

RECURSOS GENÉTICOS MICROBIANOS PARA LA INDUSTRIA OLIVÍCOLA DE LA PROVINCIA DE MENDOZA (ARGENTINA)

Sfreddo, E. S.¹; Sánchez, M.L.; Nacif, N.; André, S.; Dediol, C.; Ferrer, L.; Farrando, S.; Dotto A.

RESUMEN

La creación de ceparios de bacterias autóctonas es considerada de gran importancia a nivel mundial. Las bacterias lácticas son de difícil preservación. La liofilización es recomendada para su mantenimiento a largo plazo. Las aceitunas verdes fermentadas constituyen el tercer producto exportable de la provincia de Mendoza (Argentina). Las reglas del mercado global exigen productos de calidad genuina y uniforme en el tiempo por lo que se recomienda el agregado de inoculantes lácticos seleccionados en la región de aplicación. Previo a su selección, se aislaron cepas autóctonas aisladas de aceitunas verdes en fermentación de la variedad Arauco de las dos zonas geográficas de mayor producción en Mendoza, realizadas a temperaturas medias y bajas, que pertenecen al cepario de importancia regional creado por la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la provincia de Mendoza. La identificación preliminar de los aislados se realizó en base a sus caracteres fenotípicos. Se encontraron diferencias entre las cepas aisladas en una misma región a diferentes temperaturas y entre las zonas en estudio. Se establecieron las mejores condiciones para su mantenimiento por liofilización.

PALABRAS CLAVE: aceitunas verdes, bacterias lácticas, ceparios, fermentación, liofilización.

SUMMARY

MICROBIAL GENETIC RESOURCE FOR OLIVE INDUSTRY AT THE PROVINCIA DE MENDOZA (ARGENTINA)

The creation of collections of native bacteria is considered of great importance at world-wide level. The lactic bacteria are difficult to preserve. The liofilización is recommended for its maintenance in the long term. The fermented green olives constitute the third exportable product of Mendoza (Argentina). The rules of the global market demand products genuine with uniform quality in the time. For this reason the aggregate of selected lactic starters in the application region is recommended. Previous to their selection, were isolated native lactic acid bacteria from green olives in fermentation of the variety Arauco of the two geographic zones of greater production in Mendoza, made to medium and low temperatures. These bacteria belong to the collection of regional importance created by the Cátedra de Microbiología of Facultad de Ciencias Agrarias (Mendoza). The preliminary identification of the isolated was made on the basis of its phenotypic characters. Were differences between the isolated bacteria in a same region to different temperatures and between the zones in study. The best conditions for their maintenance by liofilización settled down.

KEY WORDS: green olive, lactic acid bacteria, strain collection, fermentation, freeze-dry.

¹Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias. Departamento de Ciencias Enológicas y Agroalimentarias. Cátedra de Microbiología. Alte Brown 500. (M5528AHB) Chacras de Coria. Mendoza. Argentina.
E-mail: esfreddo@fca.uncu.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La importancia de preservar los recursos genéticos para el futuro ha resultado en un incremento del número de colecciones de cultivos microbianos (Hawksworth, 1988; Krichevsky *et al.*, 1988). Las bacterias lácticas son difíciles de mantener viables durante su almacenamiento en condiciones de refrigeración o congelamiento (Peters & Steneryd, 1993). La liofilización es un método muy usado para preservar microorganismos porque la viabilidad a largo plazo es excelente en la mayoría de los casos. Los requerimientos de distribución y conservación son simples por lo que permite la obtención de un producto desecado de baja masa que puede ser enviado y reconstituido por rehidratación en el punto de uso. (Zhai *et al.*, 2003). La viabilidad de una cepa puede mantenerse por más de 20 años si la concentración de células es de 10^6 - 10^{10} células por mililitro antes de liofilizar. (Miyamoto *et al.*, 2000). Se han usado varios crioprotectores para atenuar los daños producidos por congelamiento como glicerol (Castro H. *et al.*, 1997; Costa E. *et al.*, 2000; Fonseca F. *et al.*, 2003; Wolff B *et al.*, 1990), gelatina (Champagne *et al.*, 1996), leche descremada (Castro H. *et al.*, 1997), trehalosa (Castro H. *et al.*, 1997; Zayed G. y Roos Y, 2003; Fonseca F. *et al.*, 2003; Conrad P *et al.*, 2000), aminoácidos (Font de Valdéz *et al.*, 1983). Las diferencias mostradas en la supervivencia de las células indican que ciertos aditivos son más efectivos que otros en la protección de bacterias lácticas sujetas a liofilización (Font de Valdéz, 1983; Teixeira H *et al.*, 1995).

