



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Producción de bacteriocinas de bacterias lácticas aisladas de encurtidos

Alumno: Laura García Zapata

Septiembre, 2015



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Producción de bacteriocinas de bacterias lácticas aisladas de encurtidos

Alumno: Laura García Zapata

Septiembre, 2015

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Los encurtidos.....	5
1.2. Proceso de fermentación.....	6
1.3. Control de la fermentación.....	9
1.4. Valor nutritivo encurtidos.....	9
1.5. Tipos de alimentos fermentados.....	10
1.6. Bacterias ácido lácticas.....	15
1.7. Componentes antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas..	18
1.8. Bacteriocinas.....	18
1.9. Mecanismos de inhibición.....	21
1.10. Bacteriocinas como aditivos alimentarios.....	23
1.11. Métodos aplicación de bacteriocinas en los alimentos.....	23
1.12. Bacteriocinas en productos enlatados o conservas.....	24
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
3.1. Alimentos utilizados.....	26
3.2. Medios de cultivos empleados.....	26
3.3. Material de laboratorio.....	28
3.4. Preparación de los medios de cultivo.....	29
3.5. Procesado de los alimentos.....	29
3.6. Recuentos bacterianos.....	30
3.7. Producción de bacteriocinas.....	30
3.8. Tinción de Gram.....	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
4.1. Recuento bacteriano.....	33
4.2. Tinción de Gram de los aislados.....	35
4.3. Bacterias productoras de bacteriocina.....	38
5. CONCLUSIONES.....	42
6. BIBLIOGRAFÍA.....	43

RESUMEN

Los encurtidos vegetales son un tipo de alimentos que consumen gran parte de la población, ya que su tratamiento no modifica los valores nutricionales de los vegetales. En su transformación a encurtidos pasan por un proceso de fermentación en el que varían algunas de sus características físico-químicas y microbiológicas, actuando para esto una serie de microorganismos, entre ellos están las bacterias ácido lácticas que transforman los azúcares de vegetal en ácido láctico y otros compuestos. A su vez, estas bacterias pueden producir bacteriocinas que actúan frente a microorganismos patógenos que se desarrollan en estos alimentos, impidiendo su rápida putrefacción y manteniendo sus cualidades organolépticas y microbiológicas de modo que no perjudiquen la salud del consumidor. En este trabajo se han aislado una serie de bacterias lácticas procedentes de encurtidos para poder ensayar su actividad antimicrobiana frente a diferentes bacterias alterantes.

ABSTRACT

The pickles vegetables are a type of food consumed by much of the population, since in his treatment not the nutritional value of vegetables changed. In its transformation pickles go through a fermentation process in which vary some of their physicochemical and microbiological characteristics, where they operate a number of organisms, including lactic acid bacteria are transforming plant sugars into lactic acid and other compounds. Also, these bacteria produce bacteriocins which act against pathogenic microorganisms that grow in these foods, preventing rapid putrefaction and keeping its organoleptic and microbiological qualities so that no harm consumer health. In this work we have isolated a number of lactic acid bacteria from pickles to test its anti microbial activity against different spoilage bacteria.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los encurtidos

Se les llama encurtidos a los vegetales u hortalizas que son conservados mediante procesos de acidificación. Esto puede lograrse mediante la adición de sal común, que origina una fermentación láctica espontánea del azúcar del vegetal, en este caso se clasifican como encurtidos fermentados; pero si se logra añadiendo directamente ácido acético o vinagre al vegetal son encurtidos no fermentados. El encurtido permite conservar los productos vegetales durante mucho tiempo, y tiene la ventaja de que sus características nutritivas y organolépticas se mantienen. Todos los productos de esta naturaleza presentan una gran ventaja y es que el riesgo de intoxicación alimenticia es mínimo.

El ácido que interviene en muchas ocasiones en estos alimentos es el ácido acético procedente del vinagre, pero también podemos encontrar ácido cítrico procedente de muchas frutas, así como el ácido láctico procedente de los procesos de fermentación. Todos los ácidos que intervienen contribuyen en el sabor característico que adquiere el producto final, pero ninguno de estos tiene la capacidad conservadora del ácido acético, y su influencia depende fundamentalmente de su efecto sobre el pH.

En la producción de encurtidos se siguen una serie de pasos o fases. (Martínez, 1988). Se describen a continuación:

- Materia prima: está constituido por los frutos inmaduros de las especies utilizadas.
- Selección: consiste en la eliminación de las partes blandas de la planta, que normalmente contienen poblaciones de hongos.
- Calibrado: los frutos se clasifican según su tamaño.
- Lavado: se realiza para disminuir la suciedad y los restos de tierra que los frutos llevan adheridos. Al ser la fermentación ácido- láctica un proceso microbiológico, la higiene en el manejo de la materia es fundamental.
- Fermentación: es el proceso más importante que explicamos más detalladamente.

1.2. Proceso de Fermentación

El proceso de fermentación es común en una gran cantidad de alimentos, no sólo encurtidos, sino también pan, cerveza, queso, embutidos, etc. Este proceso es el responsable de las características distintivas de los productos fermentados, como pueden ser su textura, sabor y aroma, prolongación de su vida útil y de los beneficios que presentan para la salud. (Holzapfel, 2002).

La fermentación realiza una serie de beneficios en los alimentos como puede ser el incremento de vitaminas, aminoácidos esenciales y proteínas. A su vez, ayuda a la digestión de proteínas y fibras, aumenta la biodisponibilidad de micronutrientes y degradación de factores antinutricionales, además de reducir la toxicidad de los alimentos con la producción de factores antimicrobianos (Holzapfel, 2002; Hansen, 2002).

El proceso de fermentación de los encurtidos consiste en colocar las especies de hortalizas que se han utilizado para hacer los encurtidos con solución salina (salmuera) y dejar que la flora microbiana, asociada de forma natural a la materia prima, realice la fermentación natural. Debemos evitar la actividad microbiana causante de fermentaciones anómalas y crear un medio adecuado y favorable a la fermentación ácido- láctica, es por esto por lo que no se utiliza agua solamente para la salmuera (Martínez, 1988).

En este proceso es cuando entran en juego las bacterias ácido lácticas, que son el objetivo de nuestro estudio. La fermentación ácido láctica se consigue mediante la combinación de dos factores:

- La concentración de sal. Esta inhibe el crecimiento de bacterias y hongos indeseables y selecciona la mayoría de las bacterias del ácido láctico. (Jones, 1997).
- Descenso de pH debido a la producción de ácido láctico por las bacterias fermentativas.

Este proceso tiene lugar en los depósitos de plástico en los que se van a mantener, y tiene lugar en anaerobiosis. Durante este proceso se producen cambios físicos, químicos y microbiológicos en los alimentos. (Martínez, 1988).

Cambios físicos

En las primeras 48- 72 horas, el agua, los azúcares, proteínas y minerales y otros tipos de sustancias se difunden a la salmuera por ósmosis. Estas sustancias constituirán el alimento de las bacterias productoras de ácido láctico y otros microorganismos. Debido a esto, el alimento pierde peso y se arruga. Después de este periodo, la sal empieza a entrar en los tejidos y lleva consigo la entrada de agua, gracias a esto los productos ganan peso y vuelven a la situación original.

Cambios químicos

El cambio químico más importante es la transformación de los azúcares presentes en las hortalizas en ácido acético gracias a la acción microbiana. Aunque el principal producto de la fermentación es el ácido láctico, también se producen pequeñas cantidades de ácido acético.

A medida que aumenta la producción de ácido láctico, desciende el pH inicial de la salmuera (6,5- 7), pasando a valores entre 3,4 y 3,8, pero nunca superior a 4.

Cambios microbiológicos

Los microorganismos más importantes que intervienen en la fermentación son:

- Bacterias productoras de ácido láctico
- Bacterias productoras de gases
- Levaduras.

Estos microorganismos están presentes de forma natural en los alimentos. A medida que desciende la concentración de la salmuera, la rápida producción de ácido láctico inhibe el desarrollo de las bacterias productoras de gases.

Las bacterias productoras de ácido láctico, aunque presentan variaciones estacionales y de distribución, son las responsables de los mayores cambios en los frutos. Podemos encontrar:

- *Leuconostoc mesenteroides*, predomina en los primeros momentos de la fermentación.
- *Streptococcus fecalis*, tiene fermentación de tipo homoláctico, transformando la lactosa en ácido láctico.

- *Pediococcus cerevisiae*
- *Lactobacillus brevis*, contribuye a la formación de ácido láctico y también es productora de gas.
- *Lactobacillus plantarum* es la bacteria más importante a la hora de producir ácido láctico.

Normalmente estas son las BAL más comunes en la fermentación de vegetales como aceitunas, pepinos o chucrut, aunque no son las únicas presentes. (González, 1963; Vaughn, 1982; Fleming, 1984).

Dentro del grupo de las bacterias productoras de gases tenemos varias especies:

- Coliformes del género *Aerobacter*, caracterizadas por la producción de anhídrico carbónico e hidrógeno.
- *Lactobacillus brevis*.

Las levaduras pueden dividirse en dos grupos:

- Levaduras oxidativas o formadoras de película en la superficie de la salmuera, éstas consumen ácido láctico por oxidación. Dentro de este grupo están los géneros *Debaryomyces*, *Endomycopsis* y *Candida*. Es necesario la eliminación de estas levaduras debido a que podría aumentar el pH de la salmuera y así aumentar la presencia de organismos sensibles al ácido que causan la putrefacción. (Nout y Rombouts, 1992)
- Levaduras que desarrollan su actividad en la masa de salmuera y fermentan restos de azúcares, produciendo una fermentación gaseosa y alcohol. Pertenecen a este grupo: *Torulopsis*, *Brettanomyces*, *Zygosacharomyces*, *Hansenula* y *Kloeckera*. La adicción de ácido sórbico inhibe la actividad de estas levaduras.

La fermentación láctica es producida por las bacterias ácido lácticas, su actividad se desarrolla en anaerobiosis y se manifiesta en el proceso de transformación de los azúcares presentes en la muestra vegetal en ácido láctico, etanol y dióxido de carbono.

