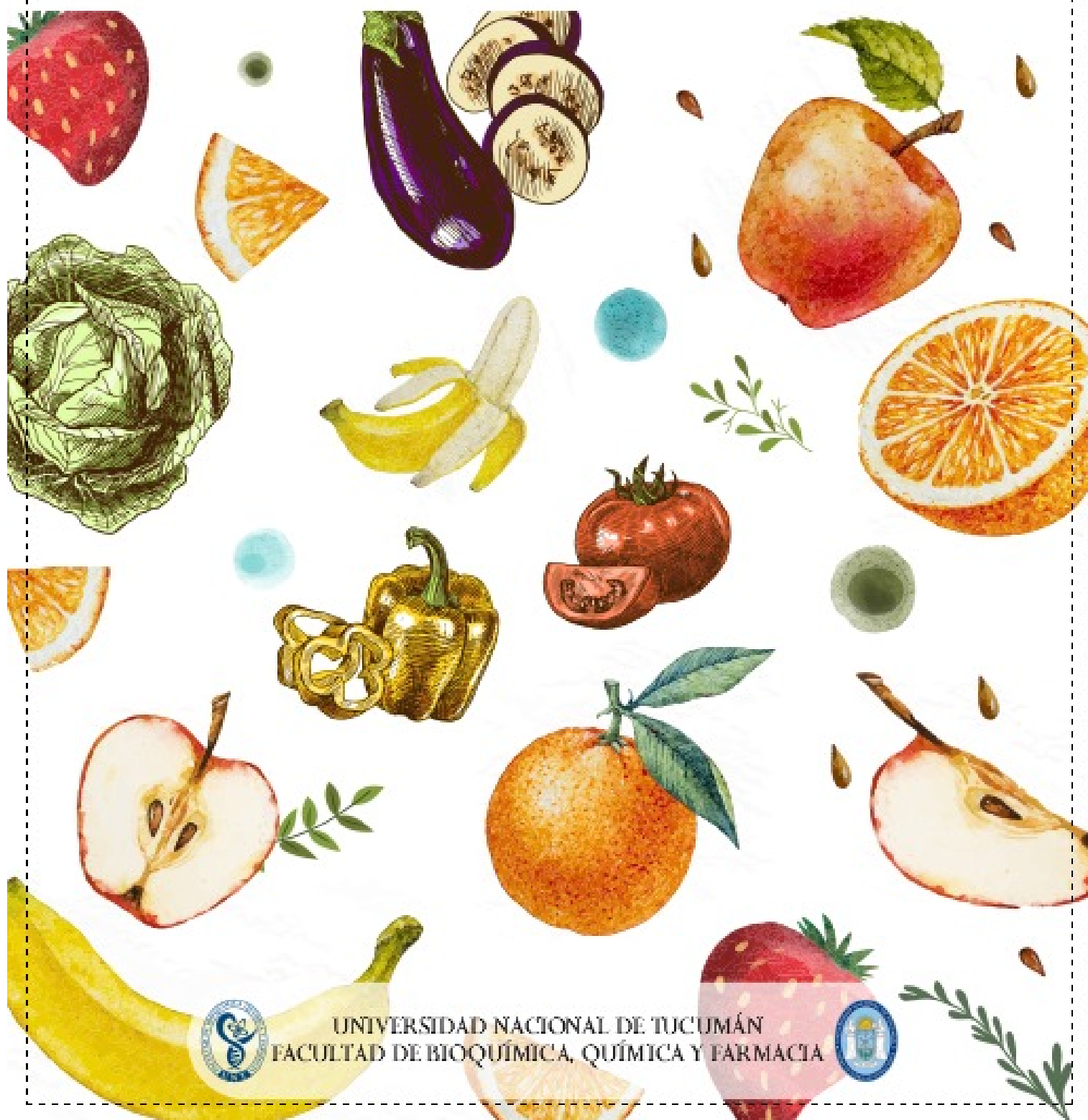


TESIS DOCTORAL

SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS AUTÓCTONAS PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL MINIMAMENTE PROCESADOS

LICENCIADA LUCIANA DEL VALLE RIVERO / 2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA, QUÍMICA Y FARMACIA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN

FACULTAD DE BIOQUIMICA, QUIMICA Y FARMACIA



TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCION DEL
GRADO ACADEMICO SUPERIOR DE DOCTORA EN
BIOQUIMICA

“SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS AUTÓCTONAS PARA SU POTENCIAL
APLICACIÓN EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL
MÍNIMAMENTE PROCESADOS”

Luciana del Valle Rivero

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN

FACULTAD DE BIOQUIMICA, QUIMICA Y FARMACIA



AUTORIDADES

HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Mag. Adriana Correa Zeballos

Dr. Manuel Javier Aybar

Dra. Viviana Andrea Rapisarda

Bioq. Esp. Ana Verónica Oldano

Dra. Ana Lucrecia Iruzubieta Villagra

Dra. María Antonieta Gordillo

Bioq. Esp. Vanesa Estela Quiroga

Sr. Mario Rodríguez

Sr. Joaquín Hernán Vargas

Srta. Elizabeth Abigail Gutiérrez

Srta. Karen Nahir Ríos

DECANO

Dr Edgardo Hugo Cutin

VICE-DECANA

Dra. Inés del Carmen Ramos

SECRETARIA DE ASUNTOS ACADEMICOS

Dra. Marta Elena Cecilia

JEFA DEL DEPARTAMENTO POSGRADO

Lic. Marta Quinteros

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN

FACULTAD DE BIOQUIMICA, QUIMICA Y FARMACIA



DEPARTAMENTO DE POSTGRADO

AUTORIDADES

DIRECTOR

Dr. Sergio Enrique Pasteris

CONSEJO TITULAR

Dra Inés del Carmen Ramos
Dra. María Carolina Navarro
Dra. Maria Cristina Gaudioso
Dra. Paula Andrea Vincent
Dra. Maria Cristina Rubio

Suplentes

Mag. Maria Graciela Benzal
Dra. Clara del Valle Silvia de Ruiz
Dra. María Inés Nieva Moreno
Dra. Claudia Alejandra Crespo
Dra. María Angélica Véliz

REPRESENTANTE DE POSGRADO ANTE LA SECRETARÍA DE POSGRADO DE LA UNT

Dra. Paula Andrea Vincent

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN

FACULTAD DE BIOQUIMICA, QUIMICA Y FARMACIA



TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO
ACADÉMICO SUPERIOR DE DOCTORA EN BIOQUIMICA

CARRERA DE DOCTORADO EN BIOQUIMICA

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)

Resolución n°: 732/00

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)

Resolución n°: 489-CONEAU-12

Director

Dr. Manuel Javier Aybar

Comité Académico:

Dra. Aida Ben Altabef

Dra. Gladis Susana Álvarez

Dra. Inés del Carmen Ramos

Dra. Roxana Beatriz Medina

Dr. Raúl Armando Salomón

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN

FACULTAD DE BIOQUIMICA, QUIMICA Y FARMACIA



TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:

**SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS AUTÓCTONAS PARA SU POTENCIAL
APLICACIÓN EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL
MÍNIMAMENTE PROCESADOS**

TESISTA:

Lic. LUCIANA DEL VALLE RIVERO

DIRECTORA:

Dra. FABIANA MARIA SAGUIR

DIRECTORA ASOCIADA

Dra. MARÍA JOSÉ RODRÍGUEZ VAQUERO

COMISION DE SUPERVISION:

Dr. PEDRO ADRIÁN AREDES FERNANDEZ

Dra. FERNANDA BEATRIZ MOZZI

*A mi Mamita,
fuiste, sos y serás y
el amor de mi vida.*

Agradecimientos

A la persona que más amo en la vida, a mi mamá, gracias mamita por acompañarme durante 30 años, porque sé que seguís estando y estarás siempre conmigo, gracias a vos porque sos la razón de mi vida, por incentivarme a seguir creciendo como mujer, persona y profesional, por acompañarme en este largo camino, por enseñarme todo en la vida, por ayudarme en cada momento y con mucho sacrificio, sos la persona que más admiro, esto es para vos.

A mi directora, Dra. Fabiana Saguir, por darme esta oportunidad, por acompañarme en esta etapa, por confiar en mí, brindarme sus conocimientos y ayudarme en ésta última parte.

A mi co-directora, Dra. María José Rodríguez Vaquero, por colaborar en gran parte de mi tesis, por sus consejos y por estar predispuesta para todo.

A Ramón, mi amor, gracias a la vida que hizo que nuestras vidas se crucen, gracias por entender, ayudarme, aconsejarme y estar en todos los momentos más difíciles que nos tocó atravesar juntos. Gracias por ser mi pilar, mi compañero y darme millones de momentos de pura alegría. Te amo.

A los Dres Aredes y Mozzi, miembros de la Comisión de Supervisión por sus importantes aportes.

A Rosa, María Torres y Clau, mis locas amigas del laboratorio que incondicionalmente me ayudaron en parte de la realización de la Tesis y estuvieron siempre para alentarme a cumplir esta meta en mi vida.

Al Instituto de Microbiología, por abrirme sus puertas, y a todos los docentes, ayudantes y compañeros de laboratorio, que siempre estuvieron para ayudarme.

A la Dra Silvia Sajur por estar siempre presente, predispuesta y colaborar en todo lo referido a la Tesis.

A la Dra Janet, Dra Cavallero y a los Ingenieros Alicia y Ramiro, por abrirme sus puertas y estar dispuestos a ayudarme en parte de los ensayos finales.

A Marta Quinteros y Carlos Puig de departamento de Posgrado de la FBQF, UNT por su colaboración en lo referido a trámites a nivel académico y por su excelente predisposición siempre.

A toda mi familia, a mi papá, mis hermanos, tíos y primos, que desde lejos siempre estuvieron alentándome, y dándome fuerzas, y más aún en este año.

A mis compañeras de facu, "las divas", a Flavia, Miguel, Gilda y Daniela, gracias por compartir cada momento, por todo el aguante y por darme una mano cuando necesité.

A mis amigas de barrio, con ellas crecí, y aprendí de la vida, gracias por alentarme siempre, entender lo importante que fue para mí llegar a éste punto y tenerme paciencia. Gracias por estar conmigo en este año tan difícil. Son mis hermanas y mis pilares para seguir con el día a día.

A mis amigas del alma "monas" y "the guari-ola", gracias por cada segundo compartido, por todo el ánimo durante este tiempo, espero compartir mucho más aún. Más allá de la amistad, se convirtieron en mis pilares para seguir adelante

A Pedro, por colaborar desinteresadamente con la preparación del material, y por las tardes llenas de risas.

A mis abuelos, que aunque no estén presentes, yo siempre los recuerdo, y ojala estén muy orgullosos.

A Gonzalo y Melina por siempre estar predispuestos y colaborarame.

A todas aquellas personas que me ayudaron en esta última etapa y me solucionaron algunos problemitas.

A todos, infinitamente muchas gracias!!!!



ÍNDICE Y RESUMEN



ÍNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN	1-53
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	54-55
CAPÍTULO 1	56-118
CAPÍTULO 2	119-183
CAPÍTULO 3	184-243
CONCLUSIONES FINALES	244-251
PROYECCIONES	252
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	253-254
BIBLIOGRAFÍA	255-277

RESUMEN

El consumo de frutas y hortalizas y sus productos mínimamente procesados (MP) constituyen una parte fundamental de la dieta humana. Sin embargo, la seguridad y estabilidad microbiológica de los productos MP, basada principalmente en la correcta cadena de frío y prácticas higiénicas, resultan difíciles de controlar. Se reportaron brotes de toxiinfecciones alimentarias debido a su consumo. En la actualidad, ha surgido la necesidad de buscar alternativas de conservación natural al uso de conservadores químicos, y las bacterias ácido lácticas (BAL) puede ser de gran interés. El objetivo de esta Tesis Doctoral es investigar las propiedades antimicrobianas de BAL de frutas y hortalizas de la región y, seleccionar cepa(s) que por sus propiedades antimicrobianas proporcionen valor agregado a la calidad del producto final. Se aislaron e identificaron 157 presuntamente BAL de ensaladas frutas (EF) y hortalizas (EH), de las cuales 81 fueron seleccionados por sus mejores crecimiento en medio MRS (pH 5,5 o 4,5) y caracterizadas por sus actividades antimicrobianas frente a patógenos relevantes para la industria de alimentos (*E. faecalis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* y dos cepas de *E. coli*). Además, se sumaron 23 cepas pertenecientes al cepario de nuestro laboratorio, observándose que 53% de las bacterias presentaron actividad inhibitoria fuerte, por lo menos contra 3 de las 5 cepas indicadoras. Se cuantificó y evaluó la naturaleza de la actividad antimicrobiana, determinándose que la misma en BAL de fruta y EF en una buena proporción de los casos estuvo asociada, además de acidez, a la producción de otros metabolitos como peróxido de hidrógeno o de naturaleza proteica lo que constituyó un valor adicional para su selección. En BAL seleccionadas, se evaluó su crecimiento en jugo comercial multifruta pasteurizado y neutralizado en cultivos individuales y co-cultivos con *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* a 37°C. Además, se determinaron propiedades de interés tecnológicos y requerimientos en vitaminas lo que permitió finalmente seleccionar las cepas de *Lactobacillus plantarum* N8 de naranja, EFf29 y EFj18, identificadas fenotípica y genotípicamente durante este estudio, para realizar ensayos de inactivación microbiana en matrices alimentarias listas para consumo (- jugo mixto de manzana/naranja, - frutillas trozadas y - manzanas trozadas). Las BAL se

inocularon (orden 10^7 ufc/g) e incubaron durante 14 y 21 días para jugo mixto y frutas trozadas respectivamente a 4 y 30°C. Además se evaluó el efecto de CaCl_2 como potencial agente preservativo y se analizaron los cambios microbiológicos, fisicoquímicos y de las propiedades antioxidantes. En las tres matrices, las cepas inoculadas crecieron alrededor de 1-1,5 U log e inhibieron el crecimiento de la microbiota natural sin detectarse células, en general, en 2 o 7 días, dependiendo principalmente de la matriz alimenticia, a diferencia del control y medio con CaCl_2 . Además, en las matrices inoculadas los atributos sensoriales y la apariencia en general se conservaron significativamente, especialmente en frutillas trozadas que rápidamente mostraron signos de deterioro. En conclusión, se proponen las cepas seleccionadas de *L. plantarum* por sus propiedades antimicrobianas, nutricionales y tecnológicas, especialmente EFf29 y N8, para su potencial aplicación como agentes de control de frutas MP, listas para consumo, efectivas aún a temperaturas abusivas.



INTRODUCCIÓN



Vegetales y la alimentación

Las frutas y hortalizas ocupan el cuarto lugar en importancia económica entre los productos agrícolas en el mundo, y son uno de los más redituables en los países en desarrollo. Son importantes en la nutrición de la mayoría de las culturas del mundo, especialmente en aquellas que por su economía tienen acceso limitado a proteínas de origen animal (Schwentenius, 2000). En este sentido, existe una tendencia mundial hacia un mayor consumo de frutas y hortaliza motivada fundamentalmente por una creciente preocupación por una dieta más equilibrada, con menor proporción de carbohidratos, grasas y aceites y con una mayor participación de la fibra dietaria, vitaminas y minerales. Esto se fundamenta, en parte, en las menores necesidades calóricas de la vida moderna, caracterizadas por un mayor confort y sedentarismo y las numerosas evidencias científicas de los beneficios que aportan a la salud. Sin embargo, la tendencia es cada vez consumir productos más frescos y sanos, y lo más parecido a su forma original. Esto debido a que se ha asociado el consumo de conservadores químicos con intoxicaciones, cáncer y otras enfermedades degenerativas, lo que resalta la necesidad de buscar alternativas de conservación que cubran las mismas propiedades antimicrobianas y compatibilidad con el alimento (Álvarez Parrilla, 2008).

Las investigaciones científicas de los últimos años han demostrado que una dieta rica en frutas y hortalizas protege contra numerosos tipos de cáncer y disminuye la incidencia de las cardiopatías coronarias (Boeing y col., 2012). En este sentido, una reciente revisión sistemática y de meta-análisis sobre la asociación dosis-respuesta entre el consumo de frutas y vegetales y mortalidad por enfermedades cardiovasculares reportó reducción en el riesgo de padecer dichas enfermedades (Wang y col. 2014) Además, una dieta rica en frutas y hortalizas es muy eficaz para regular el peso corporal dado que, su aporte calórico es significativamente menor al de otros alimentos (Mozaffarian, 2016). Asimismo, el consumo de frutas y vegetales es fuertemente recomendado por prestigiosas organizaciones internacionales tales como: Organización Mundial de la Salud (OMS), Food and Agriculture Organization (FAO), United States Department of Agriculture (USDA) y European Food Safety Authority (EFSA) (Djuric, 2011; Ramos y col., 2013

y Tiwari y Cummins, 2013). Así, las frutas y hortalizas y sus productos derivados pueden ser considerados como nutracéuticos; esto es “cualquier sustancia que pueda ser alimento, o parte de un alimento, y que tenga beneficios médicos, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades”. Sin duda, el consumo de este tipo de productos marcará significativamente la tendencia en la industria alimenticia para los próximos años.

Frutas y hortalizas. Definición y características generales

La definición de frutas y hortalizas es en ocasiones arbitraria, subjetiva y más “tradicional” que científica. Aunque ambas son vegetales presentan diferencias que permiten clasificarlos en dos grupos distintos.

Fruta: fruto, infrutescencia, la semilla o las partes carnosas de órganos florales, con un grado adecuado de madurez y propias para el consumo humano. No incluye los frutos secos (almendra, avellana, castaña, etc.) ni las semillas o frutos oleaginosos (ej.: aceituna, cacahuete, coco, etc.). En términos generales, las frutas de la industria hortícola y frutícola se pueden clasificar en: - pomáceas (manzana, pera y membrillo), - semillas (mango, melocotón, ciruela, cereza, durazno), - bayas (fresa), - hesperidio (frutas cítricas), - sorosis (mora, piña), - conocarpo (yaca) y - sincarpo (chirimoya). En general poseen un pH inferior a 4,5, aunque algunas, como bananas, melón e higos, poseen pH superior. Algunos frutos son considerados erróneamente como hortalizas, por ejemplo, el tomate es un fruto carnoso clasificado botánicamente como una baya espúrea.

Las frutas se clasifican atendiendo a dos criterios:

- **Por su naturaleza:** - Carnosas: aquellas cuya parte comestible posee en su composición al menos un 50% de agua, - Secas: aquellas cuya parte comestible posee en su composición menos de un 50% de agua, - Oleaginosas: aquellas que son empleadas para la obtención de grasas y para el consumo humano (aceituna, cacahuete, coco, girasol, sésamo).

- **Por su estado:** - Frescas: destinadas al consumo humano inmediato sin sufrir tratamiento alguno que afecte a su estado natural, - Desecadas: el producto obtenido a partir de frutas frescas,

cuya proporción de humedad se ha reducido por la acción natural del aire y del sol, - Deshidratadas: productos obtenidos a partir de frutas carnosas frescas cuya proporción de humedad ha sido reducida mediante procesos apropiados y autorizados.

El Código Alimentario Argentino (CAA) define en su Artículo 887 frutas frescas a toda fruta destinada al consumo, el cual es el fruto maduro procedente de la fructificación de una planta sana, dentro de las cuales la fruta fresca es la que habiendo alcanzado su madurez fisiológica, presenta las características organolépticas adecuadas para su consumo al estado natural. Se hace extensiva esta denominación a las que reuniendo las condiciones citadas se han preservado en cámaras frigoríficas. Entre las frutas frescas empleadas durante este trabajo de Tesis Doctoral para preparar las matrices alimenticias se utilizaron manzanas, frutillas y naranjas (Figura 1). Ellas fueron elegidas por su gran aceptación por parte del consumidor y en el caso de frutilla y naranja, además por ser cultivos de gran importancia regional.



Figura 1. Naranjas y frutillas cultivadas en la provincia de Tucumán. Manzana (variedad Red Delicious) de amplio consumo en nuestra región

Entre los productos derivados de frutas se encuentran los jugos frescos, muy valorados por su sabor natural y propiedades nutricionales. El CAA define jugos de fruta fresco a todo aquel jugo puro obtenido por procedimientos mecánicos a partir de la fruta madura, limpia, sana, seleccionada, lavada y que no ha sido sometido a un proceso de pasteurización, congelado o concentrado luego se su extracción. Poseen el color, aroma y sabor característico de la fruta de la que provienen. Por lo tanto, la producción de jugos frescos de calidad, implica el manipuleo cuidadoso de la materia

prima y condiciones higiénico- sanitarias estrictas durante su procesamiento. En el presente trabajo se realizaron ensayos en jugo de naranja y manzana.

Hortalizas: plantas herbáceas hortícolas que se pueden utilizar como alimento, ya sea crudo o cocinados. Las verduras son las hortalizas cuyas partes comestibles están constituidas por sus órganos verdes (hojas, tallos o inflorescencias). También se incluyen las setas y las leguminosas frescas, así como los alimentos cuya intención de uso es compartida con el que se hace de las hortalizas, particularmente: guisantes y habas tiernas, semillas germinadas, maíz dulce y flores. Sobre la base de la parte comestible de la planta que se utiliza se pueden agrupar en: - hojas (repollo, lechuga, espinaca, amaranto), - tallo (espárragos), - flores (brócoli), - frutos (melón, calabazas, pimiento, berenjena), - raíces (rábano, nabo, zanahoria, remolacha, papa), - bulbos (cebollas, ajo). El pH es generalmente superior a 4,5 con estructuras y composiciones químicas muy diversas entre ellas en comparación con las frutas (Pennington y Fisher, 2010). El CAA define en su Artículo 820 hortalizas frescas a la planta herbácea producida en una huerta de la que una o más partes pueden utilizarse como alimento, corresponde también a la de la cosecha reciente y consumo inmediato en las condiciones habituales de expendio. Lechuga y zanahoria fueron constituyentes de la ensalada usada para el aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL) durante este estudio.

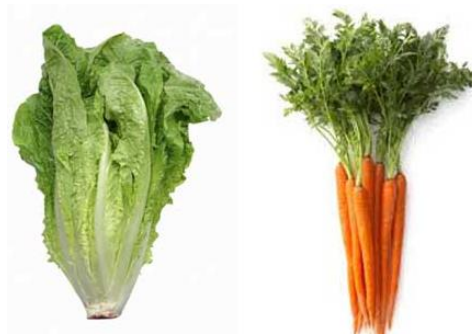


Figura 2. Lechuga y zanahorias, dos hortalizas ampliamente consumidas en la región.

Las frutas y hortalizas se encuentran entre los productos alimenticios agrícolas más valiosos.

En Argentina, la actividad agrícola es uno de los pilares fundamentales de la economía, cuenta con al menos unos 34 millones de hectáreas en los cuales se desarrollan diferentes cultivos. En la región del norte se destaca la producción de frutas cítricas y finas, especialmente limón y frutillas. En este sentido, en Argentina se cultivan 1.100 hectáreas de frutillas, de las cuales 290 se encuentran en la zona norte, mayoritariamente en la provincia de Tucumán. La zona tradicional de producción de frutillas en esta provincia es Lules, con 230 hectáreas. La otra región productora es Tafí del Valle, donde existen 60 hectáreas en los valles de altura. Cabe destacar que el consumo de esta fruta así como de frutas finas registra un aumento creciente en los últimos años ya que son alimentos funcionales con excelentes propiedades nutritivas y terapéuticas, además de presentar colores, formas y sabores muy atractivos. En la Figura 2 se muestra la producción a nivel nacional y su impacto en el mercado global de naranja, frutilla y manzana, incluidas en el presente trabajo de Tesis Doctoral para realizar ensayos de biopreservación en matrices alimenticias.

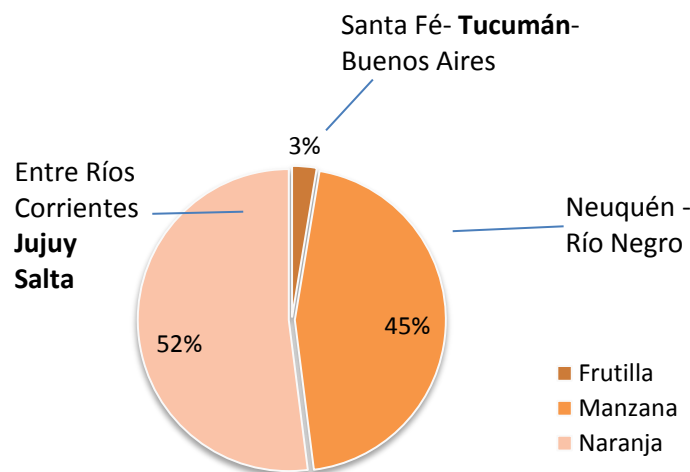


Figura 3. Producción anual de frutilla, manzana y naranja en Argentina.

Por otro lado, en la Tabla 1 se presenta la composición nutricional típica de dichas frutas frescas, ricas en ácido L-ascórbico (vitamina C), especialmente frutillas y naranjas.

Tabla 1. Principales componentes nutricionales de frutilla, manzana y naranja

Frutas	Macronutrientes (mg/100g FF)						Micronutrientes (µg/100g FF)						Fibra	Carbohidratos	Energía (por 100g FF)
	V _C	P	K	Mg	Na	Ca	V _A	Fe	Se	Cu	Mn	Zn	g/100g FF		kcal
Frutilla	58,8	24	153	13	1	16	1	410	0,4	50	390	140	0,4	7,55	30
Manzana	4,6	11	107	5	1	6	3	120	0	30	40	40	1,3	12,76	48
Naranja	53,2	14	181	10	0	40	11	100	0,5	40	30	70	2,4	11,75	47

FF: fruta fresca Vc: vitamina C; P: Fosforo; K: potasio; Mg: magnesio Na: sodio; Ca: calcio; Va: vitamina A; Fe: hierro; Se: selenio; Cu: col manganoso; Zn: zinc. (Departamento de Agricultura de Estados Unidos, USDA, 2017; Malaterre y col., 2018)

En general, las frutas son productos ricos en agua, pobres en proteínas (de 1 a 4%) y lípidos (entre el 0,5 – 0,6%), y en lo referente a carbohidratos, se encuentran entre el 7 y 18%. Son alimentos de escasa importancia desde el punto de vista plástico y energético; sin embargo, tienen gran interés por su contenido de micronutrientes como vitaminas, minerales y compuestos bioactivos beneficiosos para la salud (compuestos fenólicos, fibra, compuestos organosulfurados, glucosinolatos, etc.) (Tabla 1). Son alimentos con bajo contenido en sodio, calorías y grasa saturada y carecen de colesterol. Contienen ácidos orgánicos, fitoesteroles, y antioxidantes como compuestos fenólicos. El agua es el componente más abundante en frutas, constituyendo más del 75% de su peso e incluso en las frutillas supera el 90%. El consumo de frutas y hortalizas, bien en su estado sólido o en forma de jugos, es una de las principales fuentes de agua que tiene el ser humano en su dieta (Cano y col., 2005). En cuanto a la energía, el aporte calórico aportado por las frutas es muy bajo. Como puede observarse en la Tabla 1 el aporte calórico de 100 gramos de frutillas frescas es menos que la mitad de ese valor.