La colección de cultivos microbianos de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agrarias (Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina) comenzó a formarse a partir del año 1949. Desde 1998 integra la Red Nacional de Colecciones de Cultivos Microbianos (RACCUM). Actualmente forma parte de la creación de la Federación de Colecciones de Cultivos y Serotecas para América Latina y el Caribe (FELACC). Dada la importancia vitivinícola y agroalimentaria de nuestra región, desde 1995 nuestro Laboratorio se encuentra involucrado en proyectos de investigación relacionados al estudio de microorganismos ecotípicos.

Las aceitunas de mesa constituyen el producto vegetal más importante del mundo occidental. La fermentación de aceitunas verdes es un tema abordado desde diferentes puntos de vista, ya sea desde su conservación en salmuera (Garrido Fernández, 1997) como desde su composición y su valor nutritivo (Vázquez Ladrou, 1979). Se ha estudiado la ecología microbiana sobre la variedad Manzanilla a temperaturas medias (González Cancho, 1963; de la Borbollá y Alcalá & Rejano Navarro, 1979; Vaughn, 1982;

Fernández Díez *et al.*, 1985, González Cancho & Durán Quintana, 1981; Garrido Fernández *et al.*, 1997) y sobre aceitunas negras elaboradas en forma tradicional o con modificaciones en el proceso de fermentación típico (García García, 1982; González Cancho, 1975). La provincia de Mendoza es la primera productora de aceitunas verdes fermentadas de la Argentina (70 %). La principal variedad destinada a este tipo de elaboración es la Arauco. Debido a que se cosecha a partir de mediados de marzo y hasta los primeros días de mayo, la fermentación transcurre a una temperatura media entre 5 °C -15 °C. Los estudios citados se realizaron en fermentaciones de aceitunas de diversas variedades que se cosechan y elaboran en la época de verano. No se han encontrado referencias sobre el estudio microbiológico de aceitunas verdes que se fermenten a bajas temperaturas y mucho menos para la variedad Arauco.

En la actualidad la industria de alimentos fermentados demanda productos de calidad uniforme en el tiempo para lo cual es recomendable el agregado de inoculantes seleccionados. En el mercado existen estarters de origen extranjero que no siempre se adaptan a las condiciones ambientales de las fermentaciones locales lo que conduce a la necesidad de seleccionar cepas de microorganismos indígenas con carácter competitivo, dominante y que otorguen características organolépticas propias del producto local. Para este propósito, es imprescindible contar con una colección de cultivos originada en la región de aplicación.

El objetivo del presente trabajo fue la creación de un cepario regional de referencia de bacterias lácticas aisladas de fermentaciones de aceitunas verdes provenientes de dos zonas geográficas distintas ubicadas dentro del área de mayor producción de la provincia de Mendoza, Rivadavia y Maipú (Argentina) para encontrar diferencias en la ecología microbiana y para posteriores estudios de investigación y de uso como inoculantes industriales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Se emplearon aceitunas verdes provenientes de los Departamentos de mayor producción de Mendoza, Rivadavia y Maipú. Las aceitunas se cosecharon en verde en un estado de madurez óptimo para su elaboración.

Proceso de fermentación

Se realizaron doce microfermentaciones de las aceitunas de los dos orígenes geográficos, por triplicado, en bioreactores de plástico de 7,5 kg de capacidad con una

proporción frutos/salmuera igual a 2:1. Las aceitunas fueron desamarizadas previamente con una solución de NaOH al 2,5% hasta penetración de las $\frac{3}{4}$ partes de la pulpa con el fin de eliminar al glucósido oleuropeína. Se eliminaron los productos de la hidrólisis con tres lavados con agua corriente de 6, 12 y 4 hs, respectivamente. Los frutos se cubrieron con una solución inicial de 6% NaCl. Durante la fermentación la salmuera se mantuvo en un 5% NaCl por agregados posteriores de la sal. Seis de los bidones se incubaron a temperaturas entre 8°C - 15°C y los otros seis a 25°C.

