

LEVADURAS INVOLUCRADAS EN EL ABLANDAMIENTO DE ACEITUNAS ¹

HÉCTOR R. ROBY ² y REESE H. VAUGHN ³

RESUMEN

Con el objeto de determinar el rol que le pudiese haber a las levaduras en el problema del ablandamiento enzimático de las aceitunas producido ocasionalmente, durante la conservación previa al procesamiento como maduras o en las primeras etapas de la fermentación en el tipo verde, los autores emplearon tres métodos de ensayo: A) con preparaciones crudas de enzimas (7, 14), B) con gel de polipeptato de sodio (1, 12, 13) y C) con aceitunas estériles (7, 14).

Estos ensayos se llevaron a cabo con tres levaduras: *Saccharomyces oleaginosus*, *Rhodotorula* sp. (glutinis?) y *Hansenula anomala*, elegidas por haber sido encontradas en tanques de conservación o fermentación de aceitunas y/o por sospecharse pudieran ser productoras de enzimas con actividad pectolítica, que provocan el ablandamiento de los frutos.

Las principales características de los métodos empleados son:

A) Con preparaciones crudas de enzimas

Basado en el cultivo de las levaduras en estudio en medios estériles y de distinta composición, seguido de observación del desarrollo, centrifugación de los cultivos con el objeto de separar las células y obtener las "preparaciones crudas de enzimas", agregado a estas preparaciones de una droga (Merthiolate) para impedir el desarrollo de microorganismos. Luego, selección de aceitunas (variedad Manzanilla) mantenidas en salmuera, colocación de las aceitunas seleccionadas en las preparaciones crudas de enzimas y observaciones periódicas, con el objeto de detectar síntomas de ablandamiento en los frutos.

¹ Trabajo realizado durante 1967 en el Department of Food Science and Technology, University of California, Davis, U.S.A.

² Ingeniero Agrónomo investigador del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, República Argentina; becado para realizar este trabajo, por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, de Argentina.

³ Ph. D., profesor del Department of Food Science and Technology, University of California, Davis, U.S.A.

B) Con gel de polipectato de sodio

Método indirecto, basado en la siembra de las levaduras en estudio en cajas de petri con un medio de cultivo que lleva en su fórmula el polipectato de sodio, el que permite apreciar la actividad enzimática pectolítica de los microorganismos por los efectos de depresión o ablandamiento del gel. Observaciones periódicas para detectar dichos síntomas.

C) Con aceitunas estériles

Basado en la esterilización de aceitunas (variedad Manzanilla), previamente seleccionadas, agregado aséptico de medios de cultivo de diferente composición, inoculación con las levaduras en estudio y observación a lapsos prefijados de la consistencia de los frutos.

D) Ensayos complementarios

Para establecer las posibles causas de la inhibición de desarrollo de *Rhodotorula sp.*, observada en algunos de los ensayos previos. Parte de estos ensayos se llevaron a cabo también con *Saccharomyces oleaginosus* y *Hansenula anomala*.

Ensayos sobre influencia de: temperatura de incubación, edad del cultivo empleado (desde el repique), concentración de sal (ClNa) en el medio (proveniente de la salmuera de conservación de las aceitunas), acidez del medio, presencia de sorbato (sorbato de potasio) en el medio y concentración de nutrientes en el medio.

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos y especialmente los correspondientes a los métodos A y C, permiten establecer la producción de enzimas pectolíticas por parte de *Rhodotorula sp.* y de *Saccharomyces oleaginosus*, en contraposición de *Hansenula anomala*, que no dio muestra de tal actividad.

Dichas enzimas produjeron ablandamiento de las aceitunas, con intensidad variable según el ensayo considerado y diversas circunstancias, tales como: contenido en glucosa del medio de cultivo empleado, tiempo de incubación, agitación durante la incubación.

El máximo porcentaje de ablandamiento encontrado (sobre la totalidad de los frutos), corresponde en el método A, a: *Rhodotorula sp.*, serie estática, medios I, II y III; serie dinámica, medio III y *Saccharomyces oleaginosus*, serie estática, medio II, siendo muy pronunciado también (85% de frutos ablandados) en el medio IV de esta serie. En el método C, a: *Saccharomyces oleaginosus*, serie 20 días, medios I, II y III (este último 95% de frutos ablandados) y *Rhodotorula sp.*, serie 20 días, medios I, II y III.

ANTECEDENTES

De acuerdo a diferentes investigaciones llevadas a cabo por KOSOWICZ, RAHN, LE FEVRE, JOSLYN y por FABIAN y coautores, se llegó a la conclusión de que las bacterias estaban involucradas en el ablan-

damiento de pickles y que los miembros del género *Bacillus* eran los agentes principales de ese deterioro, actuando a través de las enzimas pectolíticas que ellos producen.

En posteriores investigaciones, NORTJE y VAUGHN⁷ llegan a la conclusión de que *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus*, no producen ablandamiento en pepinos o aceitunas que se encuentran en fermentación normal, pero pueden estar involucrados en el ablandamiento de aceitunas "tipo californiano" y en determinadas condiciones, en el de aceitunas verdes fermentadas "tipo español". Esto último puede ocurrir, cuando por alguna causa la fermentación demora en iniciarse por algunas semanas.

Además BELL, ETCHELLS y JONES habían presentado evidencias que indicaban que las enzimas capaces de ablandar pepinos mantenidos en salmuera, eran producidas por hongos⁷.

En 1954 VAUGHN *et al.*¹² publicaron su trabajo sobre las fuentes y tipos de microorganismos aerobios relacionados con el ablandamiento de pepinos en fermentación, resultado de la investigación realizada en oportunidad de presentarse un caso de ablandamiento comercial en 1952. Encontraron que los microorganismos predominantes pertenecían al género *Bacillus* y establecieron que las especies de ese género podían causar ablandamiento, si: 1) los bacilos predominaban en la población microbiana de los pepinos y salmueras, 2) el pH de los pepinos en salmuera estaba en el rango conveniente para el ablandamiento —probablemente 5.5 o más alto— y 3) la deseada fermentación láctica se retardaba varios días.

IZQUIERDO TAMAYO estableció en 1953, que las levaduras estaban presentes prácticamente a través de toda la fermentación de aceitunas verdes.

MRAK *et al.*⁶, en 1956 estudiaron las levaduras presentes en las salmueras durante la fermentación y almacenamiento de aceitunas verdes. Determinaron que la flora de levaduras no es constante en su composición y que se producían cambios cualitativos durante la fermentación y posterior almacenamiento. *Rhodotorula glutinis*, aparece en este último trabajo como constituyente de la flora, muy al principio, cuando la concentración de la salmuera es muy baja y luego desaparece.

