

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

**Estandarización de un Iniciador Microbiano para
Optimizar el Proceso de Producción de Aceituna**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Erubiel Acosta De La Vara

H. Caborca, Sonora.

Abril de 2023

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de Erubiel Acosta De La Vara lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Químico Biólogo Clínico otorgado por la Universidad de Sonora, Unidad Regional Norte, Campus Caborca.



Presidente
Dr. Edwin Barrios Villa



Secretario
Dr. Manuel Gerardo Ballesteros Monrreal



Dra. Dora Edith Valencia Rivera
Vocal



Dr. Jesús Ortega García
Suplente

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
JUSTIFICACION	12
OBJETIVOS	13
General	13
Específicos	13
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	14
La Historia del olivo	14
Aceituna	15
El Recolección y procesamiento de la aceituna	17
Fermentación	21
Bacteria ácido lácticas	22
Factores condicionantes durante el proceso de fermentación.	27
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Fase de muestreo	29
Identificación bioquímica	30
Cinéticas de crecimiento	31
Determinación de ácido láctico	31
Cuantificación de biopelícula	32

	Página
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
Muestreo y aislamiento	33
Identificación bioquímica	34
Fermentación de azúcares presentes en la aceituna	36
Cinéticas de crecimiento	37
Determinación de ácido láctico a las 8 horas	38
Cuantificación de formación de biopelícula a 7, 8, 9 % de NaCl	43
CONCLUSIONES	44
PERSPECTIVAS	45
BIBLIOGRAFÍA	46

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Tabla 1. Métodos de elaboración de la aceituna según el Consejo Oleícola Internacional (COI).	18
2. Metabolismo de carbohidratos de las BAL.	24
3. Fermentación de glucosa y galactosa de las cepas prospecto.	36
4. Producción de ácido láctico de las mezclas formuladas.	40

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Corte sagital de una aceituna.	17
2. Rutas metabólicas de las BAL.	27
3. Aislamiento en caldo y agar MRS	34
4. Morfotipos de las especies aisladas.	35
5. Especies identificadas mediante los cartuchos de BBL Crystal.	35
6. Cinéticas de crecimientos.	38
7. Producción de ácido láctico a las 8 horas	39
8. Producción de ácido láctico de las mezclas prospecto a las 8 horas.	42
9. Producción de ácido láctico de las mezclas prospecto sin <i>E. faecium</i> a las 8 horas.	42
10. Producción de biopelícula en caldo LB con concentraciones de sal de 7, 8 y 9%.	43

RESUMEN

Los cultivos iniciadores son fórmulas utilizadas en fermentaciones de alimentos, conformadas principalmente por una o varias cepas de microorganismos, los cuales pueden dar beneficios como una mayor producción de metabolitos que mejoren los tiempos de producción o las propiedades organolépticas de los alimentos fermentados y prevean una mayor protección contra agentes contaminantes. Las aceitunas no son una excepción a cuanto al uso de iniciadores microbianos, ya que los tiempos de fermentación tiene una duración aproximada de 4 semanas, siendo unos de los retos de este proyecto formular una mezcla de bacterias ácido-lácticas que beneficien la producción de ácido láctico, llegando a repercutir en los tiempos de producción. Durante la presente investigación se aislaron e especies a partir de productos lácteos como leche bronca y queso artesanal, posteriormente, se caracterizaron en cuanto a crecimiento, fermentación de azúcares presentes en la aceituna, producción de ácido láctico y formación de biopelícula antes las condiciones salinas utilizadas en los procesos de fermentación de aceituna. Teniendo las debidas características, se realizaron una serie de mezclas con el objetivo de lograr un mayor rendimiento en cuanto a producción de ácido láctico, resultando una mezcla logro sobresalir estando conformada por *L. mesenteroides*, *L. lactis subsp cremoris* y *L. lactis subsp hordriea*.

INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos empresariales más comunes, es hacer más con menos. La productividad de los procesos industriales puede repercutir significativamente disminuyendo o aumentando los ingresos de la empresa. El tiempo de los procesos industriales tiene influencia tanto en la producción como en los costos que conlleva mantenerlos durante un tiempo determinado, siendo uno de los objetivos más importantes, aprovechar al máximo los costos fijos (alquiler, electricidad, etc.) y aumentar la producción, y la industria aceitunera no es la excepción.

El procesamiento de la aceituna ha evolucionado a lo largo de la historia, y a su vez, el tiempo del proceso ha disminuido de manera considerable. Sin embargo, este último sigue siendo un factor importante involucrado en la pérdida del producto, ya que entre más tiempo dure en procesamiento la aceituna, esta se somete a una serie de riesgos que pueden afectar a sus propiedades organolépticas finales. (Besnard et al., 2018).

La pérdida de las propiedades organolépticas puede perjudicar la imagen de la empresa dedicada a la venta de este producto. En el procesamiento de la aceituna, las situaciones antes planteadas, se pueden deber a errores cometidos al momento de mantener las condiciones de las barricas en las que se almacena el producto durante el proceso de fermentación, terminando con la contaminación con distintas levaduras que no dan un aporte al producto, si no que pueden afectar integridad de la aceituna. (Anagnostopoulos et al., 2020).

El objetivo de esta investigación es caracterizar BAL ante condiciones similares a los procesos de aceituna, y formular una mezcla de cepas que logre una mayor producción de ácido láctico.

JUSTIFICACIÓN

En Caborca, el olivo se ha cultivado desde los años 50's, contado con un aproximado de 1,600 hectáreas destinadas para su cultivo. En el año 2016, a nivel nacional, se logró una producción de 21,600 toneladas de aceitunas y Caborca aportó el 58.32% de esta producción.

Los procesos de fermentación de aceituna tienen una extensa duración, teniendo una duración que va desde las 4 semanas hasta los 2 meses, esto dependiendo de distintos factores, como lo son el tipo de proceso utilizado o las condiciones proporcionadas por el ambiente. La llegada de un nuevo producto conveniente puede terminar en la ayuda de empresas locales que se dediquen al procesamiento de aceituna, apoyando así la economía local.

OBJETIVOS

General

Estandarizar una mezcla microbiana que permita la reducción en el tiempo de producción y aumente la resistencia a la descomposición de aceituna.

Específicos

1. Aislar e identificar bacterias productoras de ácido láctico a partir de muestras de origen lácteo y de suelos.
2. Caracterizar el crecimiento de las cepas prospecto.
3. Cuantificar la producción de ácido láctico de las cepas individualmente
4. Cuantificar la producción de biopelícula de las cepas.
5. Diseñar diversas mezclas de microorganismos como inoculantes y cuantificar la producción de ácido láctico.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La Historia del olivo

Las aceitunas u olivas son frutos provenientes del árbol de olivo (*Olea europaea*). El uso del olivo, y su origen, se remonta a civilizaciones antiguas. Durante la época clásica, su cultivo fue de gran importancia, siendo el árbol más emblemático de la cuenca mediterránea, llegando a dispersarse a nuevas regiones. Esta situación, con el pasar del tiempo, generó un aumento en la variedad del fruto (Besnard et al., 2018).

Conforme a la información del Consejo Oleícola Internacional (COI), el olivo se empezó a difundir por las islas griegas durante el siglo XVI a.C. por acción de los fenicios. Posteriormente, se fue introduciendo más en el continente griego entre los siglos XIV y XII a.C. Durante el siglo VI a.C. el cultivo de olivo se logró a extender por los países mediterráneos hasta Trípoli, Túnez y la isla Sicilia. El cultivo se logró trasladar desde Calabria a Liguria. En la llegada de los romanos al norte de África los bereberes ya habían logrado desarrollar sus cultivos. Después de esto, los romanos extendieron el olivo a los países ribereños del mediterráneo. (COI, 2021)

La llegada del olivo a América se remonta a 1492 durante fechas cercanas al conocido descubrimiento de América. Para 1560 en países como México, Perú, Argentina y Chile, ya se cultivaban olivos. (COI, 2021)

Aceituna

La aceituna, se conforma principalmente de pulpa, hueso y la almendra o semilla que está dentro del hueso (Figura 1). El hueso adquiere dureza durante la maduración del fruto y

los intersticios se rellenan con mucílago el cual está mezclado con algún aceite. En el interior del hueso hay presencia de una o dos semillas, siendo ricas en materia oleosa y albumen celulósico. La pulpa está cubierta por una película que retiene distintos aceites dentro de celdillas imperceptibles, entre los glicéridos que se encuentran en estas celdillas están: el ácido oleico, palmítico, linoleico y esteárico (López y Zamora, 1992)