Aislamiento de bacterias

Se tomaron muestras de salmueras en forma periódica. Las bacterias lácticas se aislaron en agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe, 1960) marca Britania (Argentina). Las placas se incubaron a 30°C en anaerobiosis. De aquellas dos placas conteniendo entre 30 y 300 colonias, se aislaron cinco colonias y se purificaron dos veces en el mismo medio de cultivo. Se registró el aspecto de las colonias y de las células teniendo en cuenta a los criterios establecidos en *Bergey's of Systematic Bacteriology* (1986) para la identificación de bacterias lácticas. Se eligieron a todas las cepas Gram positivas y catalasa negativas.

Identificación de las cepas aisladas

Se estudiaron las cepas aisladas en agar MRS sometidas a las siguientes observaciones o tests bioquímico-fisiológicos, previo crecimiento en caldo MRS durante 12 hs: forma, movilidad, carácter homo o heterofermentativo, hidrólisis de arginina, crecimiento en bilis al 40%, crecimiento a 5°C, 10°C, 37°C, 40°C y

45°C, tolerancia al 4.0, 6.5 y 8.0 % de NaCl, producción de dextranos, crecimiento a pH 9.2 y 9.6, producción de pigmentos y coagulación de la leche. Se adicionaron los resultados de la fermentación de azúcares indicados en *The Prokaryotes* (1986) y en *The Prokaryotes* (online) para las bacterias lácticas.

Los caracteres analizados se tuvieron en cuenta para lograr una discriminación a nivel de cepas entre las bacterias aisladas con forma de coco a cocoide. Se realizó un análisis multivariado de los caracteres evaluados y se construyó una matriz de similitud utilizando el coeficiente de Simple Matching. El agrupamiento de las cepas se realizó con el algoritmo UPGMA del programa NTSYS. Para el agrupamiento a nivel de géneros se tuvieron en cuenta los criterios recomendados por Carr *et al.* (2002). Los análisis se realizaron para las cepas aisladas de todos los bidones fermentados a las dos temperaturas consideradas y de los dos Departamentos estudiados.

Las cepas de lactobacilos se sometieron en primer lugar a la prueba de fermentación de azúcares de acuerdo a Sharpe (1979) usando placas de microtitulación estériles. Soluciones estériles de los siguientes azúcares, de acuerdo a *The Prokaryotes* (1986) y a *The Prokaryotes* on line: esculina, galactosa, rafinosa, trehalosa, melibiosa, xilosa, celobiosa, amigdalina, sacarosa, sorbitol, arabinosa, melezitosa, manitol, 2-ceto-gluconato, maltosa y ribosa se obtuvieron por filtración a través de filtros de 0,22 µl de diámetro (Millipore Filter Corp., Bedford Mass, U.S.A.). Se adicionaron al medio basal (caldo MRS sin extracto de carne y sin glucosa conteniendo 0,0004% (p/v) de púrpura de bromocresol como indicador) hasta una concentración final de 2 % (p/v). Las cepas a testear se centrifugaron a 10000 r.p.m. y se lavaron dos veces con solución fisiológica estéril. Luego se resuspendieron en el mismo medio hasta una concentración de 2 en la escala Mac Farland. En cada perforación de las placas se colocaron 20 µl de las suspensiones de las cepas a testear. Se les adicionaron 100 ml del medio basal con los distintos azúcares y se sellaron con 100 µl de vaselina estéril. Las placas se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 30°C por 2 días. Se construyeron dendogramas en base al perfil de fermentación de las cepas de *Lacto bacillus* aisladas a 15°C y a 25°C.

Para el análisis de las cepas aisladas se usaron las siguientes cepas de referencia: *Enterococcus faecalis* CECT 184, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CECT 188, *Lactobacillus brevis* CECT 216, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. CECT 219, *Lactobacillus plantarum* CECT 220, *Lactobacillus fermentum* CECT 285, *Pediococcus pentosaceus* CECT 923, *Enterococcus faecium* CECT 964, *Enterococcus casseliflavus* CECT 969, *Lactobacillus pentosus* CECT 4023 y *Lactobacillus casei* CECT 4040.

Cepas a liofilizar

Se consideraron 50 cepas representativas de las fermentaciones de aceitunas verdes de la variedad Arauco del Departamento Rivadavia y 50 cepas de las fermentaciones del Departamento Maipú. Los cultivos originales se conservan congelados a -20 °C en glicerol al 10% adicionado a una mezcla de leche descremada, extracto de levadura y glucosa. El stock de cultivos se mantuvo en tubos inclinados con agar MRS.