VAUGHN *et al.*¹³, en 1957 estudiaron el empleo de un medio de cultivo, con el cual fuera posible detectar a los microorganismos pectinolíticos. Para las levaduras emplearon el medio básico (gel de polipectato de sodio), con el agregado de malta en polvo.

Concluyeron en que la demostración de la pectinólisis con ese medio péctico es solamente el comienzo de la acumulación de las pruebas requeridas y que no se puede garantizar la etiología de un caso de ablandamiento, salvo que se conozca la historia completa de dicho caso y que las enzimas pectinolíticas o los microorganismos

aislados, demuestren causar ablandamiento de muestras previamente esterilizadas.

BALATSOURAS y VAUGHN¹, en 1957 estudiaron los hongos aislados de la superficie de salmueras de aceitunas almacenadas en la intemperie y su posible producción de enzimas pectinolíticas. Para ello, emplearon dos métodos cualitativos: el primero usando ácido péctico y el segundo gel de polipectato de sodio.

Concluyeron en que la mayoría, si no todos los organismos estudiados, pueden ser indicados como agentes potenciales de deterioro de aceitunas mantenidas en salmueras de almacenamiento.

VAUGHN ET AL.¹⁴, en 1964 informan que levaduras rosadas pertenecientes al género *Rhodotorula* y relacionadas con la especie *glutinis*, aisladas de salmuera de aceitunas, producen enzimas que causan un suave ablandamiento en el tejido de las aceitunas. Dicho ablandamiento se determina con cultivos que se desarrollan en aceitunas y salmuera estériles y con preparaciones crudas de enzimas.

DESARROLLO

Con el objeto de determinar la posible actividad enzimática pectolítica relacionada con la presencia de algunas levaduras, sobre aceitunas que se encuentran en recipientes de conservación previa al procesamiento como "californianas" o en las primeras etapas de la fermentación —en el tipo verdes fermentadas— y que provoca ablandamiento de los frutos, los autores realizaron diversos ensayos, tendientes en primer término a establecer las condiciones de cultivo, desarrollo de las levaduras (medios de cultivo apropiados) y luego a la aplicación de métodos que permitieran hacer extensivos los resultados obtenidos en laboratorio, a las condiciones de la industria.

MATERIAL

a) *Levaduras*: fueron elegidas tres por haber sido encontradas en tanques de conservación o fermentación de aceitunas y/o por sospecharse pudieran producir enzimas con actividad pectolítica, las que provocan ablandamiento de los frutos.

Dichas levaduras son:

Saccharomyces oleaginosus, Santa María

Rhodotorula sp. (glutinis?), Harrison

Hansenula anomala, H. et P. SYDOW

Estas levaduras estaban mantenidas bajo cultivo en el Department of Food Science and Technology, en tubos pico de flauta de agar de mosto de malta. De los tubos originales, se fueron repicando perió-

dicamente con el objeto de mantener los cultivos en buen estado de desarrollo.

b) *Aceitunas*: los frutos, correspondientes a la variedad Manzanilla, provenían de la última cosecha (setiembre-octubre 1966) y estaban conservados sin tratamiento previo, en garrafas de vidrio de 10 kg. en salmuera aproximadamente 8,5 %, con agregado de una pequeña cantidad de sorbato de potasio para inhibir desarrollo de mohos. El estado sanitario era bueno y lo mismo su consistencia.

MÉTODOS

Fueron empleados 3 diferentes métodos: A) Con preparaciones crudas de enzimas, B) Con gel de polipectato de sodio, C) Con aceitunas estériles y D) Ensayos complementarios.

Las características principales de todos ellos se detallan a continuación.

EJECUCIÓN DE LOS ENSAYOS

A) *Con Preparaciones Crudas de Enzimas.* ^{7, 14}

Este método de ensayo consistió en lo siguiente:

a) *Preparación de medios de cultivo*: sus fórmulas son las que se dan a continuación:

Medio I: 8,0 gr. Caldo nutritivo
2,5 gr. Polipectato de sodio
Agua destilada para llevar a 1.000 ml.

Medio II: 8,0 gr. Caldo nutritivo
2,5 gr. Polipectato de sodio
5,0 gr. Glucosa
Agua destilada para llevar a 1.000 ml.

Medio III: 8,0 gr. Caldo nutritivo
1,25 gr. Polipectato de sodio
Agua destilada para llevar a 1.000 ml.

Medio IV: 8,0 gr. Caldo nutritivo
5,0 gr. Glucosa
Agua destilada para llevar a 1.000 ml.

b) *Inoculación con las levaduras.*

Con cada una de las 3 levaduras en estudio se inoculó una serie de 8 erlenmeyers, correspondiendo 2 erlenmeyers a cada medio de cultivo preparado. Una serie de 8 erlenmeyers (dos por cada medio) se dejó sin inocular como "testigos". Para estas inoculaciones se emplearon cultivos de 4 días desde el repique.

c) *Incubación y control de la multiplicación de las levaduras.*

Los 32 erlenmeyers, con los medios inoculados y testigos, fueron colocados en cámara de cultivo a 30°C por un período de 20 días, divididos en 2 series iguales de 16 erlenmeyers cada una, correspondiendo una a la serie dinámica (con agitación constante —aereación—) y la otra a la serie estática. Cada 2 días se observaron a fin de controlar actividad microbiana: turbidez, color, espuma, precipitado, etc., comparando con los correspondientes testigos. Periódicamente se realizaron observaciones microscópicas.

Debido a la falta de multiplicación celular observada en *Rhodotorula sp.* y a la suposición de que la temperatura de 30°C en la cámara (ocasionalmente hasta 32-33°C), fuera demasiado elevada para la requerida multiplicación, los 8 erlenmeyers correspondientes a esta levadura fueron retirados, reinoculados con cultivo de 10 días desde el repique y colocados en cámara a 20° C. La longitud del período de cultivo (20 días) fue considerada a partir de la fecha de colocación a 20°C.

El tiempo de 20 días, fue fijado en relación a ensayos previos, que determinaron la necesidad de prolongar el período de incubación empleado en esa ocasión (8-12 días), ya que los resultados fueron negativos.

d) *Centrifugación de los cultivos.*

Cumplidos los 20 días correspondientes al período de incubación programado, se procedió a centrifugar los cultivos con centrífuga "Serval" Superspeed, a una velocidad de 8.000 R.P.M. y por espacio de 15 minutos. Se obtuvieron por lo general líquidos perfectamente claros (color ámbar), pero en algunos tratamientos, principalmente pertenecientes al medio de cultivo IV, fue necesaria una nueva centrifugación en las condiciones apuntadas, para obtener líquidos claros.