Vegetales frescos y mínimamente procesados

El beneficio para la salud del consumo diario de al menos cinco raciones entre frutas y hortalizas está bien documentado. En Argentina, no se alcanzan los 600 gramos por persona y día que recomienda la OMS en sus objetivos de salud pública, por lo que es importante mejorar el acceso a estos alimentos, aprovechar su potencial nutritivo y salvar las barreras para su consumo. Las frutas y verduras pueden ser consumidas como productos frescos, pasteurizados, cocinados al

vapor o calentadas en microondas. Sin embargo, los cambios en el estilo de vida del consumidor tendientes hacia el consumo de alimentos cada vez más naturales y saludables, sumado a la falta de tiempo que requiere la preparación y cocción de estos alimentos, ha llevado a una demanda de una gama más amplia de productos y a la presentación de los vegetales mínimamente procesados (VMP), cuya disponibilidad en el mercado mundial ha incrementado significativamente (Allende y col., 2006a; Froder y col., 2007) (Figura 4). Cabe destacar que la definición, descripción y criterios microbiológicos de VMP ha sido aprobada para incorporarla al Código Alimentario Argentino (CAA) a través de la inclusión de los Artículos 925 tris y 925 quater en el Capítulo XI Alimentos Vegetales de dicho Código. VMP se definen comúnmente como cualquier fruta u hortaliza que ha sido sometido a diferentes pasos durante su procesamiento para obtener un producto totalmente comestible mientras proporciona comodidad, funcionalidad, seguridad alimentaria, ventajas en la salud, conveniencia a la hora de preparación, alta valor nutritivo, sabor y grado de frescura similar a los vegetales frescos (Artéz y Allende, 2017).

VMP han ganado gran popularidad entre los consumidores de todo el mundo lo que ha llevado a una tendencia global de mayor investigación relacionada a su procesamiento, conservación y comercialización (Siddiq y col., 2013; Oliveira y col., 2015). El CAA define VMP como aquellas hortalizas y frutas frescas, limpias, peladas enteras y/o cortadas, cuyo procesamiento mínimo permite mantener sus propiedades naturales y tornarlas fáciles de utilizar por el consumidor ya sea para consumo directo crudo o para preparaciones culinarias, las que se presentarán envasadas. Para su obtención las mismas serán sometidas a las operaciones necesarias para garantizar la calidad e inocuidad del producto, de acuerdo a las buenas prácticas de manufactura. En Figura 5 se ilustran distintos productos de frutas y vegetales MP.

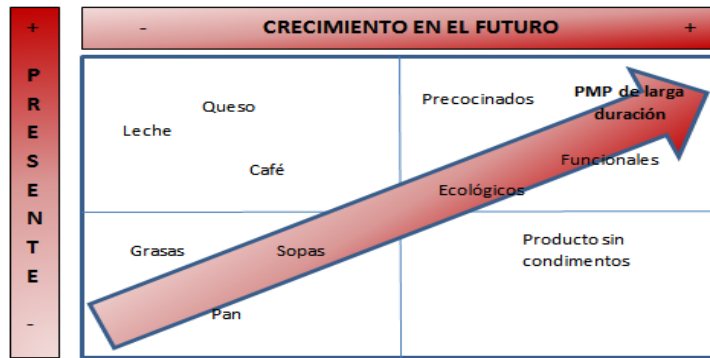


Figura 4. Las tendencias del consumo y del consumidor. Adaptado de Instituto Nacional de Consumo



Figura 5. Frutas y vegetales mínimamente procesados

En resumen, alimentos naturales con atributos de frescuras, poco dañados por calor o frío, son cada vez más requeridos por el consumidor y para satisfacer estas demandas, nuevas alternativas a las técnicas tradicionales de conservación son necesarias a fin de obtener productos inocuos, que nutran sin representar un peligro para la salud pública.

Factores del procesamiento que afectan a la calidad de VMP

Uno de los principales problemas que presentan las frutas y vegetales MP es su carácter perecedero. Durante las diferentes operaciones de preparación a las que es sometido el producto se favorecen las reacciones de deterioro: respiración, transpiración, producción de etileno, deterioro enzimático que reducen la calidad sensorial y nutricional, y limitan la vida de anaquel. Por otro

lado, el procesamiento y el tiempo transcurrido hasta su consumo pueden contribuir al crecimiento de microorganismos patógenos o indeseables por contaminación cruzada (materia prima, operarios, medio ambiente, agua, entre otros) (Alzamora y col., 2000; Selma, 2008; Francis y col., 2012). En este contexto, las frutas y vegetales MP deben mantener las características de fresca y a su vez deben proveer una vida útil conveniente, asegurando un nivel apropiado de inocuidad y valor nutricional (Alzamora y col., 2000). Por lo tanto las operaciones de manipulación, procesamiento y almacenamiento deben ser seleccionadas y realizadas cuidadosamente (Palou y col., 2000). Operaciones tales como recepción, selección, lavado, pelado, cortado o desgranado según corresponda, empaquetamiento bajo diferentes condiciones forman parte del procesamiento mínimo (Figura 6). Todas estas operaciones pueden introducir cambios favorables en el valor nutritivo de los alimentos, por ejemplo, aumentando la biodisponibilidad de nutrientes bioactivos, pero al mismo tiempo pueden limitar su vida útil debido a un aumento de la superficie expuesta del vegetal recién cortado y/o incremento de la disponibilidad de nutrientes, lo que favorece su descomposición. Por otro lado, el confinamiento de los productos dentro del envase y la falta de tratamiento para asegurar la estabilidad microbiana, favorecen la multiplicación microbiana, además de producir ciertos cambios en el vegetal como ablandamiento de tejidos, disminución del valor nutricional y presencia de mal sabor (Mantilla y col., 2013; Curutchet y col., 2014; Kim kim y col., 2014; Finnegan y O'Beirne, 2015).

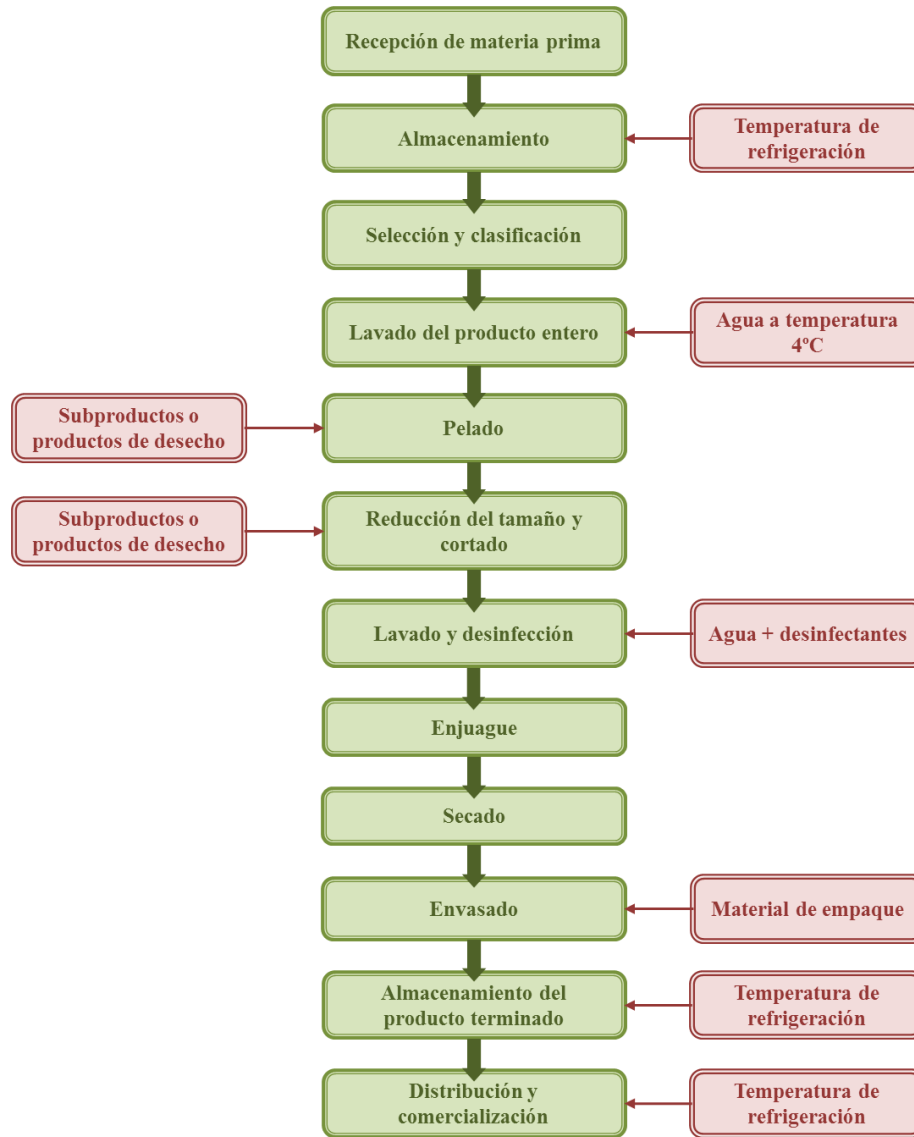


Figura 6. Diagrama general del procesamiento mínimo de un vegetal

De este modo, la alteración y vida útil de VMP depende de varios factores como la calidad de la materia prima, tecnología de la producción y conservación e interacciones entre grupos microbianos (Selma y col., 2008). Actualmente las fábricas de procesamiento requieren materias primas de alta calidad, homogeneidad y características estables que cumplan condiciones específicas para su uso (Medina y col., 2012). En la Figura 7 se resumen los factores más comunes que afectan la descomposición y vida útil de VMP. Es interesante destacar que el uso de refrigeración es un factor de preservación comúnmente usado durante el procesamiento y

conservación de alimentos MP, listos para consumir, también llamados de 4^a gama,. En la actualidad existe variedad de hortalizas y frutas MP envasadas en atmósferas controladas que pueden adquirirse en la zona de refrigerados de supermercados y, que mantienen sus propiedades sensoriales y nutritivas.

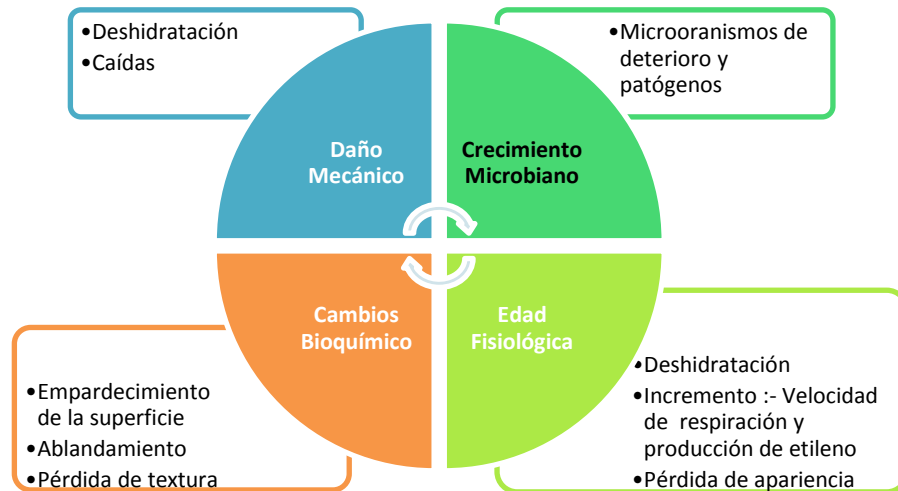


Figura 7. Factores que afectan la descomposición y vida útil de VMP. Adaptado de Artéz y Allende (2017).

Contaminación microbiana de frutas y hortalizas

Los factores principales que afectan la sobrevivencia y el crecimiento microbiano en un alimento se pueden clasificar de la siguiente forma (Alzamora, 2000):

- **Factores implícitos y microbianos:** microorganismos presentes, velocidades y fases lag de crecimiento, efectos sinérgicos, etc..
- **Factores intrínsecos:** aquellos factores químicos y físicos que actúan dentro del alimento (nutrientes, pH, actividad de agua, presencia de conservadores y otras sustancias antimicrobianas, microestructura, etc.).
- **Factores extrínsecos:** temperatura, humedad relativa, presión parcial de oxígeno, etc.

Las frutas y vegetales frescos en general, son una fuente rica de reservas alimenticias, principalmente de agua, azúcares, vitaminas, antioxidantes y fibras. Sin embargo, el contenido de ácidos orgánicos, responsable del bajo pH, son factores intrínsecos que seleccionan el crecimiento

de microorganismos ácidos tolerantes tales como BAL levaduras y hongos filamentosos (Sajur y col., 2007; Savino y col., 2012). No obstante, el procesamiento y manipulación de los vegetales frescos y VMP puede proporcionar oportunidades de contaminación microbiana (IFPA, 2001; FDA/CFSAN, 2008). En este punto resulta imprescindible cumplir con los requisitos para la implementación de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP), evitando así su contaminación cruzada (IFPA, 2001; Callejas y col., 2011; WGA, 2012; EFSA, 2013).

En los últimos años, las frutas y verduras han ganado notoriedad como vehículo de transmisión de enfermedades en todo el mundo. Según el informe del Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF) de la Unión Europea, en 2011 se ha constatado un aumento de las contaminaciones microbiológicas (en particular de *E. coli* y *Salmonella*) en estos productos, tanto enteros como cortados y MP (VI gama), y también en semillas germinadas y zumos sin pasteurizar. Sólo en EU el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) estimó que 48 millones de personas, o una de cada seis estadounidenses, se enferman por esta causa cada año (Painter y col., 2013), siendo aproximadamente un 48% de estos casos vinculados al consumo de frutas y hortalizas frescas contaminadas. Una gran variedad de microorganismos incluyendo bacterias, virus y parásitos han sido asociados a enfermedades transmitidas por estos alimentos, sin embargo, las infecciones bacterianas parecen ser dominantes (Painter y col., 2013). Cuando la fruta es procesada o manipulada, las bacterias pueden ser transferidas de la superficie externa a la porción comestible, siendo un vehículo potencial para la transmisión de los principales patógenos transmitidos por estos alimentos (Ukuku y col., 2016). De este modo, los VMP constituyen un medio idóneo para el crecimiento microbiano porque proveen los nutrientes y la humedad que necesitan para crecer, resultando más expuesto a la contaminación microbiana. Nguyen-the y col (2000) indicó que levaduras, mohos y bacterias pueden deteriorar VMP, siendo las bacterias predominantes en condición de refrigeración. En este aspecto, *Listeria monocytogenes* es generalmente la más problemática debido a su capacidad de permanecer viable e incluso crecer en productos

almacenados en frío (Sajur, 2007; Zhu y col., 2017). Se ha reportado la multiplicación de *L. monocytogenes* a temperatura de refrigeración en manzana, melón y frutas cítricas MP (Alegre y col., 2015), así como en mango y puré de tomate almacenados a 7 y 4 °C (Lokerse y col., 2016; Sajur, 2007). Cordano y Jacket (2009) informaron la presencia de *L. monocytogenes* en ensaladas de vegetales listos para consumir frescos o refrigerados preparados en puesto de venta de supermercados de Santiago de Chile. La presencia de *Salmonella* spp. también han sido descripta en tomates, brotes de semillas, melón, manzana y frutilla (Beuchat, 2002; Lewis y col., 2006). Recientemente, Wang y col. (2018) demostraron la capacidad de *Salmonella* Typhimurium para crecer en frutillas frescas almacenadas a 25 °C. Por otro lado, brotes de enfermedades ocasionadas por *Escherichia coli* O157:H7 han sido asociados con lechuga, berenjena y jugo de manzana, mientras que *E. coli* enterotoxigénica con zanahorias y *Shigella* spp. con lechuga, cebollines y perejil (Olaimat y Holley, 2012). Por otro lado, el hecho que frutas y hortalizas se consuman crudas representa un mayor riesgo para la seguridad alimentaria (Hoffmann y col., 2015). En este sentido, se encontraron brotes de enfermedades transmitidas principalmente por alimentos de hojas verdes, brotes de semillas, melón, manzanas, bayas, papas y cebollas verdes (Fletcher y col., 2013). Sin embargo no hay demasiada información disponible con respecto a la microbiota presente en frutas y hortalizas MP de nuestra región (Sajur y col., 2007). El CAA establece en su artículo 925 quarter que las hortalizas y frutas deberán ajustarse a las siguientes normas microbiológicas siguiendo los métodos de referencia del Manual Analítico de Bacteriología, año 2002 ((BAM, FDA) según lo establecido por normas ISO: - *E. coli* NMP: 100 ufc/g; - *Salmonella* spp: ausencia en 25 g; - *E. coli* O157:H7: ausencia en 25 g; - *Listeria* spp: ausencia en 25 g.

Cabe destacar que además de bacterias, hongos pectinolíticos fueron determinados como agentes de deterioro de frutas y hortalizas frescas y MP, encontrándose entre las principales especies *Penicillium fluorescens* y *Xanthomonas* sp.

Por lo tanto, es evidente la necesidad de métodos de intervención para mantener la seguridad e inocuidad de vegetales frescos y MP (Abadias y col., 2008, 2011).

En este sentido, Alzamora y col (2000) proponen tres iniciativas principales para garantizar alta calidad e inocuidad:

- Optimización de los métodos de conservación tradicionales para mejorar calidad, rendimiento y eficiencia energética. Como ejemplos se pueden citar: empaquetamiento aséptico de alimentos procesados térmicamente, calentamiento óhmico, con radiofrecuencias o infrarrojo, microfiltración, deshidratación osmótica o al vacío, secado dieléctrico y por microondas, enfriamiento criogénico o por dispersión dinámico.
- Desarrollo de procesos leves mediante la combinación de factores tradicionales de preservación físicos y químicos, cada uno aplicado en baja intensidad. Por ejemplo: empaquetamiento en atmósferas controladas/modificadas
- Desarrollo de nuevas técnicas para obtener alimentos con atributos de calidad del estado fresco. Como ejemplos de tecnologías emergentes se pueden citar: alta presión hidrostática, radiación ionizante, pulsos eléctricos, luz ultravioleta, antimicrobianos naturales, ultrasonido, **Biopreservación**.

Esta Tesis Doctoral confía en aportar al conocimiento sobre el potencial biopreservativo de BAL aisladas de frutas y hortalizas de la región para comprender más y mejor sobre la microbiología de estos productos con el fin de ofrecer alternativas de conservación. A continuación, se incluye una breve reseña de los microorganismos patógenos empleados como indicadores durante este trabajo de Tesis, todos ellos de importancia para la industria como contaminantes de vegetales frescos y VMP.

Características generales de microorganismos patógenos asociados al consumo de VMP

Salmonella Typhimurium

Las salmonellas son los microorganismos patógenos más frecuentemente identificados como agentes etiológicos de toxiinfecciones alimentarias. Son muchos los alimentos y serotipos de

salmonellas los implicados en infecciones humanas en países desarrollados, y en países en vías de desarrollo, tal como se ha constatado en las últimas décadas (Koochmaraie y col., 2011).

Salmonella, pertenece al género de la familia *Enterobacteriaceae* está constituido por bacilos Gram-negativos, aerobios facultativos, generalmente móviles, debido a la presencia de flagelos peritricos. Las salmonellas pueden adaptarse a condiciones adversas, pueden utilizar una amplia variedad de sustratos orgánicos con capacidad para metabolizar nutrientes por vía respiratoria o por fermentación. Las bacterias crecen óptimamente a 37 °C y algunas cepas pueden crecer a elevadas temperaturas (hasta 54 °C) mientras que otras muestran propiedades psicrófilas, llegando a crecer en alimentos conservados entre 2 y 4 °C, o mantenerse viables durante largos periodos de tiempo en alimentos almacenados y congelados. Son microorganismos resistentes a la deshidratación por lo que se mantienen viables en productos de baja actividad de agua. Además, su resistencia térmica aumenta a medida que disminuye la actividad de agua (a_w), por lo que no debe extrañar su presencia en leche en polvo. Recientemente también se ha demostrado que *Salmonella* spp. pueden adherirse y formar biofilms en superficies que se encuentran en las plantas de procesamiento de alimentos (entre las que se incluyen plástico, cemento y acero); esta capacidad se debe a que posee estructuras de superficie, como la SEF 17 fimbriae, que facilitan la adhesión a las superficies inanimadas, proporcionando a las células cierta capacidad de resistencia frente a fuerzas mecánicas (Montville y Matthews, 2008). Esta respuesta adaptativa puede provocar un incremento de la resistencia de los microorganismos ante factores inactivantes como tratamientos térmicos, con conservantes, acidificación, etc. (Montville y Matthews, 2008).

Según el esquema de clasificación *Salmonella* se dividen en dos especies *S. bongori* y *S. enterica* (con seis subespecies *arizonae*, *diarizonae*, *enterica*, *hutenae*, *indica* y *salamae*) (LPSN bacterio.net). La mayoría aisladas del hombre y de animales pertenecen a *S. enterica* subespecie *enterica*. Entre ellas cabe destacar las serovariedades *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis, por ser las más comúnmente asociadas con brotes de toxoinfección alimentaria (Álvarez Ojeda y col, 2009). Un estudio reciente reveló que 1/143 frutillas importadas en EU estuvo

contaminada con *Salmonella* (Food and Drug Administration, 2001). Más recientemente, frutillas han sido asociadas con brote de toxiinfección causado por *S. Typhimurium* (Food and Drug Administration, 2011).

Causan una amplia variedad de enfermedades entéricas humanas, desde leves síntomas de corta duración (náuseas y calambres abdominales) a severas gastroenteritis con o sin bacteriemia como fiebre tifoidea, una enfermedad potencialmente mortal. La salmonellosis transmitida por alimentos contaminados se caracteriza por un período de incubación de 8 - 72 h y un período corto de duración de la enfermedad (4 - 7 días) siendo este tipo de intoxicación alimentaria raramente fatal (menos del 1%).

Escherichia coli

Representa la especie tipo del género *Escherichia* perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* cuyos integrantes se caracterizan por ser bacilos rectos Gram (-), móviles por flagelos peritricos, no esporulados, aerobios facultativos, catalasa (+) y oxidasa (-). No son exigentes desde el punto de vista nutricional, fermentan azúcares con producción de gas y una mezcla de ácidos orgánicos. En condiciones aeróbicas suplen sus requerimientos energéticos a partir de la degradación de los carbohidratos a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Se encuentra como flora intestinal normal del hombre y animales por lo que se la considera como indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos. Es una bacteria utilizada frecuentemente en experimentos de genética y biología molecular. Desde su identificación como patógeno humano *E. coli* fue considerado como el microorganismo más importante responsable de severas enfermedades como el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), asociado al consumo de alimentos (Rivero y col., 2004), incluidos frutas y hortalizas crudas y procesados (Sagdic y col., 2013). En nuestro país, la infección por *E. coli* enterohemorrágica asociada al consumo de alimentos contaminados se considera como la principal etiología de SUH (Rivero y col., 2004).

Listeria monocytogenes

L. monocytogenes es la especie característica del género *Listeria*, perteneciente a la familia *Listeriaceae*. Son pequeños bacilos Gram-positivos de extremos redondeados de 0,4-0,5 μm de diámetro y 0,5-2 μm de longitud. Sin embargo, a medida que el cultivo envejece la reacción de Gram se torna irregular. Las células pueden encontrarse aisladas, en pares o formando cadenas cortas, raras veces forman largos filamentos. Esta bacteria es aerobia facultativa, catalasa (+), no presenta cápsula ni forma endosporas. Crece mejor en presencia de baja tensión de oxígeno, elevada concentración de dióxido de carbono y medios enriquecidos. Fermenta glucosa y ramnosa con producción de ácidos pero no de gas, hidrolizan esculina y es débilmente β -hemolíticas. Gracias a la presencia de flagelos peritricos son móviles a 20 - 25 °C aunque no a 37 °C. En términos generales pueden crecer en un amplio intervalo de temperaturas, entre 1 y 43 °C, si bien su temperatura óptima de crecimiento está comprendida entre 30 y 37 °C. Son psicrotrofos y toleran condiciones de acidez y de alcalinidad, siendo capaces de crecer entre pH 5,5 y pH 9,6 aunque crece óptimamente a pHs neutro o ligeramente alcalino.

Las especies del género *Listeria* se encuentran en nichos muy dispares; son bastantes ubicuas. Además, son bastante resistentes a condiciones disgenésicas y pueden desarrollarse en sustratos muy diversos y en amplios rangos de condiciones ambientales. Se han aislado tanto del suelo como de aguas residuales, de vegetales en descomposición, de heces animales, de salas de mataderos, así como de alimentos frescos, ahumados y congelados. Las cepas del género *Listeria* presentan una gran capacidad para adherirse a superficies vivas e inertes y, requieren solo un corto espacio de tiempo para la unión e iniciar la adhesión (Keskinen y col., 2008). Por lo tanto, considerando todas estas características, no es de extrañar que se detecten en muchos alimentos y que puedan acceder a ellos en cualquier etapa de la producción.

De las 10 especies incluidas dentro del género, *L. monocytogenes* es un patógeno bien reconocido. Es el agente causal de Listeriosis en el ser humano, que se caracteriza por tener una baja morbilidad y alta tasa de mortalidad (20 – 30%) (Ramaswamy y col., 2007). La infección por

Listeria puede causar síntomas leves, como fiebre, gastroenteritis, náuseas, vómitos y diarrea, o severos, como meningitis, encefalitis o septicemia en niños, ancianos o personas inmunodeprimidas (Ramaswamy y col., 2007). Choi y col. (1994) han demostrado que *L. monocytogenes* puede producir infecciones en el hombre por contaminación en forma indirecta o directa a través del consumo de leche de animales infectados, o alimentos contaminados como vegetales y frutas y productos lácteos.

