilidad de las células del cultivo iniciador se inoculó 500 uL de todos los caldos (salmuera con aditivos y salmuera bioreactor) en agar MRS selectivo (con LiCl y propionato de sodio) a 32 °C durante 48 horas en anaerobiosis y en agar hongos y levaduras durante 72 h a 28 °C.



**Aislamiento:** Las levaduras aisladas fueron identificadas por biología molecular y congeladas en crioviales hasta su utilización. El mismo tratamiento se utilizó para las BAL.

**Activación:** Las cepas congeladas fueron "activadas" caldos.



**Desarrollo:** Las cepas desarrolladas fueron inoculadas posteriormente en salmuera aditivada en una dilución 1:9.

**Centrifugación:** Los microorganismos no sobrevivieron al proceso anterior. Se repitió la operación con los caldos específicos, se centrifugaron a 3000 RPM durante 15 min y se resuspendieron en la salmuera aditivada.



**Viabilidad:** Las cepas sobrevivieron al cambio de medio de cultivo (salmuera aditivada). Las levaduras se contaron en medio H y L. Las BAL en MRS selectivo.

**Bioreactor:** Se esterilizó salmuera fresca sin el agregado de glucosa ni peptona. Se inoculó 100 mL de la suspensión de levaduras e igual cantidad de LAB.



**Incubación:** Se cambiaron nuevamente las condiciones de incubación, se mantuvo la temperatura a 24 °C durante 48 horas con agitación en anaerobiosis.



**RESULTADOS:** Se observó un desarrollo lento de los cultivos de activación, y en la primera transferencia a la salmuera modificada no hubo desarrollo. Posteriormente, en el bioreactor se desarrollaron los microorganismos inoculados:  $9,26 \times 10^7$  para las BAL y  $3,1 \times 10^7$  para las levaduras.

**CONCLUSIONES:** Es viable la producción de inóculos en grandes volúmenes a partir de los microorganismos aisladas en la fermentación de aceitunas.

**AGRADECIMIENTOS:** Fondo de la provincia de Córdoba PIR FONBIO Res. MINCYT 000135/09 por la financiación del proyecto.