El fruto del olivo es conocido como una drupa, la cual contiene una sola semilla que está cubierta por una capa exterior carnosa que anatómicamente se divide en 3 partes distintas, la primera parte de la aceituna es conocida como epicarpio que se puede decir que es la piel de la aceituna, haciendo referencia al exterior de esta misma, seguida de esta capa, se encuentra el mesocarpio, el cual se conforma por la pulpa de la aceituna, y finalmente se encuentra el endocarpio el cual está conformado por la semilla del fruto. Durante las distintas fases de crecimiento del fruto va variando en su tonalidad, siendo en etapas tempranas que presenta un color verde, esto debido a la acumulación de clorofila, pasando de ahí a un color amarillo pajizo, rosa, rosa violeta y negro. El desequilibrio y variaciones en concentraciones de compuestos como clorofilas, carotenoides y las antocianinas marcan cambios significativos en el pigmento de la aceituna. La porción comestible de la aceituna se conforma por el epicarpio y el mesocarpio, siendo del 70-85% del peso de la aceituna. El mesocarpio es el tejido de reserva de todos los componentes como el agua y las grasas. El endocarpio del 18 al 22% del peso de la aceituna. (Rocha et al., 2020)

Los compuestos fenólicos presentes en la aceituna son conocidos por su gran capacidad antioxidante, sobresaliendo el secoiridoide oleuropeína, demostrando beneficios a la salud humana, pero siendo responsable del amargor del fruto (Kafkaletou & Tsantili,

2018). Los productos de hidrólisis de la oleuropeína, como lo son el hidroxitirosol, el ácido elenólico y aglicona, demostraron un alto efecto antimicrobiano ante bacterias grampositivas, gramnegativas y hongos. (Li et al., 2016)

Los suelos ideales para el cultivo del olivo son los suelos calizos, éste es un factor importante para que el olivo produzca sus frutos en abundancia, y se obtenga aceite de buena calidad. Otro de los tipos de suelo que puede favorecer la calidad del aceite de oliva son los terrenos fértiles, profundos y ricos, favoreciendo así el crecimiento del olivo, sin embargo, los olivos en estos suelos producen una menor cantidad de frutos. (López y Zamora, 1992)

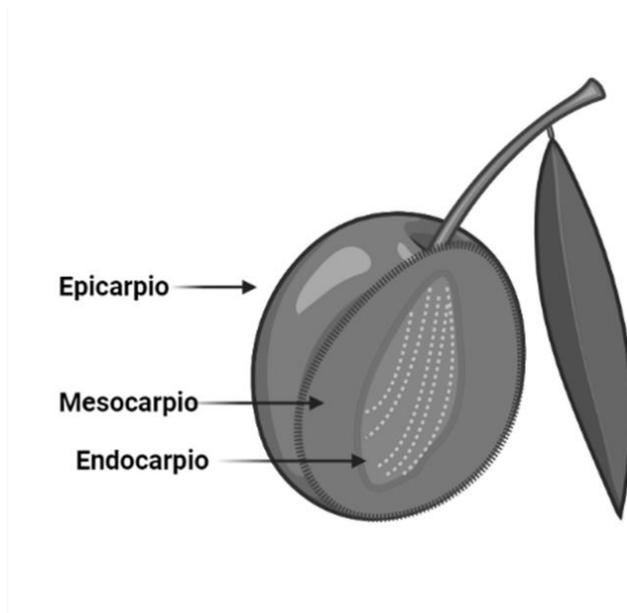


Figura 1. Corte sagital de una aceituna. Rocha et al., 2020

Recolección y procesamiento de la aceituna.

El proceso de recolección debe realizarse cuidando de no generar daños en los frutos y ramas del olivo, mismos que podrían afectar las futuras producciones del árbol. En el caso de la aceituna verde, el proceso de recolección debe ser llevado a cabo durante el mes de septiembre, para posteriormente pasar a una serie de procesos que culminan en su envasado. (López y Zamora, 1992)

El daño que es causado por el impacto durante la recolección mecánica de la aceituna se presenta como manchas marrones en el exterior del fruto. El cambio a color dorado comienza con un oscurecimiento de una sección del color verde en la superficie del fruto de la aceituna. Después de un tiempo, dependiendo de la gravedad del impacto, el pardeamiento se extiende también sobre el epicarpio y el mesocarpio y puede incluso afectar el endocarpio. (Goldental-Cohen et al., 2019)

La importancia de una propiedad organoléptica como lo es la imagen del producto juega un papel muy importante para los productores, de este modo, el uso de un proceso de recolección mecánico podría afectar la calidad. El procesamiento de la aceituna implica la eliminación del amargor del fruto y por medio de la fermentación conferir cambios en las características sensoriales, y a su vez, se le confiere cierta protección ante microorganismo patógenos, ya sea acidificando la salmuera o produciendo metabolitos con propiedades antimicrobianas o antifúngicas. (Conte et al., 2020)

Existen varios métodos que son utilizados para el procesamiento de la aceituna, esto varía dependiendo de las preferencias de las industrias y el producto que se desee producir. Según el Consejo Oleícola Internacional existen varios procesos para el procesamiento de la aceituna, siendo los principales indicados en la tabla 1. (Perpetuini et al., 2020)

Tabla 1. Métodos de elaboración de la aceituna según el Consejo Oleícola Internacional (COI) (Perpetuini et al., 2020)

MÉTODO	PROCESO
Aceituna tratada	Se aplica a aceitunas verdes, aceitunas que cambian de color o aceitunas negras. El desamargor de la aceituna se consigue mediante un tratamiento alcalino (lejía 2,5% -3% p / v). Luego, las aceitunas se colocan en salmuera (NaCl 10% -11% p / v) donde tiene lugar la fermentación y dura de 3 a 7 meses. La fermentación es impulsada por bacterias del ácido láctico.
Aceitunas naturales	Se aplica a las aceitunas verdes, aceitunas que cambian de color. o aceitunas negras. Las aceitunas se colocan directamente en salmuera. Con una concentración de sal de aproximadamente el 6% al 10% (p / v). La oleuropeína se elimina a través de las actividades enzimáticas (principalmente β -glucosidasa y esterasa) de microorganismos autóctonos. El proceso de fermentación puede durar de 8 a 12 meses y es impulsado principalmente por levaduras y bacterias del ácido láctico.
Aceituna deshidratada y/o arrugada	Se aplica a aceitunas verdes, aceitunas que cambian de color o aceitunas negras. Las aceitunas se someten o no a un tratamiento alcalino suave, se conservan en salmuera o se deshidratan parcialmente en sal seca y / o por calentamiento.
Aceituna oscurecida por oxidación	Se aplica sobre aceitunas verdes o aceitunas que cambian de color. Las aceitunas se conservan en salmuera, fermentadas o no, y se oscurecen por oxidación en medio alcalino. Se almacenan en recipientes herméticamente cerrados y se someten a esterilización por calor.
Especialidades	Aceitunas elaboradas de forma diferente a las anteriores siguiendo recetas tradicionales.

El método de aceituna tratada es el que conlleva menos tiempo en su fermentación y es más utilizado por esto mismo, este proceso se basa en tres operaciones para el procesamiento del producto: Neutralización, lavado y fermentación. (López y Zamora, 1992)

1. Neutralización: Se lleva a cabo por medio de una lejía alcalina (López y Zamora, 1992). En esta primera etapa se hace uso de hidróxido de sodio (NaOH) en concentraciones de 1.25-2.5%. El NaOH ingresa en la pulpa de la aceituna, este proceso tiene una duración de 8-12 horas, debido a que la solución alcalina debe penetrar tres cuartas partes de la pulpa. El objetivo de este primer paso es eliminar el amargor que posee el fruto debido a la presencia de oleuropeína. (Casamitiana, 1965).