Proceso de liofilización:

Los cultivos stock se sembraron en caldo MRS y se incubaron en estufa a 28°C. Al final de la fase logarítmica, las células se cosecharon por centrifugación a 5000 r.p.m.

durante 10 minutos y luego se lavaron dos veces con solución de NaCl 0,9%. Las suspensiones salinas se mantuvieron 1 hora a temperatura ambiente. Como agentes protectores se estudiaron trehalosa 5%, gelatina 2% y trehalosa 2.5% + gelatina 1%, adicionados a leche descremada al 11%. La liofilización de los cultivos se llevó a cabo en un liofilizador THERMOVAC. Las muestras de las suspensiones de bacterias se colocaron en porciones de 0.25 ml en ampollas de vidrio de 2 ml de capacidad y se adicionó la misma cantidad del medio crioprotector. Las ampollas se congelaron a -60 °C en un baño congelante (etilenglicol). Las muestras congeladas se desecaron bajo vacío (60 micrones). El tiempo de liofilizado fue de 2 horas. Una vez que se completó el ciclo de liofilizado, las ampollas se sellaron por fusión. El número de células viables se determinó por el método de recuento en placa. Inmediatamente antes de la siembra, cada muestra de bacterias liofilizadas se rehidrató a su volumen original (0,5 ml) con cada medio de rehidratación (caldo MRS y leche descremada al 10%), se homogeneizó y se mantuvo en contacto durante 10 minutos a 25°C. Se hicieron diluciones seriales de cada muestra y se sembraron por duplicado. Las placas se incubaron a 28°C por 48 horas. El porcentaje de células sobrevivientes fue determinado a partir de los recuentos de bacterias viables realizados antes y después de la liofilización. Los cultivos liofilizados se mantuvieron en ampollas bajo vacío a temperatura ambiente y a 5°C durante treinta días. Luego se determinó el número de células viables con la misma metodología de trabajo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total se consideraron para este estudio 102 cepas aisladas de fermentaciones de aceitunas provenientes del Departamento Rivadavia, desarrolladas a temperaturas entre 8°C y 15°C. Las formas cocoides representaron un 83,3% y las formas bacilares un 16,7%. Los enterococos preponderaron sobre los pediococos y los leuconostoc.

De las 120 cepas aisladas de fermentaciones llevadas a cabo a 25 °C, se aisló un 55,4% de bacterias lácticas cocoides y un 44,6% de lactobacilos. La mayor cantidad de las mismas fueron identificadas preliminarmente como enterococos. Los pediococos y leuconostoc también se encontraron en una menor proporción. Las bajas temperaturas favorecieron la preponderancia de formas cocoides. Las proporciones de las cepas pueden observarse en el Cuadro 1.

De las fermentaciones realizadas con aceitunas cosechadas en el Departamento Maipú, se aislaron 168 cepas de salmueras fermentadas a 15°C. Los cocos (16,7%) se aislaron en menor cantidad que los lactobacilos (83%). Los pediococos se encontraron en una mayor proporción que los enterococos. En las salmueras mantenidas a 25°C se aislaron 159 cepas. También hubo preponderancia de lactobacilos (74,2%) sobre cocos (25,8%) y de pediococos sobre enterococos. En las salmueras de aceitunas del Departamento Maipú no se aislaron cepas de leuconostoc. Las proporciones de las diferentes cepas pueden observarse en el Cuadro 1.

Las 344 cepas de lactobacilos aisladas de las fermentaciones de los Departamentos Rivadavia y Maipú se asignaron al género *Lactobacillus* en base en los criterios taxonómicos de Axelsson (1998). La identificación bioquímica se realizó en base a la fermentación de azúcares ya que todavía se considera satisfactoria para la identificación preliminar de lactobacilos (Sánchez *et al.*, 2000; Gotcheva *et al.*, 2000; Narvhus *et al.*, 2003; Corsetti *et al.*, 2001; Tamang & Sakar, 1996).

Las 17 cepas de lactobacilos homofermentativos aisladas del Departamento Rivadavia de las salmueras fermentadas a 8–15°C se identificaron en su mayoría como *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus pentosus* en base a su perfil fenotípico aunque Sánchez *et al.* (2000) comentan que ha sido cuestionado el hecho de mantener a *Lb. pentosus* como una especie separada (Collins, 1991). Las proporciones de las diferentes cepas pueden observarse en el Cuadro 2.

Cuadro 1. Porcentaje de las cepas de cocos aislados de dos regiones geográficas de la provincia de Mendoza (Argentina).