Los líquidos, libres de células y con las enzimas, se denominan "preparaciones crudas de enzimas"; inmediatamente de ser obtenidos se le agregó a cada erlenmeyer 0,01 % de Merthiolate en polvo, conocido también como Thimerosal N. F., con el objeto de prevenir desarrollo de microorganismos.

e) *Colocación de 20 aceitunas en cada uno de los erlenmeyers con líquido centrifugado.*

Los frutos, pertenecientes a la variedad Manzanilla (ver Material b), pág. 49, de tamaño pequeño, fueron seleccionados cuidadosamente para eliminar los que no presentaban condiciones óptimas de conservación, consistencia, madurez, etc., como también los que tenían restos de pedúnculos, los de las capas superficiales —oxidados—, etc.; luego se enjuagaron rápidamente 3 veces con agua des-

tilada, se dejaron en agua destilada por espacio de 5 horas y por último 2 cambios cada 15 minutos.

Finalizados los lavados se colocaron, en el número de unidades indicado, en los respectivos erlenmeyers con los líquidos centrifugados.

El tamaño de aceitunas elegido —pequeño—, se hizo en razón de que en ensayos previos se determinó que este tamaño mantenía mejor la consistencia que el tamaño grande —para la variedad— durante la conservación previa.

f) *Verificación periódica de la consistencia de las aceitunas y de otros síntomas.*

Los tratamientos fueron mantenidos en cámara de cultivo a 30°C, excepto los correspondientes a *Rhodotorula sp.* que se mantuvieron a temperatura ambiente (aproximadamente 24°C) y fueron observados a fin de verificar la posible actividad enzimática, mediante valoración directa manual de la consistencia de los frutos, como también por la aparición de otros síntomas.

Las observaciones se realizaron semanalmente, durante 2 meses consecutivos.

La observación indicada, es decir mediante valoración directa manual, fue empleada en razón de que los síntomas de ablandamiento que se deseaban detectar eran los que tuvieran importancia comercial y no los muy ligeros, que sólo se pudieran detectar con presímetros muy sensibles.

B) *Con Gel de Polipectato de Sodio.* ^{1, 12, 13.}

Se consideró conveniente determinar la posible actividad enzimática pectolítica de las levaduras en estudio, mediante un método que utiliza un medio de cultivo sólido, sobre el que se puede apreciar dicha actividad por sus efectos de “depresión” o “ablandamiento” del gel.

El método consistió en lo siguiente:

a) *Preparación del medio de cultivo (cajas de gel de malta polipectato).*

Su fórmula es:

Medio I Sólido: 100 gr. Malta (Diamalt)
7 gr. Calgon
44 gr. Polipectato de sodio
Agua destilada para llevar a 1.000 ml.

El pH de la solución de Diamalt y Calgon, originariamente de 6,3, se bajó a 5,3 mediante el agregado de HCl 1 N.

El medio se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos y se distribuyó en cajas de petri estériles, las que se colocaron en estufa a 30°C hasta completa solidificación y eliminación del exceso de humedad (aproximadamente 48 hs.).

b) *Siembra con las levaduras en estudio.*

Con cada una de las 3 levaduras en estudio se sembraron 2 cajas de petri, empleando el método trisector por resultar más conveniente la observación en las colonias aisladas que se consiguen por este método. Para las siembras de *Saccharomyces oleaginosus* y de *Hansenula anomala* se emplearon cultivos de 8 días desde el repique, en tanto que para *Rhodotorula sp.* se empleó cultivo de 20 días desde el repique (debido al más lento crecimiento manifestado).

Dos cajas fueron rayadas con inoculador flameado y dejadas como "testigos".

c) *Incubación, control de multiplicación celular y de actividad enzimática.*

Las 8 cajas fueron colocadas en cámara de 30°C y observadas día por medio durante un período de 15 días, para determinar en primer lugar crecimiento y posteriormente para establecer la producción de enzimas con actividad pectolítica, por sus efectos de "depresión" o "ablandamiento" del medio sólido.

Debido a la falta de multiplicación celular observada en *Rhodotorula sp.* y a la suposición de que la temperatura de 30°C en la cámara (a veces hasta 32-33°C), fuera la causa de tal inhibición o falta de multiplicación, las dos cajas correspondientes a esta levadura fueron resembradas y dejadas a temperatura ambiente (aproximadamente 24°C).

C) *Con Aceitunas Estériles.*^{7, 14}

Con el objeto de trabajar en condiciones lo más similares posible a las existentes en la industria, para la investigación de la probable actividad enzimática pectolítica de las 3 levaduras bajo estudio, se realizaron ensayos directos sobre aceitunas, que consistieron en lo siguiente:

Medio I: 40 gr. Caldo nutritivo
24 gr. Glucosa
Agua destilada para llevar a 1.000 ml.

Medio II: 40 gr. Caldo nutritivo
48 gr. Glucosa
Agua destilada para llevar a 1.000 ml.

Medio III: 40 gr. Caldo nutritivo
96 gr. Glucosa
Agua destilada para llevar a 1.000 ml.

Los medios obtenidos son líquidos, de color marrón oscuro y fueron esterilizados en autoclave a 121°C por 18 minutos.

Las fórmulas indicadas se emplearon en razón de que en ensayos previos se encontró que las fórmulas que llevaban menor cantidad de Caldo nutritivo (aproximadamente 5 veces menos), no eran apropiadas para *Rhodotorula sp.*, que no desarrolló y posiblemente fueran insuficientes para las otras levaduras.

b) *Selección de aceitunas.*

Los frutos, pertenecientes a la variedad Manzanilla, (ver Material b) pág. 49, de tamaño pequeño, fueron seleccionados cuidadosamente para eliminar los que no presentaban condiciones óptimas de conservación, consistencia, madurez, etc., como también los que tenían restos de pedúnculos, los de las capas superficiales —oxidados—, etc.; luego se enjuagaron rápidamente 3 veces con agua destilada, se dejaron en agua destilada por espacio de 16 hs. y luego 2 cambios cada 2 y ½ horas.