Enterococcus faecalis

Los organismos del género *Enterococcus* son cocos Gram-positivos, no esporulados, aerobios facultativos que se presentan individualmente, en pares o en cadenas. Hasta la fecha se admiten 50 especies (LPSN bacterio.net), siendo las más relevantes en el ámbito alimentario *E. faecalis* y *E. faecium*. Estos y otros representantes del género *Enterococcus* se encuentran ampliamente distribuidos por doquier, aunque uno de sus principales nichos, como es de suponer considerando su nombre, es el tracto gastrointestinal de animales y humanos. Las especies detectadas con más frecuencia en heces son *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. durans*, siendo más frecuentes en heces animales de abasto que en las humanas. De todas las especies de enterococcus asociadas a los humanos, *E. faecalis* es la predominante (Foulquié y col., 2006). De todas maneras, este microorganismo debe considerarse ubicuo ya que no solo se aísla de animales de sangre caliente sino también del suelo, de aguas superficiales, plantas, verduras e insectos. Estos microorganismos se caracterizan por ser muy resistentes a ambientes disgenésicos incluyendo pHs alcalinos y elevadas concentraciones de cloruro de sodio. Además muchas cepas crecen en un amplio intervalo de temperaturas, desde temperaturas de refrigeración hasta los 45°C e incluso más, aunque el crecimiento óptimo suele cifrarse en torno a los 37°C. Su resistencia y su adaptabilidad a diversos sustratos y factores que condicionan el crecimiento implica que puedan encontrarse en muchos alimentos, sobre todo en los elaborados a partir de una materia prima que no se trate térmicamente, como la carne para fabricar embutidos crudos o la leche cruda para ciertos quesos, aunque también se detectan asiduamente en aquellos que se han higienizado, ya sea por su inherente

resistencia a los tratamientos conservantes, ya sea como consecuencia de una contaminación post-tratamiento, pero, en estos casos, su concentración suele ser escasa. Por todo esto se les ha considerado unos buenos indicadores para valorar las condiciones higiénicas y de conservación de los alimentos y su posible contaminación a partir de aguas fecales o heces (Foulquié y col., 2006). Sin embargo, la presencia de *E. faecalis* y otros enterococcus en muchos alimentos no siempre se relaciona con una contaminación fecal, dejando en entredicho su papel indicado. Sin embargo, algunas cepas de *E. faecalis* y otros enterococos son patógenas oportunista sobre todo en ambientes hospitalarios, pudiendo causar infecciones del tracto urinario, en algunos casos endocarditis, incluyendo cuadros esporádicos de infecciones en el sistema nervioso. Este carácter peligroso de los enterococos se ve acrecentado por el hecho de su demostrada resistencia a muchos antibióticos, lo que hace que estos microorganismos se encuentran entre los más frecuentes causantes de enfermedades nosocomiales junto a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Aguirre y col, 2011).

Conservación de alimentos

Generalidades

La calidad de los alimentos se encuentra afectada por factores físicos, químicos, bioquímicas, microbiológicos, cuyo control y en especial el microbiológico es esencial para la preservación de los alimentos. Esto es debido a que la principal causa de deterioro de los alimentos es el ataque por diferentes tipos de microorganismos (bacterias, levaduras, mohos y virus), cuyo problema tiene implicaciones económicas evidentes, tanto para los fabricantes (deterioro de materias primas y productos elaborados antes de su comercialización, pérdida de la imagen de marca, etc.) como para distribuidores y consumidores (deterioro de productos después de su adquisición y antes de su consumo) (Matamoros, 2009).

La aplicación de factores de estrés microbiológico es de gran utilidad para lograr la inhibición y/o muerte microbiana.

Métodos de conservación

Desde el establecimiento de las primeras comunidades prehistóricas los humanos han aprovechado, inconscientemente en un principio, las actividades que desarrollaban los distintos microorganismos sobre los alimentos. Ha sido desde el siglo XX cuando se tomó conciencia de su importancia, tanto en el área del desarrollo como de conservación. Empíricamente, algunos de estos alimentos comenzaron a “conservarse” merced a la actividad de microorganismos inocuos que excluían a los causantes de alteraciones y de procesos patológicos. El proceso que “descubrieron” se conoce hoy como fermentación y los ejemplos más conocidos son, sin duda, la producción de alcohol por acción de las levaduras a partir de carbohidratos y la de ácido a partir de los mismos sustratos por la actividad de las bacterias ácido lácticas (BAL). Así, la conservación biotecnológica de los alimentos se ha originado a partir de la comprensión científica del proceso de fermentación, una de las técnicas más antiguas de conservación (Holzapfel y col., 1995).

La conservación de alimentos, en su contexto más amplio puede definirse como la aplicación de tecnologías encargadas de prolongar la vida útil y disponibilidad de los alimentos para el consumo humano y animal, protegiéndoles de microorganismos patógenos y otros agentes responsables de su deterioro. El objetivo es mantener, e incluso mejorar, sus características nutritivas, sensoriales e higiénicas, es decir, prevenir cualquier transformación que implique un menoscabo de la calidad -nutritiva, higiénica y sensorial del alimento, e intentar mantener su estado original durante su almacenamiento. Aún hoy en día, los métodos de conservación de los alimentos que se han llevado a cabo durante miles de años tales como la salazón, desecación, o en su término más científico, deshidratación, fermentación y el encurtido siguen siendo operaciones que controlan las poblaciones microbianas en los alimentos.

Existe una amplia variedad de métodos para aumentar la vida útil y seguridad de un alimento. Sin embargo, el mejor método es la prevención de la contaminación; aunque, esto no siempre es posible y el uso de técnicas que reduzcan y/o eliminen patógenos y microorganismos alterantes es de suma importancia (Corbo y col., 2006).

Los procedimientos básicos usados en el control microbiano de alimentos incluyen:

- Destrucción de todos los microorganismos no deseables mediante métodos físicos o químicos e implementación de barreras físicas que impidan la re-contaminación.
- Mantenimiento del alimento bajo condiciones ambientales que excluyan o minimicen las actividades microbianas.
- Modificación del alimento o material mediante procesado o adición de compuestos, que reduzcan su disponibilidad como sustrato para el desarrollo microbiano.

Los **métodos físicos** de conservación ajustan temperatura ambiental, humedad, presión o composición de gas. Dentro de los métodos físicos de uso común en la industria alimentaria podemos mencionar.

- Tratamientos térmicos
- Almacenamiento en frío y congelación
- Procesos de deshidratación
- Irradiación con UV o ionizante (rayos gamma, x, y haz de electrones) (Allende y col., 2006b; Rico y col., 2007).
- Retirada mecánica de microorganismos mediante filtración de líquidos.
- Alta presión hidrostática, campo eléctrico pulsado (Palgan y col., 2011), campo magnético oscilante, efectos fotodinámicos, embalaje en atmósfera modificada y ultrasonido (Rico y col., 2007; Oey y col., 2008) y combinaciones de procesos físicos.

A continuación se detallan los métodos físicos de interés para el desarrollo del presente trabajo de investigación y las operaciones de conservación más frecuentes en la industria:

Tratamientos térmicos

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que afectan al crecimiento y supervivencia microbiana. Para cada microorganismo existe una temperatura mínima y máxima por debajo o encima de las cuales no existe crecimiento, respectivamente y una óptima donde el crecimiento ocurre a la máxima velocidad posible (Figura 8).

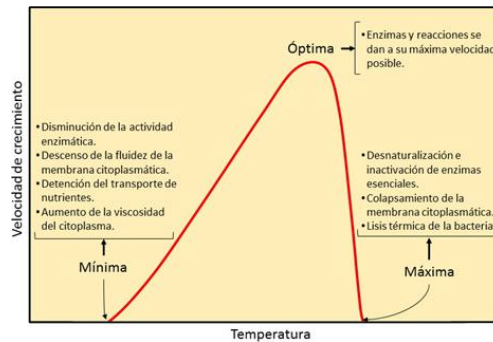


Figura 8. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de los microorganismos. Fuente: Biología de los Microorganismos (Brock, 13 edición)

En la industria alimentaria es una práctica común el empleo de tratamientos térmicos para destruir los microorganismos existentes e inactivar las enzimas. Cualquiera de ellos va a menoscabar el valor nutritivo de los alimentos. Obviamente, cuando menos intenso sea el tratamiento, mejor será la calidad sensorial del alimento. Se utilizan dos parámetros de interés, uno de ellos es el **tiempo de reducción decimal (D)** que se define como el tiempo en minutos requerido para destruir el 90% de la población a una cierta temperatura; el otro es el **tiempo de muerte térmica**, que es el tiempo necesario para matar a un número dado de organismos a una determinada temperatura e indican la resistencia térmica de un microorganismo.

Uno de los tratamientos térmicos más empleados es la **pasteurización**, que inactiva las enzimas y destruye células vegetativas, es decir bacterias patógenas no esporuladas y microorganismos alterantes. Otro proceso térmico que se utilizan en la industria es el calentamiento óhmico que consiste en aplicar alta temperatura durante corto tiempo (HTST), con el fin de pasteurizar o esterilizar el alimento a más baja temperatura. Al ser tan rápido, presenta la ventaja de que el efecto perjudicial, causado por el calentamiento en los alimentos, es mínimo ya que los nutrientes no son destruidos ni alteradas sus cualidades organolépticas. Combinada con el envasado aséptico proporciona un elevado efecto conservante.

Almacenamiento en Frío

El almacenamiento en **frío** consiste en mantener los alimentos a temperaturas bajas, pero por encima del punto de congelación (-2°C a 16°C). El tiempo de almacenamiento en estas condiciones puede variar desde pocos días hasta semanas, dependiendo de las características del alimento a conservar. La conservación en frío se basa en que al reducir la temperatura, disminuyen las velocidades de reacciones químicas, actividad enzimática y fluidez de los lípidos de la membrana citoplasmática. La refrigeración frena el crecimiento microbiano, sólo permite el desarrollo de microorganismos psicrófilos y psicrótrofos, generalmente bacterias, y si la población inicial de éstos es alta, los alimentos refrigerados pueden alterarse rápidamente. La **congelación** consiste en bajar la temperatura de un alimento hasta -18°C y mantenerlo almacenado a esta o a más baja temperatura. Es una metodología muy eficaz pues conserva sin alterar las cualidades del alimento, pero muy costosa desde el punto de vista energético. Sin embargo, puede afectar negativamente al alimento sobre todo si no se hace en óptimas condiciones, ya que su textura puede perder jugosidad u otras propiedades. Como consecuencia de la congelación disminuye la temperatura y la actividad de agua por lo que sólo pueden crecer microorganismos psicrófilos y xerotolerantes, generalmente hongos. La congelación causa múltiples daños en las estructuras, enzimas y ácidos nucleídos de los microorganismos que pueden llevar a su inactivación. Si bien los alimentos congelados son considerados seguros, pueden preservar la viabilidad de microorganismos patógenos, que durante la descongelación pueden proliferar a expensas de nutrientes liberados de las células dañadas en el ciclo congelación/descongelación. Por ello la re-congelación de los alimentos descongelados puede ser una práctica peligrosa.

La conservación basada en **métodos químicos** usualmente implica la aplicación de conservantes químicos, comúnmente conocidos como **agentes antimicrobianos**. Según el CAA los **conservantes químicos** son “sustancias que impiden o retardan la alteración de los alimentos provocada por microorganismos o enzimas”. La FDA los define como “cualquier sustancia que, cuando se añade a los alimentos, tiende a prevenir o retrasar el deterioro de los mismos, sin incluir

la sal común, azúcares, vinagre, especias o aceites extraídos de especias, sustancias añadidas a los alimentos por exposición directa al humo de leña, o productos químicos aplicados por sus propiedades insecticidas o herbicidas”.

Los **antimicrobianos o conservadores** pueden tener al menos tres tipos de acción sobre el microorganismo:

- Daños a la integridad de las membranas (externa y citoplasmática)
- Interferencia con la gran variedad de procesos metabólicos esenciales (por ejemplo, metabolismo energético)
- Inhibición de la acción enzimática, biosíntesis de ácidos nucleicos o de la pared celular

Consecuentemente algunos agentes antimicrobianos pueden afectar a muchos tipos de microorganismos, mientras que otros muestran un espectro de acción más reducido. Del mismo modo algunos antimicrobianos pueden ser directamente microbicidas, mientras que otros actúan como microbiostáticos. Los antimicrobianos pueden clasificarse en tradicionales y naturales. Sin embargo, es preciso destacar que en cualquier caso deben utilizarse en consonancia con las buenas prácticas de higiene. Deben vigilarse y controlarse los niveles empleados para garantizar que se mantienen en concentraciones eficaces y que los residuos químicos no excedan de los límites recomendados por la Comisión del Codex Alimentarius.

Agentes antimicrobianos tradicionales

Un conservante es clasificado como tradicional cuando se ubica dentro de cualquiera de las siguientes categorías: ha sido usado durante muchos años, ha sido aprobado como antimicrobiano alimentario en muchos países, es producido de forma sintética o es inorgánico. Sin embargo, muchos de los conservantes tradicionales de síntesis, se encuentran en la naturaleza, como el ácido benzoico en arándanos, el ácido cítrico en tomates o ácido sórbico en muchas frutas. Entre los antimicrobianos tradicionales, se encuentran:

- **Ácidos orgánicos y sus esteres**, como benzoato de sodio, los sorbatos, ácidos orgánicos como acético, láctico, benzoico, propiónico, sórbico, sulfitos y nitritos. Los

ácidos orgánicos son comúnmente usados como agentes antimicrobianos, acidulantes y antioxidantes en vegetales frescos y MP (Ruiz-Cruz y col., 2007). Tiene un efecto significativo sobre la membrana citoplasmática de las bacterias, interfiriendo con el transporte y mantenimiento del potencial de membrana. A la mayoría de ellos se los reconoce como seguros y su utilización está regulada por autoridades competentes.

- **Compuestos de cloro**, son poderosos germicidas de amplio espectro de actividad. El efecto bactericida se fundamenta en la capacidad oxidante del cloro en la forma de Cl^{\cdot} . Actualmente el cloro es usado como agente de lavado y desinfección de vegetales frescos. Sin embargo, numerosos estudios indican que tiene una eficacia antimicrobiana limitada. Además, ha sido asociado a la producción de sustancias potencialmente tóxicas como sus derivados carcinogénicos (Abadias y col., 2008; Iglesias y col., 2018). Hipoclorito se usa frecuentemente en concentraciones que varían desde 50 a 200 ppm y con tiempos de contacto menores a 5 min (Rico y col., 2007). También, se emplea dióxido de cloro, para sanear frutas y verduras crudas (hasta 3 ppm) cuya capacidad oxidante es 2.5 veces mayor que el cloro (Keskinen y col., 2009). El hipoclorito de sodio acidificado mostró un efecto antimicrobiano sustancial contra *E. coli* O157: H7 y *Salmonella* sp. cuando se inoculó en melones de miel y espárragos. Sin embargo, el número de estudios todavía es limitado (Artéz y col., 2009).

- **Cloruro sódico** es la sustancia más utilizada entre los aditivos alimentarios tradicionales, inhibe el crecimiento microbiano por su efecto plasmolítico. Además, el NaCl ejerce efectos tales como limitación de solubilidad del oxígeno, intoxicación por iones sodio y cloruros y pérdidas de iones de magnesio.

- **Iodo, bromo y fosfato trisódico** poseen buena actividad antimicrobiana y amplio espectro de acción (Parish y col., 2003).

- **Compuestos de amonio cuaternario (QAC)**, son agentes tensioactivos catiónicos que pueden penetrar las superficies de los alimentos más fácilmente que otros desinfectantes.

Su actividad antimicrobiana es mayor contra hongos y bacterias Gram positivas (Favrin y col., 2002).

- **Peróxido de hidrógeno** (H_2O_2): posee actividad bacteriostática y bactericida debido a su fuerte poder oxidante y también a la generación de agentes citotóxicos (radical hidroxilo).
- **Soluciones a base de calcio:** por ejemplo, cloruro de calcio, son ampliamente utilizadas en frutas y productos delicados con alto índice de senescencia, ya que mantiene la firmeza del producto.
- **Ozono:** es un agente antimicrobiano fuerte con alta reactividad y penetrabilidad. Por ejemplo, se aplica comúnmente para propósitos de saneamiento de vegetales frescos cortados logrando reducciones microbianas y aumento de la vida útil del producto (Alexandre y col., 2011, 2012; Ramos y col., 2013).

Agentes antimicrobianos naturales

Estudios relacionados al uso de nuevas sustancias naturales con capacidad antimicrobiana han incrementado significativamente en los últimos años. Muchos alimentos contienen compuestos naturales con actividad antimicrobiana. En estado natural, estos compuestos pueden desempeñar el papel de prolongadores de la vida útil de los alimentos. Incluso muchos de ellos han sido estudiados por su potencial como antimicrobianos alimentarios directos. El uso de aditivos alimentarios de origen natural implica el aislamiento, purificación, estabilización e incorporación de dichos compuestos a los alimentos con fines antimicrobianos, sin que ello afecte negativamente a las características sensoriales, nutritivas y a su garantía sanitaria. Estos conservantes incluyen compuestos orgánicos extraídos de distintas fuentes, muchos de los cuales han sido propuestos para ser utilizados en alimentos:

- **Origen animal:** incluye proteínas, enzimas líticas tales como lisozima, hidrolasas tales como lipasas y proteasas y polisacáridos como el quitosán (Beuchat y col., 2002), lactoferrina y lactoperoxidasa.
- **Origen vegetal:** incluye compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas (Beuchat, 2002).
- **Origen microbiano:** incluye compuestos producidos por microorganismos. Por ejemplo, las **bacteriocinas** como nisina, la cual ha sido aprobada por organismos reguladores.

Día a día se está aumentando el uso de antimicrobianos naturales que refuerzan la seguridad en los alimentos y prolongan la vida útil de estos frente a las bacterias, hongos y virus.

Varios métodos físicos o químicos han sido descritos para preservar e incrementar la vida útil de frutas y vegetales. En la actualidad, se busca la combinación de dos o más factores que interactúen aditiva o sinérgicamente controlando a la población microbiana, evitando la aplicación de un solo factor de conservación en forma severa, lo que mejora la calidad sensorial y nutricional del alimento; permitiendo el procesamiento de productos semejantes al producto fresco, más sanos, con menos aditivos y listos para preparar y servir (Alzamora, 2000). En casi todos los países las tecnologías basadas en la utilización conjunta de distintos factores inhibidores para conseguir la estabilidad microbiológica final se denominan “tecnologías barrera o de obstáculos”; (también se conocen como “métodos combinados de conservación”). Se definen como la combinación de barreras o técnicas, insuficientes por separado para proteger el alimento, pero que en conjunto pueden llegar a impedir o retrasar la actuación de los factores de alteración

Entre los métodos más usados para preservar frutas y hortalizas frescas y MP se destacan temperaturas de almacenamiento, lavado con solución clorada, irradiación, empaquetamiento en atmósfera modificada y adición de conservantes (Trias y col., 2008; Randazzo y col., 2009; Rahman y col., 2011). Sin embargo, la mayoría de las técnicas no muestran completa efectividad e incluso

afectan negativamente a la matriz del alimento. Microorganismos protectores podrían ser eficientes para controlar la contaminación microbiana de VMP de manera natural.

Biopreservación

A pesar de las tecnologías existentes puestas al servicio de la conservación de alimentos, el control de enfermedades transmitidas por alimentos sigue siendo un problema de gran importancia para la salud (Oliveira y col., 2015). Más aun, existen microorganismos capaces de superar el tratamiento físico o químico aplicado al alimento, lo que ha provocado que en los últimos años, incrementen nuevamente las investigaciones en el campo de la conservación alimentaria hacia los procesos de fermentación. El control biológico se adapta bien con la tendencia actual de alimentos seguros y naturales y varias bacterias y levaduras se han identificado en este sentido.

Stiles (1996) define **biopreservación** como la extensión de la vida media e inocuidad de los alimentos mediante el empleo de su microbiota natural o autóctona y/o de sus metabolitos antimicrobianos, sin alterar negativamente sus propiedades organolépticas. Este sistema de **control biológico** presenta un número de **ventajas** comparadas con otros métodos de conservación:

- El uso de microorganismos antagonistas es más seguro en comparación con la aplicación de conservantes químicos, ya que no se acumulan en los alimentos. La microbiota nativa compite con los microorganismos patógenos y alterantes por el espacio físico, nutrientes y/o la producción de compuestos antagonistas que afecten su viabilidad (Parish, 2003).
- Pueden ser más persistentes en el tiempo que los tratamientos químicos lo que dificulta que los patógenos desarrollen resistencia a los mismos.
- Tienen efecto insignificante sobre el equilibrio ecológico de manera que no destruyen enemigos naturales de las especies indeseables como lo hacen los tratamientos tradicionales.

- Pueden ser compatibles con otros sistemas de control y por lo tanto pueden aplicarse en forma combinada.

Es muy importante destacar que los microorganismos utilizados como agentes de control biológico deben poseer una alta actividad antagónica, ser seguros para la salud humana y no tener efectos adversos en la calidad sensorial y nutricional del producto.

Las nuevas técnicas de biopreservación incluyen bacteriófagos, bacteriocinas y microorganismos bioprotectores. Los bacteriófagos podrían infectar específica y efectivamente, multiplicándose en sus respectivas células bacterianas huésped (Meireles y col., 2016). Sin embargo, las BAL representan uno de los grupos más importantes en este sentido, realizando un proceso fermentativo.

Fermentación microbiana: Significado y características generales

Las transformaciones más importantes de los alimentos por fermentación tienen como sustrato principal los carbohidratos y son fundamentalmente de tres tipos: - fermentación láctica, - fermentación alcohólica y, - fermentación acética. Cada una de ellas es producida por microorganismos específicos, obteniéndose distintos productos finales. Por ejemplo, en la **fermentación láctica** se produce ácido láctico como producto único o mayoritario y es realizada por las BAL.

Aplicada a los alimentos, la fermentación es una técnica de conservación utilizada desde antiguo, que permite obtener productos con características físicas, químicas y organolépticas distintas de las de la materia prima de la que proceden. Existen referencias que indican que en muchas civilizaciones antiguas se consumían alimentos obtenidos por fermentación como el vino, la cerveza, las leches fermentadas, el pan o los encurtidos. Con el paso del tiempo, cada país ha desarrollado su propia tradición en la preparación y producción de alimentos fermentados y como muestra de ello, cabe destacar que mientras los países orientales prefieren el uso de los mohos para la elaboración de una gran variedad de leches fermentadas, en los occidentales es más frecuente el uso de bacterias y de levaduras

La **fermentación** aporta a los alimentos interesantes beneficios (Giraffa, 2004) así por ejemplo,

- Proporciona estabilidad a los alimentos, por la síntesis de compuestos antimicrobianos que inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes. Esto hace aumentar su vida útil y seguridad (por ejemplo, ácidos orgánicos, etanol).
- Al mismo tiempo, aumenta la seguridad de los alimentos, al reducir la presencia de compuestos tóxicos como las aflatoxinas y/o los compuestos cianogénicos.
- Mejora la calidad sensorial y las características organolépticas en general, al modificar la textura y el aroma de los mismos.
- Incrementa el valor nutritivo, por la síntesis de vitaminas, aminoácidos esenciales y proteínas y por la degradación de factores antinutricionales que realizan los microorganismos.
- Es una fuente de valor añadido a la materia prima, sobre todo de los productos agrícolas, pues permite ampliar el periodo de suministro al mercado, problema importante por la corta estacionalidad de frutas y hortalizas
- Requiere menor consumo energético que otros métodos de conservación de alimentos.

Dos opciones tecnológicas son usualmente consideradas para la fermentación:

- Fermentación espontánea.
- Fermentación dirigida: uso de cultivos iniciadores o "starters"

Actualmente, la mayor parte de las fermentaciones industriales son procesos dirigidos en los que se añaden de forma deliberada cultivos de microorganismos específicos llamados **cultivos iniciadores o "starters"**. Estos podrían ser definidos como "preparaciones microbianas que contienen un elevado número de células de al menos un microorganismo y que se añaden para acelerar y conducir la fermentación de un alimento" (Leroy y De Vuyst, 2004). Las ventajas de su uso no se limitan a la reducción del tiempo de fermentación, sino que además disminuyen la probabilidad de que se produzcan alteraciones y permiten la obtención de productos de mejor

calidad organoléptica, más estables y homogéneos. Por todo ello, actualmente la industria alimentaria relacionada con la producción a gran escala de productos fermentados, utiliza casi exclusivamente cultivos iniciadores que contienen cepas definidas, que han reemplazado a las viejas prácticas de fermentación basadas en el “pie de cuba” o en el empleo de iniciadores con una mezcla de cepas “desconocidas” (Leroy y De Vuyst, 2004).

Algunas de las características deseables en los cultivos iniciadores que vayan a ser utilizados en la fermentación de productos vegetales son básicamente las siguientes:

- Capacidad acidificante. Una rápida producción de ácidos hará descender el pH, lo que inhibirá el crecimiento de microorganismos indeseables en la etapa inicial de la fermentación
- Osmotolerancia (tolerancia a la sal), variando en este caso las exigencias en función del producto a elaborar.
- Temperatura de crecimiento óptima, próxima a la del ambiente del lugar de fabricación, lo que permitirá una adecuada velocidad del proceso. Siempre será deseable que las cepas seleccionadas tengan además una tasa de crecimiento lo más alta posible a temperaturas por debajo de su óptimo, ya que muchos de estos procesos se llevan a cabo a temperatura ambiente y en ocasiones ésta es baja.
- Baja producción de dióxido de carbono.
- Facilidad de sedimentación o floculación, variando en función del producto a elaborar
- Resistencia a los bacteriófagos y a inhibidores, tanto procedentes del fruto como de otros microorganismos.
- Mínimos requerimientos nutritivos.
- Capacidad para producir metabolitos inhibidores del crecimiento de otros microorganismos (peróxido de hidrógeno y/o bacteriocinas, entre otros) lo que favorecerá su implantación en el proceso y el control microbiano.

INTRODUCCIÓN

- Los productos obtenidos deben tener características organolépticas aceptables y propias.
- Potencial para incrementar el valor nutritivo del vegetal.
- Preferiblemente, podrán ser conservados por congelación o liofilización, sin que se vean afectadas sus propiedades ni se ocasionen pérdidas en su actividad, lo que hará posible su producción a nivel industrial.

En este sentido, Leroy y col. (2015) propusieron una serie de estrategias para la selección de cultivos iniciadores, que se resumen en la Figura 9.

