

Caracterización Microbiológica y Modelado del Proceso de Fermentación en la Producción de Aceitunas Negras Naturales

Álvarez Dolores M.E.^{1*}, Modesti Mario R.¹, Martínez Riachi Susana H.² y Lamarque Alicia L.^{2,3}

1: Facultad Regional Córdoba, Universidad Tecnológica Nacional (UTN-FRC). Maestro Marcelo López, esq. Cruz Roja Argentina, Córdoba.

2: Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales - UNC.

3. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA).

*e-mail: dalvarez@tecnicatura.frc.utn.edu.ar

Resumen: Los objetivos del trabajo fueron aislar y tipificar los microorganismos que intervienen en la fermentación de aceitunas negras naturales y desarrollar una red neuronal como herramienta predictiva del proceso. Los microorganismos se aislaron mediante medios de cultivo específicos. Las bacterias Gram negativas se tipificaron con la batería IMViC y las levaduras con el kit API 32 C AUX. El modelo que representa la dinámica del proceso se desarrolló por medio de una red neuronal con estructura "back propagation" entrenada con los datos físico-químicos del proceso. La flora microbiana estuvo compuesta fundamentalmente por levaduras, de las cuales se identificaron *Candida lambica* y *Pichia farinosa*. Se descartó la presencia de las bacterias Gram negativas *Escherichia sp*, *Klebsiella sp* y *Salmonella sp*. El modelo neuronal obtenido permite, con los datos experimentales empleados para entrenar la red, simular el proceso fermentativo.

Palabras clave: Aceitunas negras naturales, aislamiento y tipificación de microorganismos, red-neuronal

Microbiological Characterization and Modeling of the Fermentations Process in Natural Black Olives Production

Abstract: The aims of the work were to isolate and typify the microorganisms from natural black olives fermentation and to develop a neural system as a predictive tool of the process. Microorganisms were isolated by specific culture media. Gram negative bacteria were typified with IMViC and yeasts with API 32 C AUX battery kits. The model that represents the dynamics of the process was developed by a neural system with back propagations structure and trained with the physico-chemical data of the process. The microbial flora consisted mainly of yeast of which *Candida lambica* and *Pichia farinosa* were identified. Gram negative bacteria *Escherichia sp*, *Klebsiella sp* y *Salmonella sp* were not detected. The neural network model obtained allows, with the experimental data used as network trainer, the fermentative process simulation.

Keywords: Black natural olives, isolation and classification of microorganisms, neural network.

INTRODUCCIÓN

Los procesos de fermentación son ampliamente utilizados en la industria alimentaria. Estos presentan una dinámica compleja, son no lineales y multivariados, y su cinética de reacción no es del todo conocida. En la práctica suelen presentarse cambios en las condiciones iniciales, variación de parámetros de proceso, perturbaciones externas y demás variaciones no contempladas en el modelo, lo que ocasiona que su control sea dificultoso. Como contrapartida, el

control de este tipo de procesos repercute en beneficios económicos sustanciales.

La producción de aceitunas negras naturales es un ejemplo de procesos biotecnológicos. El olivo, luego de ser recolectado, es incorporado a la salmuera de fermentación, la que evoluciona por acción de microorganismos presentes en él.

Es conocido que 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.

Al momento, esta regulación se lleva a cabo de forma subjetiva, en base a la experiencia del personal técnico involucrado, quienes han aprendido a asociar los parámetros sensoriales del fruto con los resultados provenientes de análisis físico-químicos llevados a cabo en el laboratorio. Por otro lado, actualmente existe escasa información sobre la ecología, bioquímica y biología molecular de los microorganismos que intervienen en la fermentación de este tipo de aceitunas.