El tamaño de aceitunas elegido —pequeño—, se hizo en razón de que en ensayos previos se determinó que este tamaño mantenía mejor la consistencia que el tamaño grande —para la variedad— durante la conservación previa.

c) *Esterilización previa de los recipientes.*

Con el objeto de conseguir la máxima eficiencia de esterilización con el menor tiempo posible de exposición de los frutos al calor, se procedió a esterilizar previamente los 24 erlenmeyers requeridos, con 100 ml. de agua destilada cada uno, tapón de algodón, papel y elástico, a 121°C por 15 minutos.

d) *Esterilización de aceitunas.*

A cada uno de los 24 erlenmeyers, previamente esterilizados y enfriados, se les agregó 20 aceitunas seleccionadas, tratando de reducir al mínimo la contaminación durante el manipuleo. Inmediatamente después, los 24 erlenmeyers con los frutos se trataron por 5 minutos en cámara de vapor a presión atmosférica. Este tratamiento térmico fue repetido a las 24 hs.

El uso de 2 tratamientos térmicos de 5 minutos cada uno, en cámara de vapor a presión atmosférica, con un intervalo de 24 hs. entre ellos, complementado con la esterilización previa de los recipientes y el agua necesaria para cubrir los frutos y el empleo de aceitunas de tamaño pequeño y seleccionadas, ha demostrado en las condiciones del ensayo, ser suficiente para tener una buena esterilidad de los frutos, a la par que *no se altera sensiblemente la consistencia de los mismos.* Esto se determinó mediante ensayos previos.

La temperatura alcanzada en el líquido que cubría las muestras después de cada uno de los tratamientos, oscilaba entre 93 y 95°C.

e) *Agregado del medio de cultivo.*

Cada uno de los 3 medios de cultivo preparados fue agregado asépticamente a 8 erlenmeyers, en cantidad de 25 ml. por erlenmeyer

f) *Inoculación con las levaduras en estudio.*

Con cada una de las 3 levaduras se inoculó una serie de 6 erlenmeyers, correspondiente 2 a cada medio de cultivo preparado. Se emplearon cultivos de 7 días desde el repique. Una serie de 6 erlenmeyers, 2 de cada medio, se dejó sin inocular como "testigos".

g) *Incubación y control de la multiplicación de las levaduras.*

Los 24 erlenmeyers (correspondientes a 2 series de 12 cada una: 10 y 20 días de incubación, programadas para determinar influencia de la longitud del tiempo de incubación), fueron mantenidos a temperatura ambiente (aproximadamente 24°C) y observados periódicamente (cada 2 ó 3 días), con el objeto de controlar actividad microbiana: velo, turbidez, color, espuma, precipitado, etc., comparando con los respectivos testigos.

h) *Observación de la consistencia de los frutos.*

A los 10 días de inoculados, se hizo observación directa manual de la consistencia de los frutos de la serie 10 días de inoculación. A los 20 días se procedió de igual manera con la serie de 20 días de incubación.

La observación indicada, es decir mediante valoración directa manual, fue empleada en razón de que los síntomas de ablandamiento que se deseaban detectar eran los que tuvieran importancia comercial y no los muy ligeros, que sólo se pudieran detectar con presiómetros muy sensibles.

D) *Ensayos Complementarios.*

En relación a los problemas presentados en la multiplicación celular de *Rhodotorula sp.*, principalmente durante la realización de los ensayos previos correspondientes al Método C (con aceitunas estériles), se pensó que uno o más de uno de los factores que se mencionan a continuación, pudieron tener influencia en la falta de multiplicación observada. Algunos de estos ensayos se hicieron extensivos a las otras levaduras en estudio.

- 1) Temperatura de incubación.
- 2) Edad del cultivo empleado (desde el repique).
- 3) Concentración de sal (CINa) en el medio (proveniente de la salmuera de conservación de las aceitunas).

- 4) Acidez del medio.
- 5) Presencia de sorbato (sorbato de potasio) en el medio (proveniente de la salmuera de conservación, a la cual se le había agregado este conservador).
- 6) Concentración de nutrientes en el medio.

Estudio de:

- 1) *Temperatura de incubación*
- 2) *Edad del cultivo*
- 3) *Concentración de sal (ClNa) en el medio*

Estos tres factores se estudiaron en conjunto, con la realización del siguiente ensayo con *Rhodotorula sp.*

a) *Preparación de los medios de cultivo.*

Se prepararon 24 tubos pico de flauta de agar de mosto de malta, de los cuales:

- 8 no llevaban otro agregado
- 8 llevaban 2,5 % de ClNa (sobre el total)
- 8 llevaban 5,0 % de ClNa (sobre el total)

b) *Siembra con la levadura en estudio.*

Cuando los tubos estuvieron en condiciones, se sembraron con la levadura en estudio, de acuerdo al siguiente detalle:

Rhodotorula sp.

— de 14 días desde el repique

TUBO CON	TEMPERATURA DE INCUBACION			
	20° C	Amb. (24° C)	30° C	37° C
Agar de malta	1	1	1	1
A. de M. 2,5 % ClNa ..	1	1	1	1
A. de M. 5,0 % ClNa ..	1	1	1	1

NOTA: La concentración de sal (ClNa) máxima calculada que pudiera estar presente en el medio de los diferentes tratamientos, de acuerdo a los lavados efectuados y la dilución respectiva, sería menos del 4 %, por lo que los ensayos se hicieron a dos niveles: 2,5 y 5,0 %.

— de 25 días desde el repique

TUBO CON	TEMPERATURA DE INCUBACION			
	20° C	Amb. (24° C)	30° C	37° C
Agar de malta	1	1	1	1
A. de M. 2,5 % ClNa . .	1	1	1	1
A. de M. 5,0 % ClNa . .	1	1	1	1

c) *Incubación y control de la multiplicación celular.*

Los tubos fueron colocados en cantidad de 6 (uno por cada respectivo tratamiento), en cada una de las 4 temperaturas ensayadas y observados a intervalos de 3 ó 4 días, durante 45 días.

4) *Acidez del medio*

La acidez, en valores de pH, encontrada en los tratamientos previos correspondientes al Método C, estaba comprendida entre 4,5 y 4,7; en cambio en el ensayo definitivo de dicho método era de alrededor de 5,3, de lo que se deduce que en ambos casos la acidez no resultaría un factor de inhibición de multiplicación celular, por cuanto a esos valores de pH *Rhodotorula sp.* se desarrollaría sin inconvenientes.

5) *Presencia de sorbato (sorbato de potasio) en el medio*

En razón de que las aceitunas destinadas para estos ensayos habían sido conservadas en garrafas de vidrio de boca ancha, a las que de tanto en tanto se les hacían agregados de sorbato de potasio con el objeto de prevenir desarrollo de mohos en superficie, se pensó en la posibilidad de un efecto de inhibición de *Rhodotorula sp.*, probable consecuencia de una mayor susceptibilidad a los remanentes de la droga que pudiera haber quedado en los frutos después de los correspondientes lavados, en relación a las otras 2 levaduras en estudio.