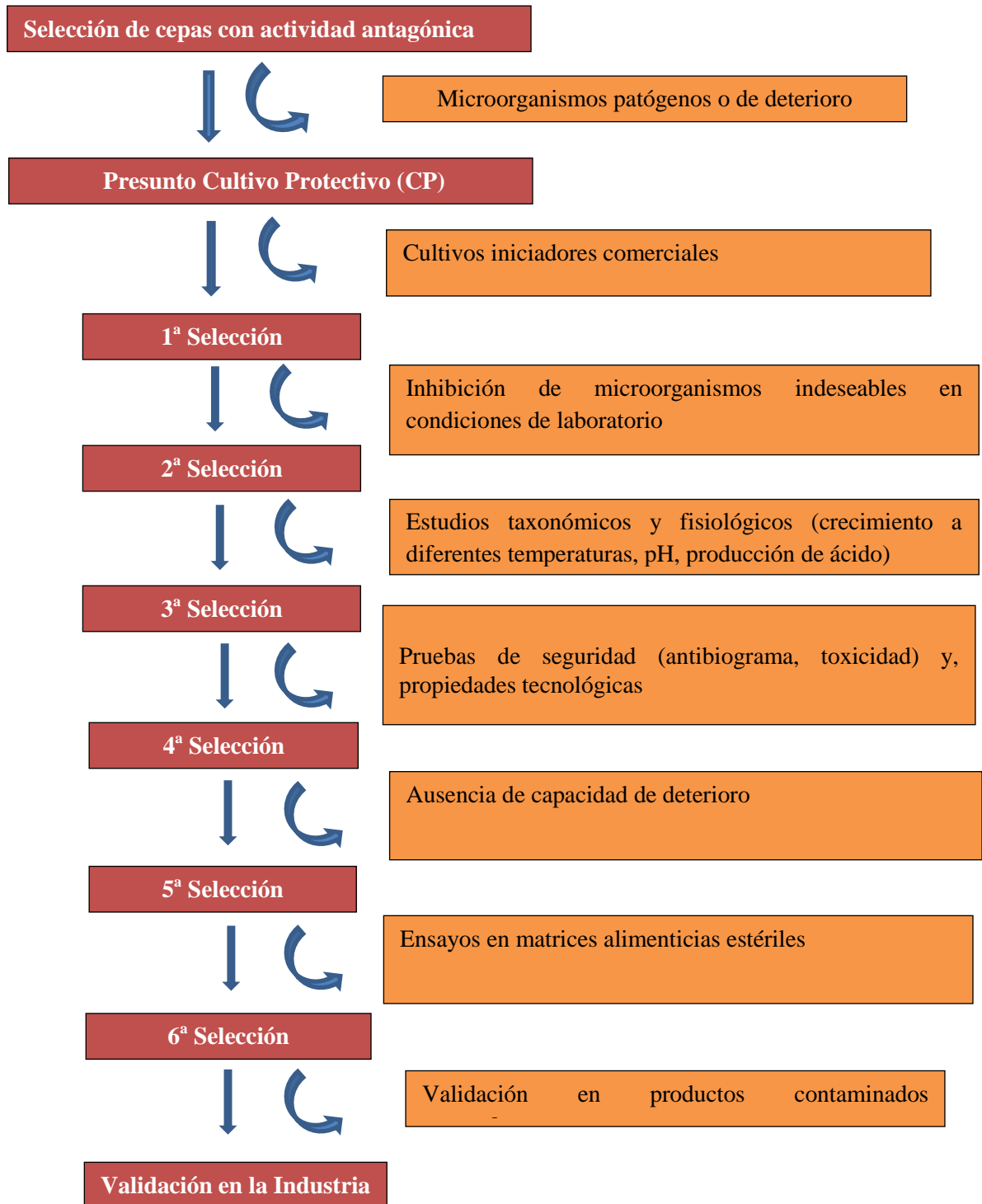


Figura 9. Estrategia para la selección de un cultivo iniciador para mejorar la calidad y seguridad microbiológica de alimentos. Adaptado de Leroy y col. (2015)

Bacterias lácticas

Características generales

Las BAL constituyen un grupo extenso y heterogéneo de microorganismos filogenéticamente relacionados, notablemente versátiles, y, ampliamente distribuidos en la naturaleza cuya característica principal es la producir ácido láctico como metabolito final mayoritario (al menos un 50%) de la fermentación de carbohidratos. Se caracterizan por ser bacterias Gram-positivas, inmóviles, no esporuladas, anaerobios aerotolerantes de morfología celular cocoide o bacilar de longitud variable, dispuestos en forma individual, de a pares, en tétradas o cadenas. Su característica principal es la de ser estrictamente fermentativas y producir como compuesto final de dicha fermentación ácido láctico, como producto único o mayoritario. Carecen de la enzima catalasa debido a su incapacidad para sintetizar compuestos porfirínicos, aunque en ciertas especies se encontró una pseudo-catalasa cuando crecen en condiciones de aerobiosis (Axelsson, 2004) y, de citocromo oxidasa. Poseen peroxidasa y superóxido dismutasa que destruyen el H_2O_2 y el ión superóxido (O_2^-) respectivamente. Forman colonias color blanco lechoso debido a la ausencia de citocromos. No poseen cadena transportadora de electrones responsable de la respiración (Axelsson, 2004).

Poseen además una gran especificidad fisiológica y sus requerimientos nutricionales son complejos (Saguir y Manca de Nadra, 2002: 2007), motivo por el que las BAL se encuentran en la naturaleza asociadas a habitats ricos en nutrientes, como son algunos alimentos, leche, carnes y vegetales, la boca, el intestino, la vagina, etc. en los que son consideradas “inquilinos” habituales (Liu y col., 2014). Generalmente utilizan glúcidos y compuestos fermentables relacionados como fuente de energía, por lo que su desarrollo está restringido a ambientes ricos en azúcares (Madigan y col., 2004). Por este motivo su cultivo en el laboratorio requiere de medios muy ricos que contengan diversos factores de crecimiento, como vitaminas del grupo B, aminoácidos preformados, péptidos y bases púricas y pirimidínicas, que resultarán por ello poco selectivos, como

el MRS o el agar sangre. Toleran bien concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajos que otras bacterias.

Clasificación taxonómica

Las BAL pertenecen al filum *Firmicutes*, clase *Bacilares* y orden *Lactobacillales*, el cual incluye seis familias (*Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae*), a la fecha se han descrito 43 géneros de BAL. De todos los géneros, el género *Lactobacillus* es el más diverso con 224 especies descritas (www.bacterio.net, noviembre 2015).

Su clasificación taxonómica tradicional en los diferentes géneros, estuvo basada principalmente en los caracteres fenotípicos tales como morfología celular, tipo de metabolismo fermentativo de la glucosa, configuración del ácido láctico producido, habilidad para desarrollar a diferentes temperaturas y concentraciones de sales, tolerancia a ácidos y álcalis. En los últimos años, el desarrollo y la aplicación de técnicas bioquímicas y moleculares sofisticadas (Dicks y col., 1993), como la determinación de la composición de bases guanina-citosina del ADN (mol% G+C), la hibridación de los ácidos nucleicos (ADN:ADN y ADN:ARN) y/o su secuenciación (Dicks y col., 1993), han originado importantes cambios.

Por ejemplo, el género *Bifidobacterium* aunque tradicionalmente estuvo incluido en este grupo por producir ácido láctico a partir de la glucosa, está filogenéticamente más próximo al grupo de los actinomicetos, por lo que ha sido excluido del grupo de las BAL (Axelsson, 1998).

Así pues, considerando como características definitorias de las BAL: la respuesta positiva a la tinción Gram, la incapacidad de esporular, el carácter microaerófilo, la ausencia de citocromos, la de ser catalasas *sensu stricto* negativas, la capacidad para producir ácido láctico como metabolito final mayoritario de la fermentación de los hidratos de carbono, el poseer un contenido G+C inferior al 55 mol% y la de tener una estrecha relación con los alimentos, se establece que el grupo de las BAL está constituido por los géneros: *Lactobacillus* (L.), *Carnobacterium* (C.), *Streptococcus* (S.), *Lactococcus* (Lc.), *Vagococcus* (V.), *Enterococcus* (E.), *Leuconostoc* (Ln.), *Oenococcus* (O.),

Pediococcus (P.), *Weissella* (W.) y *Tetragenococcus* (T.). La Tabla 2 muestra las principales características fenotípicas de estos géneros.

Tabla 2. Características fenotípicas de las BAL. (Fuente: Axxelson, 1998)

Característica.	Bacilos					Cocos				
	<i>Carnob.</i>	<i>Lactob.</i>	<i>Aeroc.</i>	<i>Enteroc.</i>	<i>Lacctoc. Vagoc</i>	<i>Leucnos. Oenoc.</i>	<i>Pedioc.</i>	<i>Streptoc</i>	<i>Tetragenoc.</i>	<i>Weissella</i> ^b
Formación de tétradas	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO ₂ a partir de glucosa ^c	- ^e	±	-	-	-	+	-	-	-	+
Crecimiento a 10 °C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Crecimiento a 45 °C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
Crecimiento con 6,5% NaCl	ND ^f	+	+	+	-	±	±	-	+	±
Crecimiento con 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Crecimiento a pH 4,4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
Crecimiento a pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Ácido láctico ^d	L	D,L,DL ^g	L	L	L	D	L,DL ^g	L	L	D,DL ^g

^a: +, positivo; -, negativo; ± respuesta variable según especies; ND, no determinada.

^b: *Weissella* también puede tener forma bacilar.

^c: Homo o heterofermentación de la glucosa: negativo y positivo indican homofermentación y heterofermentación, respectivamente.

^d: Configuración del ácido láctico producido a partir de la glucosa.

^e: Pequeñas cantidades de CO₂ pueden ser producidas, dependiendo del medio. ^f: Crecimiento negativo en 8% de NaCl. ^g: Producción de ácido D-,L- o DL-láctico varía entre especies.

Considerando que los microorganismos estudiados en este trabajo de Tesis Doctoral pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* a continuación, se detallan sus características principales.

Género Lactobacillus

Entre los géneros de BAL, *Lactobacillus* es el género más diverso y heterogéneo, comprende más de 200 especies y se caracteriza por presentar una gran diversidad filogenética y metabólica que excede el de una familia bacteriana típica. Análisis filogenéticos recientes basados en los genomas bacterianos revelaron que los lactobacilos se pueden subdividir en al menos 24 grupo filogenético (Duar y col., 2017). Su morfología es variable y pueden observarse desde bastones largos, rectos o ligeramente curvados, hasta cocobacilos (Figura 11). Desde el punto de vista metabólico pueden dividirse en tres grupos principales en base a sus características de fermentación:

- **Homofermentativos:** incluye las especies *L. delbrueckii*, *L. acidophilus* y *L. helveticus*.
- **Heterofermentativos facultativos:** incluye *L. casei*, *L. rhamnosus* y *L. plantarum*
- **Heterofermentativos estrictos:** incluye *L. brevis*, *L. fermentum* y *L. reuteri*.

Desarrollan adecuadamente en medios ligeramente ácidos con valores de pH inicial entre 6,5-5,5. Por lo general, el crecimiento se detiene cuando el medio alcanza valores de pH entre 3,5-4,0, dependiendo de la especie y cepa. La especie *L. plantarum* se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal humano, como consecuencia de su elevada capacidad de supervivencia a las condiciones adversas y habilidad para colonizar el intestino. Esta especie es considerada un microorganismo de grado alimentario, debido a su extenso historial documentado en relación a su empleo seguro en alimentos fermentados (de Vries y col., 2006). En la industria alimentaria, está involucrada en procesos fermentativos de interés, sin embargo en algunos casos se considera agente de deterioro.

L. plantarum se utiliza como cultivo iniciador en la fermentación de vegetales y, conservas como las aceitunas. En este último caso presenta capacidad de hidrolizar la oleuropeína de las

aceitunas en salmueras, eliminando su sabor amargo y la especie *L. brevis* participa en la elaboración del pan fermentado, chucrut, kimchi, y cerveza.

Género Leuconostoc

Los miembros de este género se caracterizan por su morfología en forma de cocos dispuestos de a pares o en cadenas. Se encuentran generalmente en vegetales frescos y desde allí se diseminan hacia diversos nichos ecológicos, incluyendo leche cruda y productos alimenticios refrigerados. Usualmente no se consideran parte de la microflora normal humana, aunque algunas cepas han sido aisladas de heces, muestras vaginales y leche materna (Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004). Actualmente el género *Leuconostoc* comprende la especie *Ln. mesenteroides* (con tres subespecies, *mesenteroides*, *dextranicum* y *cremoris*) y otras 13 especies. Estas especies se caracterizan por fermentar la glucosa por la vía heterofermentativa estricta, produciendo ácido láctico, dióxido de carbono y etanol (y/o ácido acético). Producen exclusivamente el isómero D (-) del ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares. No poseen la enzima arginina dehidrolasa, y pueden producir dextrano a partir de sacarosa por medio de una dextransacarasa (criterios de identificación de especie). Presentan menor tolerancia a las condiciones ácidas que los lactobacilos (Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004). Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra alrededor de 30 °C con una temperatura mínima de 5 °C, salvo raras excepciones que pueden desarrollar aún a 1 °C y juegan un rol importante en diversas industrias y producción de alimentos fermentados tales como salchichas, derivados fermentados de verduras y cereales y productos lácteos. Aunque, también se lo vincula con aspectos negativos como el deterioro producido en la industria de la caña de azúcar y alimentos por formación de gas y aumento de la viscosidad.

Metabolismo

Las BAL tienen un metabolismo complejo y diverso lo que les permite adaptarse a situaciones cambiantes, aunque las condiciones de cultivo impuestas cuando se trabaja con ellas en el laboratorio limitan sin duda sus posibilidades (Axelsson, 1998). Como se ha indicado anteriormente, la característica esencial su metabolismo es la producción de ácido láctico como

principal metabolito de la fermentación de los carbohidratos, si bien dependiendo del sustrato disponible producirán además otros compuestos.

El estudio del metabolismo de las bacterias abarca dos grandes grupos, el de los azúcares y compuestos relacionados, donde se incluyen los ácidos orgánicos y el de los compuestos nitrogenados.

Metabolismo de azúcares y ácidos orgánicos

Las BAL pueden diferenciarse en dos grupos principales en base a la vía utilizada para la fermentación de los azúcares y compuestos relacionados, homofermentativos o heterofermentativos (Madigan y col., 2004). Las bacterias **homofermentativas** convierten los azúcares por la vía Embden-Meyerhoff-Parnas o vía glicolítica casi exclusivamente hacia la formación de ácido láctico (Figura 7 A) siendo incapaces de fermentar pentosas y gluconato. Las bacterias **heterofermentativas** utilizan la vía del 6-fosfogluconato/fosfocetolasa (6-PG/PK) o también denominada vía de la pentosa fosfato, produciendo además de ácido láctico, dióxido de carbono y etanol (y/o ácido acético) como productos finales (Figura 10).

La diferencia entre ambas vías reside en la enzima clave aldolasa, la cual está ausente en las bacterias heterofermentativas lo que les impide escindir la molécula de fructosa-1,6-difosfato. En su lugar, oxidan la glucosa-6-fosfato a gluconato-6-fosfato, luego la descarboxilan a xilulosa-5-fosfato y escinden en gliceraldehido-3-fosfato y acetil-fosfato en presencia de la enzima fosfocetolasa. Por último, el gliceraldehido-3-fosfato es convertido en ácido láctico con la producción de una molécula de ATP, mientras que el acetil-fosfato se reduce, en presencia de NADH, a etanol (Figura 10 B). Es por esta razón que el rendimiento energético de la vía heterofermentativa es la mitad que el de la vía homofermentativa en la que se producen 2 moléculas de ATP a partir de una molécula de glucosa fermentada, sin producción neta de poder reductor.

Por lo tanto, en base al tipo de mecanismo fermentativo las BAL se dividen en:

I. ***Homofermentativas estrictas***: Fermentan hexosas solamente por la vía glicolítica

II. *Heterofermentativas facultativas*: Tienen la capacidad de utilizar ambas vías, siendo su metabolismo principalmente homofermentativo. Sin embargo, si se modifican las condiciones del medio, tales como la concentración de glucosa, pH, y la disponibilidad de nutrientes cambian su metabolismo a heterofermentativo (Axelsson, 2004)

III. *Heterofermentativas estrictas*: utilizan exclusivamente la vía de la pentosa fosfato, degradando tanto las hexosas como las pentosas por la vía 6-PG/PK. 1 mol de ATP es producido a partir de un mol de glucosa fermentada Figura 10 B) (Ruiz-Rodríguez y col., 2017)

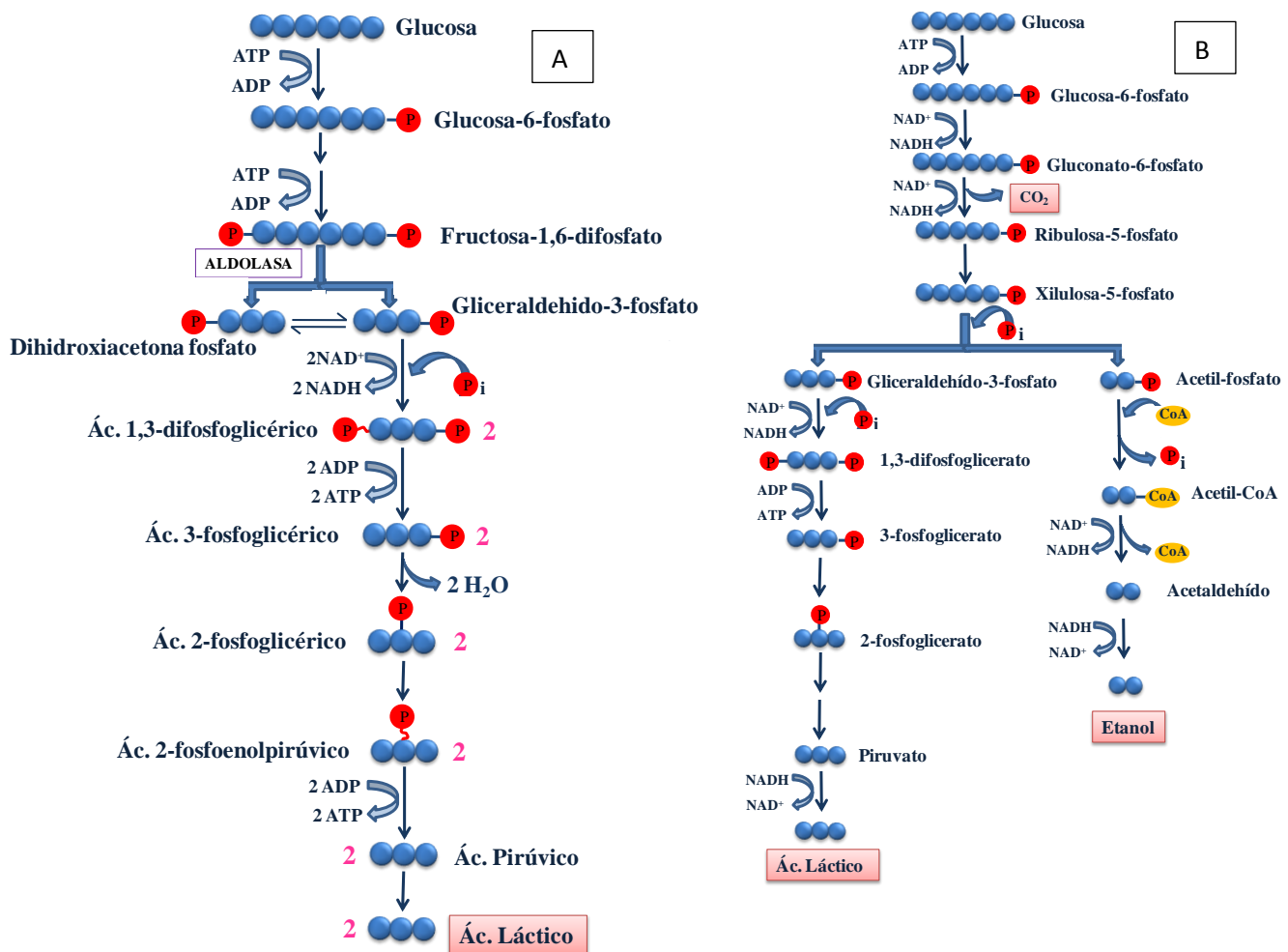


Figura 10. Esquema general de la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas empleada por BAL homofermentativas (A) y de la vía de la pentosa fosfato empleada por BAL heterofermentativas (B) (Adaptado de Tortora y col., 2007)

Puede concluirse que las diferencias entre las BL homo y heterofermentativas, en lo que a productos finales de la fermentación se refiere, son consecuencia de diferencias básicas de tipo genérico y fisiológico. Las homofermentativas poseen los enzimas fructosa 1,6-difosfatoaldolasa y hexosaisomerasa que no tienen las heterofermentativas, mientras que éstas últimas poseen una fosfoacetolasa, de la que carecen las primeras.

El rendimiento energético de ambas rutas es también claramente diferente. Las bacterias homofermentativas son capaces de extraer doble cantidad de energía de la fermentación de la glucosa que la que genera la ruta heterofermentativa. Del mismo modo, que la cantidad de ácidos producida es mayor en la ruta homofermentativa que en la heterofermentativa. Además de las diferencias fisiológicas comentadas, hay que tener en consideración que las condiciones de crecimiento pueden alterar significativamente los productos finales formados. Estos cambios pueden producirse por la alteración del metabolismo del piruvato y/o por el uso de otros aceptores de electrones externos, como el O₂ o algunos compuestos orgánicos (Axelsson, 2004).

Con referencia al ácido láctico producido, hay que indicar que existen dos posibles isómeros, el D(-) y el L(+), cuya formación depende de que el enzima que lleve a cabo la reducción del piruvato a lactato sea la D-lactato o la L-lactato deshidrogenasa. Las especies de bacterias lácticas pueden producir sólo uno de los isómeros o una mezcla de ambos y tiene importancia taxonómica el tipo de isómero producido. Cuando se producen ambas enzimas, éstos suelen tener distinta actividad, lo que da lugar a un exceso de uno de los isómeros y raramente se produce una mezcla racémica.

Respecto al metabolismo de los sustratos carbonados es interesante destacar que las BAL son capaces de degradar con cierta facilidad algunos ácidos orgánicos como el málico, el cítrico y el tartárico.

El **ácido málico** es un compuesto que se encuentra en cantidades importantes en los productos vegetales y en el vino, y es un sustrato común para algunas especies de este grupo que lo transforman en láctico y CO₂, proceso que se denomina “fermentación maloláctica”. El enzima que cataliza dicha

reacción recibe el nombre de enzima maloláctica. Esta fermentación tiene una gran importancia en el proceso de vinificación contribuyendo en gran medida a la formación del gusto y del aroma de los vinos. La especie más importante es *Oenococcus oeni*.

El **ácido cítrico** está también presente en cantidades apreciables en la mayoría de los vegetales y es abundante en los productos lácteos fermentados, donde es considerado el principal precursor del aroma característico a “mantequilla”.

El **ácido tartárico**, mayoritario en el mosto de uva y detectado también en vegetales aunque en cantidades poco importantes, es al igual que el málico un buen sustrato para el crecimiento de algunas BAL. El mecanismo de degradación del tartárico es diferente según se trate de una bacteria homo o heterofermentativa, produciéndose compuestos distintos en cada caso. Así, mientras la homofermentadoras forman acético, láctico y CO₂, las heterofermentadoras forman acético, CO₂ y cantidades minoritarias de ácido succínico.

Metabolismo de los compuestos nitrogenados

Las BAL son capaces de transformar, utilizando distintas rutas metabólicas, las proteínas, los péptidos y algunos aminoácidos. Éstas han desarrollado “sistemas proteolíticos” complejos que les permiten utilizar eficientemente las fuentes de nitrógeno presentes en los medios de cultivo, liberando péptidos y/o aminoácidos, que serán transportados a través de la membrana citoplasmática, mediante sistemas de transporte específicos y finalmente utilizados en el interior celular (Saguir y col., 2008). A pesar de ello, la presencia de aminoácidos preformados en el medio es de gran importancia para estas bacterias, dada su limitada capacidad para sintetizar aminoácidos a partir de fuentes de nitrógeno inorgánico (Saguir y Manca de Nadra, 2007), además de que, como hemos indicado anteriormente, los utilizan como fuente de carbono. Los sistemas proteolíticos de las BAL son complejos, siendo los más estudiados y mejor conocidos, por su importancia tecnológica en la fermentación de la leche, los sistemas proteolíticos de los lactococos (Kunji y col., 1996) y en especial el de *Lc. lactis* subsp. *lactis*, del que se han aislado e identificado algunas de sus proteasas y peptidasas, tanto extracelulares como intracelulares. En este, las proteasas se localizan en su mayor parte a nivel de la pared celular, aunque también se ha

INTRODUCCIÓN

detectado una débil actividad intracelular, mientras que las peptidasas están situadas tanto en la pared, como en la membrana citoplasmática, como en el citoplasma. Por acción de las peptidasas se eliminan péptidos de pequeño tamaño, responsables del sabor amargo de algunos alimentos. En la última fase de la proteólisis se produce acumulación de aminoácidos libres, algunos de los cuales influyen en la textura, son una importante reserva de compuestos precursores de aromas y contribuyen al sabor característico de algunos alimentos. Además de la actividad proteolítica, entre las BAL, es frecuente encontrar especies capaces de descarboxilar algunos aminoácidos, procesos que llevan a la formación de dióxido de carbono y la correspondiente amina. La presencia de estas aminas denominadas “biógenas” ha sido descrita en algunos alimentos fermentados, como los embutidos, los productos lácteos, los derivados del pescado, los vinos o los encurtidos (Landete y col. 2005) siendo en estos últimos la histamina, la más frecuentemente encontrada (Saguir y Manca de Nadra, 2008). En la Figura 11 se muestran algunos ejemplos de las aminas biógenas con mayor presencia en los alimentos y los aminoácidos a partir de los que se originan (Saguir y Manca de Nadra, 2008).

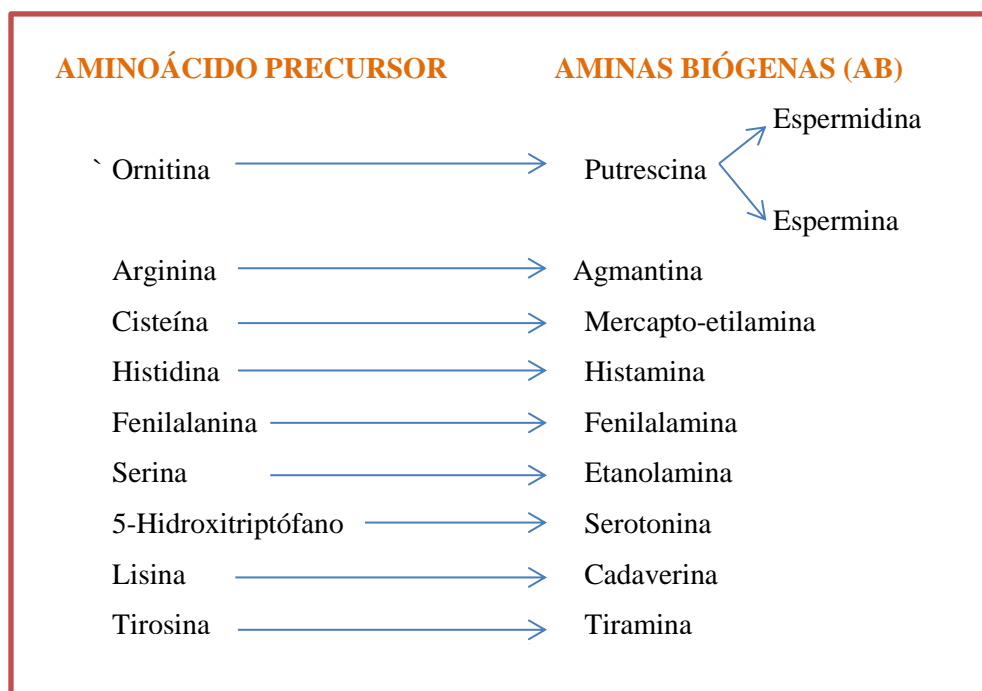


Figura 11. Aminoácidos descarboxilados por las BAL y sus correspondientes aminas biógenas

INTRODUCCIÓN

El gran interés suscitado por estos compuestos, proviene del hecho de que algunas de ellas como la histamina, pueden ser tóxicas incluso ingeridas en bajas concentraciones. Además tanto la tiramina como la histamina tienen propiedades vasoactivas y/o psicoactivas, por lo que su presencia en los alimentos supone un riesgo importante para los consumidores.