El ácido láctico es un compuesto incoloro cuya fórmula es $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$, es un líquido viscoso y no volátil, con una masa molecular de 90,08. Este producto se da

bajo formas ópticamente activas, dextrógiras y levógiras, llamadas ácido D - Láctico y ácido L – Láctico respectivamente. El ácido láctico en su estado natural es una mezcla ópticamente inactiva formada por partes iguales de ambas formas D y L, conocida como mezcla racémica.

En esta etapa también se pueden producir microorganismos responsables de la putrefacción del alimento, como pueden ser propionilbacterias y clostridios, que degradan el ácido láctico en el caso de que la concentración de sal y ácido es demasiado baja o si el pH es demasiado alto. También se pueden desarrollar levaduras oxidativas, hongos y bacterias en una etapa post-fermentación (Fleming, 1991).

1.3. Control de la fermentación

Es necesario el control de la fermentación para asegurarnos el éxito de la fermentación y si se han presentado alteraciones perjudiciales en el alimento. Para esto realizaremos dos tipos de controles:

- Control de la concentración de sal en la salmuera. Realizada con un densímetro durante los primeros diez días diariamente.
- Control de pH. Se realiza mediante un Ph-metro y a diario durante los primeros 15 días.
- Control de observación de frutos y depósitos de fermentación. Nos indica si hay alguna alteración en la fermentación así como el final de la fermentación con respecto a los cambios físicos.

1.4. Valor nutritivo encurtidos

En los procesos de conservación de los encurtidos se suele producir la pérdida de las vitaminas y nutrientes que posea el vegetal. Los encurtidos fermentados con alta salinidad y en los que no sea necesario un posterior desalado, suelen conservar los nutrientes. Pero cuando este es necesario, se elevan las pérdidas de nutrientes, descende la cantidad de azúcares, de ácido ascórbico, vitamina B1 y caroteno. (Martínez, 1988).

1.5. Tipos de alimentos fermentados

1.5.1. Aceitunas

Las aceituna, los frutos del olivo, tienen gran importancia por su capacidad para prevenir enfermedades cardíacas y relacionadas con el aparato circulatorio, ya que regula los niveles de colesterol en el organismo.

Al inicio del proceso de fermentación de estos alimentos predominan géneros *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, que compiten con la microbiota Gram-positiva, que a medida que continúa el proceso van desapareciendo y predominando otras, por lo que al final encontramos generalmente *Lactobacillus*. (Fernández et al., 1993; Harris, 1998).

Con respecto a su valor nutricional, las aceitunas son frutos grasos, siendo el 70% de la grasa monoinsaturada, por lo que estos alimentos son muy ricos en ácido oleico que le aporta numerosos efectos beneficiosos para el organismo. Gracias a este ácido, las aceitunas son importantes para la prevención de enfermedades cardiovasculares, ya que reduce los triglicéridos plasmáticos (LDL- colesterol y colesterol total) y aumenta el colesterol HDL (colesterol bueno).

Estos alimentos son fuente de fibra, siendo ésta muy digestiva para el organismo. Con respecto a su contenido en minerales, destaca el aporte de sodio ya que forma parte de la salmuera. También aportan pequeñas cantidades de vitamina B y E, siendo ésta última importante ya que, como el ácido oleico, evitan la oxidación de las lipoproteínas (transportadoras de colesterol a la sangre) y de otras sustancias que favorecen el desarrollo de cáncer.

1.5.2. Pepinillos

Los pepinillos son un tipo de pepinos llamados también pepinos cortos, son característicos para su uso en encurtidos. Esta especie vegetal es más resistente a los cambios de temperatura y tolera mejor las altas concentraciones de sal, la

bacteria que finaliza el proceso de fermentación es *L. plantarum* debido a su mayor tolerancia al ácido que otras BAL (Fleming, 1984).

Este alimento destaca por su aporte de sodio, debido a su curación con la salmuera, así como alto contenido en potasio, siendo importante en la transmisión del impulso nervioso. También se caracteriza por su alto contenido en ácido ascórbico y pequeñas cantidades de complejo vitamínico B. (Rozano et al., 2004). El ácido ascórbico actúa como antioxidante además de enriquecer el producto en vitamina C. Gracias a su poder antioxidante es capaz de neutralizar los radicales libres que se forman en los tejidos vivos, por lo que resulta primordial para la prevención de tumores (Astiasarán y Martínez, 2000).

1.5.3. Cebollas

Normalmente para encurtidos se suelen utilizar un tipo de cebolla pequeño tamaño, que suele ser exclusiva para encurtidos.

La cebolla es uno de los alimentos asociados a la reducción de enfermedades cardiovasculares o determinados cánceres, entre otros beneficios, esto es gracias a una serie de compuestos bioactivos como son los fructanos, compuestos azufrados y compuestos fenólicos (Torija et al., 2013). Los fructanos actúan sobre la microflora del colon, la fisiología gastrointestinal y el metabolismo de los lípidos además de influir en enfermedades como la osteoporosis y el cáncer de colon (Van-Konijnenburg, 2009). Además se caracterizan por su importante papel como agentes prebióticos, por lo que facilitan el desarrollo de la flora intestinal y previenen numerosas enfermedades (Torija, 2011).

Los compuestos azufrados que también contienen estos alimentos reducen los lípidos en la sangre, el colesterol y la actividad anti plaquetaria, lo que hace que se reduzca el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. (Van- Konijnenburg, 2009).

Por otro lado, los compuestos fenólicos, entre los que destacan los flavonoides como la quercitina, siendo el más abundante en estos alimentos, tiene capacidad para

reducir los procesos inflamatorios agudos y crónicos (Bozin et al., 2008). También este compuesto puede estimular la lipólisis de los adipocitos, por lo que es beneficioso en enfermedades cardiovasculares. (Muñoz et al., 2010).

Además de estos compuestos, la cebolla presenta alto contenido en fibra y en vitaminas del grupo B, que intervienen en la formación de anticuerpos del sistema inmunológico. Contiene también vitaminas C y E, ambas con efecto antioxidante y con respecto a los minerales, es una fuente importante de potasio, fósforo y magnesio, interviniendo el potasio en el impulso nervioso y, fósforo y magnesio en la formación de los huesos y dientes. (Van- Konijnenburg, 2009).

1.5.4. Altramuces

Los altramuces o lupinos se caracterizan por su alto contenido en vitaminas, por lo que es considerado una de las leguminosas con mayor potencial agronómico, especialmente en España. Estudios en estos alimentos destacan el alto contenido de proteínas, lípidos y ácidos grasos insaturados. Además poseen alcaloides como la lupanina, albina y 13- α - hidroxilupanina. (Planchuelo y Fuentes, 2007). Este alimento también es rico en celulosa y hemicelulosa por lo que es una buena alternativa para la alimentación de bovinos. Con respecto a los minerales, tiene elevado contenido en fósforo, potasio y hierro. (Ortega et al., 2010).

1.5.5. Alcaparras

Las alcaparras son las flores sin abrir de los alcaparros, y sus frutos son los alcaparrones. A este encurtido se le atribuyen propiedades medicinales como diurético, depurativo, antihemorroidal y vasoconstrictor. Las alcaparras contienen flavonoides, siendo los más importantes la rutina y quercitina. Estos flavonoides presentan importantes propiedades antioxidantes y terapéuticas como reducción de la fragilidad capilar, enfermedades hemorrágicas o hipertensión así como propiedades anticancerígenas y protege de lesiones gástricas (González et al.,

2010). Este alimento destaca también por su alto contenido en sodio y agua, seguido de proteínas e hidratos de carbono, así como también presenta cantidades apreciables de vitamina E, C y riboflavina.

1.5.6. Guindillas

La guindilla se caracteriza por su alto contenido en alcaloides, lo que le aporta importantes propiedades terapéuticas. Uno de ellos, la capsaicina, responsable de su sabor picante, estimula la circulación sanguínea así como la secreción de enzimas digestivas que protegen la pared gástrica. Las semillas de guindilla también tienen lecitina, un polifosfato que disminuye el valor de colesterol en la sangre, favoreciendo el volumen y la elasticidad de las arterias. (Franco, 1995). Así como el aceite extraído de estas semillas, presenta alto contenido en ácido oleico, y cierto contenido en ácido gadoleico, linoleico y palmítico; teniendo también altas cantidades de algunos aminoácidos esenciales. (Seigler et al., 1987).

Por otro lado, también presenta en su composición minerales como calcio, fósforo, sodio potasio y azufre; y una alta cantidad de vitaminas, destacando su alto porcentaje de vitamina C, importante para el sistema circulatorio. La vitamina A que favorece el metabolismo y la utilización de aminoácidos por las proteínas; vitamina E, con importantes funciones antioxidantes y la vitamina K, que presenta acción antihemorrágica, coagulante y acelera la cicatrización de los tejidos (Franco, 1995).

1.5.7. Pimientos rojos

El pimiento rojo es una verdura con contenido calórico bajo, además de poseer alto contenido en agua, proteína e hidratos de carbono. También se caracteriza por su contenido en vitamina C y A. Con respecto a la concentración mineral de estos alimentos, cabe destacar la presencia de potasio, aunque también están presentes en menor cantidad hierro, magnesio y fósforo.

Es importante la presencia de carotenoides, como la capsantina, es el compuesto responsable de su color pero además posee propiedades antioxidantes. Otros son los tocoferoles, precursores de la vitamina E, capaces de reducir la oxidación lipídica y enzimática, además de estar presentes en la vitamina A y C. (Waizel- Bucay y Camacho, 2011). Además, posee alta cantidad de β -carotenos, precursores de vitamina A. Todos los carotenoides también tienen actividad anticancerígena y son inmunoactivadores (Mosquera, et al., 2006).

1.5.8. Soja

La soja como alimento es importante como fuente de nutrientes que aporta en una alimentación equilibrada así como su uso en la alimentación preventiva. La soja se caracteriza por su elevado contenido proteico y lipídicos, sobre todo de ácidos grasos esenciales poliinsaturados; con respecto a los minerales, destaca su contenido en calcio, zinc y hierro. (Tomé y Mariotti, 2000).