Por ello se efectuó el siguiente ensayo, sobre las 3 levaduras:

a) *Preparación de los medios de cultivo.*

Se prepararon 24 tubos pico de flauta de agar de mosto de malta, de los cuales:

6 no llevaban otro agregado (testigos)

6 llevaban 0,05 % de Sorbato de potasio 99 % (sobre el total)

6 llevaban 0,1 % de Sorbato de potasio 99 % (sobre el total)

6 llevaban 0,2 % de Sorbato de potasio 99 % (sobre el total)

b) *Siembra con las levaduras en estudio.*

Cuando los tubos estuvieron en condiciones se sembraron (por duplicado), con las levaduras en estudio, de acuerdo al siguiente detalle:

LEVADURA	MEDIO CON SORBATO DE POTASIO			
	Agar Malta	A.M. 0,05%	A.M. 0,1%	A.M. 0,2%
<i>Rhodotorula sp.</i>	2	2	2	2
<i>Sacchar. oleag.</i>	2	2	2	2
<i>Hansenula anomala</i>	2	2	2	2

c) *Incubación y control de la multiplicación celular.*

Los tubos fueron mantenidos a temperatura ambiente (aproximadamente 24°C) y observados a intervalos de 4 a 6 días, durante un período de 25 días.

6) *Concentración de nutrientes en el medio*

Ante la posibilidad de que la concentración de nutrientes en la dilución final de los tratamientos previos del Método C, fuera baja y por lo tanto hubiese habido una inhibición de multiplicación celular de la levadura con mayor requerimiento en dichos nutrientes (*Rhodotorula sp.*), en tanto que posiblemente en las 2 restantes la multiplicación hubiese sido deficiente, se pensó en efectuar otro ensayo aumentando la concentración de los medios a agregar a valores tales que en dichas diluciones finales la concentración de los nutrientes fuese aproximadamente equivalente a la de los medios empleados en el Método A (con preparaciones crudas de enzimas), es decir 5 veces superior para Caldo nutritivo y algo mayor para glucosa.

Este ensayo corresponde al ya descrito como Método C (con aceitunas estériles).

RESULTADOS OBTENIDOS

Las observaciones y resultados obtenidos en los ensayos correspondientes a los 3 diferentes métodos empleados y en los complementarios, son los siguientes:

- A) *Con Preparaciones Crudas de Enzimas.*
- a) *Características del desarrollo de las levaduras en los diversos tratamientos.*

Testigos— *Serie estática*

Medios de cultivo I, II, III y IV: sin desarrollo

— *Serie dinámica*

Medios de cultivo I, II, III y IV: sin desarrollo

Saccharomyces oleaginosus— *Serie estática*

Medios I y III: leve, rápido (2 a 3 días)

Medios II y IV: abundante, muy rápido (antes de 48 horas)

— *Serie dinámica*

Medios I y III: leve, muy rápido

Medios II y IV: abundante, muy rápido

Rhodotorula sp.— *Serie estática*

Medios I, II, III y IV: abundante, medianamente rápido (3 a 5 días)

— *Serie dinámica*

Medios I y III: mediano, medianamente rápido

Medios II y IV: abundante, medianamente rápido

Hansenula anomala— *Serie estática*

Medios I y III: abundante, rápido; leve formación de velo superficial al comienzo

Medios II y IV: abundante, muy rápido; formación de velo superficial al comienzo

— *Serie dinámica*

Medios I y III: mediano, rápido

Medios II y IV: abundante, muy rápido

b) *Actividad enzimática.*

Se observó que a las pocas horas de colocadas las aceitunas en las preparaciones crudas de enzimas, apareció una sustancia gelatinosa sobre los frutos de algunos de los tratamientos y especialmente en la cavidad peduncular, ápice y estomas. Esta sustancia, variable en intensidad según el tratamiento considerado, se fue incrementando hasta llegar a cubrir, en ciertos casos, todos los frutos. El medio líquido fue aumentando su viscosidad hasta convertirse, en algunos tratamientos, en un gel único que incluía a todas las aceitunas, las que permanecían suspendidas en él.

Posteriormente algunos de estos tratamientos fueron perdiendo viscosidad y las aceitunas se precipitaron en el fondo del recipiente.

A continuación se detallan los resultados obtenidos, referentes a la actividad enzimática observada sobre los frutos (ablandamiento) y a la formación de la mencionada sustancia gelatinosa.

Testigos

— *Serie estática*

- Medio I: frutos sin ablandamiento; gel inicial y final muy abundante
- Medio II: frutos sin ablandamiento; gel inicial y final muy abundante
- Medio III: frutos sin ablandamiento; gel inicial mediano, final abundante
- Medio IV: frutos sin ablandamiento; sin formación de gel

— *Serie dinámica*

- Medio I: frutos sin ablandamiento; gel inicial y final muy abundante
- Medio II: frutos sin ablandamiento; gel inicial y final muy abundante
- Medio III: frutos sin ablandamiento; gel inicial mediano, final abundante
- Medio IV: frutos sin ablandamiento; sin formación de gel

Saccharomyces oleaginosus

— *Serie estática*

- Medio I: 45 % de frutos medianamente ablandados, sólo en cavidad peduncular; sin formación de gel (sólo líquido espeso inicialmente)
- Medio II: 100 % de frutos ablandados (25 % muy ablandados); sin formación de gel
- Medio III: frutos sin ablandamiento; sin formación de gel
- Medio IV: 85 % de frutos ablandados; sin formación de gel

— *Serie dinámica*

- Medio I: 10 % de frutos medianamente ablandados; gel inicial y final regular
- Medio II: 55 % de frutos medianamente ablandados; sin formación de gel
- Medio III: frutos sin ablandamiento; gel inicial y final escaso
- Medio IV: frutos sin ablandamiento; sin formación de gel

Rhodotorula sp.