No obstante, para que en los alimentos se produzca acumulación de AB es necesario que confluyan circunstancias tales como disponibilidad de los aminoácidos precursores, presencia de microorganismos con actividad amino descarboxilasa y condiciones favorables tanto para su crecimiento como para la actividad descarboxilante. La capacidad de las BAL para descarboxilar aminoácidos es dependiente de la especie e incluso algunos autores (Bover-Cid y Holzapfel, 1999) indican que tiene carácter intraespecífico, habiéndose observado claras diferencias tanto en la cantidad como en el tipo de amina producida, entre cepas de una misma especie.

Por los riesgos toxicológicos que representa la presencia de AB en los alimentos puede suponer, la determinación de la capacidad aminobiogénica es uno de los estudios que deben realizarse en la selección de cepas para el diseño de cultivos iniciadores (Bover-Cid y col., 2001), especialmente en aquellos que van a ser utilizados en la elaboración de productos cárnicos, por su elevado contenido en proteínas. Esta determinación puede hacerse por métodos cuantitativos como la cromatografía de líquidos o cualitativos como el descrito por Bover-Cid y Holzapfel (1999), basado en el cambio de color que se produce en el medio de cultivo como consecuencia del incremento de pH producido por las descarboxilaciones. Otros autores (Lucas y Lonvaud-Funel, 2002) por el contrario, han optado por determinar la presencia de los genes que codifican para las enzimas implicadas en estas descarboxilaciones utilizando la técnica de la PCR o de reacción en cadena de la polimerasa. Por último, las BAL pueden llevar a cabo otras transformaciones en los aminoácidos como son las reacciones de transaminación y de desaminación que, aunque menos frecuentes, son también de gran importancia ya que conducen a la formación de aldehídos, fenoles, indoles y otros compuestos azufrados fuertemente aromáticos, que pueden provocar malos olores.

Compuestos con actividad antimicrobiana producidos por las BAL

El efecto antimicrobiano de las BAL se debe principalmente a la síntesis y acumulación en el medio externo de una amplia variedad de metabolitos primarios y secundarios con propiedades antimicrobianas, por ejemplo: algunos ácidos orgánicos, etanol, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, diacetilo, acetaldehído, benzoatos, isómero D- de algunos aminoácidos, algunos compuestos no proteicos de pequeño tamaño molecular como la reuterina y las bacteriocinas (Ouwehand, 1998). Los mecanismos por los que estos compuestos ejercen su acción antimicrobiana son diversos. A continuación, se detallan lo más relevantes en relación con los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral:

- **Ácidos orgánicos:** láctico, acético, propiónico. Es la fracción no disociada de los mismos la que ejerce la actividad antimicrobiana al interferir con funciones metabólicas esenciales mencionadas anteriormente.
- **Dióxido de carbono,** es considerado un antimicrobiano de amplio espectro que actúa disminuyendo el pH extra e intracelular y desestabilizando las membranas celulares donde se acumula. Por su potente actividad antimicrobiana se utiliza como conservante de carnes, pescados, frutas, verduras y hortalizas refrigeradas, donde inhibe el crecimiento de microorganismos psicrótrofos, y en la fermentación de vegetales y ensilados para prevenir el desarrollo de mohos (Lindgren y Dobrogosz, 1990).
- **Peróxido de hidrogeno,** presenta un potente efecto antimicrobiano, el cual junto al de las bacteriocinas merece ser destacado. Las BAL en condiciones de aerobiosis son capaces de producir peróxido de hidrógeno a partir de la forma reducida de la nicotinamida-adenindinucleotido (NADH), por acción de una flavoproteína NADH:H₂O₂ oxidasa, y aunque no poseen catalasa, se autoprotegen de los efectos del H₂O₂ mediante actividades pseudocatalásicas o bien liberándolo al medio donde se acumula (Condon, 1987). El efecto bactericida o bacteriostático del peróxido de hidrógeno es debido a su elevado poder oxidante, que provoca (i) la peroxidación de los lípidos de la membrana,

incrementando de este modo la permeabilidad celular, y (ii) la inactivación de enzimas y coenzimas mediante la oxidación de sus grupos sulfhidrilo (Kong y Davidson, 1980). La elevada toxicidad de este compuesto también puede ser atribuida a su capacidad para destruir estructuras moleculares básicas como las proteínas y los ácidos nucleicos en los que es capaz de romper los enlaces intra e intercatenarios y de alterar las bases nitrogenadas, inhibiendo así la replicación cromosómica (Piard y Desmazaud, 1991).

- **Bacteriocinas**, término propuesto para designar a un grupo de sustancias de naturaleza proteica con actividad antimicrobiana, producidas por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Posteriormente han sido definidas por otros autores (Daeschel, 1993) como “proteínas o complejos proteínicos con actividad bactericida”. Jack y col. (1995) proponen luego de una extensa revisión sobre las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram-positivas, una nueva y más amplia definición considerando a las bacteriocinas como “un grupo heterogéneo de sustancias con capacidad antimicrobiana, de síntesis ribosomal, que se secretan al medio con o sin modificaciones postraduccionales y que poseen un espectro de acción antimicrobiano reducido y limitado en ocasiones, a algunas cepas de la especie productora, lo que implica que el microorganismo productor debe poseer algún mecanismo que le confiere inmunidad a su propia bacteriocina”. Nes y col. (1996) atribuyen esta inmunidad a la producción de una proteína de inmunidad específica mientras que otros autores (Jack y col., 1995) han sugerido que la inmunidad podría estar mediada por la acción de proteasas intracelulares que inactivarían la bacteriocina en las células productoras.

Los mecanismos de acción de las bacteriocinas son diversos. La mayoría actúan como bactericidas aunque se han descrito algunas, como la leucocina AUAL187 (Hastings y col., 1991) o la leucocina S (Lewus y col., 1992) que actúan como bacteriostáticas. En ocasiones la actividad bactericida puede ir acompañada de la lisis celular del microorganismo sensible (bacteriocinas bacteriolíticas), y algunos autores sugieren que

esta lisis podría deberse a la liberación de enzimas autolíticas que en condiciones normales están ligadas electrostáticamente a los polímeros superficiales aniónicos de la pared celular (Jack y col., 1995). Diversos estudios sugieren además que las bacteriocinas son proteínas activas a nivel de membrana cuyo mecanismo de acción primario es la formación de poros o canales iónicos en la membrana citoplasmática de las células sensibles (Abee, 1995).

Al igual que mencionamos para el peróxido de hidrógeno la capacidad bacteriocinogénica es una propiedad deseable en las cepas que vayan a ser utilizadas como cultivos iniciadores, por lo que se han descrito diversos métodos para su determinación. En todos los casos suele realizarse un estudio preliminar en medio sólido o semisólido, utilizando los que Hoover (1993) denominó métodos directos e indirectos y un estudio de confirmación, cuyo objetivo es asegurar que la inhibición del crecimiento es debida a la producción de bacteriocinas y no a la de otros compuestos inhibidores. Tanto en los métodos directos como en los indirectos, la actividad antimicrobiana del microorganismo productor se detecta como una inhibición del crecimiento de otro microorganismo denominado “indicador” (Tagg y col., 1976). En los directos, el microorganismo productor y el indicador se desarrollan simultáneamente bajo las mismas condiciones de incubación, y sólo se detectará inhibición si las sustancias antimicrobianas se sintetizan y liberan al medio durante los primeros estadios del crecimiento. En los indirectos, que son los más utilizados, el microorganismo productor se cultiva en un medio sólido durante un periodo determinado de tiempo, y a continuación el cultivo se cubre con una capa de medio semisólido fundido y atemperado que contiene el microorganismo indicador. Un ejemplo de estos es el denominado “spot test” o de la gota sobre agar. Los ensayos indirectos son más sensibles que los directos y tienen la ventaja de que permiten que, tanto el microorganismo productor como el indicador, se desarrollen bajo condiciones óptimas de incubación. La evaluación de la actividad bacteriocinogénica de los sobrenadantes libres de células o de sus concentrados, se puede evaluar mediante ensayos basados de difusión

tridimensional de las bacteriocinas en un medio sólido o semisólido y en la inhibición del crecimiento de los microorganismos indicadores (Cintas y col., 1998).

Además de la amplia gama de sustancias con efecto antimicrobiano, las BAL ejercen su acción antimicrobiana mediante la competición por sustrato.

Fermentación láctica y biopreservación de frutas y hortalizas

La fermentación láctica es la base de la bioconservación como se mencionó anteriormente. Es considerada una biotecnología simple y valiosa para mantener y/o mejorar la seguridad microbiológica, nutrición, propiedades sensoriales y la vida útil de alimentos fermentados (Demir y col., 2006).

La fermentación láctica de frutas y hortalizas se puede dividir en cuatro categorías principales (Figura 12):

i) Vegetales, como pepinos, tomates, pimientos, quimbombó, aceitunas y guisantes verdes (Dahal y col., 2005).

ii) Frutas como, manzanas, peras, mangos, palmas, limones y pulpas de frutas (Zhang y col., 2000).

iii) Raíces y tubérculos como zanahorias, nabos, remolachas, rábanos, apio, yuca y batata (Panda y col, 2009).

iv) Jugos, bebidas y batidos innovadores de frutas y verduras (Di Cagno y col., 2013).

En la actualidad, la fermentación láctica de las verduras tienen un significado industrial principalmente para hortalizas tales como repollos, pepinos, berenjenas y algunas frutas como aceitunas mientras que frutas, jugos y VMP todavía resultan innovadores y se ubican dentro de los emergentes.

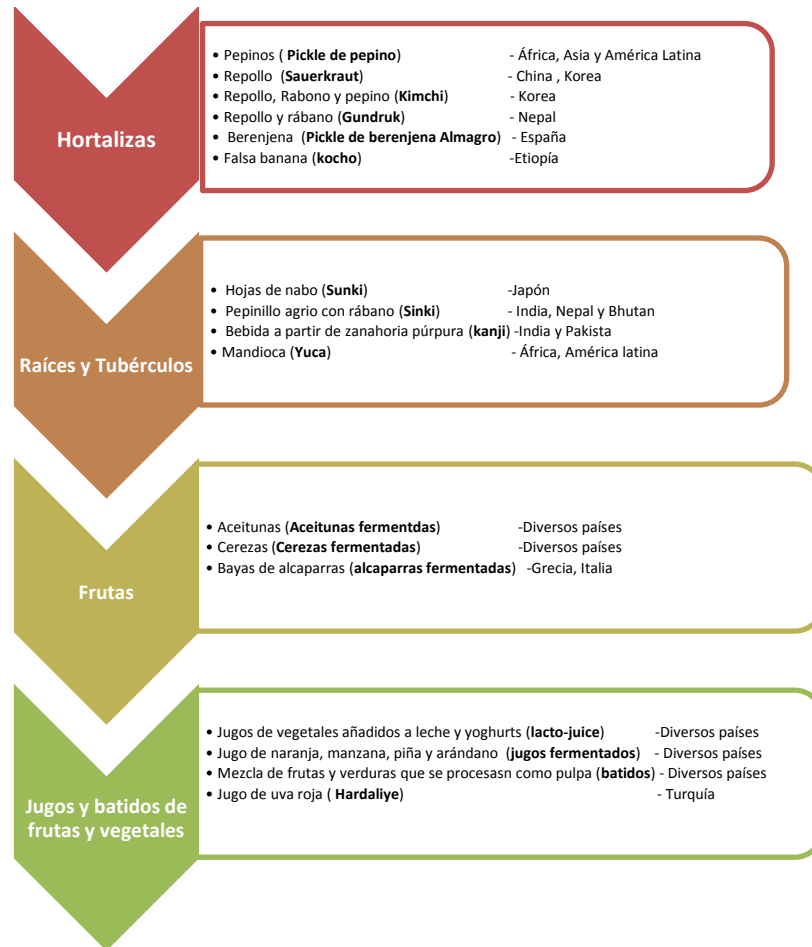


Figura 12. Ejemplos de verduras y frutas fermentadas tradicionales y emergentes, que se fabrican en diversas regiones del mundo.

Durante siglos, las BAL se han utilizado en la elaboración de alimentos fermentados como productos lácteos y cárnicos. Es muy importante resaltar que el consumo extensivo de las mismas, sin efectos negativos sobre la salud del consumidor les ha valido actualmente el estatus de organismos "GRAS" (Generally Recognized As Safe, reconocidos en general como seguros). Actualmente, su uso en la elaboración de alimentos fermentados, es aceptado como uno de los métodos de conservación más naturales y saludables, y podrá constituir una solución ecológica para VMP.

Cabe resaltar como se mencionó anteriormente que esta técnica de conservación de alimentos por fermentación es muy antigua y aunque actualmente existen otras más modernas, se mantiene más allá de su efecto sobre conservación n sí mismo, por otros interesantes motivos como por ejemplo porque puede:

- Proporcionar al producto cualidades organolépticas muy apreciadas
- Requiere en comparación con otros métodos de conservación (ultracongelación, deshidratación, otros) un bajo costo en instalaciones y un menor consumo energético
- Aportar nutrientes adicionales u otros beneficios al alimento (probióticos)
- Se trata de alimentos “seguros” en los que el riesgo de intoxicación por consumo es prácticamente inexistente.

Abundante literatura ya ha sido descripta para la fermentación de repollo y aceitunas para hacer chucruts y aceitunas de mesa (Hurtado y col., 2012). Pero pocos estudios se han realizados en la conservación de matrices frutales.

Trias y col. (2008) caracterizaron diez cepas de *Leuconostoc mesenteroides* y una de *Leuconostoc citreum* aisladas de frutas y verduras frescas por sus propiedades antagónicas contra *L. monocytogenes*; encontraron que los ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas fueron principales mecanismos de inhibición. Iglesias y col. (2018) demostraron que *Lactobacillus rhamnosus* GGW controló el crecimiento de *Listeria* spp y *Salmonella* spp en peras MP almacenadas a 5 °C. Otros ejemplos, son las cepas *Lactobacillus plantarum* B2 y *Lactobacillus fermentum* PBCC11 que inhibieron el crecimiento de *L. monocytogenes* en melón recién cortado (Russo y col., 2015) mientras que, Luo y col. (2015) investigaron la eficacia antimicrobiana de una cepa de BAL RD1 aislada de rábano fermentado sobre *Salmonella* en manzanas frescas. Por otro lado, Di Cagno y col. (2009) demostraron que cepas de *L. plantarum* aisladas de tomates podrían mejorar las propiedades beneficiosas para la salud, sensoriales y la vida útil de jugo de tomate fermentado. La fermentación espontánea de frutas y verduras incluye una sucesión de BAL autóctonas heterofermentativas y homofermentativas, con o sin levaduras (Chung, 2005). Sin

embargo, el valor poco confiable de la fermentación espontánea y una serie de factores propician el uso de cultivos iniciadores caracterizados y seleccionados.

L. plantarum, *L. xylosum* y *L. brevis* son especies comúnmente usadas como cultivos iniciadores para la fermentación de vegetales. En la mayoría de los casos tales cultivos comerciales no corresponden a cepas autóctonas, por lo que para conseguir propiedades deseables deben ser adaptados a las condiciones intrínsecas de las materias primas, lo que dificulta su uso. Hasta nuestro conocimiento ningún estudio ha considerado el uso de cepas autóctonas de BAL seleccionadas de nuestra región para realizar la fermentación de VMP, específicamente frutas troceadas. En este sentido, Sajur y col. (2007) han demostrado que *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* Tsc, aislado de tomates cultivados en Tucumán, con aptitud para uso industrial, podría ayudar a la microbiota autóctona, incluida cepas potencialmente patógenas y alterantes en puré de tomate. Perez y Saguir (2012) estudiaron el crecimiento, sobrevivencia y metabolismo de *L. plantarum* N4 aislado de naranjas cosechadas en Tucumán a temperaturas de refrigeración y abusiva y, resaltaron su potencial para ser usado como agente de bio-control y vehiculizar cepas probióticas. Los autores afirmaron que la selección de los microorganismos iniciadores es indispensable. Sin embargo, más investigación es necesaria, especialmente en BAL autóctonas de la región para la selección de cepas con óptimas cualidades para su potencial aplicación como agente de bio-control de VMP.

Para la fermentación controlada o dirigida de matrices vegetales se pueden utilizar dos tipos de cultivos iniciadores:

- **Cultivos alóctonos:** son cultivos originarios de un lugar diferente al lugar o matriz en que se encuentran (Duar y col., 2017), como ocurre con la mayoría de los cultivos comerciales. Estos cultivos presentan limitaciones como I) no considerar otras características además de la tasa de acidificación, II) su adaptación a las propiedades físicoquímicas y funcionales de la matriz en las que se aplican es pobre, III) la flexibilidad metabólica es baja, y IV) su diversidad no refleja el ecosistema donde son inoculados
- **Cultivos autóctonos:** son “residentes verdaderos”, es decir, son aislados y reutilizados en la misma matriz. Estos cultivos presentan un crecimiento más rápido y competitivo en cultivos mixtos que

INTRODUCCIÓN

los cultivos autóctonos, mejor adaptación al sustrato, propiedades antimicrobianas y sensoriales positivas. El uso de cepas autóctonas de BAL en vez de alóctonas como cultivos iniciadores puede potenciar las propiedades nutricionales, sensoriales y reológicas de los productos fermentados y asegurar una vida útil prolongada (Di Cagno y col., 2013, 2017; Filannino y col., 2018). Además, las BAL pertenecientes a nichos específicos pueden presentar rasgos metabólicos específicos como resultado de adaptaciones al medio ambiente (Endo y col., 2013). Contrariamente a otros alimentos fermentados (por ejemplo, quesos, embutidos y productos horneados con levadura), el uso de cultivos iniciadores para la fermentación de nuevas hortalizas y frutas está en constante aumento (Montet y col., 2006). En este sentido, la búsqueda de cepas autóctonas adaptadas a las condiciones locales de elaboración del producto permitirá obtener alimentos vegetales con óptimas cualidades en relación con su seguridad, propiedades sensoriales y nutricionales, lo que redundará en beneficios para el sector productivo de la región y el consumidor.

Más aún, en el mercado local no existen cultivos iniciadores de BAL autóctonas adaptadas a las condiciones locales para ser utilizados como agentes de biocontrol de VPM, listo para consumo



OBJETIVOS



HIPÓTESIS

La seguridad de los alimentos es una preocupación constante en todo el mundo. En la actualidad ha surgido la necesidad de buscar alternativas de conservación, esto debido a que se ha asociado el consumo de conservadores químicos con intoxicaciones. La necesidad de aumentar la seguridad de los alimentos, unida a la demanda de los consumidores de alimentos naturales, con menor tratamiento tecnológico, mejor calidad nutricional y, una vida útil relativamente larga determina que se modifique la forma de aplicar las técnicas de conservación tradicionales y, que progresivamente surjan nuevas tecnologías.

Bacterias lácticas (BAL) autóctonas pueden ser usadas por sus propiedades antimicrobianas y, fermentativas como agentes de bio-control para extender la vida útil y aumentar la seguridad microbiológica de derivados de frutas y/o hortalizas de nuestra región, proporcionándoles al mismo tiempo valor adicional.

OBJETIVO GENERAL

Investigar las propiedades antimicrobianas de BAL aisladas de frutas y hortalizas frescas y mínimamente procesadas (MP) de nuestra región para su potencial aplicación como agentes de bio-control de alimentos vegetales. Al mismo tiempo evaluar sus propiedades nutricionales y tecnológicas, lo que le otorgará un valor adicional al producto final.

Las investigaciones permitirán profundizar los conocimientos sobre el metabolismo de BAL de frutas y hortalizas y seleccionar cepas que, por sus propiedades antimicrobianas, tecnológicas y nutricionales constituyan un valor agregado para productos, listos para consumo, derivados de las materias primas en estudio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar, cuantificar e identificar la microbiota láctica de frutas y hortalizas MP de la región, listos para consumo.

- Evaluar sus actividades antimicrobianas, así como de BAL de frutas y hortalizas frescas sobre bacterias patógenas. Establecer la naturaleza y el modo de acción antibacteriano

- Evaluar el crecimiento en diferentes condiciones de cultivo y en jugo multifruta comercial y, las propiedades tecnológicas y nutricionales de cepas seleccionadas.

- Realizar fermentaciones con cepas seleccionadas en matrices alimenticias almacenadas a 4 y 30 °C.

- Evaluar los cambios microbiológicos, fisicoquímicos y propiedades antioxidantes en las matrices inoculadas en comparación las muestras sin tratar.

- Realizar ensayos de microscopía electrónica y análisis sensorial de los alimentos fermentados.

CAPÍTULO 1

*Selección de bacterias lácticas de
frutas, hortalizas y productos
mínimamente procesados con
actividad antimicrobiana*



1.1 INTRODUCCIÓN

Las frutas y hortalizas constituyen una fuente alimenticia muy importante en la dieta del ser humano (Warriner y col., 2005; Abadias y col., 2008). Aportan vitaminas, minerales, azúcares, aminoácidos esenciales, fibras, sustancias antioxidantes y agua, además su aporte calórico es significativamente menor al de otros alimentos. Son fundamentales en mantener un óptimo estado nutricional reduciendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Su y Arab, 2006). En nuestro país el consumo de vegetales equivale a la mitad de lo recomendado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y por la Organización Mundial de la Salud (OMS): 400 gramos de frutas y hortalizas por día y por persona. Una razón de esto es el tiempo de elaboración prolongado que requiere la preparación y cocción de estos alimentos. Como solución a este inconveniente se presentan los vegetales mínimamente procesados (MP), cuya definición, descripción y criterios microbiológicos han sido aprobados para incorporarlos al Código Alimentario Argentino (CAA) a través de la inclusión de los Artículos 925 tris y 925 quater en el Capítulo XI, Alimentos Vegetales de dicho Código. Estos productos presentan características organolépticas y nutricionales similares a las frutas y hortalizas frescas y la ventaja de ser fáciles de preparar por el consumidor. Su mínimo procesamiento consiste en operaciones de clasificación, lavado, pelado, reducción de tamaño, etc., por lo cual se comercializan como productos para consumo directo o para preparaciones culinarias rápidas. En este contexto, las frutas y hortalizas MP constituyen un área importante de rápida expansión. Sin embargo, la seguridad y estabilidad microbiológica de los mismos, basada principalmente en la correcta cadena de frío y prácticas higiénicas, resultan difíciles de controlar (Lanciotti, 2003).

Durante las distintas etapas del procesamiento mínimo, estos productos pueden ser contaminados, inclusive con microorganismos patógenos que si no se manifiestan en forma de lesiones visibles pueden pasar desapercibidos y dar lugar a toxiinfecciones alimentarias (Beuchat, 2002; Froder y col., 2007; Sánchez y col., 2012; Callejón y col., 2015). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos causados por patógenos humanos como *Escherichia coli* O157:H7 (Ackers y col., 1998,

Capítulo 1

Kirezieva y col., 2015), *Listeria monocytogenes* (Beuchat, 1996; Abadias y col., 2011), *Salmonella* spp. (Lin y col., 1996; Salleh y col., 2003; Buck y col., 2003), *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Viswanathan y Kaur, 2001) han sido informados. Por lo tanto, el desarrollo de tratamientos factibles, de bajo costo y eficientes que prolonguen la vida útil y aumenten la seguridad microbiológica de vegetales frescos y MP, sacrificando al mínimo sus características nutricionales y sensoriales iniciales resulta de gran interés (Del Valle, 2003).

En la actualidad ha surgido la necesidad de buscar nuevas alternativas de conservación natural al uso de conservantes químicos cuyo consumo ha sido asociado con intoxicaciones, lo que llevó a la falta de aprobación de algunos de los productos más efectivos. El control biológico encaja bien con esta nueva tendencia y varias bacterias y levaduras han sido identificadas en este sentido, aunque en muchos casos con efectos negativos tales como el pardeamiento de frutas o ineficiente inactivación (Vermeiren y col., 2004; Leverentz y col., 2006). Entre ellos, las BAL participan en numerosos procesos de fermentación y conservación de alimentos, especialmente de productos lácteos y cárnicos, algunos vegetales y bebidas fermentadas (Stiles y Holzappel, 1997; Fernández Escarlatín, 2000; Palmi y Buchanan, 2002; Leroy y col., 2003; Trias y col., 2008; Saguir y col., 2009; Siroli y col., 2016; Maturano y Saguir, 2017). Sin embargo, su actividad antagónica relacionada a la producción de ácidos orgánicos u otras sustancias antimicrobianas (peróxido de hidrógeno, de naturaleza proteica, etc) y/o competición de sustrato ha sido relativamente poco investigada en BAL aisladas de frutas y hortalizas frescas o MP y, menos aún de la región del noroeste argentino. En este contexto, nos propusimos evaluar la actividad antimicrobiana de BAL de frutas y hortalizas para su potencial aplicación tecnológica.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar, cuantificar e identificar fenotípicamente la microbiota láctica de frutas y hortalizas mínimamente procesadas.
- Evaluar sus propiedades antagonicas, así como de bacterias lácticas aisladas de frutas y hortalizas frescas de nuestro cepario.
- En cepas seleccionadas, caracterizar la naturaleza y el modo de acción antibacteriano.

1.3 MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

Los microorganismos utilizados en este estudio se muestran en Tabla 1.1. Los aislados procedieron de muestras de ensaladas de frutas (EF) y hortalizas (EH) obtenidas de un puesto de venta al público de frutas y verduras (verdulería) y de supermercado según detalla en el apartado 1.3.5.1. También, se utilizaron cepas de BAL aisladas de frutas y hortalizas de la región pertenecientes a nuestro cepario (Tabla 1.1), cuyas propiedades beneficiosas en distintos aspectos (nutricionales, funcionales o aromáticos) justificaron su elección (Saguir y Manca de Nadra, 2007; Saguir y col., 2008; Saguir y col., 2009, Savino y col., 2012; Perez y Saguir, 2012; Perez, 2013; Rodriguez Vaquero y col., 2014; Maturano y Saguir, 2017).

Los microorganismos se propagaron rutinariamente en medio de cultivo MRS (De Man y col., 1960), pH 6,5 cuya composición se describe en el apartado 1.3.3. Las cepas de *O. oeni* se inocularon en el mismo medio suplementado con ácido L-málico (5 g/L) y fructosa (4,0 g/L) (MRSMF), pH 4.8. Todos los cultivos se incubaron a 30 °C durante tiempo necesario. Para el cultivo en placa se adicionó 15 g/L de agar según se indica en el apartado 1.3.3.