Las isoflavonas también forman parte de su composición, aportando beneficios como antioxidante, inhibición de enzimas que intervienen en la replicación celular y anticancerígeno. (Ridner, 2006). Por otro lado, la soja también es fuente de fibras que le aportan efectos sobre el tránsito digestivo, la carcinogénesis cólica y la eliminación de colesterol y glucemia. (Tomé y Mariotti, 2000).

1.5.9. Zanahorias

La zanahoria se caracteriza por su alto contenido en vitamina A, principalmente en carotenoides con actividad provitamínica A, siendo el más importante el β -caroteno con papel antioxidante y reguladora de la respuesta inmunitaria. Aunque también podemos encontrar α - caroteno que impide la formación de la placa arterial y enfermedad coronaria; y otro caroteno, la luteína, que puede prevenir el daño oxidativo del ojo provocado por la luz.

Es fuente de vitamina E y de vitaminas del grupo B. Con respecto a los minerales se puede destacar el aporte de potasio, aunque también presenta cantidades de fósforo, magnesio, yodo y calcio. Tiene elevado contenido en agua y bajo en lípidos y proteínas. (Rozano et al., 2004)

1.5.10. *Remolacha*

Este alimento destaca por su moderado contenido calórico, además de poseer alto contenido en agua y proteínas, siendo también buena fuente de fibra. Con respecto a su contenido proteico destacan los folatos y la vitamina C, siendo los folatos importantes en la producción de glóbulos rojos y blancos y en la formación de anticuerpos. Con respecto al contenido mineral presenta alto contenido en potasio, y cierto contenido en hierro, magnesio y fósforo; siendo el potasio importante en la transmisión del impulso nervioso.

Es un potente anticancerígeno debido a la presencia de flavonoides. También desintoxica y depura la sangre y es importante en anemia y enfermedades relacionadas con la sangre por la presencia de hierro y folatos.

1.6. **Bacterias ácido lácticas**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen diversas aplicaciones pero una de las más importantes es la fermentación de alimentos tales como la leche, carne y vegetales, para obtener productos como el yogurt, quesos, encurtidos, embutidos, etc. También forman la mayoría de los probióticos, que son cultivos puros o mezcla de cultivos de microorganismos vivos, que al ser consumidos por hombres o animales en las cantidades adecuadas, mejoran las propiedades de la microflora activa. Estos cultivos se usan en la industria alimentaria, para la elaboración de productos fermentados y como complementos alimenticios con el fin de promover la salud (Ramírez et al., 2011).

En la mayoría de los casos, los probióticos se usan para estimular la salud intestinal y para estimular el sistema inmunológico. (Fuller, 1989). En el mundo se conocen

más de 20 especies diferentes de microorganismos probióticos, los cuales pueden ser aislados de diferentes tipos de materiales: del tracto intestinal humano y de animales, carnes, frutas y productos fermentados, entre otros. (Guilliland, 1990; Barboza et al., 2004). Los microorganismos que predominan pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus*. (Ogueke, 2010)

Los probióticos son beneficiosos para combatir el desarrollo de la microflora nativa en el intestino, para el control de infecciones en el intestino por patógenos entéricos, así como el control de infecciones en el tracto urogenital y para combatir la intolerancia a la lactosa. Por otro lado también se usa para reducir la incidencia de diarreas, de tumores y el colesterol sérico y enfermedades cardíacas, estimula el sistema inmune y el movimiento intestinal. (Ramírez et al, 2011).

En general, las bacterias lácticas son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes, oxidasa, catalasa y bencidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Carr et al., 2002; Vázquez et al., 2009).

1.6.1. Clasificación de las bacterias lácticas

Las bacterias ácido lácticas se clasifican en géneros en función de sus diferentes características como morfología, modo de fermentación, crecimiento, etc. Son los siguientes géneros: (Axelsson, 1998; Car et al., 2002).

Aerococcus, *Alloinococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactophaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*.

Pero los más representativos son:

Lactobacillus, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*.

En la siguiente tabla (Tabla 1) podemos ver la utilización de estos géneros más representativos y sus aplicaciones:

Género	Principales especies y aplicaciones
<i>Streptococcus</i>	<i>S. lactis</i> , <i>S. cremoris</i> . Mantequilla, queso, yogurt <i>S. thermophilus</i> . Yogurt, queso.
<i>Pediococcus</i>	<i>P. cerevisiae</i> . Cerveza, carne procesada. <i>P. halophilus</i> . Salsa de soya
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. mesenteroides</i> . <i>L. citrovorum</i> . Alimentos fermentados, producción de dextrán.
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. bulgaricus</i> . Yogurt, bebidas fermentadas a base de leche. <i>L. helveticus</i> . Queso, yogurt, bebidas a base de leche fermentada. <i>L. acidophilus</i> . Yogurt, bebidas a base de leche fermentada, preparación de <i>Lactobacillus</i> . <i>L. casei</i> . Quesos, leche refinada, bebidas a base de leche fermentada, preparación de <i>Lactobacillus</i> . <i>L. plantarum</i> . Diversos alimentos fermentados, ensilajes. <i>L. fermenti</i> , <i>L. brevis</i> . Productos fermentados.
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. adolescents</i> . Leche fermentada, preparación de bacterias lácticas. El intestino de infantes y adultos. <i>B. thermophilum</i> , <i>B. Pseudolongum</i> . El intestino de animales

Tabla 1: Utilización principales bacterias ácido lácticas. (Torres, 2002)

Las bacterias homofermentadoras como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pedicococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus* poseen la enzima aldolasas y producen ácido láctico como el producto principal de la fermentación de la glucosa utilizando la vía de glucólisis. Por otro lado, las del género *Leuconostoc*, *Oenococcu*, *Weisella*, *Carnobacterium*, *Lactophaera* y algunos *Lactobacillus* son heterofermentadoras y convierten hexosas a pentosas por la vía de 6- fosfogluconatofosfocetolasa, produciendo en el proceso, además de ácido láctico, cantidades significantes de otros productos como acetato, etanol y CO₂. (Axelsson, 1998; Carr et al., 2002).

Las bacterias ácido lácticas son capaces de inhibir la acción de microorganismos alterantes y patógenos en los alimentos, por lo que son útiles a la hora de extender e incrementar la vida útil y la calidad higiénica de los alimentos. Los ácidos que producen estas bacterias (láctico, acético y propiónico) ejercen su acción antimicrobiana interfiriendo con el potencial de membrana, inhiben su transporte activo, reducen el pH intracelular, dando lugar a la liberación de iones hidrógeno y del anión correspondiente, haciendo que ambos iones inhiban una gran variedad de funciones metabólicas y el crecimiento celular. (Doores, 1993; Vazquez et al., 2009).

Estas bacterias actúan tanto contra bacterias Gram positivas como Gram negativas, levaduras o mohos.

Las bacterias lácticas pueden sobrevivir y desarrollarse en presencia de pH relativamente bajo. Esto es debido a que las bacterias lácticas poseen un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y de protones al exterior celular, que además de contribuir a la homeostasis del pH interno, origina energía (Vázquez et al., 2009).

1.7. Componentes antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas.

Las bacterias lácticas producen sustancias antagonistas que les permite tener poder conservante, inhibiendo la formación de microorganismos patógenos. Estas sustancias son ácidos como láctico y acético, el peróxido de hidrógeno y otros radicales libres, diacetilo, acetaldehído, isómeros D de los aminoácidos y otros metabolitos como moléculas pequeñas y bacteriocinas así como productos secundarios generados por la acción de lactoperoxidasa sobre el peróxido de hidrógeno y tiocianato (Hernández, et al., 1993; Shirai et al., 1996). Estos productos se clasifican en dos grupos:

- Compuestos no proteicos. Uno de estos compuestos es la reuterina. Esta sustancia sólo es producida por *Lactobacillus reuteri*, aislado del tracto gastrointestinal de personas y animales. Su actividad antimicrobiana afecta a bacterias Gram positivas y negativas, levaduras, mohos y protozoos. La reuterina se forma durante la utilización anaerobia del glicerol.
- Metabolitos del oxígeno. Las BAL en medios aerobios dan lugar a la formación de metabolitos del oxígeno, como peróxido de hidrógeno, aniones súper óxido y radicales libres.

1.8. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son moléculas que tienen estructura tipo péptido o proteína biológicamente activa, las cuales presentan acción bacteriocida sobre receptores

específicos de las células; además, la composición química de estas sustancias es muy variada y su modo de acción específico (Vázquez et al., 2009).

Las bacteriocinas se encuentran en los ribosomas de las bacterias ácido lácticas, la célula productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina. La producción de ésta ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida (Feria, 2007).

Podemos encontrar producción de bacteriocinas en numerosas bacterias Gram-Positivas y Gram- negativas, aunque las más utilizadas en la industria alimentaria son las producidas por las BAL. Por otro lado, el uso de BAL por los consumidores para la conservación de alimentos es considerado como algo natural y beneficioso para la salud (Parra, 2010). Las bacteriocinas actúan contra microorganismos no deseados o patógenos, estrechamente relacionados con el deterioro de los alimentos y causantes de enfermedades, por esta razón, se utilizan en diversas aplicaciones como son la biopreservación, la extensión en la vida útil, la acción antimicrobiana clínica y el control de la fermentación de la microflora. (Marcos et al., 2013). Esto explica la conciencia de los consumidores de los riesgos que proceden tanto de los agentes patógenos transmitidos por los alimentos, como también de los conservantes químicos usados para controlarlos. (Parra, 2010).

Las bacteriocinas son inactivadas por enzimas como la tripsina y la pepsina, las cuales se encuentran en el tracto gastrointestinal y por lo tanto, no alteran la microbiota del tracto digestivo (Marcos et al., 2013). También algunas bacteriocinas son sensibles a enzimas no proteolíticas (lipasas, amilasas y fosfolipasas), indicando así la heterogeneidad de estas moléculas. Además la mayoría son termoresistentes y estables a pH ácido y neutro (Hernández et al., 1993).