Los objetivos del trabajo fueron aislar y tipificar los principales microorganismos presentes en la salmuera y desarrollar, con los datos físico-químicos disponibles, una red neuronal como herramienta predictiva de la evolución de la fermentación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo con frutos de olivo provenientes de Cruz del Eje, Córdoba. Las muestras de salmuera y aceitunas se tomaron desde fermentadores alimentados con aire con caudales de 0.25 l/h/l de salmuera durante 8 h/día (Álvarez et al., 2003). Para los ensayos físico-químicos y microbiológicos se tomaron muestras de salmuera a intervalos regulares de tiempo, mientras que las de aceitunas se efectuaron al inicio y final del proceso.

Aislamiento y tipificación de microorganismos

Bacterias Gram negativas: Para el aislamiento y recuento se utilizó el medio selectivo eosina-azul de metileno (EMB) agar cultivándose a 37 °C durante 48 horas. Se utilizó la tinción de Gram para determinar la morfología bacteriana y las pruebas bioquímicas IMViC (Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer y Citrato) para la identificación de aislamientos sospechosos (bacterias fermentadoras de la lactosa en EMB) observado durante los primeros días de la fermentación.

Levaduras: 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, suplementado con 0,005 % (p/v) de sulfato de gentamicina y oxitetraciclina como agentes inhibidores de bacterias. Las placas se incubaron aeróbicamente en oscuridad a 25 ± 2 °C durante 72 horas. Las colonias desarrolladas en LM agar que mostraron variación en la apariencia macroscópica fueron seleccionadas para su identificación. Se utilizó azul de metileno para determinar la morfología micros-

cópica. La tipificación se realizó mediante métodos bioquímicos utilizando el sistema API 32 C AUX de asimilación de azúcares, siguiendo las indicaciones del fabricante (bioMérieux, Francia). Las ampollas del API C Suspensión Medium fueron inoculadas con células de las levaduras aisladas previamente. La suspensión resultante fue ajustada a 2 en la escala de turbiedad de Mc Farland (bioMérieux). Se transfirió 250 µl de la suspensión precedente a una ampolla del medio semisólido API C Medium. Las bandejas inoculadas fueron incubadas a 30 °C durante 72 horas. Los pocillos que mostraron turbiedad similar al control positivo fueron considerados positivos.

La identificación fue realizada por comparación con el índice de perfiles analíticos del sistema API (Muir and Pritchard, 1997). La morfología y esporulación fue investigada como sugiere el fabricante y fue determinada en el medio agar acetato de McClary Clary et al., (1959).

Desarrollo del modelo de fermentación

El modelo que representa la dinámica del proceso se desarrolló por medio de una red neuronal con estructura "back propagation" entrenada con la información disponible y relevada experimentalmente en la Tabla I. Este tipo de modelo fue aceptado en procesos de fermentación por otros autores (Peroni, 2002), donde se requiere de un modelo para proceder al control del proceso.

Como entrada de la red se consideró la matriz de datos compuesta por las variables del proceso (180x6 elementos): variación de pH, porcentajes de acidez libre, NaCl (Garrido Fernández et al., 1997), azúcares reductores (método de Lane Eynon) y concentración de CO₂ determinada de acuerdo a Fernández Diez et al., (1985). A su vez, se consideraron las temperaturas ambiente media y amplitud térmica de la región. En relación a esta última variable, se trabajó específicamente con el arco térmico producido en la jornada muestreo, sea definida Arco de temperatura = $T_{max} - T_{min}$.

El color superficial del fruto se midió en un espectrofotómetro Minolta Chroma 508d. Se efectuaron cinco destellos sobre la superficie de la aceituna entera (3 frutos por fermentador) a fin de obtener valores representativos. El parámetro registrado fue porcentaje de reflectancia a 700 nm. La dureza de las aceitunas se cuantificó mediante una prensa a la que se acopló una celda de compresión cizallamiento.