Tabla 1.1 Origen de los aislados y cepas de bacterias lácticas utilizadas durante este estudio.

Origen	Código de aislado/Cepa de BAL	Referencias
Ensalada de Frutas (frutas)	EFf1, EFf2, EFf3, EFf4, EFf5, EFf6, EFf7, EFf8, EFf9, EFf10, EFf11, EFf12, EFf13, EFf14, EFf15, EFf16, EFf17, EFf18, EFf19, EFf20, EFf21, EFf22, EFf23, EFf24, EFf25, EFf26, EFf27, EFf28, EFf29, EFf30, EFf31, EFf32, EFf33, EFf34, EFf35, EFf36, EFf37, EFf38, EFf39, EFf40, EFf41, EFf42, EFf43, EFf44, Ff45, EFf46, EFf47, EFf48, EFf49, EFf50, EFf51, EFf52, EFf53, EFf54, EFf55, EFf56, EFf57, EFf58, EFf59, EFf60, EFf61, EFf62, EFf63, EFf64, EFf65, EFf66.	
Ensalada de Frutas (jugo)	EFj1, EFj2, EFj3, EFj4, EFj5, EFj6, EFj7, EFj8, EFj9, EFj10, EFj11, EFj12, EFj13, EFj14, EFj15, EFj16, EFj17, EFj18, EFj19, EFj20, EFj21, EFj22, EFj23, EFj24, EFj25, EFj26, EFj27, EFj28, EFj29, EFj30, EFj31, EFj32, EFj33, EFj34, EFj35, EFj36, EFj37, EFj38, EFj39, EFj40, EFj41, EFj42, EFj43, EFj44, EFj45, EFj46, EFj47, EFj48, EFj49, EFj50, EFj51, EFj52, EFj53, EFj54, EFj55, EFj56, EFj57, EFj58, EFj59, EFj60, EFj61, EFj62, EFj63, EFj64, EFj65, EFj66	
Ensalada de Hortalizas	EH1, EH2, EH3, EH4, EH6, EH7, EH8, EH9, EH11, EH12, EH13, EH14, EH15, EH16, EH17, EH18, EH19, EH20, EH21, EH22, EH23, EH24, EH25, EH27, EH34	
Jugo de Naranja	<i>Lactobacillus plantarum</i> JNB25	Pérez (2013)
Jugo de Manzana	<i>Lactobacillus brevis</i> JNB23 <i>L. plantarum</i> M42	Savino y col. (2012)
Naranja	<i>L. plantarum</i> N4, <i>L. plantarum</i> N8	Arena y col. (1996); Saguir y Manca de Nadra (2007)
Uva	<i>Oenococcus oeni</i> MS46, <i>O. oeni</i> MS9	Saguir y col. (2009)
Pimiento	<i>L. plantarum</i> SP33, <i>L. plantarum</i> JP11	Rodríguez Vaquero y col. (2014)
Berenjena	<i>L. plantarum</i> SB1, <i>L. plantarum</i> SB2, <i>L. plantarum</i> SB5, <i>L. plantarum</i> SB6, <i>L. plantarum</i> SB8, <i>L. plantarum</i> JB1, <i>L. plantarum</i> JB2 y <i>L. plantarum</i> JB3	Rodríguez Vaquero y col. (2014)
Lechuga	<i>L. plantarum</i> SLGR1, <i>L. plantarum</i> SLGR2, <i>L. plantarum</i> SLGR4, <i>L. plantarum</i> SLGR6, <i>L. plantarum</i> SLM7 y <i>L. plantarum</i> JLM1	Rodríguez Vaquero y col. (2012)

En negrita se muestran los aislados obtenidos durante en este trabajo. Las cepas de BAL de frutas, hortalizas, jugo de naranja y bebidas fermentadas pertenecen a nuestro cepario y fueron aisladas e identificadas en estudios previos según se indica en la columna de “Referencia”.

1.3.2 Conservación de los microorganismos

Los cultivos puros de las BAL empleadas durante este estudio se conservaron en medio MRS en estado líquido y sólido (De Man y col., 1960) durante corto período de tiempo (1-3 meses) a 4 °C y, durante un largo período de tiempo, en caldo MRS con 30% (v/v) de glicerol estéril a -20 °C (congelación). El glicerol penetra en las células, protegiéndolas de los efectos de la deshidratación y evitando la formación de cristales de hielo.

Para inocular los medios de pruebas, colonias aisladas se inocularon en medio MRS, incubaron a 30 °C y, se activaron por sucesivas transferencias a medio fresco.

1.3.3 Medios de Cultivos

- **Medio MRS** (De Man y col., 1960) con la siguiente composición en g/L: glucosa, 20; peptona, 10; extracto de carne, 10; extracto de levadura, 5; fosfato monopotásico, 2,0; acetato de sodio, 5,0; citrato diamónico, 2,0; sulfato de magnesio, 0,10; sulfato de manganeso, 0,05. El pH se ajustó a 6,5 ± 0,2. El medio se utilizó para cultivar las BAL, ya que su formulación favorece su desarrollo. Para cultivar y conservar las cepas de *O. oeni*, el medio se adicionó con ácido L-málico y (4 g/L) y fructosa (5 g/L) y se ajustó a pH 4,8.

El medio líquido MRS se solidificó por el agregado de agar (1,5%, p/v) para recuento de células viables (**agar MRS**).

Para pruebas de crecimiento en medios ácidos, el MRS se ajustó a pH 4,5 ó 5,5 con HCl 0,1 N.

Para el aislamiento de la microbiota láctica, Agar-MRS se suplementó con 2 µg/mL de cicloheximida (Sigma-Aldrich, Chemical Co, MI, EE.UU.) para inhibir el crecimiento de levaduras (**MRS-C**).

Para ensayos de fermentación, el caldo MRS, sin glucosa, se suplementó con el indicador de pH púrpura de bromo cresol en solución alcohólica (0,17 g/L) y la solución del hidrato de carbono en estudio, la cual fue esterilizada por filtración y agregada asépticamente al medio para obtener una concentración final de 1,0 g% (p/v). El pH se llevó a 5,5 con HCl 0,5 N. (**MRS-pbc**).

Capítulo 1

- **Plate Count Agar (PCA)** con la siguiente composición en g/L: peptona, 5,0; extracto de levadura, 2,5; glucosa, 1,0, pH $7 \pm 0,2$. El caldo PCA se suplementó con 1,5% de agar para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales (**Agar PCA**)

- **Mac Conkey Agar** con la siguiente composición en g/L: peptona de carne, 17; peptona de gelatina, 3,0; lactosa, 10; mezcla de sales biliares N° 3, 1,5; cloruro de sodio, 5,0; rojo neutro, 0,03; cristal violeta, 0,001; agar, 13,5, pH $7,0 \pm 0,2$. El medio se utilizó para aislamiento y recuento de bacilos Gram negativos aerobios y anaerobios facultativos incluyendo todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*.

- **Medio Gibson** con la siguiente composición en g/L: sacarosa, 50; triptona de soja, 10; extracto de levadura, 5; fosfato dipotásico, 5; citrato de amonio, 5; agar, 15. El medio se utilizó para diferenciar el metabolismo homofermentativo o heterofermentativo de BAL.

- **Medio Garvie** con la siguiente composición en g/L: sacarosa, 50; triptona, 10; extracto de levadura, 5,0; fosfato dipotásico, 5,0; citrato de amonio, 5,0, agar, 15. El medio se utilizó para evaluar la producción cualitativa de polisacárido.

- **Medio Arginina** con la siguiente composición en g/L: L-arginina, 3,0; triptona, 4,0; extracto de levadura, 4,0; glucosa, 1,0; peptona de carne, 6,0; y tween 80, 0,1% (v/v). El medio se utilizó para evidenciar la producción de amoníaco a partir de arginina usando el reactivo de Nessler, cuya preparación consistió en: disolver 5,0 g de KI en 5 mL de agua destilada y agregar una solución saturada de HgCl_2 (6%) hasta la formación de un precipitado. Luego se agregó 20 mL de NaOH 5,0 N y se diluyó hasta 100 mL con agua destilada, se dejó decantar y, el sobrenadante límpido constituyó el reactivo de Nessler.

- **Medio BHI** con la siguiente composición en g/L: infusión de cerebro de ternera 200; infusión de corazón vacuno 250; peptona 10; cloruro de sodio 5,0; glucosa 2,0; fosfato disódico 2,5; pH final $7,4 \pm 0,2$. El medio se utilizó para el crecimiento y recuento de las bacterias patógenas en ensayos

de actividad antimicrobiana. Para realizar el ensayo de actividad antimicrobiana mediante la técnica de la gota, se agregó agar al medio BHI al 0,75% (p/v) (**medio BHI semi-blando**).

Los medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C, 20 min, excepto las sustancias termolábiles que fueron esterilizadas por filtración a través de membranas de 0,22 µm (Millipore, Merck), y luego se adicionaron al medio estéril.

1.3.4 Medidas de crecimiento

El crecimiento microbiano se determinó espectrofotométricamente y por el método de las diluciones sucesivas. En el primer caso se evaluó la **turbidez** producida en el medio líquido, midiéndose densidad óptica (DO), es decir absorbancia, a una longitud de onda de 560nm (DO_{560nm}) en espectrofotómetro (WPA Bioware DNA, Biochrom, England).

$$A = -\log T/100$$

Donde, A: Absorbancia; T: transmitancia

El método de las **diluciones sucesivas** consistió en realizar diluciones decimales sucesivas de la muestra, tomar un volumen determinado y sembrarlo en sólido medio. Tras la incubación a temperatura óptima del microorganismo y una vez desarrollado el cultivo, se contó el número de colonias en aquellas placas conteniendo entre 30 y 300 colonias. Con este dato y, conociendo la dilución realizada y el volumen de siembra, se calculó el número de unidades formadoras de colonias/mL o gramo (ufc/mL ó ufc/g) dependiendo de la muestra. Los resultados se expresaron como las medias de los recuentos obtenidos ± DE.

1.3.5 Aislamiento de BAL de vegetales MP

1.3.5.1 Muestras

Se analizaron dos muestras de ensalada de frutas (EF) y dos de ensalada de hortalizas (EH) obtenidas de puesto de verdulería y de supermercado. Las mismas se encontraban en recipientes cerrados y refrigeradas al momento de su compra y, de esta manera se trasladaron al laboratorio donde

fueron mantenidas a 4 °C hasta su procesamiento. Las muestras presentaron apariencia y calidad sensorial agradable.

Las EFS estuvieron compuestas por manzanas, bananas, naranjas y duraznos cortados en trozos pequeños aderezados con jugo de naranja. Además, se les agregó trozos de frutillas lavados con agua destilada estéril que se compraron junto con las EFs.

La EH estuvo compuesta por una mezcla de lechuga y tomates cortados y zanahorias ralladas, sin aderezos. Todas las muestras se prepararon en los locales de venta al público con un día de anticipación a la compra. Los vegetales, según nos informaron en los locales de compra, fueron lavados con agua antes de su procesamiento (Figura 1.1 A, B, C)



Figura 1.1 Muestras de ensaladas de frutas (EF) y hortalizas (EH) obtenidas de puesto de verdulería y supermercado (A, B y C respectivamente).

1.3.5.2 Recuento de la carga microbiana y obtención de aislados de BAL

Veinticinco gramos de la mezcla de frutas u hortalizas se recogieron al azar, se homogeneizaron con 225 mL de solución fisiológica estéril por agitación (150 rpm, 25 °C, durante 30 min), se recolectó el agua de lavado en recipientes estériles y se almacenó a 4 °C hasta su utilización. Por otro lado, se tomaron alícuotas del jugo de EFs (25 g) y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

La cuantificación de la carga microbiana de EF y EH se realizó a partir de las muestras de agua de lavado y de jugo por el método de las diluciones sucesivas, descrito anteriormente. En esta condición, alícuotas de 0,1 mL de las diluciones adecuadas se sembraron por triplicado en medios PCA, agar MRS-C y agar Mac Conkey para recuentos de mesófilos aerobios totales, BAL y coliformes respectivamente. Las placas de agar MRS-C se incubaron en microaerofilia 30 °C (Anaerobic System

“Anaerogen”, Oxoid) durante 5 días mientras que las de PCA y agar Mac Conkey en aerobiosis a 30 y 37 °C respectivamente durante 96 h. respectivamente. Los resultados se expresaron como la media de los valores obtenidos. Posteriormente, las placas de PCA fueron tratadas con H₂O₂ al 3% (v/v) a fin de determinar la presencia de colonias catalasa positivas.

Un total de 234 colonias que presentaron morfologías (color, tamaño, forma) típicas de BAL se seleccionaron al azar, a partir de agar MRS-C (200: 120 de EFs y 80 EHs) y PCA (34: 20 EFs, 14 EH), se transfirieron a medio líquido MRS, pH 6,5 y se purificaron por repiques sucesivos en agar MRS incubado a 30 °C durante 72 h en microaerofilia. Esta operación se realizó por lo menos tres veces a fin de asegurar la pureza de los cultivos. Los cultivos puros que exhibieron morfología celular de cocos o bacilos, reacción de Gram positiva y catalasa negativa se consideraron como pertenecientes al grupo de las BAL y se seleccionaron para continuar las investigaciones.

Los cultivos puros se conservaron en medio MRS, pH 6,5 según se ha descrito en el apartado 1.3.3.

1.3.6 Selección de BAL e identificación fenotípica

1.3.6.1 Preparación del inóculo

Se preparó una suspensión celular a partir de 3-4 colonias de cada cultivo puro que fueron inoculadas en 5 mL de caldo MRS pH 6,5. Los tubos así preparados se incubaron a 30 °C hasta observar turbidez (~ 12 h, en general), luego se tomó una alícuota y se inoculó bajo las mismas condiciones durante dos veces. Después de 12 h de incubación (final de fase exponencial), las células de la última transferencia, se recolectaron por centrifugación (4000 g, durante 10 min), se lavaron dos veces con solución fisiológica estéril y, se resuspendieron en el mismo diluyente a fin de obtener una DO_{560nm}= 1.0. Esta suspensión celular se utilizó para inocular los medios de pruebas al 2% (v/v) lo que correspondió a una densidad celular inicial ~ 1-2 x 10⁷ ufc/mL.

1.3.6.2 Selección de BAL en medio MRS, pH 4,5 y 5,5

Se evaluó las repuestas de crecimiento de 157 aislados clasificados como BAL en medio MRS ajustado a pH 5,5 y 4,5 a 48 h de incubación a 30 °C. El crecimiento se determinó por medidas de turbidez (DO_{560nm}) según se indicó en el apartado 1.3.3 y, se establecieron los porcentajes de crecimiento relativo al control (MRS, pH 6,5) aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Crecimiento (\%)} = DO_{\text{prueba}} \times 100 / DO_{\text{control}}$$

Donde,

- DO: densidad óptica a 560nm; - prueba: MRS ajustado a pH 5,5 ó 4,5; - control: MRS ajustado a pH 6,5

Se seleccionaron aquellos aislados cuyos crecimientos fueron superiores a 80% en ambas condiciones de cultivo.

Esta propiedad fue considerada como primer criterio de selección debido a que el pH (generalmente ácido) de las matrices vegetales representa una barrera principal de control microbiano y, el objetivo general de este trabajo de Tesis es seleccionar cepas para su potencial aplicación como agentes de biocontrol de frutas y/u hortalizas frescas o MP.

A continuación, los cultivos puros de las bacterias seleccionadas se caracterizaron fenotípicamente a nivel de género mediante pruebas morfológicas, de tinción, fisiológicas y bioquímicas. En este estudio se utilizaron como referencia las siguientes cepas de nuestro laboratorio: *L. plantarum* N4 y N8, *L. brevis* JNB23 (Pérez, 2013) y *Ln mesenteroides* ssp *mesenteroides* Tsc (Sajur y col., 2007)

1.3.6.3 Pruebas de tinción, bioquímicas y fisiológicas ensayadas

1.3.6.3.1 Pruebas de tinción. Se realizaron coloraciones simples, de Gram y diferencial a fin de determinar morfología, tamaño relativo y disposición celular, carácter Gram y presencia de endosporas respectivamente.

Capítulo 1

Coloración simple: El extendido secado y fijado por calor en portaobjeto se cubrió con solución colorante azul de metileno. Después de 3 a 5 min de acción, el exceso de colorante fue eliminado y el portaobjeto lavado suavemente con abundante agua (diferenciador). Las bacterias se colorearon de azul oscuro.

Coloración de Gram: Se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Harrigan y McCance (1976) empleando violeta de genciana o cristal violeta (colorante primario), solución de iodo-ioduro de potasio (mordiente), la mezcla alcohol absoluto-acetona como diferenciador y, fucsina fenicada de Ziehl (colorante de contraste). Las bacterias de color violeta, se clasificaron Gram positivas. Las decoloradas por el diferenciador y re-coloreadas por el colorante de contraste de color rojo, Gram negativas.

Coloración de Shaeffer-Fulton: El extendido secado y fijado en portaobjeto se coloreó con verde de malaquita en presencia de calor hasta emisión de vapores durante 10 min, se lavó con abundante agua; y se agregó el colorante de contraste fucsina básica recubriendo el extendido durante 3 min. Luego, se lavó con abundante agua, se dejó secar y se observó al microscopio óptico. Las esporas se observaron de color verde y las formas vegetativas de rojo.

La observación microscópica de los preparados coloreados se realizó con una magnificación de 100x, previo agregado de aceite de cedro para el examen por inmersión.

1.3.6.3.2 Prueba de la catalasa: Se colocó 10 µl de inóculo en un portaobjeto adicionado con agua oxigenada de 10 volúmenes. El desprendimiento de burbujas, debido a la acción de la enzima catalasa bacteriana que descompone el peróxido de hidrógeno liberando oxígeno, indicó resultado positivo. La lectura de la reacción se realizó hasta 10 minutos después del agregado del reactivo.

1.3.6.3.3 Motilidad: Se prepararon tubos con medio de cultivo MRS semisólido, pH 7,3. Los aislados se sembraron con aguja por picadura hasta una profundidad de 1,2 cm e incubaron a 30 °C durante 72 h. Si el microorganismo es móvil el crecimiento se propaga desde la línea de inoculación, provocando turbidez. En caso contrario desarrolla sólo a lo largo de la línea de inoculación y, el medio circundante se mantiene claro.

Capítulo 1

1.3.6.3.4 Tipo de fermentación ácido láctica: Para diferenciar entre metabolismo homofermentativo y heterofermentativo, los aislados se inocularon en medio Gibson descrito en el apartado 1.3.3 e incubaron a 30 °C hasta crecimiento visible. Las cepas con metabolismo heterofermentativo se evidenciaron por la aparición de resquebrajamiento del medio agarizado como consecuencia de la formación de dióxido de carbono mientras que, las cepas con metabolismo homofermentativo no modificaron el aspecto del medio.

1.3.6.3.5 Hidrólisis de arginina: Las células se cultivaron en el medio arginina descrito en el apartado 1.3.3 e incubaron a 30 °C durante 48 h. La producción de amoníaco a partir de la hidrólisis de arginina se determinó utilizando el reactivo de Nessler. La aparición de un color rojo ladrillo indicó resultado positivo.

1.3.6.3.6 Fermentación de azúcares: Se evaluó la capacidad de las bacterias para fermentar diversos hidratos de carbono (1%, v/v) en medio MRS-pbc adicionado con campanita de Durham invertida. Los medios inoculados fueron incubados a 30 °C. Tras 72 h de incubación se observaron los diferentes resultados: - Sin fermentación del azúcar (color púrpura); - fermentación del azúcar sin producción de gas (color amarillo), - fermentación del azúcar con producción de gas (color amarillo y burbuja en campana Durhman). Los resultados negativos se evaluaron hasta 96 h considerando la presencia de bacterias fermentadoras lentas

1.3.6.3.7 Producción de dextrano: Las bacterias se sembraron en medio de cultivo Garvie descrito en el apartado 1.3.3, y se incubaron a 30 °C durante 7 días. Al final de la incubación, la producción de polisacárido se determinó cualitativamente a través de la observación de colonias mucoides.

1.3.6.3.8 Crecimiento a diferentes temperaturas: Para determinar la capacidad de los aislados de crecer a distintas temperaturas se utilizó el protocolo descrito por Mohd Adnan y Tan (2007). Las células se inocularon en caldo MRS-pbc (apartado 1.3.3), e incubaron en microaerofilia a 15, 30 y 45 °C durante 7 días. Luego de este tiempo, la presencia de turbidez y el viraje del indicador de color violeta a amarillo indico resultado positivo.

Capítulo 1

1.3.6.3.9 Crecimiento a diferentes valores de pH: Se evaluó la capacidad de las bacterias en estudio para crecer a pH ácido, neutro y básico. Para ello se empleó medio MRS-pbc ajustado a pH 4,0; 7,0 y 9,0. Los cultivos se incubaron a 30 °C durante 7 días; posteriormente, los resultados se interpretaron de acuerdo a lo descrito en el apartado 1.3.6.3.8.

1.3.6.3.10 Tolerancia a NaCl: La tolerancia de las BAL a diferentes concentraciones de NaCl se determinó cualitativamente empleando el medio MRS-pbc suplementado con 2,5; 5,0; y 7,5% (p/v) de NaCl. La incubación de los cultivos e interpretación de los resultados se realizó según lo descrito en el apartado 1.3.6.3.8.

1.3.7 Actividad antibacteriana de BAL

Se realizó una extensa caracterización "in vitro" de la actividad antagónica de 104 BAL; 81 aislados provenientes de muestras de EF o EH y 23 cepas pertenecientes a nuestro cepario (Tabla 1.1). Las pruebas de inhibición se realizaron frente a cuatro cepas bacterianas procedentes de American Type Culture Collection y una cepa aislada de muestra clínica de un hospital público de Tucumán, Argentina (Rodríguez Vaquero y col., 2007). Las mismas fueron seleccionadas como indicadores de microorganismos patógenos causantes de enfermedades transmitidas por vegetales: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), dos cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922 y ATCC 700), *Salmonella* Typhimurium (ATTC 14028) y *Listeria monocytogenes* respectivamente. Las cepas indicadoras se propagaron rutinariamente en medio BHI a 37 °C. Los cultivos puros se conservaron en el mismo medio en estado sólido a 4 °C y, por congelación a -20 °C con 20 % (v/v) de glicerol estéril por un período largo de tiempo.

1.3.7.1. Ensayo de la gota

La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de la gota descrito por Trias y col. (2008) con algunas modificaciones. Alícuotas (5 µL) de cada cultivo activo de las cepas bacterianas crecidas en medio MRS, pH 6,5 durante 12 h a 30 °C, se sembraron en agar MRS ($1-2 \times 10^7$ ufc/mL), se dejaron reposar durante 30 min a temperatura ambiente e incubaron a 30 °C durante 24 h. Una vez

desarrolladas las colonias, las placas se cubrieron con 10 ml de medio BHI semisólido conteniendo 2% (v/v) de un cultivo activo de cada cepa indicadora para obtener una concentración final de $1-2 \times 10^6$ ufc/mL. Las placas se incubaron aeróbicamente a 37 °C durante 48 h. La zona de inhibición alrededor de las colonias se determinó utilizando una regla calibrada y la actividad antibacteriana se clasificó como: - Sin inhibición (0 mm); - Baja (hasta 10 mm); - Moderada (11 a 21 mm) ó - Fuerte (mayor a 21 mm).

En base a los resultados obtenidos se seleccionaron las BAL que mostraron actividad antimicrobiana fuerte al menos frente a tres de las cinco cepas indicadoras ensayadas. Las pruebas se realizaron por triplicado en 2 ensayos independientes y se realizaron cultivos control de todas las cepas indicadoras para comprobar su viabilidad.

1.3.7.2 Caracterización de la actividad antimicrobiana en sobrenadantes de cultivos

Para caracterizar la naturaleza de la actividad antimicrobiana se emplearon sobrenadantes de cultivo libre de células (SCL) según la técnica descrita por Trias y col. (2008). Los SLC de cada BAL crecida en medio MRS, pH 6,5 durante 24 h a 30 °C (fase estacionaria de crecimiento) fueron obtenidos luego de remover las células por centrifugación (4000 g durante 20 min a 4 °C) y, esterilizarlos por filtración usando membranas de 0,22 µm de poro (Millipore, Merck).

Los SLC se separaron en las siguientes fracciones: - Fracción A: consistió de SLC cuyo pH fue neutralizado con NaOH 0,1N para poner en evidencia inhibición por presencia de ácidos orgánicos; - Fracción B: consistió de SLC neutralizado y tratado con catalasa (Sigma-Aldrich, EU) a una concentración final de 0,1 mg/mL a 37 °C durante 1 h para evidenciar la producción de peróxido de hidrógeno; - Fracción C: consistió de SLC neutralizado y tratado con tripsina (Sigma Aldrich, EU) a una concentración final de 1 mg/mL durante 1 h a 37 °C para detectar la presencia de bacteriocina. Las reacciones enzimáticas (Fracción B y C) fueron incubadas a 67 °C durante 10 min para su detención, antes de realizar el ensayo de actividad antimicrobiana. 100 µl de cada SLC (control y fracciones tratadas) se inocularon por triplicado en 100 µl de medio BHI conteniendo 10^6 ufc/mL de cada cepa indicadora. Además, 100 µl de medio MRS estéril se inoculó en medio BHI conteniendo 10^6 ufc/mL de

cada cepa indicadora como control positivo de crecimiento y se ensayaron en cultivos de microplaca (Molecular Devices, CA, EU). Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C.

La actividad antimicrobiana de SLC se evaluó frente a *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *E. faecalis*. El crecimiento fue considerado positivo cuando la densidad óptica fue mayor que 0,1 unidad. La Figura 1.2 muestra el diagrama del procedimiento.