Las bacteriocinas han sido muy estudiadas por su actividad microbiana contra bacterias patógenas tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Salmonella* entre otras. (Holo et al., 2001; Vázquez et al., 2009).

1.8.1. Clasificación de bacteriocinas

La heterogeneidad en el espectro microbiano de las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas condujo a Klaenhammer (1993) a dividir las bacteriocinas en dos clases según su espectro antimicrobiano:

- Bacteriocinas activas frente a bacterias taxonómicamente relacionadas
- Bacteriocinas con un amplio rango de actividad frente a bacterias Gram positivas.

También según otros autores se pueden clasificar las bacteriocinas en función a sus características bioquímicas y genéticas. Esta es la clasificación de los compuestos propuesta por Kemperman (2003). (Monroy et al., 2009).

- **Clase I- Lantibióticos:** son pequeñas moléculas peptídicas (<5 kDa), que en su estructura contienen aminoácidos modificados como son lantionina, metil-lantionina y α - aminoácidos insaturados tales como dihidroxilamina y dehidrobutirina, que se hacen referencia como lantibióticos. Dentro de este grupo podemos incluir la nisina, que es la bacteriocina mejor caracterizada y comercializada como aditivo alimentario. Esta molécula actúa adecuadamente a pH ácido, lo que hace que se pueda utilizar en alimentos fermentados. También pertenecen a este grupo la lacticina 481 y lacticina S. A su vez en función de su estructura y modo de acción, los lantibióticos se subdividen en 2 grupos:
 - o **Clase I A: Péptidos de 2.1 a 3.4 kDa, elongados y catiónicos (2 a 7 cargas positivas).** Péptidos elongados y catiónicos que actúan a nivel de membrana y que engloban a los lantibióticos de un solo péptido y a que los que requieren la presencia de dos péptidos para ejercer su actividad.
 - o **Clase I B: Péptidos globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores enzimáticos.** Péptidos globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores enzimáticos.
- **Clase II- Pequeños péptidos- no Lantibióticos:** A este grupo pertenecen las moléculas peptídicas pequeñas termoestables (<10 kDa), no presentan estructura terciaria lo que permite su termoresistencia, haciéndola útil en la

industria alimentaria ya que resistiría a tratamientos térmicos. Un ejemplo es la pediocina PA-1.

- Clase II a: péptidos activos contra *Listeria*.
- Clase II b: Formadores de complejos para la formación de poros que dependen de dos péptidos diferentes.
- Clase II c: péptidos pequeños termoestables no modificados.
- **Clase III- Grandes proteínas termolábiles:** Son proteínas de alto peso molecular (>30 kDa) y termolábiles, como por ejemplo la helventicina J.
- **Clase IV- Bacteriocinas complejas:** Son péptidos con una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucídicas.
- **Clase V- Bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente.** Pertenecen la enterocina AS- 48 y la gasicina A.

En general, las bacteriocinas mejor conocidas y hasta ahora las únicas que han sido aceptadas como aditivo alimentario han sido la nisina y las pediocinas. Los alimentos en los que está permitido su uso son quesos, postres, leche, yogurt, alimentos fermentados, carne, pescado y productos enlatados

1.9. Mecanismos de inhibición

El espectro de inhibición muestra que tipo de microorganismos son sensibles a ser inhibidos por las bacteriocinas. Este espectro es reducido por las bacterias ácido lácticas, generalmente sobre microorganismos relacionados taxonómicamente. Según el tratamiento al que se sometan las bacteriocinas o sus extractos, puede cambiar el espectro de inhibición, como liofilización, concentración del sobrenadante, purificación y neutralización entre otros. Los extractos de bacteriocinas tienen más actividad cuando están concentrados pero hay que tener en cuenta la termoresistencia para evitar una alteración en la función de la bacteriocina. Además la acción inhibitoria de las bacteriocinas se puede reforzar con la acción conjunta de dos o más proteínas (Vázquez et al., 2009).

En cuanto a los mecanismos de inhibición utilizados por las bacteriocinas, la formación de poros en la membrana citoplasmática de células sensibles parece ser un mecanismo de acción común (Vázquez et al., 2009). Al formar estos poros,

agotan el potencial de membrana ($\Delta\Psi$) y/o el gradiente de pH y dando lugar a una pérdida de material celular. Los primeros estudios en este sentido sugieren que para que la nisina forme poros, las células sensibles requieren un $\Delta\Psi$ (con el interior negativo) y un ΔpH (con el interior alcalino) (Okereke y Montville, 1992).

La unión de las regiones hidrofóbicas de las bacteriocinas con la membrana hidrofóbica de las células se ha modelada por una simulación en ordenador con el fin de predecir como ocurre la interacción. (Lins et al., 1999). Es probable que la porción hidrofóbica se inserte en la membrana dando lugar a la formación de los poros. Se han propuesto dos modelos para la formación de éstos, el modelo de "duela de barril" y el de "cuña". Según el primer modelo cada molécula de nisina se orienta perpendicularmente a la membrana, formando un canal iónico que atraviesa la membrana (Ojcius y Young, 1991). Por el contrario, de acuerdo con el modelo de "cuña", cuando un número crítico de moléculas de nisina se han asociado con la membrana, se insertan consecutivamente formando una cuña (Driessen et al., 1995).

Hay otras bacteriocinas que también interaccionan con sitios específicos de las membranas de las células diana, probablemente con proteínas (Chikindas et al., 1993; van Belkum et al., 1991). Si bien esta interacción puede incrementar la efectividad de la bacteriocina *in vivo*, es cierto que no parece ser un requisito para su actividad en vesículas artificiales (Chen et al., 1997 a y b).

Algunos autores consideran que el espectro de inhibición de las bacteriocinas es reducido. Otros autores afirman que la susceptibilidad de las bacterias Gram negativas a las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas es mucho más reducida, debido a que se sensibilizan a la nisina tras una permeabilización de su membrana externa con compuestos quelantes (Hernández, et al., 1993). Esta variedad es debido a que algunos microorganismos pueden ser sensibles a la acción de una bacteriocina y resistentes a otra. El campo de acción de las bacteriocinas se relaciona con el contenido de cistina en la célula, habiendo por esto distintos tipos de bacteriocinas en función de su acción antimicrobiana. (Cintas et al., 2001).

1.10. Bacteriocinas como aditivos alimentarios.

El principal objetivo de los aditivos en los alimentos es obtener productos sanos que no perjudiquen a la salud del consumidor y mantengan sus cualidades organolépticas y microbiológicas hasta el momento de su consumo. El tipo de alimento (líquido, sólido, emulsión), su composición (contenido graso, proteasas y otros factores), la presencia de conservantes químicos, y la temperatura de almacenamiento, entre otros, pueden tener una enorme influencia en la actividad y efectividad de las bacteriocinas.

En cambio, los conservantes son aditivos para alimentos, como agentes físicos, químicos o naturales y que se utilizan básicamente para alargar la vida útil del producto, previniendo posibles daños o alteraciones de su sabor, textura o apariencia debidos a la acción de agentes químicos (oxidación), físicos (temperatura y luz) o biológicos (microorganismos). (Madrid, 1992).

Las bacteriocinas se pueden usar en los alimentos de distinto modo:

- Como ingredientes bioactivos en polvo para alimentos
- Como péptidos purificados, semipurificados
- A través de cultivos lácticos productores de bacteriocinas.

1.11. Métodos de aplicación de bacteriocinas en los alimentos

Se han considerado diversos métodos para la aplicación de bacteriocinas en los alimentos (Vázquez et al, 2009)

- **Añadiendo un cultivo puro BAL viables productoras de bacteriocina.**
- **Añadiendo bacterias ácido lácticas mesófilas como una protección contra el abuso de temperatura.** La cepa protectora se mantendrá en condiciones frías.
- **Añadiendo preparaciones de bacteriocina cruda.**
- **Adicionando sustancias antagónicas puras o semipuras como las bacteriocinas producidas por BAL.** Al usar este método, la dosis de bacteriocina es más precisa y más predecible. Sin embargo la aplicación se limita de acuerdo a la regulación de cada país. (Vázquez et al, 2009)

Los primeros dos métodos son considerados “*in situ*” de biopreservación, por la inoculación de la cepa productora de bacteriocina en el alimento en condiciones que favorezcan su producción. Las dos últimas son “*ex situ*”, donde la bacteriocina es producida fuera del alimento en condiciones controladas y luego aplicada al alimento.

De todas las opciones, la adición directa de bacteriocinas purificadas o semipurificadas ofrece una mejor herramienta de control para los productos, ya que se puede alcanzar una mejor distribución y se evitan los cambios físicos, químicos y organolépticos que producen los procesos fermentativos (Castro y Valbuena, 2009). Pero los casos de producción *ex situ*, pueden llegar a ser metodologías más costosas debido a que se requiere medios de cultivo y equipos para el desarrollo de las cepas y para la producción de la bacteriocina, además de las cepas iniciadoras (microorganismos completamente aislados). Adicionalmente se debe garantizar la actividad de cada extracto o de la bacteriocina e incluso puede llegar a ser necesario determinar la concentración mínima inhibitoria contra patógenos. La utilización de estos sistemas de biopreservación requiere en cualquier caso estudios preliminares para determinar el comportamiento de las bacterias en el medio de cultivo en que se desarrolla (curvas de crecimiento), y la estandarización de las técnicas para lograr producirlas en cantidades suficientes (Vázquez et al., 2009).

1.12. Bacteriocinas en productos enlatados o conservas

En muchos de los alimentos enlatados o en conservas, las bacteriocinas son utilizadas para controlar termófilos esporulados, por ser productos de baja acidez que reciben un tratamiento térmico mínimo (Rojas y Vargas, 2008). Una de las bacteriocinas más empleadas, la nisina, se utiliza para disminuir la intensidad del tratamiento térmico de los alimentos enlatados mejorando la apariencia y sabor del producto final sin comprometer la seguridad del alimento (Díez, 2011).