Microorganismos	Rivadavia		Maipú	
	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C
leuconostoc	3,5	5,5	-	-
enterococos	81,0	90,0	21,4	24,4
pediococos	15,0	4,0	79,0	75,6

Cuadro 2. Porcentaje de las cepas de lactobacilos aislados de dos regiones geográficas de la provincia de Mendoza (Argentina).

Microorganismos	Rivadavia		Maipú	
	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C
<i>Lb. plantarum</i>	29,4	74,0	59,3	67,8
<i>Lb. pentosus</i>	35,3	20,7	39,3	29,7
<i>Lb. casei</i>	-	5,0	-	-
<i>Lb. atípicos</i>	35,3	-	1,4	2,5
<i>Lb. fermentum</i>	-	-	5,7	6,8

El 35% de las cepas fueron capaces de crecer a 45°C en contraste a lo publicado por Kandler & Weiss (1986). Nuestros resultados coinciden con los de otros investigadores (Hugas *et al.*, 1993; Gökaran *et al.* 1995; Tamang & Sarkar, 1996). El 82 % de las cepas toleraron 8% de NaCl en concordancia con lo encontrado por Vaughn (1985), Montañó *et al.* (1992) y Samelis *et al.* (1994). Las 58 cepas de lactobacilos aislados de salmueras fermentadas a 25°C se identificaron de igual manera encontrándose mayor proporción de *Lactobacillus plantarum* que de *Lactobacillus pentosus* y algunas cepas (3) de *Lactobacillus casei*. En las salmueras de fermentación de aceitunas del Departamento Rivadavia no se aislaron lactobacilos heterofermentativos. Un 36% de las cepas crecieron a 45°C y un 11,6% a 8% de NaCl. También cabe notar que muchas cepas (41%) crecieron a pH 9,2 los que las hace especialmente interesantes para tenerlas en cuenta para su empleo como iniciadores lácticos sin necesidad de tener que acidificar la salmuera inicial que luego del proceso de desamarizado queda a valores de pH elevados. Otros autores (Tanasupawat *et al.*, 1992) aislaron cepas de *Lactobacillus plantarum* y de *Lactobacillus pentosus* que crecieron a pH 9.0-9.5. de Castro *et al.* (2001) realizaron ensayos de inoculación de cepas de lactobacilos a pH elevados en salmueras de aceitunas de la variedad Manzanilla.

En los aislamientos del Departamento Maipú a partir de salmueras mantenidas entre 8°C y 15°C, las 140 cepas de lactobacilos homofermentativos se identificaron principalmente como *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus pentosus*. Se aislaron 6 cepas de lactobacilos heterofermentativos cuyo perfil de fermentación de azúcares se aproximó al de *Lactobacillus fermentum*. Otro carácter que reafirma esta apreciación es que todas las cepas crecieron a 15°C y a 45°C al igual que la especie tipo (*The Prokaryotes* online). De las salmueras fermentadas a 25°C se aislaron 118 lactobacilos que en la identificación

fenotípica presentaron el mismo perfil que las cepas aisladas de las salmueras a baja temperatura evidenciando un dominio de *Lactobacillus plantarum*. Las proporciones de las diferentes cepas pueden observarse en el Cuadro 2.

Se pudieron encontrar diferencias, a nivel fenotípico, entre las cepas de bacterias lácticas aisladas de las salmueras de fermentaciones de aceitunas de la variedad Arauco cosechadas en los Departamentos Rivadavia y Maipú. Las disimilitudes se observaron entre las cepas de salmueras fermentadas a distintas temperaturas dentro de un mismo Departamento así como entre los dos sitios geográficos. No debe sorprender el número de cepas diferentes que surge del agrupamiento de las cepas de *Lactobacillus* estudiadas en el presente trabajo ya que Leissner (2001) demostró un alto grado de diversidad entre las cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas de "tempoyak" mediante el análisis de los perfiles plasmídicos de las cepas analizadas. Tales diferencias terminarían de confirmarse cuando se ponga a punto una técnica molecular que permita lograr diferencias a nivel de cepas.