— *Serie estática*

- Medio I: 100 % de frutos ablandados (50 % muy ablandados); gel inicial abundante; final mediano
- Medio II: 100 % de frutos ablandados (50 % muy ablandados); sin formación de gel.
- Medio III: 100 % de frutos ablandados (50 % muy ablandados); gel inicial abundante-mediano, final regular
- Medio IV: 10 % de frutos levemente ablandados; sin formación de gel

— *Serie dinámica*

- Medio I: frutos sin ablandamiento; gel inicial y final muy abundante
- Medio II: 30 % de frutos medianamente ablandados; gel inicial y final escaso
- Medio III: 100 % de frutos muy ablandados (prácticamente 100 % de ablandamiento); sin formación de gel
- Medio IV: frutos sin ablandamiento; sin formación de gel

Hansenula anomala

— *Serie estática*

- Medio I: frutos sin ablandamiento; gel inicial y final muy abundante
- Medio II: frutos sin ablandamiento; gel inicial y final muy abundante
- Medio III: frutos sin ablandamiento; gel inicial y final abundante
- Medio IV: frutos sin ablandamiento; sin formación de gel

— *Serie dinámica*

- Medio I: frutos sin ablandamiento; gel inicial y final muy abundante

Medio II: frutos sin ablandamiento; gel inicial y final muy abundante
 Medio III: frutos sin ablandamiento; gel inicial y final abundante
 Medio IV: frutos sin ablandamiento; sin formación de gel

NOTA: Los frutos denominados "sin ablandamiento", corresponden a aceitunas de buena textura, firmes.

A continuación se transcriben los lapsos correspondientes hasta la aparición de los primeros frutos con síntomas de ablandamiento y los transcurridos hasta la obtención de los porcentajes máximos de frutos ablandados.

Tratamiento	Aparición primeros frutos ablandados	% máximo de frutos ablandados
<i>Testigos</i>		
— <i>Serie estática</i> Medios I-II-III y IV	—	—
— <i>Serie dinámica</i> Medios I-II-III y IV	—	—
<i>Saccharomyces oleag.</i>		
— <i>Serie estática</i>		
Medio I	A los 35 días	A los 60 días
Medio II	A los 21 días	A los 60 días
Medio III	—	—
Medio IV	A los 28 días	A los 60 días
— <i>Serie dinámica</i>		
Medio I	A los 50 días	A los 60 días
Medio II	A los 35 días	A los 60 días
Medio III	—	—
Medio IV	—	—
<i>Rhodotorula sp.</i>		
— <i>Serie estática</i>		
Medio I	A los 17 días	A los 45 días
Medio II	A los 17 días	A los 38 días
Medio III	A los 25 días	A los 38 días
Medio IV	A los 38 días	A los 50 días
— <i>Serie dinámica</i>		
Medio I	—	—
Medio II	A los 45 días	A los 50 días
Medio III	A los 10 días	A los 30 días
Medio IV	—	—
<i>Hansenula anomala</i>		
— <i>Serie estática</i> Medios I-II-III y IV	—	—
— <i>Serie dinámica</i> Medios I-II-III y IV	—	—

B) *Con Gel de Polipectato de Sodio.*

a) La multiplicación de las 3 levaduras empleadas en este ensayo, para el medio de cultivo sembrado y para cada respectiva temperatura, se puede clasificar de la siguiente manera:

Saccharomyces oleaginosus: rápida

Hansenula anomala: rápida

Rhodotorula sp.: medianamente rápida

Testigos: sin desarrollo.

b) Las 3 levaduras mostraron una moderada actividad enzimática pectolítica sobre el medio empleado, manifestada por depresiones alrededor de sus colonias.

c) Los primeros síntomas de depresión se manifestaron en cada uno de los siguientes días, posteriores a la siembra:

Saccharomyces oleaginosus: 3er. día

Rhodotorula sp.: 3er. día

Hansenula anomala: 7mo. día

d) De acuerdo a la profundidad observada en dichas depresiones, la actividad enzimática de las levaduras se puede clasificar de la siguiente manera:

Saccharomyces oleaginosus: mediana (depresiones suaves, bien marcadas)

Rhodotorula sp.: mediana (depresiones suaves, bien marcadas)

Hansenula anomala: escasa (depresiones muy suaves).

C) *Con Aceitunas Estériles.*

a) *Características del desarrollo de las levaduras en los diversos tratamientos.*

Testigos

— *Serie 10 días*

Medios I - II y III: sin desarrollo

— *Serie 20 días*

Medios I - II y III: sin desarrollo

Saccharomyces oleaginosus

— *Serie 10 días*

Medios I, II y III: abundante, muy rápido

— *Serie 20 días*

Medios I, II y III: abundante, muy rápido

Rhodotorula sp.

— *Serie 10 días*

Medio I: abundante, medianamente rápido; leve velo superficial

Medio II: abundante, medianamente rápido; regular velo superficial
 Medio III: abundante, medianamente rápido; mediano velo superficial

— Serie 20 días

Medio I: abundante, medianamente rápido; muy leve velo superficial
 Medio II: abundante, medianamente rápido; leve velo superficial
 Medio III: abundante, medianamente rápido; regular velo superficial

Hansenula anomala

— Serie 10 días

Medio I: abundante, rápido; mediano velo superficial
 Medio II: abundante, rápido; mediano velo superficial
 Medio III: abundante, rápido; abundante velo superficial

— Serie 20 días

Medio I: abundante, rápido; regular velo superficial
 Medio II: abundante; rápido; mediano velo superficial
 Medio III: abundante, rápido; mediano-abundante velo superficial

b) *Actividad enzimática.*

Testigos

— Serie 10 días

Medios I, II y III: frutos sin ablandamiento, buena consistencia

— Serie 20 días

Medio I: frutos sin ablandamiento, buena consistencia
 Medio II: frutos sin ablandamiento, buena consistencia
 Medio III: 10% frutos con ablandamiento, resto buena consistencia

Saccharomyces oleaginosus

— Serie 10 días

Medio I: 20% de frutos ablandados en zona cavidad peduncular
 Medio II: 45% de frutos ablandados en zona cavidad peduncular
 Medio III: 65% de frutos ablandados en zona cavidad peduncular

— Serie 20 días

Medio I: 100% de frutos ablandados, algunos muy ablandados
 Medio II: 100% de frutos ablandados, algunos muy ablandados
 Medio III: 95% de frutos ablandados, algunos muy ablandados

Rhodotorula sp.