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio son:

- Realizar un análisis microbiológico de bacterias lácticas en diferentes tipos de encurtidos, así como su aislamiento y cultivo.
- Identificación morfológica de las bacterias mediante Tinción de Gram.
- Ensayo de la producción de bacteriocina frente *Enterococcus faecalis* S- 47 y *Listeria innocua* mediante la técnica de ensayo con pocillos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Alimentos utilizados

Para llevar a cabo este proyecto se han usado muestras de 10 alimentos distintos, el estudio se dividió en dos partes, encurtidos a granel y encurtidos en conserva

Primero se utilizaron encurtidos como aceitunas, altramuces, pepinillos, cebollas y alcaparras, todos procedentes de muestras cogidas a granel para que posean menos cantidad de conservantes.

En la segunda parte del experimento, se utilizaron cinco muestras de encurtidos distintas, pero la misma cantidad de cada una de ellas. En este caso utilizamos zanahoria, remolacha, soja, guindilla y pimiento rojo. Estos proceden de muestras en conservas puesto que era más complicado de conseguir a granel.

3.2. Medios de cultivo empleados

Se utilizaron dos tipos de medio de cultivo: MRS Agar y MRS Broth que es un medio selectivo para la obtención de bacterias lácticas, y BHA tamponado y BHA blando para sobrecapas, ya que este es un medio de ensayo adecuado para la producción de bacteriocinas.

- **MRS AGAR**

Este medio se utiliza para el recuento y cultivo de *Lactobacillus* y de otras bacterias ácido lácticas.

Composición (g/L)

- di-Amononio Hidrógeno Citrato.....2,0
- Extracto de carne.....8,0
- Extracto de levadura.....4,0
- D(+)-Glucosa.....20,0
- Magnesio Sulfato.....0,2
- Manganeso (II) Sulfato.....0,05

- Peptona Bacteriológica.....10,0
- di-Potasio Hidrógeno Fosfato.....2,0
- Sodio Acetato.....5,0
- Tween 80.....1,0
- Agar.....10,0

pH: 6,2±0,2

- **MRS BROTH**

Es utilizado para el cultivo de *Lactobacillus* y otras bacterias lácticas.

Composición (g/L)

- Protesose peptone.....10,0
- Meat extract.....8,0
- Yeast extract.....4,0
- D(+)- Glucose.....20,0
- Sodium acetate.....5,0
- Triammonium citrate.....2,0
- Magnesium sulfate.....0,2
- Manganese sulfate.....0,05
- Dipotassium phosphate.....2,0
- Polysorbate 80.....1,0

pH 6,2±0,2 at 25°C

- **BHA Tamponado**

Este medio se utiliza como medio de ensayo para la producción de bacteriocinas. Se utilizó como capa base de las placas para los ensayos de actividad antibacteriana.

Composición (g/L)

- BHI.....35,0
- Fosfato monosódico.....4,3
- Fosfato disódico.....10,0
- Agar.....17,0

El preparado comercial (BHI) se reconstituyó en tampón fosfato 0,1M, pH 7,2

- **BHA Blando**

Este medio fue empleado para cubrir la capa base una vez que haya sido inoculado con la bacteria indicadora. Este medio, utilizado como sobrecapa, se fundirá al microondas y se repartirán 6 mL por tubo antes del autoclavado.

3.3. Material de laboratorio

1. Pequeñas bolsas estériles
2. Solución salina
3. Tubos Eppendorf
4. Placas Petri
5. Puntas de distintos tamaños
6. Pipetas de varios volúmenes
7. Gradillas
8. Matraces estériles
9. Tubos de ensayo
10. Asas de siembra
11. Peso
12. Estufa
13. Autoclave
14. Stomacher o Homogeneizador
15. Guantes
16. Mechero Bunsen
17. Agua destilada
18. Torres de acero inoxidable estériles
19. Pinzas estériles
20. Alcohol
21. Portas de vidrio
22. Cristal violeta
23. Safranina
24. Lugol

25. Aceite de inmersión.

26. Microscopio

3.4. Preparación de los medios de cultivo

Para la preparación de estos medios primero habría que calcular la cantidad de medio que habría que echar en 800 mL de agua que necesitamos, según las medidas indicadas en el bote, que te indica los gramos que habría que añadir para un litro de agua. Se pesa y se añade a un matraz con la cantidad necesaria de agua destilada estéril para posteriormente esterilizarlo en el autoclave a 121°C. Se atemperan a 50°C y se vierten en placas Petri unos 15 mL por placa pero siempre al lado del mechero para evitar una posible contaminación y moviendo la placa para que el medio la cubra completamente. Una vez que están todas las placas preparadas, se dejan enfriar para que el medio se solidifique y las dejamos en la cámara frigorífica hasta su uso.

3.5. Procesado de los alimentos

Para preparar las muestras se pesan 5 gramos de cada tipo de encurtido diferente (Aceitunas, Alcaparras, Altramuces, Pepinillos y Cebollitas), se añaden a una bolsa estéril con 45 mL de solución salina al 0.9% y son procesados por el homogeneizador o Stomacher para poder homogeneizar la muestra. Posteriormente se preparan diluciones seriadas añadiendo 100µL de la solución madre sobre un Eppendorf con 0.9 mL de solución salina estéril, y de este Eppendorf volvemos a coger 100 µL que pasamos a otro tubo nuevo con otros 0.9 mL de solución salina, siempre actuando al lado del mechero Bunsen. De estas diluciones, sembramos 100 µL de cada una de ellas en placas Petri con medio MRS, desde la 0 hasta la -2 y se dejan en la estufa durante 48 horas a 30 °C. Repetimos el mismo procedimiento para cada alimento, por lo que en total tenemos 3 placas distintas por alimento, nombradas como 0, -1 y -2.

Una vez que hemos terminado este experimento lo repetimos con otros 5 encurtidos diferentes, en este caso utilizaremos zanahoria, remolacha, soja, guindilla y pimiento

rojo. Siguiendo el mismo procedimiento que ya se ha descrito y obteniendo también 3 placas para cada alimento.

3.6. Recuentos bacterianos

Los recuentos se realizan a las 24 y 48 horas donde apuntamos el número de colonias en cada placa que hemos obtenido. Pasadas las 48 horas, sembramos con una pipeta y con mucho cuidado para que no se contaminen, 10 colonias de cada alimento, picando colonias de las 3 placas distintas, y sembrando en tubos de MRS líquido, previamente rotulados para saber de qué alimento se trata y el número de colonia que es, con el fin de aislar y aumentar la concentración de cada una de las distintas colonias.

Estos tubos los dejamos en la estufa durante 24 horas para que las bacterias crezcan también en este medio. Tras este tiempo observamos si ha habido crecimiento o no en MRS líquido, observamos su turbidez, agitándolo con cuidado para que la bacteria se distribuya por todo el medio; si no hay turbidez del medio, no hay crecimiento y se descarta. Pasamos todas las colonias que hayan crecido a tubos con MRS inclinado al lado del mechero y con el asa de siembra y los dejamos en la estufa a 30°C durante 48 horas para que haya aquí también crecimiento y poder conservarlos en este medio durante más tiempo, ya que pasadas esas 48 horas se mantienen en la cámara fría para su posterior utilización en la producción de bacteriocina y tinción de Gram.

3.7. Producción de bacteriocinas

Para poder observar la producción de bacteriocinas, se siembran cada una de las colonias aisladas en MRS líquido para obtener un cultivo overnight que es el que vamos a utilizar para ensayar la producción de bacteriocina. Una vez que tenemos todas las colonias en MRS líquido, cogemos 800 µL de cada tubo y lo pasamos a tubos Eppendorf para su centrifugación a 13000rpm durante 10 minutos. Posteriormente estudiamos la producción de bacteriocina en placas de BHA

tamponado, observando o no la presencia de halo inhibitor frente a microorganismos indicadores.

3.7.1. Técnica de ensayo con pocillos (Tagg y McGiven, 1971)

En placas de BHA tamponado, utilizando una placa por cada cinco muestras de colonias, se colocan 5 torres de acero inoxidable (8 mm de diámetro x 1 cm de altura). Aunque la cantidad de torres por placa también depende de la cantidad de colonias que tengamos, pero siempre manteniendo el suficiente espacio para permitir el crecimiento del halo alrededor del pocillo. En nuestro caso sólo utilizamos 4 placas, poniendo en 3 de ellas 5 torres y en otra sólo dos, utilizamos una placa para las alcaparras, dos para las colonias de altramuces y una sólo para las dos colonias de pepinillos. Utilizando también 4 placas en la repetición con los segundos alimentos, pero en este caso ponemos 4 torres de acero por placa.

Seguidamente, se vierten sobre la placa de BHA tamponado, 6 mL del medio BHA blando (sobrecapa), mantenido en sobrefusión (50°C) e inoculado con aproximadamente 3×10^8 unidades formadoras de colonias del microorganismo indicador (60 µL de *Enterococcus faecalis* S-47 en este caso). Utilizaremos un tubo de BHA blando previamente inoculado, para cada placa de BHA tamponado que tengamos, y movemos cuidadosamente para que la cubra por completo.

Una vez solidificada la sobrecapa, a los 15 minutos aproximadamente, procedemos a retirar las torres de acero con unas pinzas esterilizadas y cuidadosamente de no contaminar. En los huecos de estas torres o pocillos se depositaron 85 µL de la muestra, obtenida de los tubos Eppendorf previamente centrifugados, nombrando cada pocillo con el mismo nombre de la muestra que hemos marcado en los tubos anteriores. Estas placas las dejamos en la estufa durante 18- 24 horas y observamos si ha habido aparición de halo de inhibición alrededor de los pocillos, en el caso de que si haya indica que la colonia es productora de bacteriocina.

Volvemos a realizar este procedimiento, pasando a MRS líquido de nuevo todas las colonias que teníamos en MRS inclinado para volverlo a utilizar con la sobrecapa pero en este caso utilizaremos como cepas indicadora *Listeria innocua*, para observar los halos frente a esta bacteria.