Durante el tratamiento alcalino con NaOH se llevan a cabo modificaciones a nivel estructural tanto en el epicarpio como en el mesocarpio, dependiendo de la concentración y temperatura de la solución alcalina, se determinará que tanto influirá en la composición. La solución de NaOH que penetra en la pulpa contenida en el mesocarpio hidroliza la oleuropeína y la ligtosida, lo cual provoca que se produzcan fenoles hidrolizados no amargos, como lo son el hidroxitirosol y el tirosol. Además, se provocan cambios en la composición de los polisacáridos en la estructura de la pared celular, esto reduce la firmeza del fruto, entre más concentrada sea la concentración de la solución alcalina y el tiempo de tratamiento sea más largo, mayor será la pérdida de firmeza. El daño en la piel de la aceituna por el tratamiento químico permite una difusión más rápida de los compuestos fenólicos restantes y de los azúcares en la salmuera durante las siguientes etapas de enjuague y fermentación. (Pozo et al., 2020)

Por lo tanto, el tratamiento alcalino, tiene un papel muy importante, en las propiedades organolépticas de la aceituna, ya que aparte de quitarle la dureza al fruto, logra cambios en diferentes compuestos presentes dentro de la aceituna que podrían causar problema en su posterior fermentación.

2. Lavado: Después del primer paso, es importante eliminar los restos de lejía absorbida por las aceitunas (López y Zamora, 1992). Los lavados se realizan con agua, con la finalidad de reducir la alcalinidad del fruto hasta un pH aproximado de 8.5 con intervalos de lavado que van de 3 hasta 5 horas. (Casamitiana, 1965)

3. Fermentación y conservación del producto en salmuera: Una vez lavadas las aceitunas, estas son sumergidas en salmuera. La concentración de las salmueras dependerá del tipo de riego que el olivo recibió (por ejemplo, en España, debido a sus niveles de precipitación pluvial, necesita una salmuera con un porcentaje entre 10 y 12% de sal). Cuando este árbol llegó a América el tipo de riego paso a ser manual, afectando así la cantidad de sal requerida en la salmuera quedando entre 7 y 9%; si la concentración de sal es mayor se corre el riesgo de sufrir exósmosis. (Casamitiana, 1965)

Fermentación

La etapa de fermentación desempeña un papel trascendental, ya que de esta dependerán varias propiedades organolépticas del producto y se pondrán a prueba las habilidades conservadoras del proceso.

Los cambios fisicoquímicos que se producen durante la fermentación son muy importantes, ya que los compuestos solubles en agua se difunden de la aceituna a la salmuera, siendo el caso contrario de la sal que va en dirección opuesta. Una de las principales fuentes de carbono para los microorganismos son los azúcares fermentables, el metabolismo de estos azúcares termina en la producción de ácidos orgánicos, los cuales son esenciales para la estabilidad y sucesión del proceso de fermentación. (Anagnostopoulos et al., 2020)

Si bien existen diversos tipos de fermentación, la que influye en el procesamiento de la aceituna es la fermentación láctica, donde el producto deseado es ácido láctico. Siendo las bacterias ácido lácticas (BAL), los microorganismos necesarios para llevar a cabo el proceso (López y Zamora, 1992). La gran capacidad de fermentación que poseen las BAL, hace que sean los microorganismos más implementados en la industria alimentaria, ya que estos se utilizan en la fermentación de distintos alimentos, como lo es el caso de la leche y los pepinillos. (Hatti-Kaul et al., 2018)

La población microbiana depende del cultivo de olivo, el manejo del cultivo. La presencia de esta población microbiana puede contribuir a la formación de consorcios microbianos responsables de la fermentación e influir en el perfil sensorial y seguridad del producto. (Anagnostopoulos et al., 2020)

Bacterias ácido-lácticas

El grupo de las BAL está constituido por bacterias de distintos géneros, los cuales son genética y ecológicamente diferentes. Entre estos se encuentran miembros del filo Firmicutes, incluyendo los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Weissella*, etc., y del filo *Actinobacteria*, el género *Bifidobacterium*. (Hatti-Kaul et al., 2018)

También se ha demostrado que la presencia de algunas levaduras puede repercutir en la producción de ácido láctico de ciertos alimentos, y a su vez, puede contribuir considerablemente en las características organolépticas finales produciendo compuesto volátiles y deseables. Otra de las funciones que cumplen las levaduras es la de mejorar el crecimiento de las BAL, y su vez contribuyen en la degradación de compuestos fenólicos y secosteroides. (Anagnostopoulos et al., 2020)

El uso de cultivos microbianos en la fermentación repercute en gran medida en las propiedades organolépticas del producto procesado. Estos cultivos, denominados cultivos iniciadores, pueden ser puros (una sola especie de microorganismo) o mixtos (múltiples especies). Entre las ventajas del uso de BAL en el proceso de fermentación, destacan la producción de metabolitos secundarios que inhiben la formación de microorganismos no deseados, pudiendo evitar la descomposición del producto final (Beldarraín et al., 2008). Estos iniciadores microbianos, además de otorgar seguridad al producto final, también son capaces de proporcionar características organolépticas distintivas. (Anagnostopoulos et al., 2020)

Los microorganismos deben adaptarse y sobrevivir fácilmente a las condiciones de la fermentación y tener características no patógenas, probióticas y de aplicación biotecnológicas. Más específicamente, las cepas seleccionadas deben tener la capacidad de disminuir el pH de la salmuera a través de su actividad metabólica mediante la producción de ácidos orgánicos, crecer en las condiciones de fermentación como pH bajo, concentración alta de sal, sustratos de baja fermentación, degradan los compuestos fenólicos, producen un aroma y sabor deseables a través de la producción de compuestos volátiles, poseen enzimas específicas que contribuyen al producto final, tienen propiedades probióticas, promotoras de la salud y que previenen enfermedades. El uso de iniciadores tiene la finalidad de mejorar el proceso de fermentación, ya sea en tiempo o repercutiendo en las propiedades organolépticas, pero, sin provocar una alteración en el producto que pueda ser insalubre para su consumo. (Bonatsou et al., 2017) Una de las formas en las que las BAL logran disminuir la presencia de microorganismos no deseados es acidificando pH de la salmuera, lo cual proporciona un ambiente de selección de microorganismos, de esta manera se logra un control microbiológico el cual extenderá la vida útil del producto. (Anagnostopoulos et al., 2020)

A pesar de que las BAL pueden fermentar azúcares produciendo ácido láctico, existen diferencias metabólicas que permiten distinguir 3 tipos de BAL: homofermentativas obligadas, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas obligadas. La diferencia entre los tipos de BAL, depende de la ruta metabólica que utilizan para la producción de ácido láctico (Tabla 2). (Vuan, 2018). Las homofermentativas obligadas solo producen ácido láctico a partir de hexosas y pentosas mediante la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), las bacterias que presentan este tipo de metabolismo pueden generar dos moléculas de ácido láctico a partir de un mol de glucosa (figura 2). Las heterofermentativas obligadas, son capaces de fermentar pentosas por la vía de la fosfoacetolasa (figura 2), produciendo ácido láctico, ácido acético, etanol y CO₂ (Abedi & Hashemi, 2020). Las heterofermentativas facultativas son capaces de fermentar hexosas a partir de la vía de EMP, con la diferencia de que puede fermentar pentosas a ácido láctico mediante la vía de la fosfoacetolasa, obteniendo productos como etanol, ácido acético y CO₂. (Vuan, 2018)

La ruta utilizada para el metabolismo depende de la presencia de 2 enzimas, en el caso de las homofermentativas obligadas dependerá de la presencia del fosfato aldolasa, para las heterofermentativas obligadas dependerá de las fosfocetolasa, y en el caso de las heterofermentativas facultativas, al presentar las 2 enzimas pueden usar ambas rutas. (Vuan, 2018)

Tabla 2 Metabolismo de carbohidratos de las BAL. Tomada de Vuan, 2018

Tipo de Fermentación	Carbohidrato	Ruta metabólica	Géneros
Homofermentativas obligadas	Hexosas	EMP	<i>Lactobacillus</i> spp
Heterofermentativas facultativas	Hexosas	EMP	<i>Enterococcus,</i> <i>Lactococcus,</i> <i>Lactovum</i>
Heterofermentativas facultativas	Pentosas	Fosfocetolasa	<i>Paralactobacillus,</i> <i>Pediococcus,</i> <i>Streptococcus,</i> <i>Vagococcus,</i> y <i>Lactobacillus</i> spp
Heterofermentativa obligada	Pentosas	Fosfocetolasa	<i>Leuconostoc,</i> <i>Oenococcus,</i> <i>Weissella</i> y <i>Lactobacillus</i> spp