— Serie 10 días

Medio I: 65% de frutos ablandados en zona cavidad peduncular
 Medio II: 45% de frutos ablandados en zona cavidad peduncular
 Medio III: 60% de frutos ablandados en zona cavidad peduncular

— Serie 20 días

Medios I, II y III: 100% de frutos ablandados, algunos muy ablandados

Hansenula anomala

— Serie 10 días

Medios I, II y III: frutos sin ablandamiento, buena-mediana consistencia

— Serie 20 días

Medios I, II y III: frutos sin ablandamiento, buena consistencia

C) *Ensayos Complementarios.*

- 1) *Temperatura de incubación*
- 2) *Edad del cultivo*
- 3) *Concentración de sal (ClNa) en el medio*

Debido a que los resultados referentes al punto 2) (Edad del cultivo) son coincidentes entre las dos series, es decir, que no se han apreciado diferencias entre los tratamientos homólogos de las mismas, las observaciones se dan conjuntamente:

- *Rhodotorula sp.* de 14 días desde el repique
- *Rhodotorula sp.* de 25 días desde el repique

20° C

- Agar de malta: abundante desarrollo, rápido
- A. de m. 2,5% ClNa: abundante desarrollo, medianamente rápido
- A. de m. 5,0% ClNa: mediano-abundante desarrollo, lento

Ambiente (aproxim. 24° C)

- Agar de malta: abundante desarrollo, rápido
- A. de m. 2,5% ClNa: abundante desarrollo, medianamente rápido
- A. de m. 5,0% ClNa: mediano-abundante desarrollo, lento

30° C

Agar de malta, A. de m. 2,5% ClNa y A. de m. 5,0% ClNa: sin desarrollo.

37° C

Agar de malta, A. de m. 2,5% ClNa y A. de m. 5,0% ClNa: sin desarrollo

4) *Acidez del medio* (Ver pág. 56).

5) *Presencia de sorbato (sorbato de potasio) en el medio*

— *Saccharomyces oleaginosus*

- Agar de malta : abundante desarrollo, rápido
- A. de m. 0,05 % sorb.: sin desarrollo
- A. de m. 0,1 % sorb.: sin desarrollo
- A. de m. 0,02 % sorb.: sin desarrollo

— *Rhodotorula sp.*

- Agar de malta : abundante desarrollo, rápido
- A. de m. 0,05 % sorb.: mediano desarrollo, rápido
- A. de m. 0,1 % sorb.: mediano desarrollo, medianamente rápido
- A. de m. 0,2 % sorb.: mediano desarrollo, medianamente rápido

— *Hansenula anomala*

- Agar de malta : abundante desarrollo, rápido
- A. de m. 0,05 % sorb.: mediano-abundante desarrollo, rápido

A. de m. 0,1 % sorb.: mediano desarrollo, medianamente rápido
 A. de m. 0,2 % sorb.: mediano desarrollo, medianamente rápido

6) Concentración de nutrientes en el medio

Los resultados de este ensayo corresponden a los dados en el Método C (con aceitunas estériles), página 61.

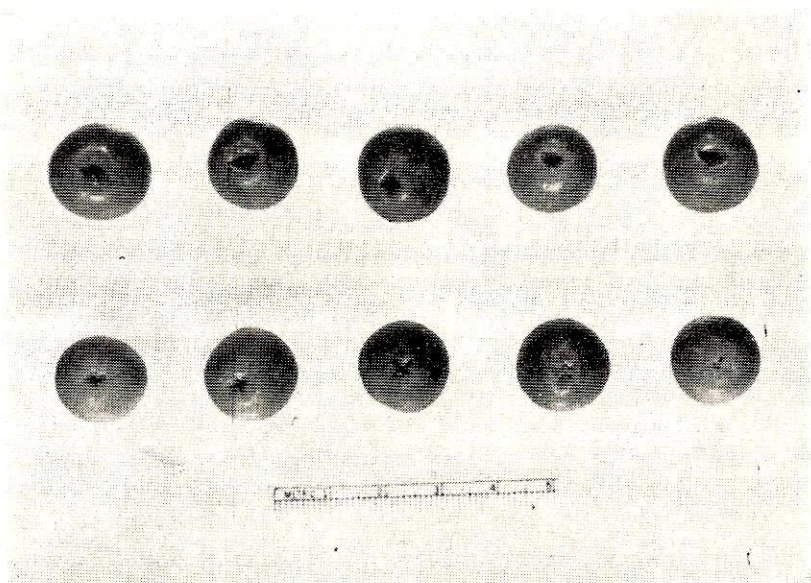


Fig. 1 — Aceitunas con síntomas de ablandamiento causados por la actividad enzimática pectolítica de *Saccharomyces oleaginosus* y *Rhodotorula sp.*

Serie superior: testigos normales (sin ablandamiento).

Serie inferior: frutos ablandados (intensidad creciente de izquierda a derecha).

CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas de la ejecución de los ensayos en las condiciones descritas, se detallan a continuación:

A) Con Preparaciones Crudas de Enzimas.

a) Este ensayo puso de manifiesto la actividad enzimática pectolítica de *Saccharomyces oleaginosus* y de *Rhodotorula sp.*

b) Esta actividad se manifestó con diferente intensidad según la levadura y el medio de cultivo considerado. Puede señalarse que el efecto de ablandamiento fue máximo, ya que se produjo sobre la totalidad de los frutos, en *Rhodotorula sp.* serie estática medios I, II y III, serie dinámica medio III y en *Saccharomyces oleaginosus* serie

estática medio II, siendo muy pronunciado también (85 % de frutos ablandados) en el medio IV de esta serie.

c) *Hansenula anomala* no produjo ningún efecto de ablandamiento enzimático sobre los frutos.

B) *Con Gel de Polipeptato de Sodio.*

a) Este ensayo puso de manifiesto la actividad enzimática pectolítica de las 3 levaduras en estudio.

b) Dicha actividad en general fue moderada, siendo comparativamente mucho menor que la desarrollada por algunos mohos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, etc.¹

c) *Saccharomyces oleaginosus* y *Rhodotorula sp.* demostraron una actividad mayor que *Hansenula anomala*, siendo ésta muy débil.

C) *Con Aceitunas Estériles.*

a) El desarrollo de las 3 levaduras en estudio fue abundante en todos los medios de cultivo ensayados, correspondientes tanto a las series 10 días como a las series 20 días de incubación. Es decir, se consiguió superar los problemas presentados en los ensayos previos, referentes a la falta o deficiencia de desarrollo de *Rhodotorula sp.*, lográndose además un muy buen desarrollo de *Saccharomyces oleaginosus* y *Hansenula anomala*.

b) Los testigos, tanto de la serie 10 días como de la 20 días de incubación, se presentaron en general con buena consistencia, ya que sólo el tratamiento correspondiente al medio III de la serie 20 días presentó 10 % de frutos (2 sobre 20) con ablandamiento.

c) El ensayo puso de manifiesto la actividad enzimática pectolítica, tanto de *Saccharomyces oleaginosus* como de *Rhodotorula sp.*, ya que en ambos casos se obtuvo un porcentaje variable de frutos ablandados en los tratamientos correspondientes a la serie 10 días y prácticamente el total de los frutos ablandados en los de la serie 20 días.

d) Para *Saccharomyces oleaginosus* serie 10 días, el porcentaje de frutos ablandados fue proporcional al contenido en glucosa de los medios de cultivo empleados. No ocurrió lo mismo con *Rhodotorula sp.*

e) Para la serie 20 días, en los tratamientos de *Saccharomyces oleaginosus* y *Rhodotorula sp.*, la diferente concentración de glucosa de los medios de cultivo empleados no fue significativa en cuanto a los resultados obtenidos, puesto que el medio con más baja concentración produjo ya el efecto de ablandamiento sobre el total de los frutos.

f) *Hansenula anomala* no presentó frutos ablandados en los tratamientos de ninguna de las 2 series.