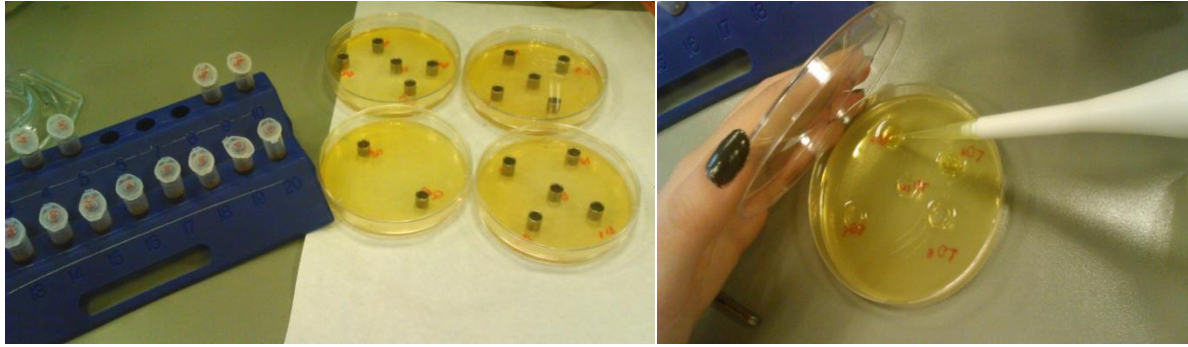


Figura 1. Ensayo de la producción de bacteriocina frente *Enterococcus faecalis* y *Listeria innocua*

3.8. Tinción de Gram

La tinción de Gram es una técnica que mediante el uso de colorantes permite observar e identificar las distintas bacterias en un microscopio, permitiéndote diferenciar según la forma o color que presenten entre bacterias Gram negativas o Gram positivas. Puesto que las bacterias Gram positivas tienen una gruesa pared de peptidoglucanos, queda atrapado el cristal violeta y por eso se tiñen de color azul/morado, en cambio las bacterias Gram negativas tienen una capa de peptidoglucanos mucho más delgada, no retienen el cristal violeta y al tiñerse con safranina se observan rojas.

La disposición de las bacterias observadas también nos permite diferenciar entre cocos, cocobacilos o bacilos entre otros tipos de microorganismos.

Para esta técnica se coge la bacteria del MRS inclinado con un asa de siembra y se extiende sobre un portaobjetos con una gota de agua destilada, se coloca cercano al mechero y se fija la gota con la bacteria al porta por calor. Tras esto empezamos a añadir los colorantes, primero le aplicamos cristal violeta, dejándolo actuar durante dos minutos; después escurrimos el porta y le añadimos lugol durante otros dos minutos. Una vez pasado este tiempo, se lava con alcohol durante 30 segundos, que es lo que produce la decoloración de las bacterias Gram negativas, y se lava con agua destilada un poco para quitar el alcohol. Por último añadimos safranina durante 3 minutos, lavamos con agua destilada, secamos la preparación y ya podemos observarla al microscopio al 100x con aceite de inmersión.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez realizados los experimentos procedemos al análisis de los resultados que hemos obtenido en cada uno de los ensayos.

4.1. Recuento bacteriano

En la siguiente tabla (Tabla 2) podemos observar el número de colonias aisladas de los alimentos ensayados, una vez que se preparó la suspensión madre en la bolsa y se homogenizó se sembraron en placas de MRS-agar, donde se obtuvieron los siguientes resultados.

Alimentos	24 horas			48 horas		
	Placa 0	Placa -1	Placa -2	Placa 0	Placa -1	UFC/g
Aceitunas	0	0	0	0	0	0
Altramuces	0	0	0	53	11	$5.3 \cdot 10^2$
Alcaparras	0	0	0	4	1	$4 \cdot 10^1$
Pepinillos	0	0	0	2	0	$2 \cdot 10^1$
Cebollas	0	0	0	0	0	0
Zanahoria	1	0	0	2	0	$2 \cdot 10^1$
Remolacha	7	0	0	10	0	$1 \cdot 10^2$
Soja	0	0	0	0	0	0
Guindilla	1	0	0	2	0	$2 \cdot 10^1$
Pimiento R.	0	0	0	2	0	$2 \cdot 10^1$

Tabla 2: Recuento de colonias en MRS

Como vemos en la tabla anterior, no se observa apenas crecimiento en las 24 primeras horas, siendo más notable su crecimiento a las 48 horas, aunque como también podemos ver hay alimentos en los que no se muestra crecimiento en ninguna placa, por lo que los descartamos. También podemos destacar un mayor crecimiento en los altramuces comparados con los demás encurtidos, en los que no hay más de 10 colonias como máximo.

Si representamos este crecimiento en los diferentes alimentos, en el siguiente gráfico (Figura 2) se puede ver la diferencia de entre unos alimentos y otros.

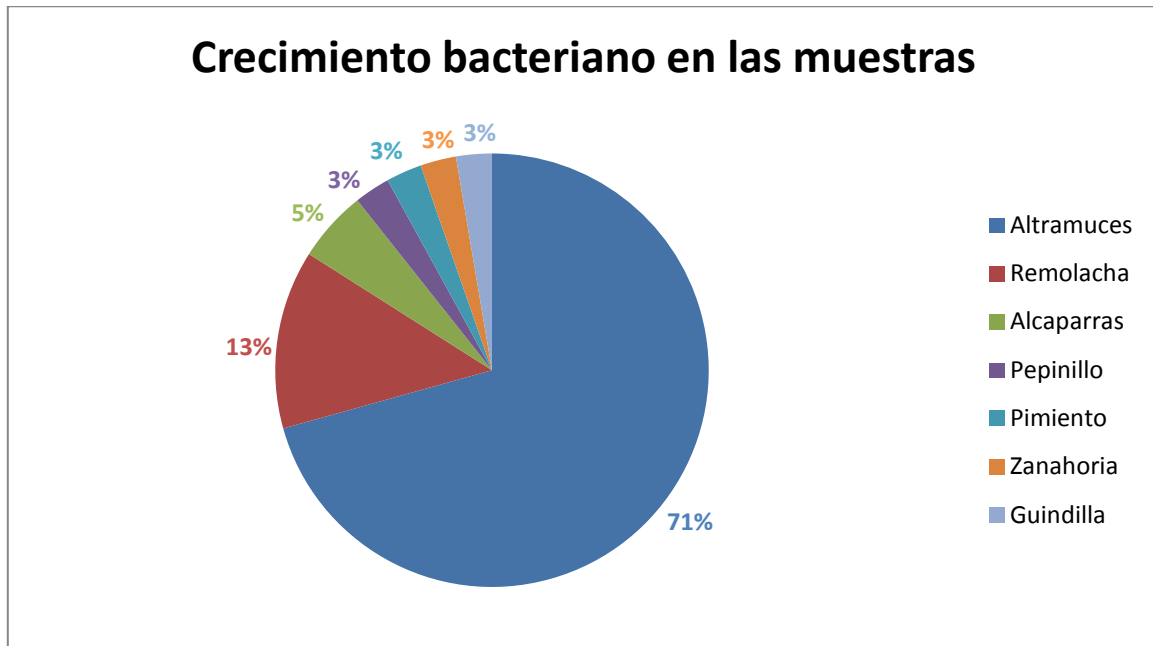


Figura 2: Distribución del crecimiento de BAL en los distintos alimentos.

Destacando como hemos comentado anteriormente los altramuces y la remolacha, obteniendo el mismo número de aislados en pepinillos, zanahoria, guindilla y pimientos, algo más en las alcaparras. No se detectó la presencia de bacterias lácticas en aceitunas, cebollas y soja.

Para la siembra en MRS líquido empezamos aislando 10 colonias de cada alimento, pero como podemos observar en nuestros resultados, algunos de ellos tienen muy poco crecimiento bacteriano. Por lo tanto, en los encurtidos en los que no haya suficientes colonias para obtener 10 aislados, se pasan todas las colonias que hemos obtenido. En conclusión obtuvimos una colección de 5 aislados de alcaparras, 10 de altramuces, 2 de pepinillos, 10 para remolacha y 2 para pimiento, zanahorias y guindillas, como se describen en la tabla siguiente (Tabla 3).

Altramuces	Remolacha	Alcaparras	Pepinillo	Pimiento	Zanahoria	Guindilla
At ₁	Rm ₁	Ap ₁	Pep ₁	Pim ₁	Zn ₁	Gn ₁
At ₂	Rm ₂	Ap ₂	Pep ₂	Pim ₂	Zn ₂	Gn ₂
At ₃	Rm ₃	Ap ₃				
At ₄	Rm ₄	Ap ₄				
At ₅	Rm ₅	Ap ₅				
At ₆	Rm ₆					
At ₇	Rm ₇					
At ₈	Rm ₈					
At ₉	Rm ₉					
At ₁₀	Rm ₁₀					

Tabla 3: Colonias aisladas de cada muestra.

En los resultados también pudimos observar en las aceitunas fermentadas la presencia de levaduras, estas como han indicado otros autores pueden desplazar a las bacterias del ácido láctico, esta puede ser una de las consecuencias de que no hayamos obtenido ningún aislado en encurtidos como las aceitunas, ya que también hay descritos numerosos trabajos en los que se detecta la presencia de bacterias lácticas en diferentes tipos de aceitunas de mesa, en las distintas etapas del proceso de la fermentación.

4.2. Tinción de Gram de los aislados.

Una vez obtenida una colección de aislados de algunos de los alimentos fermentados, los estudiamos morfológicamente para comprobar la presencia de bacterias lácticas.

Mediante la tinción de Gram pudimos comprobar la presencia de bacterias lácticas en prácticamente todos los aislados. Como se puede observar en la tabla 4, los aislados de altramuces, todos menos dos eran bacterias Gram positivas con morfología típicas de bacterias lácticas. Mientras que los aislados de remolacha, alcaparras, pepinillos, pimientos, zanahorias y guindillas (Tablas 5, 6, 7, 8, 9 y 10 respectivamente) todos eran bacterias, cocos o cocobacilos Gram positivas.