La dureza del fruto se considera como la fuerza

Días	pH	%Acidez	%NaCl	% Az. Red.	%CO ₂	T Prom. (°C)	Arco T.	Dureza (kg/100g)	Color (% ref.)
0	3,90	0,20	9,01	0,15	0,00	15,20	9,60	62,97±11,03	41,3±21,3
7	4,30	0,13	7,84	0,23	97,00	16,80	19,60		
21	3,90	0,36	7,49	0,15	97,00	21,80	11,60		
35	4,00	0,34	7,96	0,05	90,00	10,90	10,20		
49	4,10	0,38	6,90	0,15	77,00	10,00	16,20		
66	4,20	0,32	7,61	0,10	62,00	13,00	14,00		
79	4,30	0,42	7,96	0,15	68,00	22,95	11,10		
92	4,00	0,44	7,72	0,15	70,00	11,70	18,60		
114	4,00	0,44	7,30	0,10	75,00	12,25	18,90		
124	4,00	0,41	7,10			12,85	22,50		
135	4,10	0,36	7,00	0,10	66,00	16,65	14,90		
150	4,10	0,49	7,20	0,05	57,00	19,10	16,20		
165	4,00	0,59	7,80	0,05	22,00	21,70	19,00		
178	3,90	0,68	6,70	0,05	35,00	20,15	17,30	11,54±5,87	38,5±7,42

Tabla I: Datos físico-químicos utilizados para el entrenamiento de la red neuronal

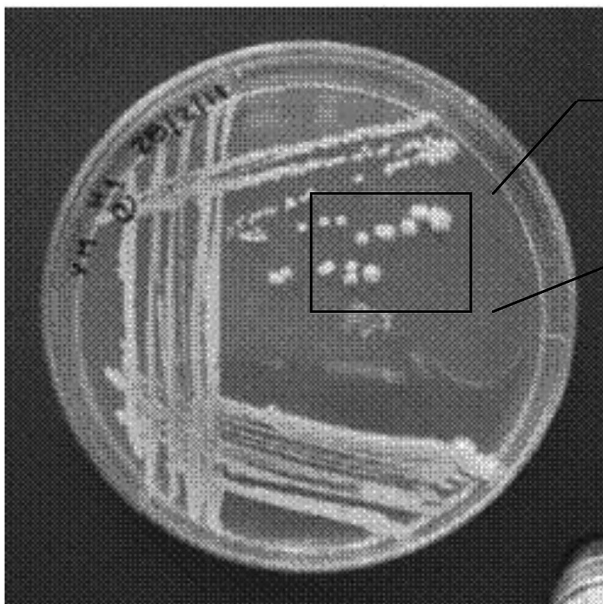


Figura 1a: Análisis macroscópico de colonias de levaduras

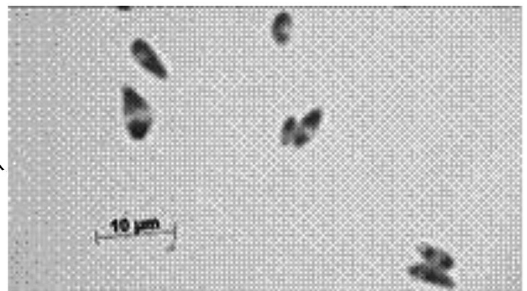
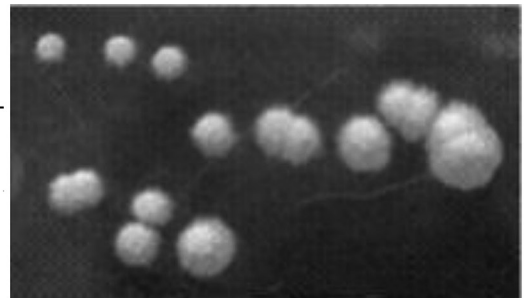


Figura 1b: Análisis microscópico de colonia de levaduras. Muestra teñida con cristal violeta.

máxima alcanzada durante el ensayo. El valor obtenido para cada muestra analizada se calculó como la media de 10 determinaciones y se expresó en kg fuerza/100 g de fruto.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron estadísticamente mediante análisis de Varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y tipificación de microorganismos

A lo largo del proceso se detectó la presencia de levaduras y bacterias Gram negativas y ácido lácticas. Las bacterias Gram negativas estuvieron presentes desde el comienzo y hasta el segundo mes de fermentación, descartándose la presencia de *Escherichia* sp, *Klebsiella* sp y *Salmonella* sp.