EMP: Vía Embden-Meyerhof-Parnas

Las BAL pueden colonizar la superficie de las aceitunas y formar biopelículas durante la fermentación en combinación con la microestructura de la superficie de la aceituna que protege a los microorganismos durante la digestión establecen nuevas opciones para el uso de las aceitunas de mesa no solo como producto nutricional sino también como un portador probiótico. Existen pruebas in vitro que determinan el potencial probiótico de las cepas y aclaran el mecanismo del efecto probiótico, resistencia la acidez gástrica y a las

sales biliares, la actividad de las sales biliares hidrolasa, así como la capacidad de adherirse a las líneas celulares y exhibir efectos antimicrobianos actividad y reducción o inhibición de la adhesión de patógenos a superficies. (Bonatsou et al., 2017)

La fermentación, dependiendo de los cuidados y manteniendo las condiciones adecuadas, puede durar entre 3 a 4 semanas (López y Zamora, 1992). Las condiciones del medio utilizado (salmuera) representan un obstáculo para el desarrollo de los microorganismos utilizados en el proceso. Una de las condiciones que limita el crecimiento microbiano es la presencia de oleuropeína, la cual genera un efecto inhibitorio y reduce la oportunidad de que diversos microorganismos importantes para el proceso de fermentación puedan crecer y llevar cabo su metabolismo. El efecto antimicrobiano de la oleuropeína depende de la concentración que esté presente, sin embargo, en el proceso de fermentación de la aceituna puede causar problemas debido a que la capacidad de inhibir microorganismos se acentúa ante la presencia de salmuera, esto debido a la degradación de la oleuropeína. (Li et al., 2016)

Factores condicionantes durante el proceso.

Otro de los factores condicionantes del desarrollo microbiano es la concentración de sal, puesto que concentraciones arriba del 9% pueden causar inhibición en el crecimiento de los microorganismos, presentando una reacción de inhibición sinérgica con la oleuropeína. De igual forma, el pH es otro factor que puede afectar el crecimiento microbiano, puesto que las condiciones ácidas representan un ambiente que el microorganismo debe tolerar. (Durán Quintana et al., 1997)

En el presente trabajo se pretende aislar especies que, en base a sus características, se pueda utilizar para la formulación de un cultivo iniciador que beneficie a la aceituna en la producción de ácido láctico, generando un producto que confiera una mayor protección contra agentes patógenos, una mejora en las características organolépticas y una disminución en los tiempos de fermentación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fase de muestreo

Los microorganismos para implementar este estudio se obtuvieron a partir de productos lácteos de ganado bovino, y de suelos diversos del municipio de Caborca, Sonora; se recolectaron muestras de leche bronca y cruda, las cuales fueron obtenidas de forma manual, así como de quesos frescos tradicionales obtenidos de forma artesanal.

Obtención de muestras lácteas: Para la obtención de leche bronca se realizó la compra de un frasco en un puesto local el cual se dedique a su venta. En el caso de la recolección de queso fresco, se tomó un trozo con una espátula estéril, la muestra se colocó en un recipiente estéril.

Obtención de muestras de suelo: Se recolectaron muestras de suelo en el corral donde se encuentra el ganado. Se tomó una muestra del tamaño de una nuez utilizando una espátula de acero previamente esterilizada, la muestra se depositó en un recipiente estéril y se transportó al laboratorio.

Aislamiento

Se tomó una espátula estéril y se le puso en contacto con la muestra que se desee inocular, posteriormente se introdujo la espátula en tubos con caldo MRS y se dejó incubando en el equipo New Brunswick a 37°C, 150 RPM durante 18 hrs.

Posterior a la incubación, en una campana de flujo se tomó una azada de los caldos inoculados y mediante estría cruzada se inoculo en placas de agar MRS, las cuales se dejaron incubando 18 hrs a 37°C. Se seleccionaron las colonias aisladas y se inocularon en tubos con caldo de MRS y se dejaron incubando durante 24 hrs a 37 °C. Después de las 24 hrs al observar el crecimiento se tomó 1 ml del caldo y se colocó en glicerol y se puso en congelación.

Identificación bioquímica.

Tinción de Gram: Se realizó un análisis morfológico de todas las cepas, en base a la tinción del peptidoglicano en la cual se utilizaron reactivos como cristal violeta durante 1 minuto, lugol durante 1 minuto, alcohol-cetona durante 30 segundos y safranina durante 1 minuto. Posterior a esto se procedió a la observación en el microscopio óptico a 100X.

ID BBL Crystal: Para la identificación se utilizaron los cartuchos ANR ID System (identificación de Anaerobios) y RGP ID System (Rapid Gram Positive). Se utilizaron colonias jóvenes con un crecimiento en placa de agar MRS de 18 a 24 horas, posteriormente se realizó un ajuste a 0.5 McFarland en el fluido de inoculación compuesto por agua estéril, finalmente el líquido se añadió al cartucho y se dejó incubando durante 4 horas a 37°C para su posterior interpretación utilizando el software BBL Crystal MIND.

Vitek 2: Primeramente, se preparó un inculo, el cual se ajustó entre 0.5-0.63 McFarland utilizando el Densicheck Plus (Biomerux). Posteriormente se utilizó la tarjeta de identificación VITEK 2 GP (Gram-Postivos), que después de inocular el

equipo se encargó de su incubación y lectura. La prueba cuenta con 64 pocillos con distintos sustratos.

Cinéticas de crecimiento

Una vez teniendo identificadas la especie se procedió a caracterizar su cinética de crecimiento. Se utilizó caldo MRS para promover el crecimiento. Se realizaron diluciones seriadas a partir de un cultivo principal ajustado a 0.5 McFarland, hasta llegar a la concentración de 5×10^5 UFC/mL en un matraz. Posteriormente se dejó incubando en rotación en una incubadora New Brunswick a 30°C y 150 RPM, se tomaron mediciones de absorbancia a 620nm cada 30 min. Los gráficos se realizaron utilizando GraphPad Prism V6,01.

Determinación de ácido láctico

Primeramente, se realizó la inoculación de cada una de las cepas en 1 mL de medio MRS ajustando a una concentración de 5×10^5 UFC/mL y se dejó incubando durante 8 horas a 37°C, pasado el tiempo, se centrifugó a 13,000 RPM durante 10 minutos, y se realizó una dilución 1:10 del sobrenadante. Posteriormente, a 200 µl de cloruro férrico al 0.2% se le añadieron 5 µl de la dilución del sobrenadante, la medición de la absorbancia se realizó a 405 nm con un espectrofotómetro Chromate (Awareness Technology).

Se realizaron 58 mezclas entre las cepas manteniendo la misma concentración por cada cepa, finalmente, se procedió a la determinación de ácido láctico bajo la metodología planteada anteriormente.

Cuantificación de biopelícula

Las cepas aisladas se cultivaron en agar Luria Bertani (LB) a 37°C durante 18 horas. Posteriormente, se tomó una asada del agar incubado y se inoculó en 5 ml de caldo LB y se incubó durante 18 horas a 37°C. Posterior a la incubación, se prepararon distintos caldos de LB a varias concentraciones de NaCl (7, 8 y 9%), en una microplaca de 96 pozos. Se añadieron 300 µl de una dilución 1:14 del precultivo y se dejó incubando durante 24 horas a 37°C. Pasadas las 24 horas se realizó una lectura de los pozos a 492 nm. Posteriormente se decantó el medio y los pozos se lavaron con PBS estéril, luego se agregaron 20 µl de cristal violeta al 1% y se dejó incubando durante 15 minutos. Pasados los 15 minutos se realizó un lavado con agua destilada eliminando el exceso de cristal violeta y se le adicionaron 230 µl de etanol al 96%. Después de incubar durante 2 minutos se realizó una lectura a 600 nm, cada experimento se realizó por triplicado y los resultados se extrapolaron contra una curva de calibración con un estándar de albumina sérica bovina para expresarlos en miligramos de biopelícula/gramo de proteínas totales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestreo y aislamiento.

Se obtuvieron productos lácteos artesanales de las regiones de H. Caborca y H. Nogales, Sonora, y distintos suelos de los corrales del ganado de bovino. A las 18 horas de incubación, se observó que en el caldo MRS en condiciones aerobias había un mayor crecimiento en la parte inferior del tubo de cultivo, mientras que en los caldos en condiciones anaerobias se observó un crecimiento más distribuido en el medio. Esto se puede asociar a que la mayoría de las BAL son anaerobias facultativas. En los sembrados en placas se obtuvieron un total de 52 aislados y observándose distintas morfologías coloniales: (figura 3)

- Colonias blancas de tamaño mediano, cremosas y con forma circular.
- Colonia pequeñas, transparentes y con forma circular.
- Colonia rugosas, grandes y circulares.