Durante la aplicación de un método de conservación por liofilización de las cepas aisladas se encontraron diferencias significativas ($\alpha=0,05$) en la viabilidad de las células luego de la liofilización, entre la trehalosa y los otros crioprotectores. No se encontró diferencia significativa ($\alpha=0,05$) entre la mezcla de trehalosa - gelatina y la gelatina. El protector más efectivo fue la trehalosa 5% (66% de viabilidad), seguido de la combinación trehalosa 2,5% más gelatina 1% (33%). No se detectaron diferencias significativas entre la rehidratación con leche descremada al 10% y caldo MRS. Se encontraron diferencias significativas entre las bacterias lácticas liofilizadas almacenadas a 5°C y a temperatura ambiente ($\alpha=0,05$). Las diferencias obtenidas en la supervivencia de las células en este estudio indicaron que la trehalosa es más efectiva que la gelatina en la protección de bacterias lácticas. Los beneficios de usar

trehalosa como protección de las células bacterianas concuerda con trabajos publicados previamente (Castro *et al.*, 1997; Zayed & Roos, 2003; Fonseca *et al.*, 2003). Los azúcares reemplazan el agua estructural en las membranas luego de la deshidratación, por lo tanto preservan la estructura y funcionalidad de las proteínas durante el secado. Esta habilidad resulta de que los disacáridos forman puente hidrógeno con las proteínas cuando se remueve el agua, lo que previene la deshidratación (Patist & Zoerb, 2004). Además, la trehalosa tiene menos tendencia a formar cristales intracelulares y extracelulares (Costa *et al.*, 2000; Leslie *et al.*, 1995). No se encontraron diferencias entre la rehidratación con leche descremada y caldo MRS. Costa *et al.* (2000) indicaron que se obtuvo alta recuperación con medios de rehidratación complejos como la leche descremada en polvo. Font de Valdéz *et al.* (1985) indicaron que la rehidratación se lleva cabo en unos pocos segundos, por eso las células son sometidas a cambios rápidos de condiciones de deshidratación, a mezcla de coloides hidratados y soluciones acuosas. La complejidad de estos cambios y la velocidad con que ocurren hace extremadamente difícil medir o controlar el fenómeno. No se pueden obtener conclusiones definitivas. La mayor viabilidad obtenida con las bacterias lácticas liofilizadas conservadas a 5°C está de acuerdo con Tsvetkov (1983) quién indicó que temperaturas de 5°C y vacío constituyen las mejores condiciones para conservación de los microorganismos liofilizados.

CONCLUSIONES

Se ha creado un cepario de referencia de bacterias lácticas aisladas de fermentaciones de aceitunas verdes de la variedad Arauco de importancia regional para la provincia de Mendoza (Argentina). El mismo servirá para investigaciones futuras vinculadas principalmente a su uso como inoculantes lácticos apropiados a cada región productora y condiciones de fermentación particulares. Para su conservación se eligió el método de liofilización usando como crioprotector leche descremada al 11% adicionada de trehalosa al 5% y condiciones de almacenamiento en refrigeración a 5°C.

BIBLIOGRAFÍA

- AXELSSON, L. 1998. *Lactic acid bacteria: classification and physiology*. En: SALMINEM, S.; VON WRIGHT, A. (Ed.), *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects*, 2 edition, Marcel Dekker, New York, Bassel.
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. 1986. Sneath, P.H.A. MAIR N. S.; SHARPE M. E.; HOLT J. G. (Eds.). vol 2, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- CARR, FRANK J. *et al.*, 2002. The Lactic Acid Bacteria: a Literature Survey. *Critical Rev. Microb.* 28(4):281-370.
- CASTRO, H.; TEIXEIRA, P. & KIRBY, R. 1997. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. *J. Appl. Microbio.* 82: 87-94.
- CHAMPAGNE, C.; MOUNDOU, F.; RAYMOND, Y. & ROY, D. 1996. Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze dried lactic acid bacteria. *Food Research Intern.* 29 (5 - 6): 555-562.
- COLLINS, M. D.; RODRIGUES, U.; ASH, C.; AGUIRRE, M.; FARROW, J.AE.; MARTÍNEZ-MURCIA, A.; PHILLIPS, B.A.; WILLIAMS, A.M.; & WALLBANKS, S. 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 77: 5-12.
- CONRAD, P.; MILLER, D.; CIELENSKI, P. & DE PABLO, J. 2000. Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology* 41 (1): 17-24.
- CORSETTI, A.; LAVERMICOCCA, P.; MOREA, M.; BARUZZI, F.; TOSTI, N. & GOBETTI, M. 2001. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (spices *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 64: 95-104
- COSTA, E.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; GARCÍA, N. & VIÑAS, I. 2000. Effects of protective agents, rehydration media and initial concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze drying. *J. Appl. Microbio.* 89: 793- 800.
- DE CASTRO, A.; SÁNCHEZ, A. G.; REJANO, L. & MONTAÑO A. 2001. Utilization at high pH of starter cultures of lactobacilli for Spanish-style green olive fermentation. *Int. J. Food Microbio.* 67:155-122.