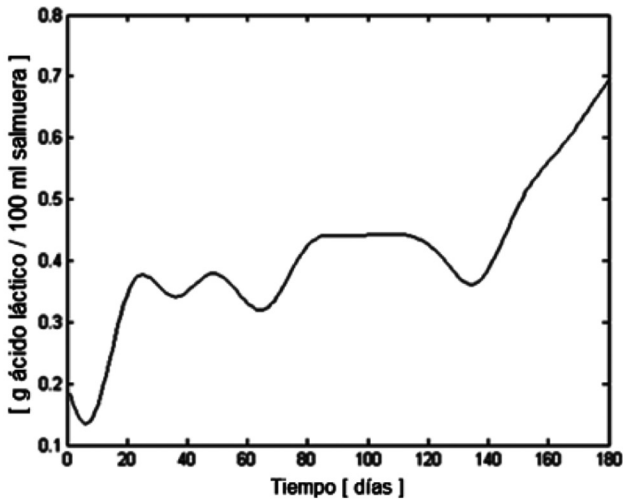


Figura 2a:
Porcentaje de Acidez

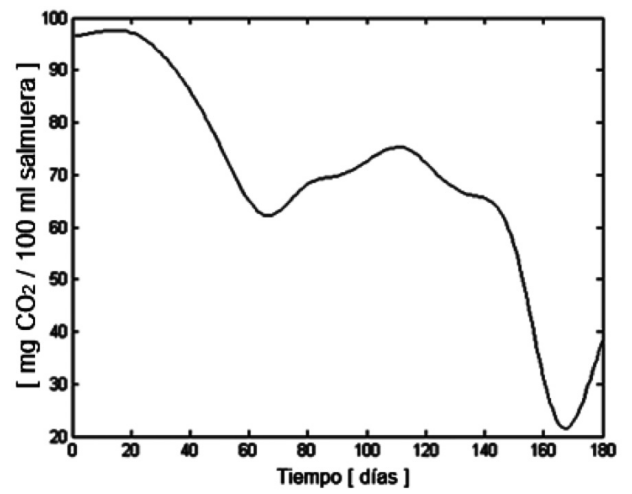


Figura 2d:
Concentración de CO₂

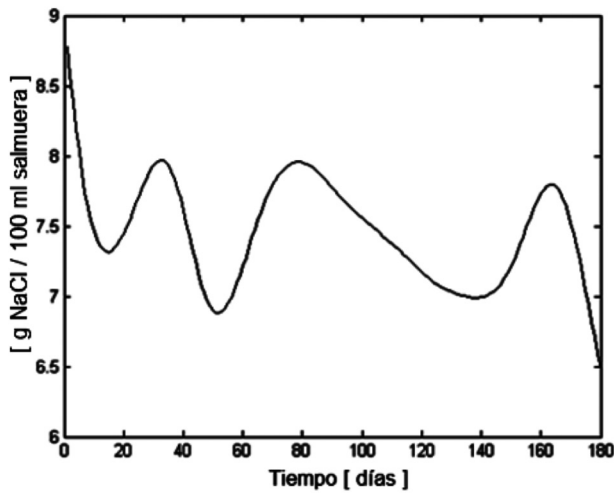


Figura 2b:
Porcentaje de NaCl

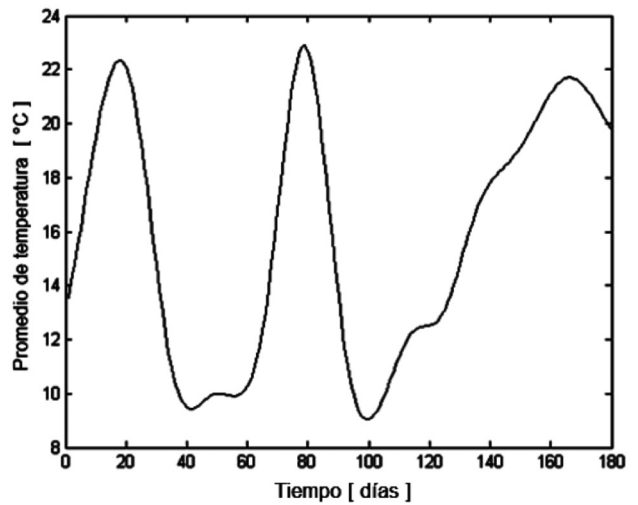


Figura 2e:
Promedio de temperatura

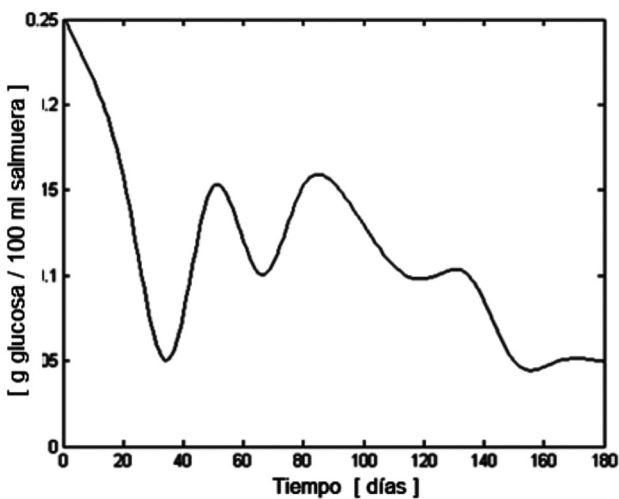


Figura 2c:
Concentración de Az. reductores

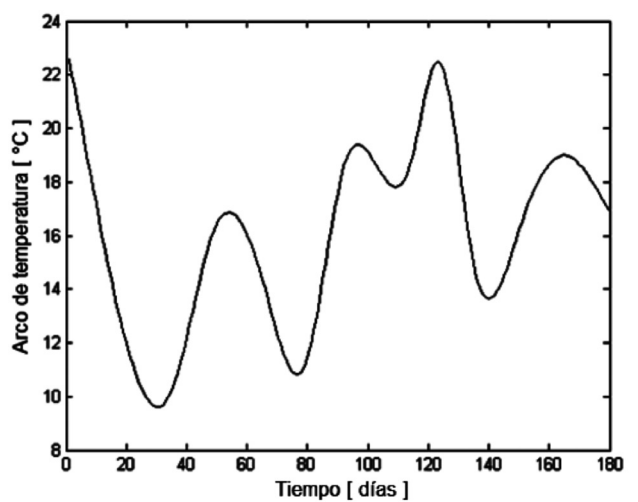


Figura 2f:
Arco de temperatura

En relación a las levaduras, y como consecuencia de la observación de sus características macroscópicas diferenciales en el microscopio (Figuras 1a y 1b), se presumió la presencia de 10 géneros distintos y se pudieron identificar *Candida lambica* y *Pichia farinosa*.

Estos géneros han sido informados por otros autores en las salmueras de fermentación de aceitunas negras naturales en cultivares griegos (Balatsouras, 1967) y españoles (González Cancho et al., 1975). Además, otros investigadores informaron específicamente que cuando las aceitunas se fermentaron en presencia de aire las especies presentes fueron *Candida saitoana*, *Debar-yomyces hansenii* y *Pichia membranifaciens*, entre otras (Durán Quintana et al., 1986).

Desarrollo del modelo de fermentación

Las Figuras 2 (a-f), muestran las diferentes variables de entrada interpolada para 180 días de fermentación.