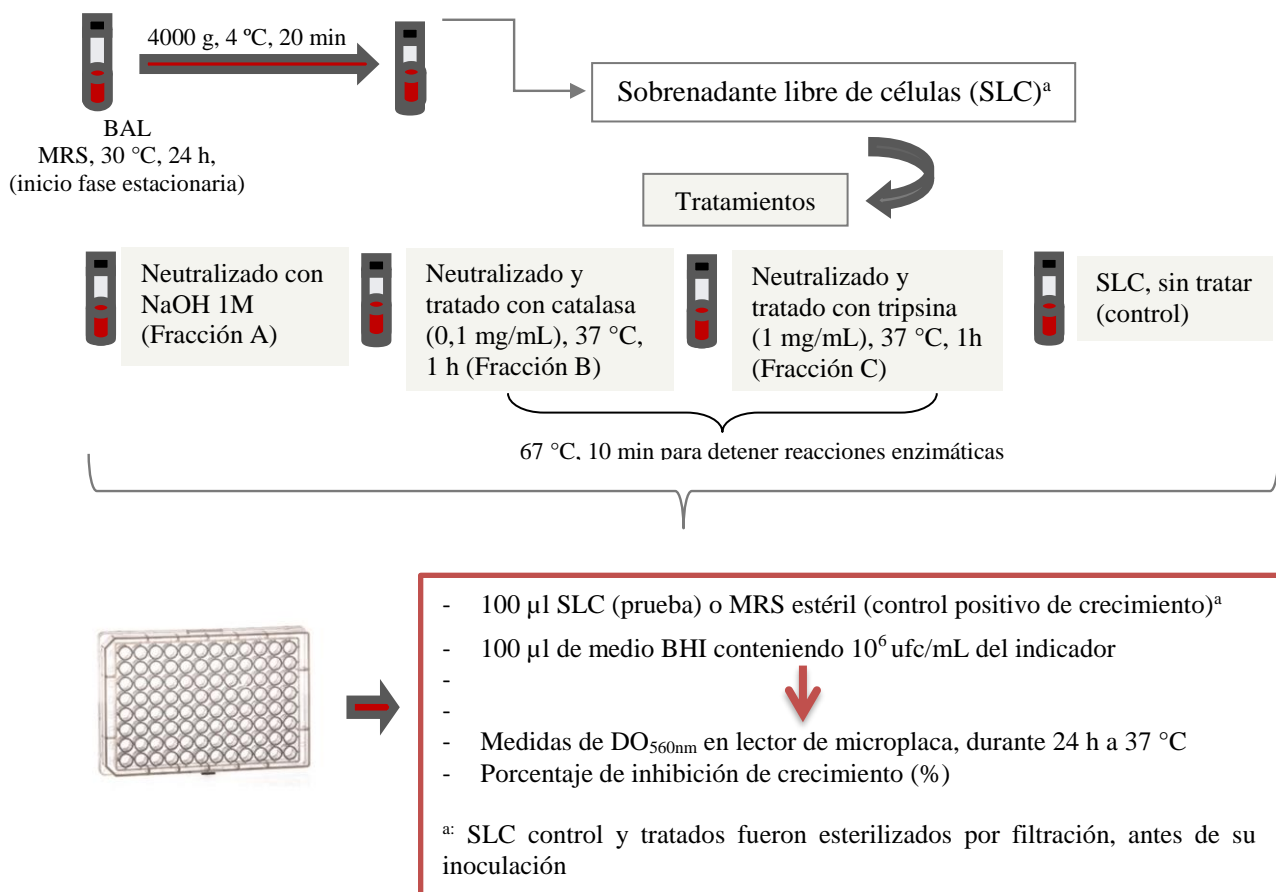


Figura 1.2 Diagrama del procedimiento empleado para la obtención de SLC bajo diferentes condiciones y ensayo de actividad antibacteriana.

Para detectar diferencias entre las actividades antibacterianas de los SLCs sin tratar y tratados se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis (también conocido como test H) para cada variable. A partir de las medianas obtenidas se establecieron los porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 - (\text{DO}_{\text{MeSLC,BAL}} \times 100 / \text{DO}_{\text{MeControl}})$$

Donde,

- DO: densidad óptica a 560nm a 24 h de incubación
- SLC, BAL: sobrenadante de cultivo de BAL de prueba; - Control: sin SLC

A continuación, se seleccionaron las cepas de BAL que mostraron actividad inhibitoria fuerte ($\geq 70\%$) debida a acidez al menos frente a dos del total de tres cepas indicadoras ensayadas, a las que presentaron actividad inhibitoria F ó I asociada a acidez y/u otra sustancia y, actividad inhibitoria F ó I contra una cepa indicadora Gram positiva y una Gram negativa.

Cabe destacar que la misma experiencia se realizó empleando SCLs obtenidos de cultivos bacterianos en medios MRS modificado de las siguientes maneras:

- Disminución de glucosa de 20 a 2 g/L (MRS0.2)
- Adición de fructosa y ácido L-málico (5 g/L) (MRSFM).

En ningún caso se observaron diferencias significativas con respecto a los resultados obtenidos con SLC de cultivos en medio MRS (control). Por lo tanto dichos datos experimentales no se muestran en la sección Resultados y Discusión.

1.3.7.3 Modo de acción de SLC

El modo de acción (bacteriostático o bactericida) de las sustancias antagónicas presentes en SLC sin tratar y neutralizado de las 19 cepas seleccionadas se evaluó frente a *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *E. faecalis*. Los SLC obtenidos según se indicó en el punto 1.3.7.2, se inocularon en medio BHI conteniendo 10^6 ufc/mL del microorganismo indicador, ambos en iguales proporciones e incubaron a 37 °C durante 24 h. Se usó como control positivo medio MRS estéril en lugar de SLC. El crecimiento se cuantificó mediante el método de diluciones sucesivas (ufc/mL).

1.3.8 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos a partir de dos o tres experiencias independientes se sometieron a

análisis estadístico empleando el programa Infostat (70). Se empleó el análisis de varianza (ANOVA) utilizando la prueba de Tukey para realizar comparaciones múltiples de las medias. Para ensayos de actividad antimicrobiana de SLC en cultivos de microplaca se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para realizar comparaciones múltiples de las medianas. La significancia estadística se determinó para $P < 0,05$.

1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4.1 Cuantificación de la carga microbiana de EF y EH. Aislamiento de BAL

La tendencia actual en alimentación se refleja en un aumento de popularidad de productos frescos, listos para consumo. Entre ellos, el consumo de frutas y verduras cortadas aumentó fuertemente. Sin embargo, no hay todavía suficiente información sobre su calidad microbiológica y, menos aún en productos de elaboración local. En este contexto se cuantificó la carga microbiana de ensaladas de frutas (EF) y de hortalizas (EH), listas para consumo, empleando los medios de cultivos PCA, agar MRS-C y agar Mac Conkey para el recuento de aerobios totales, BAL y coliformes respectivamente. Cabe destacar que los recuentos microbianos medios expresados, como log ufc/g no mostraron variaciones significativas ($P < 0,05$) dependiendo del origen de la muestra para cada tipo de ensalada analizada (Datos no mostrados). Por lo tanto, para el análisis se consideraron los valores promedios de los recuentos medios de cada muestra para cada tipo de ensalada analizada.

Los recuentos microbianos totales variaron de 10^3 a 10^8 ufc/g y, fueron significativamente más altos en EF que en EH (Tabla 1.2), en concordancia con resultados fueron informados por Graca y col. (2017) y Faour-Klingbeil y col. (2016) para EF elaborada con mango, papaya, melón, piña y frutilla en Portugal y ensalada de vegetales frescos elaborada en la República del Líbano respectivamente. Sin embargo, Abadías y col. (2008) reportaron mayores recuentos totales en EH (compuesta por tomates y lechuga frescas) que en EF (manzana, piña, naranja, mango y melocotón) correspondientes a 7,5 y 4,0 U log (unidades logarítmicas), respectivamente.

Capítulo 1

En el presente estudio, en las muestras de EF los mayores recuentos microbianos promedios fueron determinados en agar MRS-C ($9,5 \times 10^7$ y $1,9 \times 10^7$ ufc/g para el jugo y las frutas respectivamente) y, estuvieron representados principalmente por colonias bacterianas redondeadas, de bordes enteros, de color blanco sin brillo, capaces de crecer en condiciones anaeróbicas, sugiriendo que pertenecieron al grupo de las BAL (Figura 1.3). En medios PCA o Mac Conkey los recuentos promedios fueron 0,3 ó 4,6 y 0,4 ó 3,7 U log menores que los obtenidos en agar MRS-C para el jugo y las frutas respectivamente (Tabla 1.2) y, estuvieron representados principalmente por colonias de tipo levaduriformes y en menor proporción bacterianas en medio PCA, mientras que en agar Mac Conkey se observaron colonias rosadas e incoloras (éstas últimas mayoritariamente), algunas mucoides, catalasas positivas típicas de *Enterobacteriaceae*. De este modo, las BAL constituyeron la microbiota predominante de muestras de EF de elaboración local en coincidencia con resultados informados por otros autores (Oms-Oliu y col., 2010; Pasha y col., 2014; Graca y col., 2017). La predominancia de BAL podría estar relacionada a : (i) mayor disponibilidad de azúcares y otros nutrientes presentes en EF, (ii) ventaja selectiva como es su resistencia a ácidos orgánicos presentes en el medio natural y/o (iii) rasgos antagónicos tales como la capacidad para producir metabolitos con actividad antimicrobiana (Oms-Oliu y col., 2010 y Pasha y col., 2014), propiedad de gran interés en función de los objetivos propuestos en el presente estudio. De acuerdo a Francis y col. (2012) y Beuchat (2002) la supervivencia y el crecimiento de microorganismos son dependientes de su capacidad de adaptación a condiciones de estrés, así como de su comportamiento en poblaciones mixtas, tales como competencia, antagonismo y sinergismo. En el presente estudio, la detección de colonias presumiblemente de Enterobacterias en el orden de 10^3 ufc/g en medio Mac Conkey constituye un riesgo para la salud del consumidor. Coincidentemente, Pérez (2013) detectó la presencia de *Enterobacteriaceae* en la superficie de naranjas provenientes de una verdulería de mercado de la ciudad de San Miguel de Tucumán. Abadías y col. (2006) describieron que los niveles de Enterobacterias en las superficies de manzana determinados desde su cosecha hasta la venta al público en mercado, incrementaron significativamente en la última etapa probablemente debido a la interrupción de la cadena de frío o por la inadecuada manipulación del

Capítulo 1

alimento en los puestos de venta al público. De acuerdo a Guzewich y Roos (1999) microorganismos patógenos llegan, en general, a los alimentos procesados a través de manos contaminadas con organismos del tracto gastrointestinal.

Contrariamente a lo observado en EF, los recuentos promedios de las muestras de EH determinados en medios PCA y Mc Conkey (orden de 10^3 ufc/g) resultaron ~ 1 U log mayor que en agar MRS-C (Tabla 1.2). Coincidentemente en medio PCA, desarrollaron principalmente colonias de tipo levaduriformes y, en menor proporción bacterianas. Este resultado sugirió la predominancia de levaduras en una proporción ligeramente mayor que de BAL y no-BAL en EH. Sin embargo, Sajur y col. (2007) reportaron que las BAL constituyeron la microbiota predominante de la superficie de tomates cultivados en nuestra región en coincidencia con los resultados publicados por Drosinos y col. (2000) quienes demostraron que la población microbiana de la superficie de tomates estuvo constituida por BAL (4,15 U log.), *Enterobacteriaceae* (2,80 U log.) y levaduras (2,10 U log.). Las diferencias encontradas entre el presente estudio y los citados autores podrían estar relacionadas con el procesamiento mínimo del tomate y la presencia de otros vegetales en la EH. Una gran variedad de factores contribuyen a la contaminación de frutas y hortalizas por microorganismos tanto saprófitos como patógenos para el hombre, algunos de ellos de riesgo para la calidad microbiológica del producto tales como el uso de agua contaminada, procesos inadecuados en los campos de cultivo, cosecha y transporte, prácticas deficientes de desinfección, condiciones deficientes de higiene durante el procesamiento, manipulación y almacenamiento del alimento (Froder y col., 2007; Sánchez y col., 2012).

Considerando, que en ambas matrices alimentarias se obtuvieron recuentos positivos de microorganismos potencialmente patógenos y alterantes en agar Mac Conkey (10^2 - 10^3 ufc/g) y PCA es evidente que, el aislamiento de BAL autóctonas con actividades antagónicas relevantes resulta de gran interés en función de una potencial aplicación biotecnológica.

Tabla 1.2 Cuantificación de la carga microbiana presente en ensaladas de frutas (EF) y hortalizas (EH) de elaboración local.

Medio de cultivo	Recuentos microbianos (ufc/g) ^a		
	Ensalada de Frutas		Ensalada de Hortalizas
	Jugo	Frutas	Hortalizas
PCA	$4,52 \times 10^7 \pm 2,61 \times 10^{6a}$	$3,71 \times 10^6 \pm 1,96 \times 10^{5a}$	$1,36 \times 10^3 \pm 7,52 \times 10^{2a}$
Agar MRS-C	$9,55 \times 10^7 \pm 7,64 \times 10^{6a,c}$	$1,03 \times 10^7 \pm 4,15 \times 10^{5a,b}$	$1,05 \times 10^2 \pm 4,51 \times 10^{a,b}$
Agar Mac Conkey	$2,45 \times 10^3 \pm 1,47 \times 10^{2b}$	$2,04 \times 10^3 \pm 1,02 \times 10^{2c}$	$5,2 \times 10^2 \pm 2,30 \times 10^{1b}$
Recuento Total*	$1,40 \times 10^8 \pm 6,8 \times 10^{6c}$	$1,40 \times 10^7 \pm 6,4 \times 10^{5b}$	$1,98 \times 10^3 \pm 9,50 \times 10^{2a}$

^a: Valor promedio obtenido a partir de los recuentos medios de cada muestra cuyas variaciones no fueron significativas entre sí.

*Recuento Total: sumatoria de los recuentos promedios determinados en cada medio de cultivo.

Valores con diferentes letras como superíndices dentro de cada columna son significativamente diferentes de acuerdo al test de Tukey ($P < 0,05$).

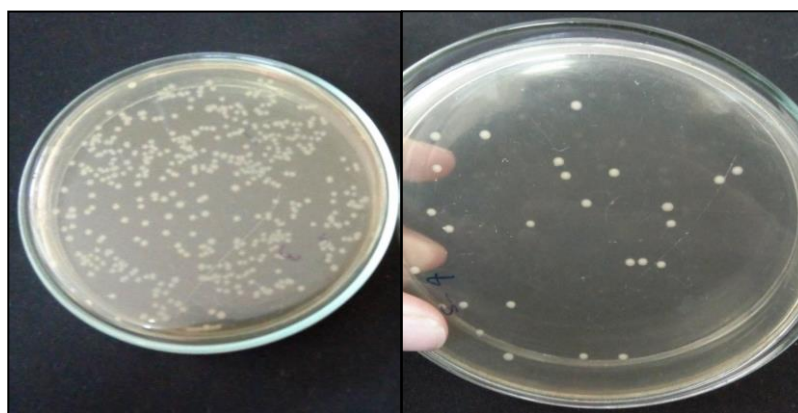


Figura 1.3. Bacterias lácticas de EF crecidas en agar MRS-C (suplementado con 2,0 µg/mL de cicloheximida).

1.4.2 Aislamiento y selección de BAL

De las placas de MRS-C y, en menor proporción de PCA utilizadas en los recuentos microbianos, se obtuvieron 234 aislados (140 de EF y 60 de EH y, 20 de EF y 14 de EH respectivamente) que fueron purificados y sometidos a pruebas fenotípicas. Del total de bacterias aisladas, 157 (67%) resultaron ser cocos o bacilos Gram positivos, catalasa negativos e inmóviles y, fueron clasificadas como BAL. El resto de los aislados, provenientes principalmente de medio PCA y

Capítulo 1

EH, fueron identificados como levaduras y bacilos Gram negativos, catalasa positivos, y en una muy pequeña proporción, como cocos dispuestos en racimos o de a pares con reacciones de Gram y catalasa positivas, potencialmente patógenos. Soares y col. (2012) informaron la presencia de *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus* en manos de 53,3% del personal encargado de manipular alimentos en escuelas de Brasil, aun cuando los mismos fueron instruidos con respecto a la inocuidad de los alimentos.

A continuación, se investigó las respuestas de crecimiento de los 157 aislados identificados como BAL en medio MRS ajustado a pH 4,5 o 5,5. Los resultados obtenidos demostraron que un 51% del total de las bacterias ensayadas alcanzó un crecimiento > 80% relativo al control a ambos valores de pH, de las cuales un 53,3% y 48,1% provenían de EF y EH respectivamente (Tabla 1.3), indicando que no hubo variaciones significativas en sus comportamientos dependiendo del origen de las muestras. Las frutas y hortalizas tienen, en general valores de pH bajos (Holdsworth, 2002), siendo este efecto más pronunciado en las frutas, tales como el tomate presente en la EH y, las manzanas o naranjas presentes en la EF. De este modo, el alto porcentaje de BAL capaces de crecer eficientemente a pH 4,5 y 5,5 podría reflejar una respuesta adaptativa al hábitat natural (Savino y col., 2012). Por otro lado, la posibilidad de crecer a valores bajos de pH les otorgaría a las células una ventaja competitiva para desarrollar en los medios naturales, más o menos ácidos, en relación con otros microorganismos contaminantes e indeseables.

Los aislados clasificados como BAL y seleccionados (81) por sus respuestas de crecimiento en medio MRS ajustado a valores bajos de pH fueron identificados fenotípicamente a nivel de género.

Tabla 1.3. Aislados de EF y EH con crecimiento mayor a 80% en medios ácidos relativo al control

Crecimiento > al 80% relativo al control (MRS, pH 6,5)		
MRS ajustado a pH	Código de aislados de EF ^a	Código de aislados de EH
5,5	EFj1, EFj3, Efj7, EFj12, EFj15, EFj16, EH1, EH2, EH3, EH4, EH5, EH6, EH7, EFj18, EFj21, EFj24, EFj27, EFj28, EH8, EH9, EH10, EH11, EH12, EH13, EFj30, EFj31, EFj34, EFj36, EFj37, EH14, EH15, EH16, EH17, EH18, EFj39, EFj40, EFj42, EFj45, EFj47, EH19, EH20, EH22, EH23, EH24, EFj48, EFj49, EFj50, EFj51, EFj52, EH25, EH27, EH28, EH34, EH40, EFj53, EFj59, EFj60, EFj61, EFj63, EFf2, EH52, EH59, EH61, EFf3, EFf5, EFf6, EFf10, EFf15, EFf20, EFf23, EFf25, EFf27, EFf29, EFf32, EFf33, EFf34, EFf35, EFf37, EFf38, EFf42, EFf41, EFf47, EFf48, EFf49, EFf50, EFf51, EFf52, EFf53, EFf56, EFf59, EFf60, EFf63, EFf71, EFf79, EFf84, EFf91	
4,5	EFj1, EFj3, EFj7, EFj12, EFj16, EFj18, EH1, EH2, EH3, EH4, EH6, EH7, EH8, EFj21, EFj24, EFj27, EFj28, EFj30, EH9, EH11, EH12, EH13, EH14, EFj31, EFj34, EFj36, EFj37, EFj39, EH15, EH16, EH17, EH18, EH19, EFj40, EFj42, EFj47, EFj48, EFj49, EH20, EH22, EH23, EH24, EH25, EFj50, EFj51, EFj52, EFj53, EFj59, EH27, EH34, EFj60, EFj61, EFj63, EFf2, EFf3, EFf6, EFf10, EFf15, EFf20, EFf23, EFf25, EFf27, EFf29, EFf32, EFf33, EFf34, EFf35, EFf37, EFf38, EFf42, EFf47, EFf48, EFf49, EFf50, EFf51, EFf52, EFf53, EFf56, EFf59, EFf60, EFf63, EFf71, EFf79, EFf84, EFf91	

En negrita se indican los microorganismos seleccionados, capaces de crecer eficientemente a ambos valores de pH ácidos ensayados.

1.4.3 Identificación fenotípica de BAL

La identificación fenotípica de las BAL seleccionadas demostró que todas las cepas presentaron catabolismo fermentativo de glucosa, correspondiendo un 65% a bacilos homofermentativos (Grupo I y III) mientras que el 35% restante fueron heterofermentativos obligados (Grupo II y IV) de acuerdo a los resultados obtenidos en medio Garvie. Este resultado estuvo en concordancia con Savino y col. (2012) quienes reportaron que la mayoría de las BAL aisladas de manzanas (85%) presentaron metabolismo homofermentativo. Sin embargo, Pérez (2013) encontró que la microbiota predominante en jugo de naranja estuvo constituida principalmente por bacterias

heterofermentativas obligadas.

En el presente estudio las BAL fueron divididas en 4 grupos de acuerdo a sus características morfológicas y fisiológicas según se indica en las Tablas 1.4. y 1.5.

Grupo I: Constituido por 38 aislados provenientes de EF (35) y EH (3) con metabolismo homofermentativo a partir de glucosa y morfología celular de bacilos cortos dispuestos de a pares o en cadena cortas e, incapacidad para hidrolizar arginina (Figura 1.4). Entre las BAL de este grupo se observó un alto grado de homogeneidad en cuanto a las características fenotípicas ensayadas y fueron asignados a la especie *L. plantarum*. Todas ellas produjeron ambos isómeros, D y L, del ácido láctico a partir de glucosa, no desarrollaron colonias de tipo mucoides en medio Garvie, lo que descartó la posibilidad de formar dextrano a partir de sacarosa, crecieron a 45 y 15 °C, a valores de pH 7,0 y 4,0 y en presencia de 7,5% de NaCl. Curk y col. (1996) y Perez (2013) reportaron que las cepas *L. plantarum* ATCC 4917 y JNB25 toleraron niveles de 8 y 7,5% de NaCl, respectivamente. La presencia de NaCl puede ejercer un efecto inhibitor sobre el crecimiento bacteriano al producir cambios en la osmolaridad, afectando funciones esenciales de las células. Como respuesta al este estrés salino las bacterias utilizan mecanismos de protección que normalmente consisten en la acumulación de sustancias osmoprotectoras como prolina, glicina-betaína o glutamato (Champomier-Vergès y col., 2002), las cuales han sido ampliamente demostradas en especies como *L. plantarum* y *Lactococcus lactis* (Van de Guchte y col., 2002). Por otro lado, Ricciardi y col. (2005) demostraron que entre 55 cepas de *L. plantarum* ensayadas solamente dos fueron capaces de producir dextrano a partir de sacarosa. Coincidiendo con nuestro resultado, Sánchez y col. (2000) ha descrito que la mayoría de los aislados de muestras de salmuera identificados como *L. plantarum* fueron capaces de crecer a 45 °C, en contra de los criterios definidos para esta especie por Kandler y Weiss (1986). Las bacterias en estudio fermentaron arabinosa, esculina, glucosa, rafinosa y manitol, siendo incapaces de fermentar D-xilosa, un azúcar típicamente utilizado por *Lactobacillus pentosus* (Zanoni y col., 1987). Además, todas las BAL de este grupo fueron capaces de utilizar α -metil-D manósido, usualmente catabolizado por *L. plantarum* pero no por *Lactobacillus paraplantarum* (Bringel y col., 1996) y presentaron un comportamiento similar a las cepas de

referencias *L. plantarum* N4, N8 y JNB25 (Pérez y Saguir, 2012; Pérez, 2013).

Grupo II: constituido por 13 BAL aisladas de EF (8) y en menor medida de EH (5) con metabolismo heterofermentativo obligado en oposición a los aislados del grupo I, aunque con morfología celular de bacilos dispuestos de a pares o en cadena cortas. A diferencia del grupo I, todas las cepas testeadas exhibieron habilidad para hidrolizar arginina (Figura 1.4) y producir principalmente el isómero D-ácido láctico a partir de glucosa. Fueron capaces de fermentar arabinosa, esculina, glucosa, rafinosa y en forma variable manitol pero no sorbosa. Al igual que en el Grupo I, no formaron colonias mucoides en medio Garvie. El crecimiento fue positivo a 15 °C y a valores de pH de 4,0 y 9,0 excepto para el aislado EH11 que no desarrolló a pH alcalino. A 45 °C, fue variable. En este grupo la mayoría de las cepas no desarrollaron a 7,5% de NaCl; sin embargo, si lo hicieron en presencia de 5 y 2,5% de NaCl. En base a las pruebas fenotípicas ensayadas se identificó a los aislados de este grupo como pertenecientes a la especie de *L. brevis*.

Grupo III: constituido por 15 aislados de EF (8) y EH (7), resultando así la distribución bastante uniforme entre las muestras analizadas. Las bacterias de este grupo presentaron morfología cocoide con metabolismo homofermentativo a partir de glucosa, capacidad para hidrolizar arginina, fermentar rafinosa y en forma variable manitol. En medio Garvie no produjeron colonias mucoides ni desarrollaron a 45 °C, excepto una de ellas, mientras que todas fueron capaces de crecer a 30 y 15 °C. Con respecto al crecimiento a diferentes valores de pH, alrededor del 50% exhibieron resultados positivos a pH 9,0 mientras que todos crecieron a pH 7,0 y 4,0. En presencia de 7,5% de NaCl, la mayoría de los aislados no crecieron, con excepción de uno de EF; sin embargo, en presencia de 5 y 2,5% de NaCl si lo hicieron. Todas las cepas testeadas produjeron principalmente el isómero L - del ácido láctico a partir de glucosa. En base a las pruebas fenotípicas ensayadas se presumió que estos aislados podrían pertenecer al género *Lactococcus*.

Grupo IV: constituido por 15 BAL aisladas de EF (3) y EH (12). Su morfología celular de cocos dispuestos de a pares o en cadenas cortas, metabolismo heterofermentativo obligado, producción del isómero D- del ácido láctico a partir de glucosa, incapacidad para hidrolizar arginina y capacidad

Capítulo 1

para crecer a 15°C pero no a 45°C permitió identificarlas como pertenecientes al género *Leuconostoc*. En concordancia con nuestros resultados, Lonvaud- Funel (1999); Hemme y Foucaud-Scheunemann (2004) y Sajur y col., (2007) describieron características generales semejantes para bacterias del género *Leuconostoc*. En medio Garvie, más del 50% de los aislados formaron colonias de tipo mucoide (Figura 1.5). Produjeron ácidos, en forma variable a partir arabinosa, rafinosa y manitol, crecieron a pH 7,0 y 4,0 y, variable a pH 9,0. La mayoría no creció en presencia de 7,5% de NaCl, con excepción de un aislado de EF y otro de EH mientras que, todos crecieron en presencia de NaCl a 5 y 2,5%. Características comunes en relación con la fermentación de azúcares, perfiles de crecimiento y capacidad para producir dextrano de ocho cepas aisladas principalmente de EH sugirieron que podrían identificarse con *Ln. mesenteroides*. En un estudio previo Sajur y col. (2007) demostraron que *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* fue la especie dominante en la superficie de tomates cultivados en el norte argentino.

Los resultados obtenidos demostraron, por primera vez, en muestras de EF y EH de elaboración local la presencia de cuatro géneros comunes de BAL con aptitud para crecer en medios ácidos, siendo *Lactobacillus* y *Leuconostoc* spp. mayoritarios en cada una de ellas respectivamente (Figura 1.6). Las pruebas fenotípicas ensayadas permitieron, además, inferir que en segundo lugar, *L. brevis* sería la especie dominante en EF mientras que, cocos heterofermentativos presumiblemente identificados como *Ln. mesenteroides* sería la especie dominante en EH. Este hecho estaría relacionado con una mejor adaptación a las condiciones de los medios naturales y a sus capacidades para iniciar más rápidamente sus crecimientos en comparación con las otras BAL. La predominancia de *Leuconostoc* spp. y, particularmente *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* en vegetales ha sido descrita por Nguyen-the y Carlin (2000) y Sajur y col. (2007). Además, se reportó la presencia *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. paraplantarum*, *L. hilgardii*, *Ln. mesenteroides* y *Lactococcus lactis* en vegetales fermentados naturalmente (Dahal y col., 2005; Tamang y col., 2005; Montet y col. 2006, Ponce y col., 2008; Paramithiotis y col., 2010; Di Cagno y col., 2010; 2013).