- DE LA BORBOLLÁ Y ALCALÁ, J.M. R. & REJANO NAVARRO L. 1979. Sobre la preparación de la aceituna tipo sevillano. La fermentación I. *Grasas y Aceites*. 30 (3): 175-185.
- FERNÁNDEZ DÍEZ, M.J.; DE CASTRO RAMOS, R.; GARRIDO FERNÁNDEZ, A.; GONZÁLEZ CANCHO, F.; GONZÁLEZ PELLISÓ, F.; NOSTI VEGA, M.; HEREDIA MORENO, A.; MÍNGUEZ MOSQUERA, M.I.; REJANO NAVARRO, L.; DURÁN QUINTANA, M.C.; SÁNCHEZ ROLDÁN, F.; GRACÍA GARCÍA, P. & DE CASTRO A. 1985. En: *Biotecnología de las Aceitunas de Mesa*. CSIC, Madrid. pp. 51-123.
- FONSECA, F.; BÉAL, C.; MIHOUB, F.; MARIN, M. & CORRIEU G. 2003. Improvement of cryopreservation of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CFL1 with additives displaying different protective effects. *Int. Dairy Journal*. 13: 917- 926.
- FONT DE VALDÉZ, G.; SAVOY DE GIORI, G.; PESCE DE RUIZ HOLGADO, A. & OLIVER G. 1983. Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze drying. *Cryobiology*; 20 (5): 560-566.
- FONT DE VALDÉZ, G.; SAVOY DE GIORI, G.; PESCE DE RUIZ HOLGADO, A. & OLIVER G. 1985. Effect of the rehydration medium on the recovery of freeze dried lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*; 50 (5): 1339-1941.
- GARCÍA GARCÍA, P.; DURÁN QUINTANA, M. C. & GARRIDO FERNÁNDEZ, A. 1982. Modificaciones en el proceso de fermentación de aceitunas negras al natural para evitar alteraciones. *Grasas y Aceites* 33: 9-17.
- GARRIDO FERNÁNDEZ, A.; BRENES BALBUENA, M.; GARCÍA GARCÍA, P. & DURÁN QUINTANA, M. C. 1997. Conservación de aceitunas verdes o de color cambiante en salmuera. *Grasas y Aceites* 47 (3): 197-206.
- GONZALEZ CANCHO, F. & DURÁN QUINTANA M. C. 1981. Bacterias cocáceas del ácido láctico en el aderezo de aceitunas verdes. *Grasas y Aceites* 32 (6): 373-379.
- GONZALEZ CANCHO, F.; NOSTI VEGA, M.; DURÁN QUINTANA, M. C.; GARRIDO FERNÁNDEZ, A. & FERNÁNDEZ DÍEZ M. J. 1975. El proceso de la fermentación en las aceitunas negras maduras en salmuera. *Grasas y Aceites* 26:297-309.
- GONZALEZ CANCHO, F. 1963. Microorganisms which develop in the pickling of «Spanish style» green olives. *Microbiol Esp*. 16:221-30.
- GOTCHEVA V.; PANDILLA, M.A.; ANGELOV, ROSHLOVA,K. & WEBB, C . 2000. Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage boza. *Proc. Bioch*. 36: 127-130.
- GÜKARAN, G. C.; BOZOGLU, T. F.& WEISS N. 1995. Identification of *Lactobacillus* strains from Turkish-style dry fermented sausages. *Lebensm. Wiss. Technol*. 28: 139-144.
- HAWKSWORTH, D. L.; SASTRAMIHARDJA, I; KOKKE, R. & STEVENSON, R. 1999. *Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms*. 2nd ed. World Federation of Culture Collection Standard Committee. UK: Simwoth Press. pp.18.
- HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, T. & MONFORT; J.M. 1993. Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol*. 18: 107-113.
- KANDLER, O. & WEISS, N. 1986. *Regular, nonsporing Gram-positive rods*. In: Sneath, P. H. A., MAIR, N. S., SHARPE M. E., HOLT J. C. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp. 1208-1234.
- KRICHEVSKY, M. I.; FABRICIUS, B. O. & SUGAWARA, H. 1988. *Information resources*. En: Hawsworth DL, Kirsop BE, eds. *Filamentous fungi: living resources for biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press. pp.31-51.
- LEISSNER, J.J.; VANCANNETY, M.; RUSUL,G; POT, B.; LEFEBURE, K.; FRESI, A. & TEE, L. K. 2001. Identification of lactic acid bacteria constituting the predominanting microflora in an acid-fermented condimente (tempoyak) popular in Malasya. *Int. J. Food Microbiol*. 63: 149-157.
- LESLIE, S.; ISRAELI ,E.; LIGHTHART, B.; CROWE, J. & CROWE L. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microbiol*; 61 (10): 3592-3597.
- MAN, J. D.; DE, ROGOSA, M. & SHARPE, M. E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bact*. 23: 130-160.
- MIYAMOTO – SHINOHURA, Y.M; IMAIZUMI, T.; SUKENOBE, J.; MURAKAMI, Y.; KAWAMURA, S. & KOMATSU, Y. 2000. Survival Rate of Microbes after freeze – drying and long term storage. *Cryobiology*; 41:251-255).
- MONTAÑO, A.; SÁNCHEZ, A. H. & DE CASTRO, A. 1993. Controlled fermentation of Spanish type green olives. *J. Food Sci*. 58 (4) 842-852.
- MONTAÑO, A.; DE CASTRO A. & REJANO L. 1992. Transformaciones bioquímicas durante la fermentación de vegetales. *Grasas y Aceites* 43 (6): 352-360.
- NARVHUS, J.A.; MUYANJA, C. M. B. K.; TREIMO, J. & LANGSRUD, T. 2003. Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from *bushera*: a Ugandan traditional fermented beverage. *Int. J. Food Microb*. 80 (3) pp. 201-210.