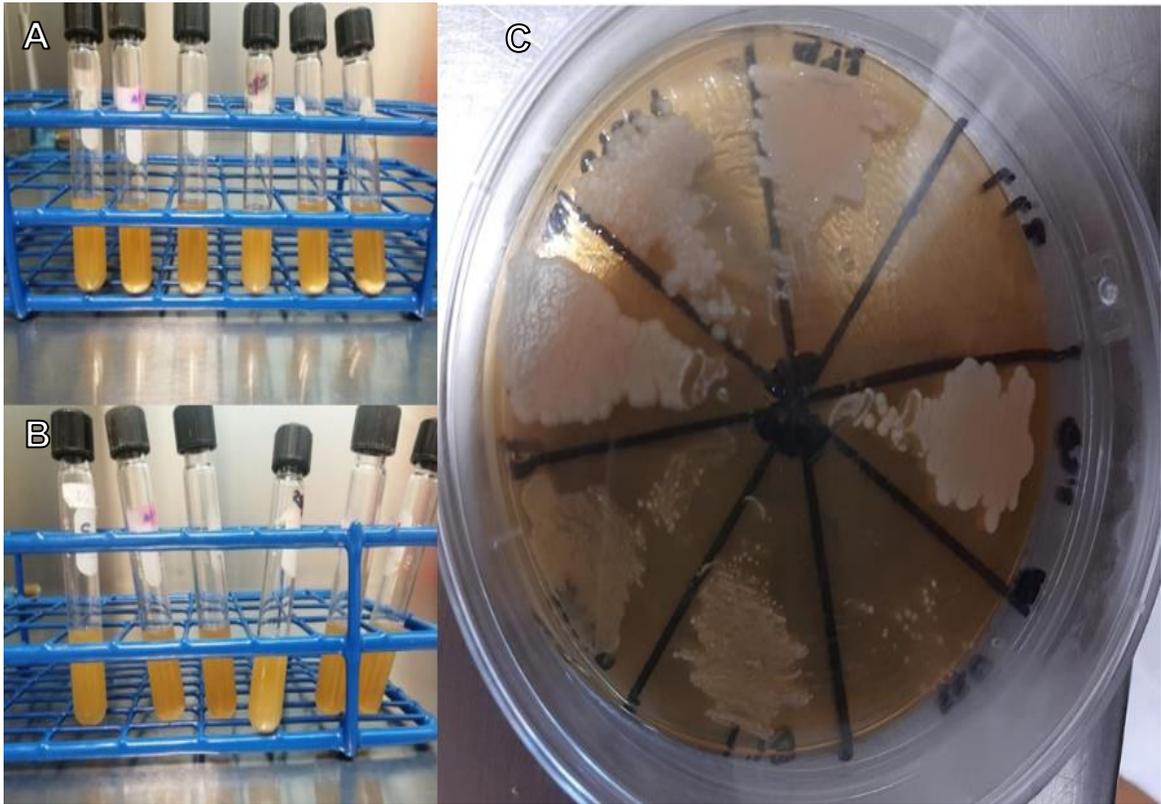


Figura 3. Aislamiento en caldo y agar MRS. Crecimiento en la parte inferior del tubo por las condiciones aerobias (A). Crecimiento esparcido por todo el caldo (B). Morfologías coloniales (C).

Identificación bioquímica

Una vez aisladas las colonias se procedió con la caracterización morfológica en donde se logró observar que predominaron los cocos Gram positivos, ocupando el 62.5% del total, mientras que el porcentaje de bacilos Gram positivos fue del 27%. (figura 4)

Posteriormente, las bacterias aisladas se identificaron mediante pruebas bioquímicas, identificando 12 especies. (figura 5)

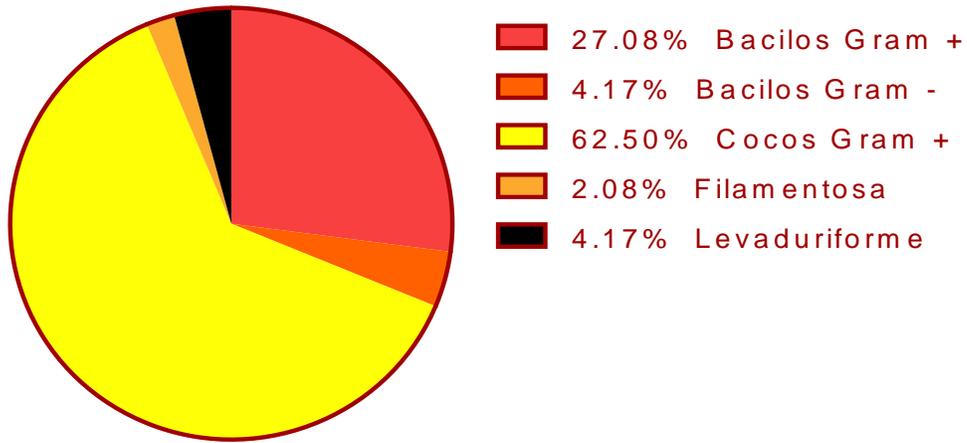


Figura 4. Morfotipos de las especies aisladas.

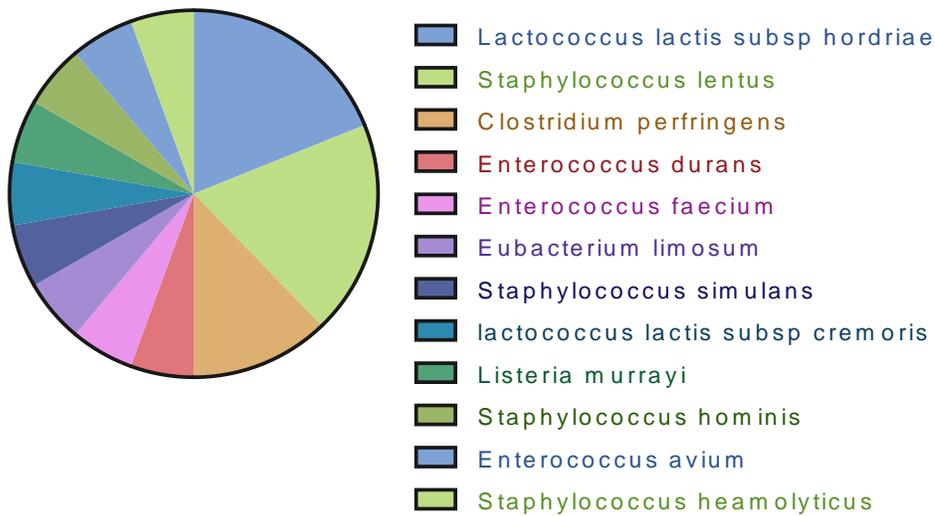


Figura 5. Especies identificadas mediante los cartuchos de BBL Crystal.

Una vez hecha la identificación se seleccionaron aquellas bacterias que no representaran un riesgo, para esto, las especies deben contar con el estatus GRAS; por lo tanto, para fines de esta investigación, las cepas utilizadas fueron: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis subsp hordriae* y *Lactococcus lactis subsp Cremoris*, y a su vez, se caracterizaron junto con *Enterococcus faecium* (BAL patógena) para comparar sus características.

Fermentación de azúcares presentes en aceituna por pruebas bioquímicas.

Se ha reportado en varias investigaciones que el perfil de azúcares de aceituna fresca se compone principalmente por: glucosa, fructosa y galactosa. En base a las pruebas bioquímicas realizadas, se logró identificar si las especies utilizadas para esta investigación son capaces de fermentar la glucosa y la galactosa.

Tabla 3 Fermentación de glucosa y galactosa de las cepas prospecto.

Cepas	Glucosa	Galactosa
<i>L. mesenteroides</i>	-	+
<i>Lactococcus lactis subsp hordriae</i> (1)	+	-
<i>Lactococcus lactis subsp hordriae</i> (2)	+	-
<i>Lactococcus lactis subsp hordriae</i> (3)	+	-
<i>L. lactis subsp cremoris</i>	+	+
<i>E. faecium</i>	-	+

Con base en los resultados obtenidos, se demostró que *L. lactis subsp cremoris* tiene una mayor afinidad hacia los dos azúcares que están presentes ante la aceituna. (Tabla 3)

Tanto como en *L. mesenteroides* y *E. faecium* fueron especies no fermentadoras de glucosa.