D) *Ensayos Complementarios.*1) *Temperatura de incubación. (Rhodotorula sp.)*

a) Las temperaturas de 20°C y 24°C son favorables para su desarrollo.

b) Las temperaturas de 30°C (ocasionalmente hasta 32-33°C) y 37°C son inhibitoras de su desarrollo.

2) *Edad del cultivo. (Rhodotorula sp.)*

No se observó ninguna diferencia de desarrollo entre los cultivos homólogos, sembrados con stocks de 14 y 25 días desde el repique, respectivamente.

3) *Concentración de sal (ClNa) en el medio. (Rhodotorula sp.)*

a) No se observaron diferencias entre los cultivos mantenidos a 20°C y a 24°C.

b) En ambos casos, el 2,5 % de ClNa no afectó al desarrollo final de la levadura en estudio, comparado con el testigo, pero demoró algo el mismo.

c) En ambos casos, el 5,0% de ClNa afectó tanto al desarrollo final como a la velocidad del mismo, ya que la levadura en estudio no alcanzó a tener igual desarrollo que el testigo o el tratamiento con 2.5 % de ClNa y además fue más lento que el de los mencionados.

d) Parecería que la concentración del 5,0 % de ClNa en el medio, si bien no es inhibitora del desarrollo de *Rhodotorula sp.*, se encuentra próxima a ese valor.

4) *Acidez del medio (ver pág. 56)*5) *Presencia de sorbato (sorbato de potasio) en el medio*– *Saccharomyces oleaginosus*

La presencia de sorbato, a cualquiera de los niveles de concentración ensayados, inhibe el desarrollo de esta levadura.

– *Rhodotorula sp.*

a) La presencia de sorbato, a cualquiera de los niveles de concentración ensayados, afecta al desarrollo de esta levadura, haciéndolo menos abundante que el del testigo correspondiente.

b) Las concentraciones 0,1 % y 0,2 % afectan también la velocidad de desarrollo, haciéndola más lenta que las del correspondiente testigo y de la concentración 0,05 %.

– *Hansenula anomala*

a) La presencia de sorbato, a cualquiera de los niveles de concentración ensayados, afecta al desarrollo de esta levadura,

haciéndolo menos abundante que el testigo correspondiente. La concentración 0,05 % es de menores efectos que las concentraciones 0,1 % y 0,2 %.

b) Las concentraciones 0,1 % y 0,2 % afectan también a la velocidad de desarrollo, haciéndola más lenta que las del testigo correspondiente y la de la concentración 0,05 %.

6) *Concentración de nutrientes en el medio*

Las conclusiones de este ensayo corresponden a las dadas en el Método C (con aceitunas estériles), página 65.

NOTA: En todos los ensayos se observó que la eventual presencia de restos de pedúnculos en los frutos, impedía o retardaba considerablemente el ablandamiento de los mismos.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la Sra. VERÓNICA CRAMPTON su colaboración en la preparación de medios de cultivo y otras tareas de laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BALATSOURAS, G. D. and R. H. VAUGHN, *Some fungi that might cause softening of storage olives*. Food Research, 1958, Vol. 23, N° 3, pages 235-243.
- 2 — COOK, A. H. 1958. *The chemistry and biology of yeasts*. Academic Press Inc. Publishers, New York.
- 3 — DIXON, MALCON and EDWIN C. WEBB. 1958. *Enzymes*. Academic Press Inc. Publishers, New York.
- 4 — KERTESZ, Z. I. 1951. *The pectic substances*. Interscience Publishers, New York — London.
- 5 — KING, A. D. JR. and R. H. VAUGHN, *Media for detecting pectolytic gram-negative bacteria associated with the softening of cucumbers, olives, and other plant tissues*. Journal of Food Science, 1961, Vol. 26, N° 6, pages 635-643.
- 6 — MRAK, E. M., R. H. VAUGHN, M. W. MILLER, and H. J. PHAFF. *Yeasts occurring in brines during the fermentation and storage of green olives*. Food Technology, 1956, Vol. X, N° 9, pages 416-419.
- 7 — NORTJE, BAREND K. and R. H. VAUGHN. *The pectolytic activity of species of the genus Bacillus: qualitative studies with Bacillus subtilis and Bacillus pumilus in relation to the softening of olives and pickles*. Food Research, 1953, Vol. 18, N° 1, pages 57-69.
- 8 — PRESCOTT, SAMUEL C. and CECIL G. DUNN. 1959. *Industrial Microbiology, third edition*. Mc. Graw Hill Book Co.
- 9 — RAINBOW, C. and A. H. ROSE. 1963. *Biochemistry of industrial microorganisms*. Academic Press Inc. Publishers, New York.

- 10 — ROSE, A. H. 1961 *Industrial microbiology*. Butterworths, Washington.
- 11 — VAUGHN, R. H., H. C. DOUGLAS, and J. R. GILLILAND. 1943. *Production of Spanish-type green olives*. Bulletin 678, Agricultural Experiment Station, University of California.
- 12 — VAUGHN, R. H., J. H. LEVINSON, C. W. NAGEL, and P. H. KRUMPERMAN. *Sources and types of aerobic microorganisms associated with the softening of fermenting cucumbers*. Food Research, 1954, Vol. 19, Nº 5, pages 494-502.
- 13 — VAUGHN, R. H., G. D. BALATSOURAS, G. K. YORK II, and C. W. NAGEL. *Media for detection of pectinolytic microorganisms associated with softening of cucumbers, olives, and other plant tissues*. Food Research, 1957, Vol. 22, Nº 6, pages 597-603.
- 14 — VAUGHN, R. H., T. JAKUBCZYK, J. D. MAC MILLAN, and T. E. HIGGINS. *Some pink yeasts associated with softening of olives*. Bacteriological Proceedings, 1964.