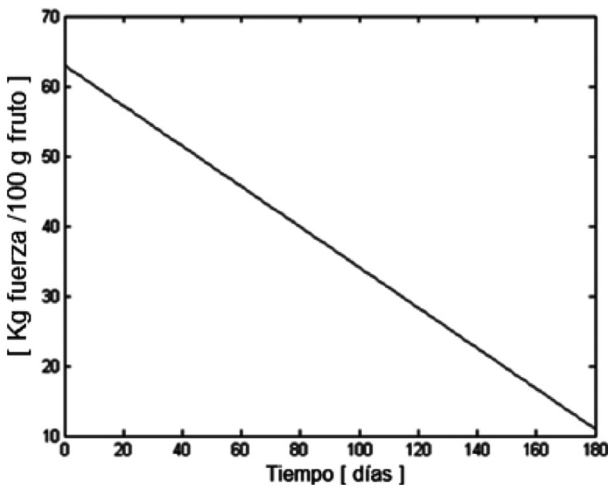


Figura 3a: Dureza

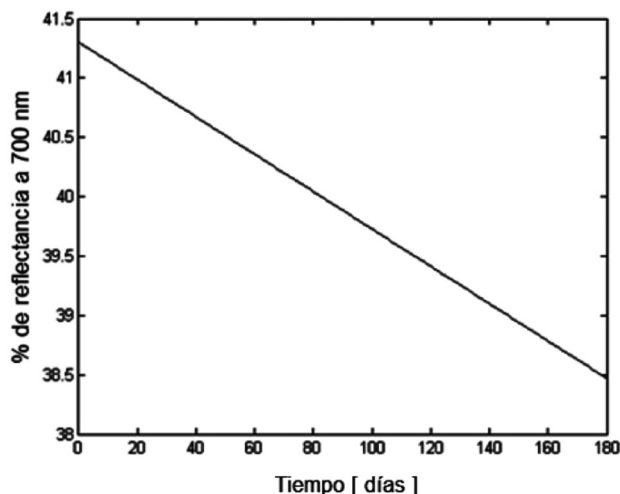


Figura 3b: Color

La salida de la red se conformó a través de la matriz de datos correspondientes a las variables dureza y color (180x2 elementos) consideradas parámetros de calidad para el producto (Figuras 3 a y b). La interpolación se realizó con el mismo criterio aplicado para las entradas.

En la figura 4 se observa la estructura de la red neuronal obtenida. Esta red está constituida por una capa con función de transferencia sigmoideal y una capa con función de transferencia lineal y fue entrenada hasta obtener un error del orden de 10⁻⁶.

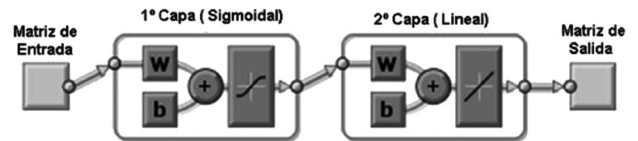


Figura 4: Estructura de la red neuronal

Implementación del modelo neuronal

Se obtuvo un modelo neuronal backpropagation (Hilera y Martínez, 1995) con los siguientes valores para las matrices de ponderación:

$$W_1 = [0.4377 \quad 0.5979 \quad -0.6202 \quad -0.0771 \quad 0.2132 \quad 0.7803 \quad 0.6050]$$

$$b_1 = 0$$

$$W_2 = []$$

$$b_2 = \begin{bmatrix} 0.1655 \\ 0.7099 \end{bmatrix}$$

$W_2 = []$ significa que la matriz aloja el resultado de la primera capa de la red.

Este modelo representa la dinámica del proceso de fermentación planteado, que propone las respuestas de color y dureza de las Figuras 3 para las variables de proceso de las Figuras 2, lo que significa que permite simular, con el orden de error obtenido y para los valores experimentales utilizados como entrenador de la red, el proceso mismo.

CONCLUSIONES

El conocimiento de los micro-organismos presentes en el proceso fermentativo durante la elaboración de aceitunas negras naturales es de fundamental importancia para su posible aplicación como cultivos iniciadores de la fermentación.

Por otra parte, el uso de redes neuronales como una herramienta para obtener un modelo que permita al operador conocer la evolución de la fermentación y controlar las variables físico-químicas y microbiológicas del proceso es de gran importancia en las industrias elaboradoras de aceitunas de mesa.