Colonias Altramuces	Tinción
At ₁	Cocobacilos Gram +
At ₂	Cocos Gram +
At ₃	Cocos Gram -
At ₄	Cocobacilos Gram +
At ₅	Levadura
At ₆	Cocos Gram +
At ₇	Bacilos Gram +
At ₈	Cocos Gram +
At ₉	Cocobacilos Gram +
At ₁₀	Cocos Gram +

Tabla 4: Resultados de Tinción de Gram en colonias de altramuces

Colonias Remolacha	Tinción
Rm ₁	Cocos Gram +
Rm ₂	Cocos Gram +
Rm ₃	Cocos Gram +
Rm ₄	Cocos Gram +
Rm ₅	Cocos Gram +
Rm ₆	Cocos Gram +
Rm ₇	Cocos Gram +
Rm ₈	Cocos Gram +
Rm ₉	Cocos Gram +
Rm ₁₀	Cocos Gram +

Tabla 5: Resultados de Tinción de Gram en colonias de remolacha.

Colonias Alcaparras	Tinción
Ap ₁	Cocos Gram +
Ap ₂	Cocos Gram +
Ap ₃	Cocos Gram +
Ap ₄	Cocos Gram +
Ap ₅	Cocos Gram +

Tabla 6: Resultados de Tinción de Gram en colonias de alcaparras.

Colonias Pepinillos	Tinción
Pep ₁	Cocos Gram +
Pep ₂	Cocos Gram +

Tabla 7: Resultados de Tinción de Gram en colonias de pepinillos.

Colonias Pimiento	Tinción
Pim ₁	Cocos Gram +
Pim ₂	Cocos Gram +

Tabla 8: Resultados de Tinción de Gram en colonias de pimiento.

Colonias Zanahoria	Tinción
Zn ₁	Cocos Gram +
Zn ₂	Cocos Gram +

Tabla 9: Resultados de Tinción de Gram en colonias de zanahoria.

Colonias Guindilla	Tinción
Gn ₁	Cocos Gram +
Gn ₂	Cocos Gram +

Tabla 10: Resultados de Tinción de Gram en colonias de guindilla.

4.3. Bacterias productoras de Bacteriocina

Una vez que teníamos las bacterias aisladas nos quedamos con las bacterias Gram+ para estudiar la producción o no de bacteriocinas. Como ya hemos mencionado anteriormente realizamos este estudio frente a dos tipos de bacterias indicadoras, *Enterococcus faecalis* S-47 y *Listeria innocua* CECT 4030, y observamos la presencia o no de halo, que indicarían la presencia de actividad antimicrobiana, midiendo su longitud. En la tabla 11 se puede observar que de los 8 aislados de altramuces, 6 tenían capacidad antimicrobiana frente a *E. faecalis* S-47, observándose halos de 9, 10 u 11 milímetros.

Colonias Altramuces	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Listeria innocua</i>	Longitud del halo
At ₁	-	-	0
At ₂	+	-	11 mm
At ₄	-	-	0
At ₆	+	-	11 mm
At ₇	+	-	10 mm
At ₈	+	-	10 mm
At ₉	+	-	10 mm
At ₁₀	+	-	9 mm

Tabla 11: Presencia de halo de inhibición en los aislados de altramuces

En ninguno de los aislados se vio inhibición frente a *Listeria*.

En el caso de la remolacha (Tabla 12) no hay ningún halo para ninguna de las cepas indicadoras ensayadas.

Colonias Remolacha	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Listeria innocua</i>	Longitud del halo
Rm ₁	-	-	0
Rm ₂	-	-	0
Rm ₃	-	-	0
Rm ₄	-	-	0
Rm ₅	-	-	0
Rm ₆	-	-	0
Rm ₇	-	-	0
Rm ₈	-	-	0
Rm ₉	-	-	0
Rm ₁₀	-	-	0

Tabla 12: Presencia de halo de inhibición en los aislados de remolacha

Para las alcaparras sólo detectamos un halo de inhibición de una de las colonias frente a *E. faecalis*, sin mostrar inhibición ninguno de los aislados frente a *Listeria*.

Colonias Alcaparras	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Listeria innocua</i>	Longitud del halo
Ap ₁	-	-	0
Ap ₂	-	-	0
Ap ₃	-	-	0
Ap ₄	-	-	0
Ap ₅	+	-	10 mm

Tabla 13: Presencia de halo de inhibición en los aislados de alcaparras

En los pepinillos, las dos colonias aisladas mostraron actividad antimicrobiana frente a *E. faecalis* S-47, de 11 y 12 mm. Aunque no se observó actividad ninguna frente a *L. innocua*. (Tabla 14)

Colonias Pepinillos	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Listeria innocua</i>	Longitud del halo
Pep ₁	+	-	11 mm
Pep ₂	+	-	12 mm

Tabla 14: Presencia de halo de inhibición en los aislados de pepinillos

En el caso de la zanahoria sólo uno de los aislados mostró inhibición frente a *E. faecalis*, con un halo de 11 mm (Tabla 16). Con respecto a la guindilla (Tabla 17) y pimiento (Tabla 15) podemos ver que no se observó ningún halo inhibitor frente a ninguna de las bacterias indicadoras utilizadas.

Colonias Pimiento	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Listeria innocua</i>	Longitud del halo
Pim ₁	-	-	0
Pim ₂	-	-	0

Tabla 15: Presencia de halo de inhibición en los aislados de pimiento

Colonias Zanahoria	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Listeria innocua</i>	Longitud del halo
Zn ₁	+	-	11 mm
Zn ₂	-	-	0

Tabla 16: Presencia de halo de inhibición en los aislados de zanahorias

Colonias Guindilla	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Listeria innocua</i>	Longitud del halo
Gn ₁	-	-	0
Gn ₂	-	-	0

Tabla 17: Presencia de halo de inhibición en los aislados de guindilla

En resumen, como podemos observar en la figura 3, aunque sólo se ha obtenido actividad antimicrobiana frente a *E. faecalis* S-47, hay que destacar que obtenemos un total de 6 aislados en los altramuces, 1 en las alcaparras, 2 en los pepinillos, y 1 en las muestras de zanahorias.

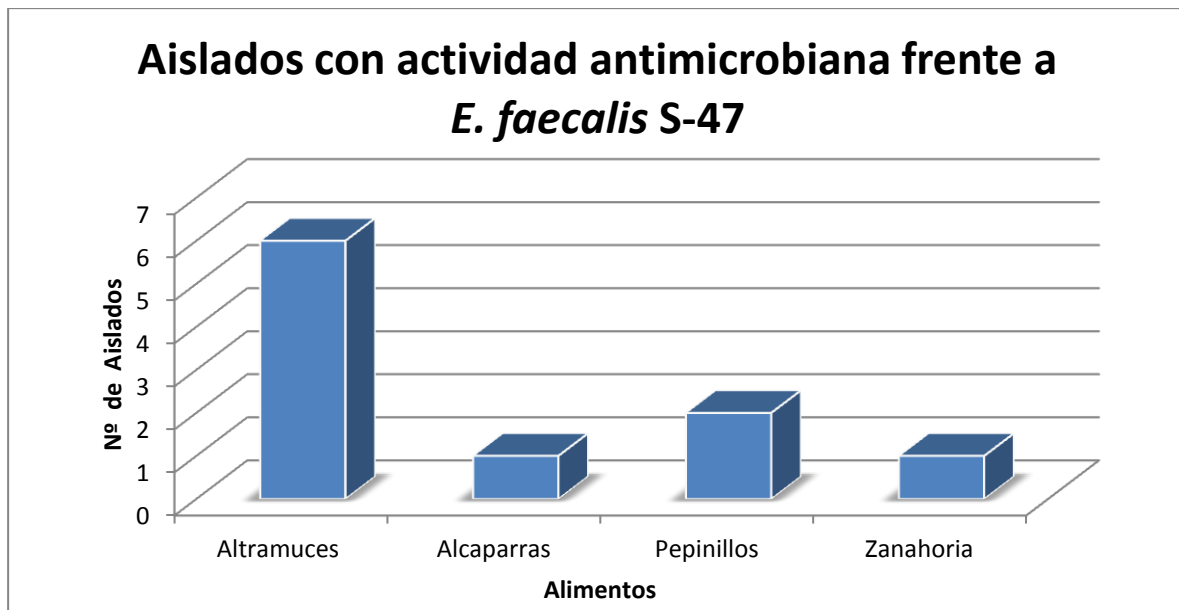


Figura 3. Número de aislados que producen actividad antimicrobiana frente a *E. faecalis*

Como ha sido descrito por otros autores, la producción de bacteriocinas ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida. (Feria, 2007), y según el tratamiento al que se sometan las bacteriocinas o sus extractos, puede cambiar el espectro de inhibición. Todo esto habría que tenerlo en cuenta en nuestros aislados en futuros ensayos, sobre todo en los de 11 y 12 mm, para intentar mejorar el espectro de inhibición de las muestras aisladas. Ya que se sabe que los extractos de bacteriocinas tienen más actividad cuando están más concentrados e incluso podrían mostrar actividad también frente a otras bacterias.

La utilización de estos sistemas de biopreservación requiere en cualquier caso estudios preliminares para determinar el comportamiento de las bacterias en el medio de cultivo en el que se desarrollan, y optimización de las técnicas para lograr producirlas en cantidad y con actividad suficiente.