Cinética de crecimiento

L. mesenteroides alcanzó la Densidad Óptica máxima en un menor tiempo. Mientras que en el caso de las especies de *L. lactis* subsp *hordriae* y *L. lactis* subsp *cremoris*, se mantuvo cierta similitud entre sus cinéticas de crecimiento. También se evaluó el crecimiento de *E. faecium*, en su cinética se observó que crecimiento fue mucho más lento que las demás cepas. (figura 6)

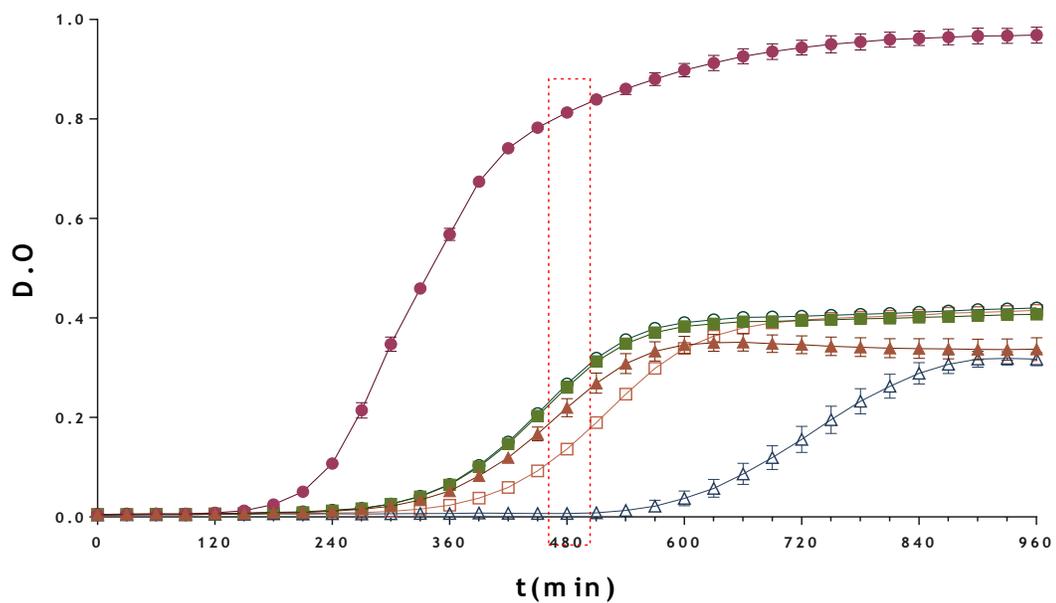


Figura 6. Cinéticas de crecimientos. ● *L. mensenteroides*, ▲ *L. lactis* subsp *hordriae* (2), ■ *L. lactis* subsp *hordriae* (1), ○ *L. lactis* subsp *hordriae* (3), □ *L. lactis* subsp *cremoris*, Δ *E. faecium*.

Determinación de ácido láctico a las 8 horas.

Primeramente, se realizó determinación por separado de cada especie, donde se observó que *L. lactis subsp cremoris* tuvo una mayor producción al pasar las 8 horas. (figura 7)

Determinación de ácido láctico individual a las 8 horas

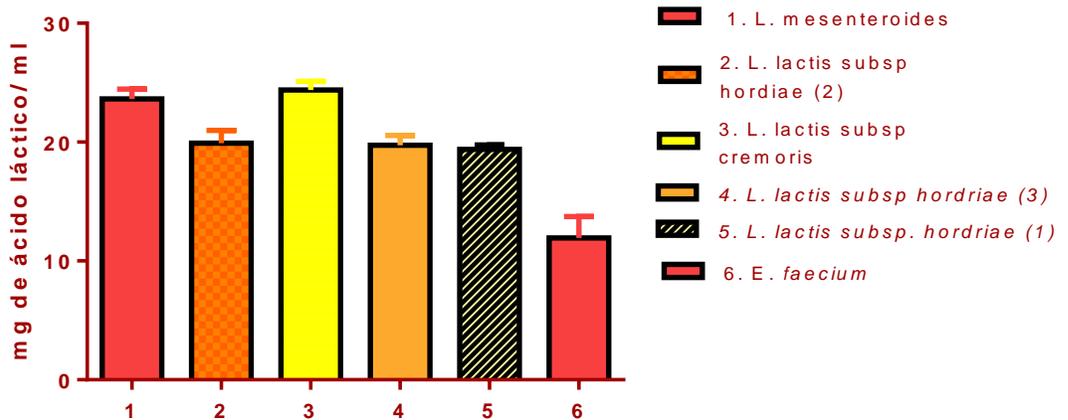


Figura 7. Producción de ácido láctico a las 8 horas.

Posteriormente, se formularon un total de 58 de mezclas de especies bacterianas y se determinó la cantidad de ácido láctico producido por la mezcla a las 8 horas (tabla 4). De las mezclas realizadas resaltaron 9 por la cantidad de ácido láctico producido, sin embargo, 4 de estas tenían a *E. faecium* en su formulación (figura 8). Por lo tanto, las nuevas mezclas prospecto que se seleccionaron no contaban con la presencia de *E. faecium*, siendo la mezcla 32 la que tenía la característica de una mayor producción de ácido láctico; ésta se conforma por *L. mesenteroides*, *L. lactis subsp cremoris* y *L. lactis subsp hordiae* (3). (figura 9)

Tabla 4. Producción de ácido láctico de las mezclas formuladas.

Mezcla	Media de producción de ácido láctico mg/ml	DS	Presencia de <i>E.faecium</i>
1	27.4	2.1	No
2	26.6	1.2	No
3	29.2	0.1	No
4	35.3	0.6	No
5	31.1	2.4	Si
6	29.4	7.2	No
7	30.0	4.02	No
8	35.4	7.2	No
9	35.0	0.6	Si
10	32.6	4.0	No
11	33.16	3.9	Si
12	43.9	3.8	No
13	40.9	1.4	No
14	31.1	9.5	Si
15	34.3	3.6	Si
16	31.7	2.8	No
17	32.0	3.7	No
18	39.0	1.3	No
19	28.9	7.7	Si
20	31.9	2.6	No
21	39.9	1.5	No
22	28.3	2.3	Si
23	35.4	0.4	No
24	33.0	7.4	Si
25	45.5	7.7	Si
26	39.6	8.3	No
27	33.9	8.3	No
28	40.2	2.8	Si
29	37.8	2.5	No
30	33.7	2.3	Si
31	31.1	0.2	Si
32	44.8	7.6	No
33	39.0	8.2	Si
34	35.7	5.1	Si

35	36.7	0.8	Si
36	38.7	3.0	No
37	37.4	1.1	No
38	37.6	5.61	Si
39	34.6	3.01	No
40	35.2	2.71	Si
41	38.3	2.2	Si
42	43.4	8.9	No
43	38.2	1.6	Si
44	31.7	7.4	Si
45	44.2	3.9	Si
46	36.3	1.2	No
47	35.5	4.4	Si
48	39.0	3.2	Si
49	36.2	3.5	Si
50	40.1	8.1	Si
51	36.8	1.3	No
52	33.7	7.3	Si
53	31.2	6.0	Si
54	40.7	1.6	Si
55	35.1	0.6	Si
56	42.2	3.7	Si
57	37.2	8.8	Si

En negrita se indican las mezclas con mayor producción e ácido láctico. DS, desviación estándar.