Asimismo, y dada la complejidad del proceso, es conveniente continuar el entrenamiento de la red neuronal propuesta con otros parámetros que inciden sobre la calidad del producto, a los fines de incrementar su capacidad predictiva.

Algunos parámetros que pueden considerarse de importancia son, por ejemplo, los vinculados a las características de los frutos que se incorporan a los fermentadores (índice de madurez, relación pulpa/hueso, etc.), y aquellos relacionados a las condiciones del proceso (relación kg de fruto/litros de salmuera, diferentes concentraciones de NaCl y caudal de aire, utilización de inóculos iniciadores de la fermentación, etc.).

A su vez y a fin de definir el final de la fermentación, otro parámetro a considerar en el entrenamiento de la red neuronal sería la evolución de alguno de los compuestos fenólicos, como la oleuropeína, que le otorgan el amargor al fruto y que disminuyen a medida que evoluciona la fermentación.

Este trabajo es de particular interés ya que brinda sustento científico y tecnológico en la elaboración de un producto clave para el crecimiento del noroeste de Córdoba.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a las instituciones y empresas que hicieron posible este trabajo a través de diferentes programas, a detallar:

Programa de becas de la Universidad Tecnológica Nacional.

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCYT).

Fondo Biotecnológico de Córdoba (FONBIO), Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba.

Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC)

Empresa Cuenca del Sol S.A.

REFERENCIAS

Álvarez, D. M. E., Sánchez, A., Lamarque, A. L., (2003). "Aceitunas negras al natural. Estudio comparativo de tres procesos fermentativos de frutos de la variedad Farga", *Olivae*; 97, 47-51.

Mc Clary, D. O., Nulty, W. L. and Miller, G. R., (1959). "Effect of potassium versus sodium in the sporulation of *Saccharomyces*", *Journal of Bacteriology*; 78, 362-368.

Balatsouras, G. D., (1967). "Processing the naturally ripe black olives. Proceedings of the international olive oil seminar", *International Olive Oil Council, Perugia-Spolete-Italy*, 491-510.

González Cancho, F., Nosti Vega, M., Durán Quintana, M. C., Garrido Fernández, A. y Fernández Díez, M. J., (1975). "El proceso fermentativo de las aceitunas negras maduras en salmuera", *Grasas y Aceites*; 26, 297-309.

Fernández Díez, M. J., De Castro y Ramos, R., Garrido Fernández, A., Gonzales Cancho, F., Pellisó Gónzales, F., Nosti Vega, M., Heredia Moreno, A., Mínguez Mosquea, M. I., Rejano Navarro, L., Durán Quintana, M. C., Sánchez Roldán, F., García García, P., Castro Gómez Millin, A., (1985). "Biotecnología de la aceituna de mesa", Primera edición, Unidad de Investigación de Química, Microbiología y Tecnología de aceitunas de mesa y otros productos vegetales. Instituto de la Grasa y sus derivados. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, España, 387-453.

Durán Quintana, M. C., García García, P. y Garrido Fernández, A., (1986). "Fermentación en medio aeróbico de aceitunas maduras en salmuera con inyección alternante de aire. Estudio de la influencia de la adición de cloruro cálcico sobre la textura", *Grasas y Aceites*; 37, 242-249.

Hilera, J. R. y Martínez, V. J., (1995). "Redes neuronales artificiales, fundamentos, modelos y aplicaciones", Addison-Wesley Ibero-americana, RA-MA, 131-154.

Garrido Fernández, A., Fernández Díez, M. J. and Adams M. R., (1997). "Table Olives. Production and Processing", Chapman and Hall, England.

Muir, D. B. and Pritchard, R. C., (1997). "Use of the BioMérieux ID 32 C yeast identification system for identification of aerobic actinomycetes of medical importance", *Journal of Clinical Microbiology*; 35: 3240 - 3243.

Peroni, C. V., (2002). "Optimization and Control of fed-batch fermentation processes by using artificial neural systems", Thesis (Ph. D. en Ingeniería Química), Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, España, 69-74.