- PATIST, A., & ZOERB, H. 2004. RESERVATION MECHANISMS OF TREHALOSE IN FOOD AND BIOSYSTEMS. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 40 (2): 107-113.
- SAMELIS, J.; MAUROGENAKIS, F. & METAXOPOULOS, J. 1994. Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Int. J. Food Microbiol.* 23: 179-196.
- SÁNCHEZ, I., L.; PALOPL, & BALLESTEROS, C. 2000. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of Almagro eggplants. *Int. J. Food Microbiol.* 59: 9-17.
- SHARPE, M. E. 1979. Identification of the lactic acid bacteria. En: SKINNER, F.A., LOVELOCK, D. W. (eds.), *Identification Methods for Microbiologists*, Academic Press, London, pp. 233-259.
- TAMANG, J.P. & SARKAR, P. K. 1996. Microbiology of mesu, a traditional fermented bamboo shoot product. *Int. Food Microbiol.* 29: 49-58.
- TANASUPAWAT, S.; EZAKI, T.; SUZUKI, K.-I.; OKADA, S.; KOMAGATA, K. & KOZAKI, M. 1992. Characterization and identification of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* strains from fermented foods in Thailand. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 38:121-134.
- THE PROKARYOTES. 1992. BALOWS, A.; TRUPER H. G.; DWORKIN M.; HARDER W. & SCHLEIFER K.-H. (Eds.). Springer-Verlag, New York.
- THE PROKARYOTES. DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H. & STACKEBRANDT, E. (Eds.). Hardcover. Electronic edition.
- TSVETKOV, T. & BRANKOVAR. 1983. Viability of micrococci and lactobacilli upon freezing and freeze drying in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology*. 20 (3): 318-323.
- VAUGHN, R. H. 1985. *The microbiology of vegetable fermentations*. En: Microbiology of Fermented Foods, Vol. 2. Wood, B. J. B. (Ed.). Elsevier, New York. pp. 49-109.
- VAUGHN, R. H. 1982. Industrial Microbiology. Avi Publishing Co., Westport, Conn. pp.207-236.
- VAZQUEZ LADROU. 1979. Composition and nutritive value of some Spanish varieties of table olives. *Grasas y Aceites* 30 (4) 221-22.
- WOLFF, E.; DELISLE, B.; CORRIEU, G. & GILBERT, H. 1990. Freeze drying of *Streptococcus thermophilus*: a comparison between the vacuum and the atmospheric method. *Cryobiology*; 27 (5): 569-575.
- ZHAI, S.; TAYLOR, R.; SANCHES, R. & SLATER N. 2003. *Chemical Engineering Science* 58: 2313-2323.
- ZAYED, G. & ROOS Y. 2003. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochemistry* 39 (9): 1-6.