Determinación de ácido láctico de las mezclas a las 8 horas

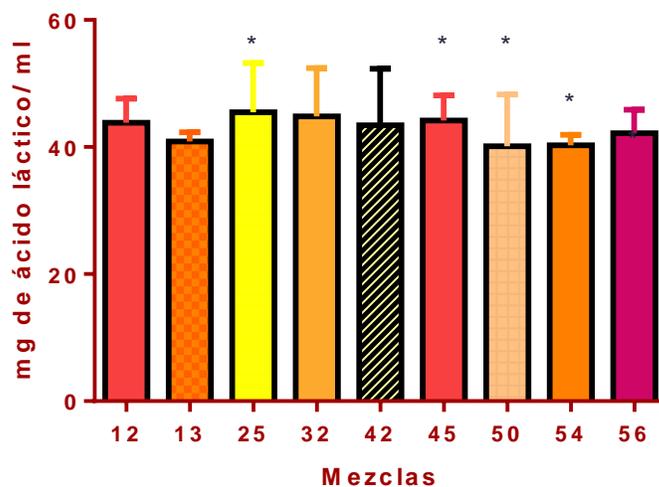


Figura 8. Producción de ácido láctico de las mezclas prospecto a las 8 horas. * = Mezcla con *E. faecium* en su formulación

Determinación de ácido láctico de las mezclas a las 8 horas

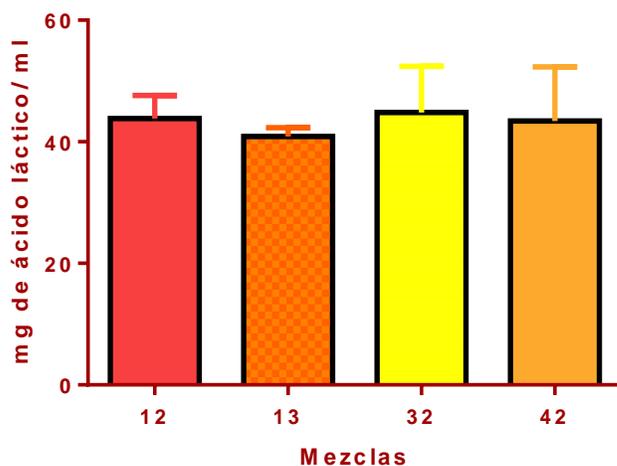


Figura 9. Producción de ácido láctico de las mezclas prospecto sin *E. faecium* a las 8 horas.

Determinación de la formación de biopelícula a 7, 8 y 9% de NaCl.

Para determinar la formación de biopelícula, se seleccionaron 3 concentraciones diferentes de NaCl, la cuales son utilizadas para la salmuera de la aceituna. Se observó una gran diferencia en cuanto a la producción, ya que *E. faecium* siendo BAL patógeno, tuvo una mayor producción de biopelícula, probablemente debido a que este rasgo fenotípico se considera una importante característica de patogenicidad. Al comparar la producción de biopelícula de las especies propuestas para la mezcla, se observó que la cantidad producida es mucho menor a la de *E. faecium*. (figura 9)

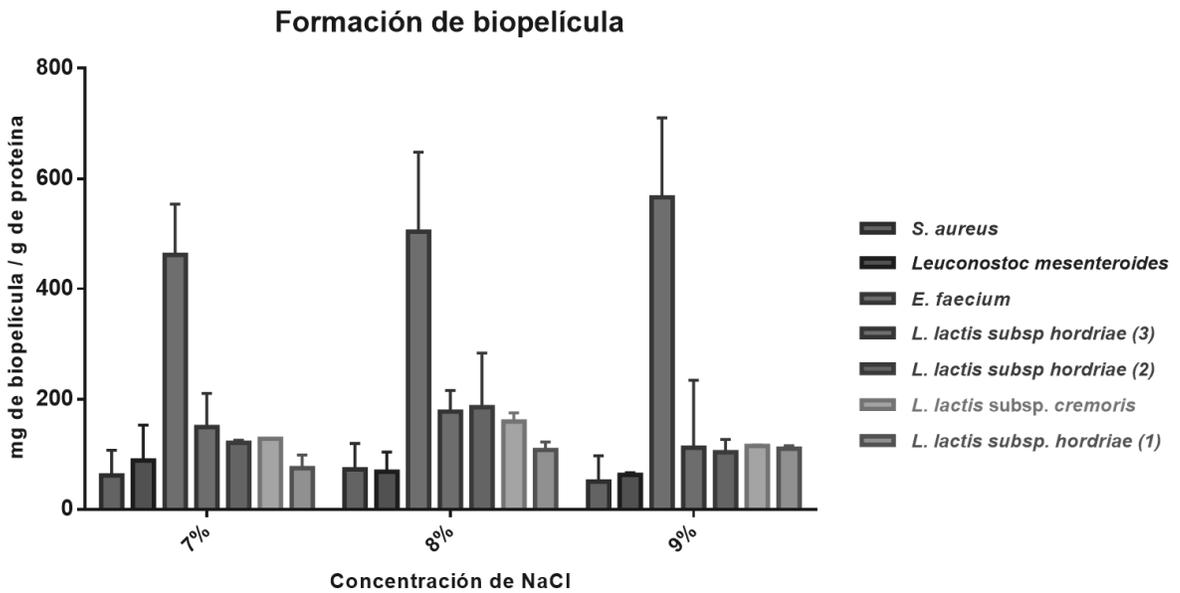


Figura 10. Producción de biopelícula en caldo LB con concentraciones de NaCl de 7, 8 y 9%. La cepa ATCC25923 de *Staphylococcus aureus* se utilizó como control positivo al ser una cepa productora de biopelícula.

CONCLUSIONES

Durante las pruebas bioquímicas se tomó en cuenta el tipo de azúcares presentes en la aceituna que ya han sido reportados anteriormente, y se observó que la cepa aislada de *L. mesenteroides* no es capaz de fermentar la glucosa, siendo el uno de los azúcares que se encuentran con mayor concentración en la aceituna, sin embargo, durante su crecimiento en caldo MRS presento más turbidez indicando que hay una mayor concentración celular (figura 6). Para evaluar la producción de ácido láctico se decidió hacer la evaluación a los 450 minutos de crecimiento, ya que durante esta hora es cuando las fases exponenciales están en el clímax de producción de ácido láctico, sin embargo, a pesar de que *L. mesenteroides* es un microorganismo no fermentador de glucosa, es uno de los mayores productores de ácido láctico en caldo MRS (a pesar de que su principal componente es glucosa), manteniéndose casi a la par con *L. lactis* subsp *cremoris*. Lo anterior puede deberse al mayor crecimiento de *L. mesenteroides*, por lo tanto, aunque este microorganismo presente baja eficiencia en la fermentación de glucosa, hay un mayor número de células fermentado dicho azúcar alcanzando niveles similares a los presentados por *L. lactis* subsp *cremoris*.

Cuando se evaluó la producción de ácido láctico por las diferentes mezclas de cepas formuladas para este fin, se observó una mayor producción por parte de la mezcla numero 32 (Tabla 4) conformada por *L. mesenteroides*, *L. lactis* subsp *hordriae* y *L. lactis* subsp *cremoris*. Sin embargo, el análisis estadístico mediante ANOVA no arroja diferencias significativas entre mezclas. Es importante notar que otras mezclas con niveles similares

de producción de ácido láctico incluían dentro de su formación *E faecium*, el cual es un microorganismo patógeno por lo que la utilización de tales mezclas no sería recomendable por el impacto potencial a la salud al tratarse de un desarrollo biotecnológico con aplicación a un producto de consumo humano.

Otro importante parámetro evaluado fue la capacidad de formación de biopelícula; éste rasgo fenotípico en bacterias patógenas se encuentra vinculado a procesos de resistencia a los antimicrobianos y es una importante característica de virulencia (Karygianni et al., 2020). Nosotros comparamos la producción de biopelícula de *E. faecium* el cual es una BAL patógena, contra el resto de especies BAL no patogénicas. El análisis estadístico de comparación múltiple con ANOVA, se observó una diferencia significativa con las demás especies. De igual forma, la aplicación de la misma herramienta estadística para evaluar la producción de biopelícula a distintas concentraciones de NaCl, sin observar una diferencia significativa intra-especie, esto nos indica que la concentración de NaCl utilizada en la salmuera no afectaría la producción de biopelícula entre las concentraciones de 7, 8 y 9%. Este aspecto es importante ya que el papel de la biopelícula en las BAL no patógenas pudiera estar asociada a la protección de la aceituna ante el ataque de hongos o bacterias patógenas de la planta o del humano conduciendo a un doble beneficio.

CONCLUSIONES

1. La presencia de *L. lactis* subsp *cremoris* es necesaria en mezcla para un iniciador microbiano debido a su capacidad de fermentar tanto la glucosa como la galactosa.
2. *L. mesenteroides* tiene una mayor tasa de crecimiento por lo que alcanza la fase estacionaria antes que el resto de las cepas probadas.
3. A pesar de que el mayor crecimiento de *L. mesenteroides*, *L. lactis* subsp *cremoris* presentó una mayor producción de ácido láctico.
4. La mezcla 25, conformada por *L. mesenteroides*, *L. lactis* subsp *cremoris* y *L. lactis* subsp *hordriæ* arrojó mejores resultados en cuanto a producción de ácido láctico.
5. La mezcla 25 cumplió con la característica de no contener *E. faecium* y mantener la presencia de *L. lactis* subsp *cremoris*, y que a su vez sugeriría una mejor fermentación de la aceituna.
6. A pesar de los resultados obtenidos en la mezcla, se debe de optimizar la concentración de las cepas inoculadas manteniendo la velocidad de producción de ácido láctico.
7. La producción de biopelícula de las especies prospectos para el iniciador microbiano, tuvieron una gran diferencia en comparación de *E. faecium*, demostrando su viabilidad para ser utilizadas en el proceso de las aceitunas.