Podemos concluir que la composición de la microbiota responsable de la fermentación depende de diferentes factores incluidos las condiciones ambientales y los métodos de procesamiento, dichos factores, pueden también influir en la obtención o de cepas productoras de bacteriocinas

5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el trabajo se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. Se ha comprobado la presencia de distintos grupos bacterianos, bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos y levaduras en los distintos tipos de encurtidos.
2. De los encurtidos ensayados, los altramuces, la remolacha y las alcaparras son de los encurtidos que se ha obtenido un mayor número de aislados.
3. Se ha podido aislar un número similar de colonias en los encurtidos a granel y en los encurtidos en conserva.
4. De los aislados con morfología de bacterias lácticas, el número mayor de actividad antimicrobiana se ha encontrado en los altramuces, seguido de los pepinillos.
5. Se ha observado actividad antimicrobiana solo frente a *E. faecalis* S-47 en los distintos aislados ensayados.
6. Frente a *Listeria innocua* no se ha detectado presencia de actividad antimicrobiana en ninguno de los aislados de los encurtidos ensayados.
7. Como conclusión final podemos decir que en los encurtidos podemos encontrar Bacterias Lácticas con propiedad antimicrobiana frente *E. faecalis* S-47, estos aislados podrían ser interesantes en estudios futuros a la hora de optimizarlos para poderlos utilizar como conservantes alimentarios.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Astiasarán, I., Martínez, A., 2000. Alimentos: Composición y propiedades. McGraw-Hill, D. L., Madrid.
- Axelsson, L., 1998. Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects. Marcel Dekker Inc. 2, 1-72
- Barboza, J., Vázquez, H., Salcedo, R., Bautista, M., 2004. Probióticos y conservadores naturales en alimentos. Acta Universitaria. 14, 32-38.
- Bozin, B., Mimica-Dukić, N., Samojlik, I., Goran, A., Igić, R., 2008. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). Food Chemistry. 111, 925-929.
- Carr, F., Chill, D., Maida, N., 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. Critical Reviews in Microbiology. 28, 281- 370.
- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., Vignolo, G., 2008. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina, Meat Sci. 2. 79, 483 - 499
- Castro, G., Valbuena, E., 2009. Biopreservación: alternativa para mejorar la calidad de los quesos. Venezuela Ganadera.
- Chen, Y., Ludescher, R. D., Montville, T. J., 1997a. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4770-4777.
- Chen, Y., Shapira, R., Eisenstein, M., Montville, T. J., 1997b. Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. Appl. Environ. Microbiol. 63, 524-531.
- Chikindas, M. L., García-Garcera, M. J., Driessen, A. J., Ledebøer, A. M., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Abee, T., Konings, W. N., Venema, G., 1993. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrana of target cells. Appl. Environ. Microbiol. 59, 3577-3584.

- Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F. & Hernández, P.E., 2001. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science Technology International*. 7, 281-305.
- Díez, L., 2011. Tesis doctoral: Efectos de agentes enológicos y pediocina PA-1 sobre las bacterias lácticas del vino. Logroño, España: Universidad de la Rioja.
- Doores, S., 1993. Organic Acids. In: Davidson, P. M, Branen, A. L. (eds.), pp. 95-136. Marcel Dekker, New York.
- Driessen, A. J., Van den Hooven, H. W., Kuiper, W., van de, K. M., Sahl, H. G., Konings, W. N., 1995. Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry*. 34, 1606-1614.
- Feria, P., 2007. Aislamiento y caracterización Bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 en suero de leche. Tesis Msc Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Medellín - Colombia.
- Fernández, M.J., García, P., Garrido, A., Duran, M.C., 1993. Microflora of the aerobic preservation of directly brined green olives from Hojiblanca cultivar. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 226-233.
- Fleming, H.P., 1984. Developments in cucumber fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 34, 241-252.
- Fleming, H.P., 1991. Mixed cultures in vegetable fermentations. In: *Mixed Cultures in biotechnology* (ed.), pp. 69-103. McGraw-Hill, New York
- Franco, M., 1995. La Guindilla, cura y sana. De Vecchi, S.A., Barcelona.
- Fuller, R., 1989. Probiotica in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66, 356-378.
- García, T., Martín, R., Sanz, B. Hernández, P., 1995. Extensión de la vida útil de la carne fresca. El envasado en atmósfera modificada y utilización de bacterias ácido lácticas y bacteriocinas. *Rev Española Cienc Tecnol Al.* 35, 1-18.
- Gilliland, S., 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 87, 175-188.

González, F., 1963. Microorganismos que se desarrollan en el aderezo de aceitunas verdes estilo español. *Microbiol. España*. 16, 221-230.

González, E., Coria, Y., Nazareno, M., 2010. Effect of different preservation treatments on the antiradical activity of capers (*Capparis spinosa* L.) cultivated in Santiago del Estero, Argentina. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 1, 47-57

Hansen, E.B., 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int. J. Food Microbiol.* 78, 119-131.

Harris, L.J., 1998. The microbiology of vegetable fermentations. In: Wood, B.J.B. (ed.). *Microbiology of Fermented foods*.

Hernández, P., Rodríguez, J., Cintas, L., Moreira, W., Sobrino, O., Fernández, M., Sanz, B., 1993. Utilización de bacterias lácticas en el control de microorganismos patógenos de los alimentos. *Microbiología*. 9, 37-48

Holo, H., Jeknic, Z., Daesche, M., Stevanovic, S., Nes, I., 2001. Plantacirin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two peptide lantibiotics. *Microbiology*. 147, 643- 651.

Holzappel, W.H., 2002. Appropriate starter culture technologies for small scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.* 75, 197-212.

Jones, I.D., 1997. Some pigment changes in cucumbers during brining and brine storage. *Food Technol.* 3, 324.

Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 12, 39-86.

Lins, L., Ducarme, P., Breukink, E., Brasseur, R., 1999. Computational study of nisin interaction with model membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1420, 111-120

Madrid, A. 1992. *Los aditivos en los alimentos*. Mundi-prensa libros S.A., Madrid.

Marcos, E., Castillo, F. A., Dimitrov, S. T., Gombossy, B. D., De Souza, R. P., 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*. 32, 134 - 142.

Martínez, J., 1988. Fabricación de encurtidos de pepinillo. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 7. Madrid.

Monroy, M., Castro, T., Fernández, F. J., Mayorga, L., 2009. Revisión Bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. ContactoS. 73, 63 - 72.

Mosquera, M., Pérez, A., Hornero, D., 2006. Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales: mucho más que simples colorantes naturales. Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación. 26, 108-113.

Muñoz, S., Gómez, C., Gil, A., 2010. Compuestos bioactivos de los alimentos de origen vegetal y obesidad. Nutrición Clínica en Medicina. 4, 138-152.

Nabais, R.M., 1997. Algunos aspectos de la elaboración de encurtidos vegetales. Food Science and Technology International. 3, 1 – 11.

Nout, M.J.R., F.M. Rombouts., 1992. Fermentative preservation of plant foods. J. Appl. Bact. Symp. Suppl. 73, 136-147.

Ogueke, C.C., Owuamanam, C. I., Ihediohanma, N.C., Iwouno, J.O., 2010. Probiotics and prebiotics. Unfolding Prospects for Better Human Health. Pakistan Journal of Nutrition. 9, 833-843.

Ojcius, D. M., Young, J. D., 1991. Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif. TIBS 16, 225-229.

Okereke, A., Montville, T. J., 1992. Nisin dissipates the proton motive force of the obligate anaerobe *Clostridium sporogenes* PA 3679. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2463-2467.

Ortega, E., Rodríguez, A., David, A. Zamora, A., 2010. Characterization properties of lupin (*Lupinus mutabilis*) seeds grown in the Colombian Andean region. Acta Agronómica. 59, 111-118.

Parra, R., 2010. Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. Revista de biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial. 8, 93 - 105.

- Planchuelo, A., Fuentes, E., 2007. Evaluación de los componentes de las semillas de lupino blanco (*Lupinus albus* L.) en relación a sus usos medicinales. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 42, 72.
- Ramírez, J., Rosas, P., Velázquez, M., Ulloa, J., Romero, F., 2011. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Revista Fuente, 7.
- Requena, T., Peláez, C., 1995. Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas, Rev Española Cienc Tecnol Al. 35, 19-44
- Ridner, E., 2006. Soja, propiedades nutricionales y su impacto en la salud. Sociedad Argentina de Nutrición. 1, 8-98
- Rojas, C., Vargas, P., 2008. Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. Tecnología en marcha. 21, 9 - 16.
- Ross, R., Morgan, S., Hill, C., 2002. Preservation and Fermentation, Past, Present and Future, Int J Food Microbiol. 14, 3-16
- Rozano, V., Quiróz, C., Acosta, J., Pimentel, L., Quiñones, E., 2004. Hortalizas, las llaves de la energía. Revista Digital Universitaria. 5, 1-30
- Salgado, B., Pericles, E., 2010. Tesis doctoral: Proceso de elaboración de vegetales encurtidos y su comercialización. Universidad de Guayaquil.
- Seigler, D., Cortes, M., Aguilera, J., 1987. Chemical Components of Guindilla Seeds (*Valenzuela Trivervis*). Biochemical Systematics and Ecology. 15, 71-73.
- Shirai, K., Guerrero, I., Lara, P., 1996. Bacterias lácticas en alimentos fermentados. Ciencia. 47, 125- 137
- Tagg, J.R., Macgiver, A.R., 1971. Assay system for bacteriocins. Applied and Environmental Microbiology. 21, 934.
- Tomé, D., Mariotti, F., 2000. La soja en la alimentación. Alimentación, nutrición y salud. 7, 31-33.
- Torres, M., 2002. Flora intestinal, probióticos y salud 2ª ed. Formas finas, Guadalajara.

Torija, M., 2011. Fibra dietética y salud, Concepto y composición de la obra dietética. Los alimentos como fuente de fibra. Cátedra Kelloggs. Alimentando el conocimiento. I, 1.

Torija, M., Matallana, M., Chalup, N., 2013. Garlic and onion: from ancient medicine to current interest. Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. Sec. Biol. 107, 29-37

Van Belkum, M. J., Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I. F., Konings, W. N., Abee, T., 1991. The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. J. Bacteriol. 173, 7934-7941.

Vázquez, S.M., Suárez, H., Zapata, S., 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Revista chilena de Nutrición. 36, 64-71.

Vaughn, R.H., 1982. Fermentation of olives. Industrial Microbiology, 4th edn. In: Reed, G. (ed.), pp. 206-236. AVI Publishing Co., Westport.

Van-Konijnenburg, A., 2009. Cebolla: Propiedades, Actualidad, Variedades y Claves productivas. Fruticultura y Diversificación. 59, 8-13

Waizel – Bucay, J., Camacho, R., 2011. El género *Capsicum* spp. Revista de divulgación científica y tecnológica, Aleph Zero. 60, 67- 79.

Páginas web consultadas

Fundación Española de Nutrición: <http://www.fen.org.es/>

Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente:
<http://www.magrama.gob.es/es/>

http://www.infoagro.com/conservas/fabricacion_encurtidos.htm

<https://alimentos.blogia.com/temas/09-encurtidos/>