PERSPECTIVAS

1. Realizar una secuenciación genómica de las especies utilizadas para identificar los genes que benefician su producción de ácido láctico.
2. Utilizar las mezclas en biorreactores con aceituna para encontrar un beneficio en el producto.
3. Optimizar las características de las mezclas para lograr un mejor rendimiento.
4. Realizar ensayos de sensibilidad de las especies contaminantes de la aceituna ante el sobrenadante de la fermentación inoculado con las mezclas.
5. Aislar e identificar cepas que puedan complementar a la mezcla.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abedi, E., & Hashemi, S. M. B. (2020). Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*, 6(10), e04974. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04974>
2. Alfonzo, A., Martorana, A., Settanni, L., Matraxia, M., Corona, O., Vagnoli, P., Caruso, T., Moschetti, G., & Francesca, N. (2018). Approaches to improve the growth of the starter lactic acid bacterium OM13 during the early stages of green Spanish-style table olive production. *Grasas y Aceites*, 69(3). <https://doi.org/10.3989/gya.0103181>
3. Alori, E. T., & Babalola, O. O. (2018). Microbial inoculants for improving crop quality and human health in Africa. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02213>
4. Anagnostopoulos, D. A., Goulas, V., Xenofontos, E., Vouras, C., Nikoloudakis, N., & Tsaltas, D. (2020). Green Cracked Cypriot Table Olives Fermentation.
5. Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, 33(2), 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.005>
6. Arroyo-López, F. N., Bautista-Gallego, J., Domínguez-Manzano, J., Romero-Gil, V., Rodríguez-Gómez, F., García-García, P., Garrido-Fernández, A., & Jiménez-Díaz, R. (2012). Formation of lactic acid bacteria-yeasts communities on the olive surface during Spanish-style Manzanilla fermentations. *Food Microbiology*, 32(2), 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.07.003>

7. Autonoma de nariño. (2012). 5, 7227.
8. Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., & Cocolin, L. (2013). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International*, 50(1), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.004>
9. Beldarraín, T., Cepero, Y., Bruselas, A., Santos, R., Ramos, M., Moya, Y., Núñez, M., & Vergara, N. (2008). Caracterización de cultivos iniciadores en productos cárnicos. Parte 1. 18(2), 8–15.
10. Benítez-Cabello, A., Calero-Delgado, B., Rodríguez-Gómez, F., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R., & Arroyo-López, F. N. (2020). The use of multifunctional yeast-lactobacilli starter cultures improves fermentation performance of Spanish-style green table olives. *Food Microbiology*, 91(July 2019), 103497. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103497>
11. Benítez-Cabello, A., Romero-Gil, V., Rodríguez-Gómez, F., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R., & Arroyo-López, F. N. (2015). Evaluation and identification of poly-microbial biofilms on natural green Gordal table olives. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 108(3), 597–610. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0515-2>
12. Besnard, G., Terral, J. F., & Cornille, A. (2018). On the origins and domestication of the olive: A review and perspectives. *Annals of Botany*, 121(3), 385–403. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx145>
13. Bevilacqua, A., Beneduce, L., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2013). Selection of yeasts as starter cultures for table olives. *Journal of Food Science*, 78(5). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12117>

14. Bonatsou, S., Tassou, C., Panagou, E., & Nychas, G.-J. (2017). Table Olive Fermentation Using Starter Cultures with Multifunctional Potential. *Microorganisms*, 5(2), 30. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020030>
15. Carafa, I., Stocco, G., Franceschi, P., Summer, A., Tuohy, K. M., Bittante, G., & Franciosi, E. (2019). Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter and non-starter cultures for the production of Traditional Mountain cheese. *Food Research International*, 115(February 2018), 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.069>
16. Conte, P., Fadda, C., Del Caro, A., Urgeghe, P. P., & Piga, A. (2020). Table olives: An overview on effects of processing on nutritional and sensory quality. *Foods*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/foods9040514>
17. De, N., De, E., & De, R. (2011). U Niversidad a Utonoma. 20092915–20092915.
18. Durán Quintana, M. C., Romero Barranco, C., García García, P., Brenes Balbuena, M., & Garrido Fernández, A. (1997). Bacterias del ácido láctico en la fermentación de aceitunas de mesa. *Grasas y Aceites*, 48(5), 297–311. <https://doi.org/10.3989/gya.1997.v48.i5.806>
19. Fuentes-Coto, G., Ruiz-Romero, R. A., Sánchez-Gómez, J. I., Ávila-Ramírez, D. N., & Escutia-Sánchez, J. (2013). Análisis microbiológico de leche de origen orgánico: atributos deseables para su transformación. *Agricultura Sociedad y Desarrollo*, 10(4), 419. <https://doi.org/10.22231/asyd.v10i4.134>
20. Goldental-Cohen, S., Biton, I., Many, Y., Ben-Sason, S., Zemach, H., Avidan, B., & Ben-Ari, G. (2019). Green Olive Browning Differ Between Cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 10(October), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01260>

21. Hatti-Kaul, R., Chen, L., Dishisha, T., & Enshasy, H. El. (2018). Lactic acid bacteria: From starter cultures to producers of chemicals. *FEMS Microbiology Letters*, 365(20), 1–20. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny213>
22. Kafkaletou, M., & Tsantili, E. (2018). The paradox of oleuropein increase in harvested olives (*Olea europea* L.). *Journal of Plant Physiology*, 224–225(January), 132–136. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.03.019>
23. Li, X., Liu, Y., Jia, Q., LaMacchia, V., O'Donoghue, K., & Huang, Z. (2016). A systems biology approach to investigate the antimicrobial activity of oleuropein. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(12), 1705–1717. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1841-8>
24. López-García, E., Benítez-Cabello, A., Rodríguez-Gómez, F., Romero-Gil, V., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R., & Arroyo-López, F. N. (2022). Bacterial metataxonomic analysis of industrial Spanish-style green table olive fermentations. *Food Control*, 137(November 2021). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108969>
25. Lous, J., Ryborg, C. T., & Thomsen, J. L. (2011). A systematic review of the effect of tympanostomy tubes in children with recurrent acute otitis media. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* (Vol. 75, Número 9). <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2011.05.009>
26. Orberá Ratón, T., & Pérez Portuondo, I. (2005). Para La Bioprotección Y La Estimulación Del Crecimiento. *Revista Cubana de Química*.
27. Orozco, F. (2011). Producción de ácido láctico por medio de fermentación anaerobia y su polimerización a partir de reacciones de apertura de anillo. *Centro de investigación científica de Yucatan.*, 1, 3–92.

https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1333/1/PMP_M_Tesis_2011_Fatima_Orozco_Olivarez.pdf

28. Perpetuini, G., Prete, R., Garcia-gonzalez, N., Alam, M. K., & Corsetti, A. (2020). Table Olives More than a Fermented Food. 1–16.
29. Pozo, M. B. Del, Gallardo-Guerrero, L., & Gandul-Rojas, B. (2020). Influence of alkaline treatment on structural modifications of chlorophyll pigments in NaOH-treated table olives preserved without fermentation. *Foods*, 9(6), 1–17. <https://doi.org/10.3390/foods9060701>
30. Rocha, J., Borges, N., & Pinho, O. (2020). Table olives and health: A review. *Journal of Nutritional Science*, 1–16. <https://doi.org/10.1017/jns.2020.50>
31. Rodríguez, M. (2009). Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. Tesis, 197.
32. Song, C. W., Rathnasingh, C., Park, J. M., Lee, J., & Song, H. (2018). Isolation and evaluation of *Bacillus* strains for industrial production of 2,3-butanediol. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 409–417. <https://doi.org/10.4014/jmb.1710.10038>
33. Vuan, V. (2018). Tendencias de producción de ácido láctico a partir de recursos renovables. 1–56.
34. Karygianni L., Ren Z., Koo H., Thurnheer T. (2020). Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends in Microbiology*, August 2020, Vol. 28, No. 8. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>