Tabla 1.4 Características fenotípicas y bioquímicas diferenciales de los grupos de BAL aisladas de EF

Características	Grupo I (37)	Grupo II (8)	Grupo III (8)	Grupo IV (3)
Morfología	BC de a pares o en cadenas cortas	B solos o de a pares	C	C de a pares o en cadenas cortas
Tipo de fermentación	Homofermentativo	Heterofermentativo	Homofermentativo	Heterofermentativo
Isómero del ácido láctico	D-L	Principalmente L	Principalmente L	D
Hidrólisis de Arg	-	+	v	-
Producción de ácidos a partir de:				
Arabinosa	v	+	ND	V
Esculina	+	+	ND	-
Glucosa	+	+	+	+
Rafinosa	+	v	v	V
Sorbosa	-	-	ND	-
Manitol	+	+	v	V
D-xilosa	-	ND	ND	ND
α -metil-D manósido	+	ND	ND	ND
*Crecimiento:				
Temperatura (°C)				
15	+	+	+	+
30	+	+	+	+
45	+	v	v	-
NaCl (%)				
2,5	+	+	+	+
5,0	+	+	+	+
7,5	v	v	v	V
pH				
4,0	+	+	+	+
7,0	+	+	+	+
9,0	v	+	v	+

C: Cocos; B: Bacilos; BC: Bacilos cortos. (): Número de microorganismos aislados e identificados

+: Reacción positiva; -: Reacción negativa

*: Sin desarrollo de turbidez ni cambio de color del indicador de pH indicó ausencia de crecimiento.

v: Variable (\pm)

ND: No determinado

Tabla 1.5 Características fenotípicas y bioquímicas diferenciales de los grupos de BAL aisladas y seleccionadas de EH

Características	Grupo I (1)	Grupo II (5)	Grupo III (7)	Grupo IV (12)
Morfología	BC de a pares o en cadenas cortas	B solos o de a pares	C	C de pares o en cadenas cortas
Tipo de Fermentación	Homofermentativo	Heterofermentativo	Homofermentativo	Heterofermentativo
Ácido láctico	D/L	Principalmente L	Principalmente L	D
Hidrólisis de Arginina	-	+	-	-
Fermentación de azúcares				
Arabinosa	+	+	ND	V
Esculina	+	+	ND	-
Glucosa	+	+	+	+
Rafinosa	+	v	v	V
Sorbosa	-	-	ND	-
Manitol	+	+	v	V
D-xilosa	-	ND	ND	ND
α -metil-D manósido	+	ND	ND	ND
*Crecimiento:				
Temperatura (°C)				
15	+	+	+	+
30	+	+	+	+
45	-	-	-	-
NaCl (%)				
2,5	+	+	+	+
5,0	+	+	+	+
7,5	-	-	-	V
pH				
4,0	+	+	+	+
7,0	+	+	+	+
9,0	+	V	v	V

C: Cocos; B: Bacilos; BC: Bacilos cortos. (): Número de microorganismos aislados e identificados

+: Reacción positiva; -: Reacción negativa

*: Sin desarrollo de turbidez ni cambio de color del indicador de pH indicó ausencia de crecimiento.

v: Variable (\pm) ND: No determinado

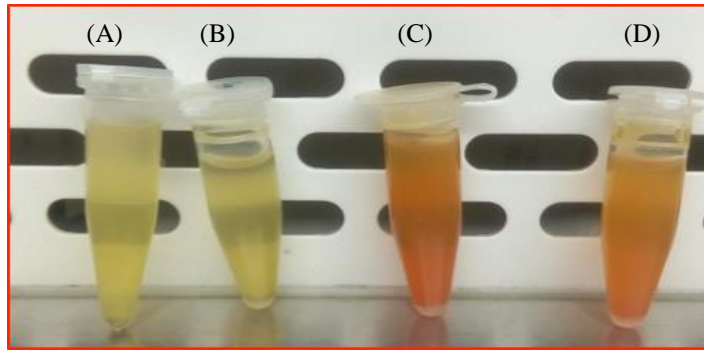


Figura 1.4 Hidrólisis de arginina por BAL aisladas de EF: *L. plantarum* EFj1 (A), *L. plantarum* EFf29 (B), *L. brevis* EFj52 (C) y, de EH: *Leuconostoc* spp. EH23 (D). Resultado negativo: color amarillo, resultado positivo: color rojo ladrillo.

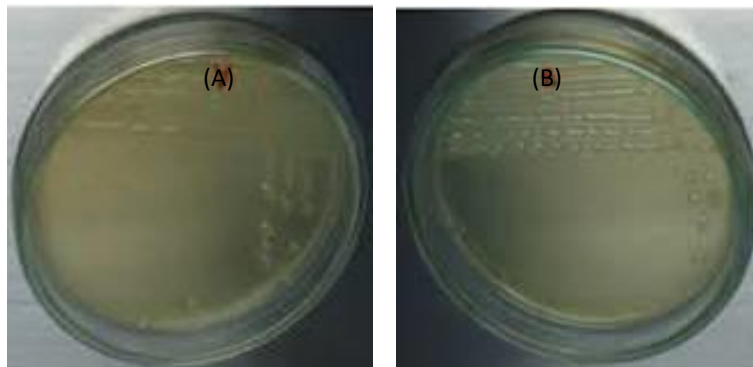


Figura 1.5 Producción de dextrano por BAL aisladas de EF (*Ln. mesenteroides* EFf25, A) y EH (*Lc. mesenteroides* EH23) evidenciado por el aspecto mucoide de las colonias en medio Garvie.

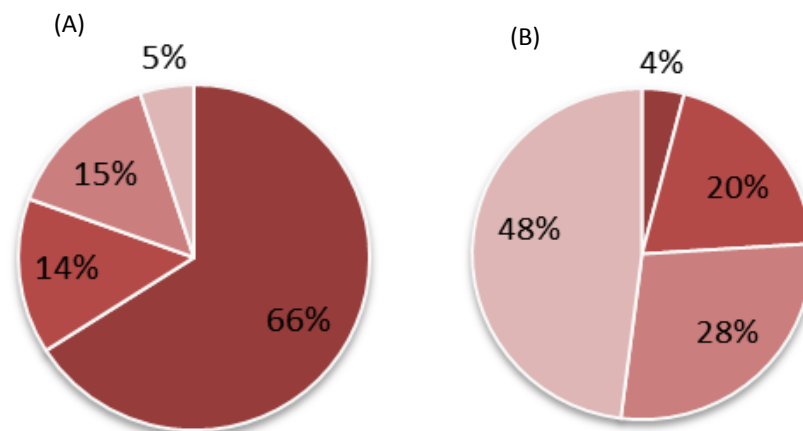


Figura 1.6. Distribución porcentual de BAL provenientes de muestras de EF (A) y EH (B) en cuatro grupos diferenciados fenotípicamente: Grupo I, identificado como *L. plantarum* (☛); Grupo II, identificado como *L. brevis* (☛); Grupo III, identificado como *Lactococcus* spp. (☛); Grupo IV, identificado como *Leuconostoc* spp. (☛)

Cabe destacar que las diferencias cuantitativas observadas en la composición de la microbiota láctica de las muestras de EF y EH analizadas estuvieron de acuerdo con resultados obtenidos en estudios previos por nuestro grupo de investigación. Por ejemplo: (i) Bacilos homo y heterofermentativos correspondientes al género *Lactobacillus* constituyeron la microbiota dominante en jugo de naranja obtenido de frutas cultivadas en la región, cuya identificación fenotípica y genotípica confirmó la presencia de *L. brevis* y *L. plantarum* como especies dominantes y en baja proporción de *Ln. sp.* (Pérez y Saguir, 2012; Pérez, 2013, Saguir y col., 2018). El jugo de naranja es un componente común de las EFs analizadas; (ii) *L. plantarum* fue la especie predominante en manzanas variedad Golden Delicious cultivadas en el noroeste argentino mientras que *L. brevis* fue la única especie común aisladas de las dos variedades de manzanas ensayadas (Red Delicious y Golden Delicious) (Savino y col., 2012). Manzana fue un ingrediente común de las EFs analizadas; (iii) la especie de *Ln. mesenteroides ssp. mesenteroides* fue dominante en la superficie de tomates cultivados en la provincia de Tucumán (Sajur y col., 2007; Sajur, 2015; Saguir y col., 2018). Los autores también informaron que la cepa *Ln. mesenteroides ssp. mesenteroides* Tsc podría ser usada para ayudar a controlar el desarrollo de microorganismos alterantes en tomates frescos y MP. Tomate estuvo presente en EH.

Las cepas seleccionadas y diferenciadas fenotípicamente se caracterizaron por sus actividades antimicrobianas frente a cinco cepas indicadoras (4 ATTC y un aislado de muestra clínica), cuyas especies han sido asociadas a intoxicaciones alimentarias debido al consumo de frutas y hortalizas frescas y MP.

1.4.4 Actividad antimicrobiana de BAL. Método de la gota

El estudio de la actividad antimicrobiana se realizó sobre un total de 104 BAL compuesto por 81 aislados de EF y EH seleccionados e identificados fenotípicamente durante este estudio y 23 cepas aisladas de frutas y hortalizas frescas sin procesar en estudios previos pertenecientes cepario (Tabla 1.2). Entre ellas, se ha demostrado la actividad antimicrobiana de *L. plantarum* N4, N8 y JP11 frente a *Staphylococcus aureus* 23922 y *Escherichia coli* ATCC 35218 lo que permitió usarlas, al mismo

Capítulo 1

tiempo, como cepas de referencias (Pérez, 2013; Rodríguez Vaquero y col., 2014). La actividad antimicrobiana se determinó por el método de la gota en dos ensayos experimentales independientes por triplicado. En las Tablas 1.6 y 1.7 se muestran los valores medios de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos ($P < 0,05$). Al mismo tiempo se representa el tipo de actividad antimicrobiana (I) con los siguientes colores: Rojo (Fuerte, F), verde (Moderada, M), Azul (Débil, D) y amarillo (Sin inhibición, SI), según se ha descrito en Materiales y Métodos.

Del total de bacterias analizadas, independientemente de su origen, 47,1% presentó actividad antagónica fuerte al menos frente a tres de las cinco bacterias indicadoras ensayadas lo que representó un total de 48 cepas, de las cuales 43,5 y 56,5% correspondieron a hortalizas o EH (H/EH) y frutas o ensaladas de frutas (F/EF) respectivamente. A su vez, esta propiedad ocurrió en orden decreciente a razón de 81,2%; 46,4%; 42,8% y; 28,0%; del total de cepas analizadas de hortalizas, EF, frutas, y EH respectivamente. Así, en términos cuantitativos, las cepas de EH resultaron las menos eficientes en relación a sus propiedades antibacterianas en oposición a las de hortalizas enteras mientras que las cepas de frutas y EF mostraron un comportamiento bastante homogéneo. Este hecho podría explicar la menor proporción de BAL aisladas de EH en oposición a lo determinado en EF en donde constituyeron la microbiota predominante compuesta principalmente por *L. plantarum*. Contrariamente, en EH se identificaron mayoritariamente cepas heterofermentativas pertenecientes al género *Leuconostoc*. Coincidentemente con nuestros resultados, Valerio y col. (2013) y Coman y col. (2014) describieron actividades antagónicas fuertes de cepas probióticas de *L. plantarum* y *Lactobacillus paracasei* contra *Salmonella enterica* y *L. monocytogenes* comparado con otras especies de BAL como *Ln. mesenteroides* y *L. brevis*. Los citados autores informaron diámetros de halos de inhibición similares a los observados en el presente estudio. Por otro lado, Angmo y col. (2016) estudiaron la actividad antibacteriana de BAL contra *Yersinia enterocolitica* y, en oposición a nuestros resultados detectaron halos con diámetros entre 1 y 10 mm, mientras que Siroli y col. (2015) informaron, en general, diámetros de halos intermedios cuando evaluaron las actividades antagónicas de BAL aisladas de manzanas y lechuga MP mediante la técnica de la gota frente a cepas de *E. coli*, *Salmonella enteritidis* y *L. monocytogenes*.

Capítulo 1

En las condiciones ensayadas, las cepas de *E. coli* seguidas por *S. Typhimurium* fueron las más susceptibles a la acción antimicrobiana de las BAL en estudio, mientras que *E. faecalis* la más resistente. De este modo, del total de cepas de BAL evaluadas un 77,5 y 64,0% inhibieron fuertemente a ambas cepas de *E. coli* (29522 y 700) y *S. Typhimurium*, mientras que solamente un 26 y 3% lo hizo frente a *L. monocytogenes* y *E. faecalis*, respectivamente (Figura 1.6). Es importante destacar que ambas cepas de *E. coli* testeadas mostraron un comportamiento bastante uniforme entre sí. En concordancia con nuestros resultados, Trias y col. (2008a) afirmaron que BAL de frutas y vegetales produjeron las mayores inhibiciones sobre cepas de *E. coli* mientras que, éstas fueron significativamente menores sobre bacterias Gram positivas. Cabe destacar que entre las bacterias patógenas transmitidas por alimentos contaminados, los agentes etiológicos más comunes *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. generan especial preocupación debido a su baja dosis infectiva (Chart, 2000) y, capacidad de sobrevivir en condiciones de refrigeración (De Rover, 1998) así como, al hecho que frutas y hortalizas se consuman crudas representando un mayor riesgo para la seguridad alimentaria (Hoffmann y col., 2015). Por lo tanto, los resultados obtenidos son de gran interés considerando la mayor efectividad antimicrobiana de las cepas en estudio contra *E. coli* y *S. Typhimurium* en oposición a *E. faecalis* que es considerado un patógeno oportunista sobre todo en ambientes hospitalarios (Vancanneyt y col., 2002; De Vuyst y col., 2003).

En base a los resultados obtenidos se seleccionaron 48 cepas de BAL (28 de frutas y EF y 20 de hortalizas y EH resaltadas con negrita en sus respectivas Tablas), cuyos efectos antagonistas fueron clasificados como fuertes al menos frente a tres de las cinco cepas indicadoras ensayadas y, se evaluó la naturaleza de sus actividades antimicrobianas empleando sobrenadantes de cultivo libres de células (SLC) sin tratar, y tratados bajo diferentes condiciones según se ha descrito en el apartado 1.3.7.2. Las pruebas se realizaron frente a *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *E. faecalis*, las cuales fueron seleccionadas por presentar grados de sensibilidad alto, intermedio y bajo respectivamente.

Tabla 1.6 Actividad antimicrobiana de BAL aisladas de frutas y EF determinada mediante la prueba de la gota

Cepa de BAL	Microorganismo sensible					Cepa de BAL	Microorganismo sensible				
	<i>E. coli</i> 25922	<i>E. coli</i> 700	<i>E. faecalis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>		<i>E. coli</i> 25922	<i>E. coli</i> 700	<i>E. faecalis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>
N4	28±1,6	20±1,2	16±0,9	30±1,7	28±1,6	EFj28	34±1,9	26±1,7	ND	10±0,6	8±0,4
N8	30±1,8	23±1,3	19±0,9	30±1,9	30±2,1	EFj30	40±2,8	28±1,8	ND	40±2,6	10±0,5
JNB23	ND	ND	ND	ND	ND	EFj31	ND	ND	ND	15±0,8	ND
JNB25	25±1,6	23±1,3	18±0,9	30±1,6	26±1,7	EFj34	18±0,9	18±1,0	10±0,6	16±0,9	15±0,9
M42	19±1,2	ND	ND	18±0,9	18±1,0	EFj36	40±2,7	28±1,8	18±0,9	36±2,2	32±2,3
MS9	20±1,5	18±1,1	ND	17±0,9	16±0,8	EFj37	40±2,5	28±1,7	10±0,5	22±1,3	9±0,5
MS46	22±1,5	20±1,4	ND	18±0,8	17±0,8	EFj39	40±2,8	23±1,6	ND	>50±3,4	9±0,4
EFj1	40±2,6	34±1,9	10±0,6	23±1,3	18±0,8	EFj40	45±3,1	19±0,9	14±0,8	>50±3,7	15±0,9
EFj3	36±2,3	30±1,6	10±0,5	14±0,6	17±0,9	EFj42	45±2,8	26±1,5	13±0,6	19±0,9	13±0,7
EFj7	20±1,3	ND	ND	17±0,9	16±0,7	EFf2	16±0,8	28±1,7	8±0,5	22±1,5	25±1,3
EFj12	21±1,4	18±0,8	ND	16±0,9	14±0,8	EFf3	15±0,8	30±1,6	ND	25±1,4	25±1,2
EFj16	40±2,5	30±1,6	9±0,5	23±1,2	17±0,7	EFf6	30±1,9	34±1,8	11±0,5	19±0,9	23±1,3
EFj18	40±2,2	36±2,3	13±0,7	24±1,5	21±1,4	EFf10	20±1,2	18±1,0	ND	18±1,0	18±0,9
EFj21	16±0,8	32±1,9	ND	26±1,5	25±1,6	EFf15	28±1,8	30±1,7	9±0,5	22±1,5	18±1,0
EFj24	20±1,4	34±1,9	9±0,4	24±1,6	25±1,7	EFf20	22±1,4	22±1,5	8±0,4	22±1,6	18±0,8
EFj27	34±1,7	15±0,8	11±0,6	30±1,4	18±0,9	EFf23	20±1,3	18±1,4	ND	14±0,8	ND

Capítulo 1

Tabla 1.6 (continuación)

EFf25	29±1,8	24±1,5	18±1,2	20±1,3	20±1,3	EFj53	38±2,2	28±1,6	11±0,6	38±2,1	14±0,8
EFf27	42±2,4	28±1,9	17±0,8	38±2,1	20±1,4	EFj57	20±1,3	ND	ND	18±0,9	17±0,8
EFf29	42±2,3	24±1,5	15±0,8	36±2,2	30±1,7	EFj60	22±1,5	18±1,2	ND	16±0,9	15±0,9
EFf32	34±1,8	25±1,2	15±0,7	19±0,9	15±0,8	EFj61	20±1,3	17±0,9	12±0,9	15±1,0	16±1,0
EFf33	30±1,9	12±0,7	11±0,7	24±1,4	13±0,7	EFj63	20±1,4	18±1,2	10±0,6	18±1,0	17±0,9
EFf34	30±1,8	25±1,5	10±0,6	37±2,6	11±0,8	EFf47	28±1,8	18±0,9	10±0,4	38±2,5	17±0,8
EFf35	20±1,3	18±0,9	12±0,7	28±1,6	17±0,9	EFf48	38±2,5	20±1,3	13±0,9	32±2,1	18±1,5
EFf37	30±1,8	32±1,9	ND	18±1,1	13±0,7	EFf49	40±2,3	25±1,8	10±0,5	38±2,4	13±0,8
EFf38	40±2,4	28±1,7	10±0,5	38±2,2	8±0,4	EFf50	46±2,9	28±1,8	15±0,9	20±1,5	16±0,9
EFf42	34±1,9	18±0,9	10±0,6	30±1,7	14±0,8	EFf51	40±2,7	25±1,8	7±0,5	39±3,2	10±0,4
EFj47	40±2,6	30±1,8	15±0,8	38±2,2	22±1,3	EFf52	40±2,6	25±1,6	ND	20±1,4	ND
EFj48	32±1,9	20±1,1	10±0,4	>50±2,8	15±0,7	EFf53	40±2,1	30±1,3	15±0,6	46±2,2	17±0,6
EFj49	40±2,1	20±1,3	13±0,7	40±2,6	15±0,8	EFf56	23±1,4	19±0,9	10±0,4	16±0,7	15±0,7
EFj50	35±1,8	20±1,1	15±0,8	39±1,9	15±0,9	EFf59	21±1,4	20±1,1	9±0,4	18±0,7	14±0,6
EFj51	40±3,2	26±2,1	10±0,8	40±2,8	13±1,0	EFf63	20±1,0	17±0,8	11±0,8	17±0,8	14±0,7
EFj52	38±2,9	26±2,4	ND	20±1,5							

Los colores indican el grado de inhibición: Rojo (F, HI > 21 mm), verde (M, HI entre 11-21 mm), azul (D, HI < 11 mm), amarillo (SI, ND). HI: halo de inhibición, ND: no detectado. En negrita se indican las cepas seleccionadas por sus propiedades antimicrobianas.

Tabla 1.7 Actividad antimicrobiana de cepas de BAL de hortalizas y EH determinada mediante la prueba de la gota

Cepa de BAL	Microorganismo sensible					Cepa de BAL	Microorganismo sensible				
	<i>E. coli</i> 25922	<i>E. coli</i> 700	<i>E. faecalis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>		<i>E. coli</i> 25922	<i>E. coli</i> 700	<i>E. faecalis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>
SLGR1	22±1,0	18±0,8	18±0,9	23±1,4	28±1,5	EH1	34±1,9	30±1,6	10±0,4	15±0,9	16±0,8
SLGR2	22±1,3	12±0,7	12±0,5	22±1,2	24±1,3	EH2	28±1,5	23±1,2	13±0,7	>50±2,9	17±0,9
SLGR4	ND	ND	ND	ND	ND	EH3	30±1,6	28±1,6	7±0,4	>50±2,6	10±0,5
SLGR6	23±1,4	21±1,2	22±1,1	30±1,5	30±1,7	EH4	20±1,0	20±1,2	10±0,6	18±1,0	17±0,8
SLM7	ND	ND	ND	ND	ND	EH27	38±1,8	24±1,1	18±0,8	19±0,9	16±0,7
JLM1	25±1,6	16±0,9	16±0,8	26±1,3	23±1,5	EH6	30±1,6	28±1,3	7±0,4	>50±2,5	10±0,4
SB1	14±0,7	ND	ND	ND	ND	EH7	18±0,9	18±1,1	12±0,5	16±0,8	14±0,6
SB2	25±1,2	16±0,7	15±0,7	24±1,2	25±1,6	EH8	40±2,2	28±1,3	10±0,6	21±1,1	14±0,7
SB5	25±1,3	18±0,8	26±1,5	26±1,3	25±1,2	EH9	18±0,8	17±0,7	10±0,6	17±0,8	17±0,9
SB6	28±1,5	23±1,4	21±1,3	30±1,6	28±1,3	EH34	33±1,5	20±1,4	10±0,5	>50±2,7	18±0,7
SB8	25±1,2	15±0,8	12±0,5	28±1,2	23±1,2	EH11	20±1,2	17±0,7	14±0,7	18±0,7	18±0,8
JB1	25±2,4	16±0,8	15±0,8	30±1,3	25±1,2	EH12	21±1,2	20±0,9	9±0,5	17±0,8	16±0,7
JB2	25±2,6	13±0,6	14±0,7	28±1,3	24±1,1	EH13	36±2,2	26±2,1	18±1,6	24±2,1	14±0,6
JB3	28±1,8	17±0,9	16±0,9	28±1,4	28±1,5	EH14	40±2,2	20±1,5	ND	30±1,6	10±0,4
JP11	23±1,6	20±1,5	21±1,2	28±1,3	28±1,9	EH15	40±2,1	20±0,8	8±0,4	30±1,4	16±0,8

Capítulo 1

Tabla 1.7 (continuación)

SP33	23±1,3	21±1,4	10±0,6	32±1,6	30±1,6	EH16	17±0,9	18±0,8	13±0,7	18±0,9	18±0,8
EH17	40±2,1	26±1,4	ND	21±1,1	ND	EH22	30±1,6	20±1,4	ND	>50±3,7	15±0,9
EH18	35±1,7	20±1,2	13±0,6	>50±3,5	17±0,9	EH23	41±2,1	26±1,4	9±0,4	50±2,9	18±0,7
EH19	20±1,0	20±0,9	17±0,8	13±0,7	13±0,6	EH24	34±1,8	19±0,8	ND	>50±3,2	ND
EH20	50±2,6	25±1,5	6±0,4	>50±3,7	7±0,4	EH25	22±1,1	20±1,2	ND	18±0,8	16±0,7
EH21	18±0,9	18±1,1	10±0,5	16±0,9	14±0,8						

Los colores indican el grado de inhibición: Rojo (Fuerte, HI \geq 21 mm), verde (Moderado, HI entre 11-20 mm), azul (Débil, HI < 11 mm), amarillo (Sin inhibición, ND). HI: halo de inhibición, ND: no detectado. En negrita se indican las cepas seleccionadas por sus propiedades antimicrobianas.

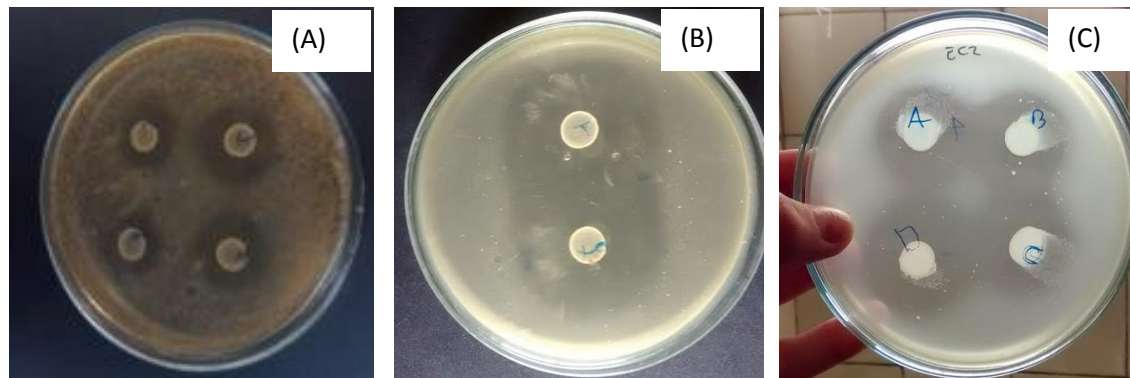


Figura 1.7 Actividad antimicrobiana de distintas cepas de BAL sobre *L. monocytogenes* (A), *S. Typhimurium* (B) y *E. coli* 25922 (C) determinada mediante prueba de la gota.

1.4.5 Actividad antimicrobiana de sobrenadantes de cultivo

La naturaleza de las propiedades antimicrobianas de las 48 cepas seleccionadas en el ensayo de la gota se evaluó empleando SCL frente a tres cepas indicadoras en ensayos de microcultivo (Materiales y Métodos, apartado 1.3.7.2).

Los resultados se analizaron empleando las pruebas estadísticas de Kruskal Wallis (KW) y post-test de Conover y se expresaron como porcentajes de inhibición de crecimiento. Se realizaron, además gráficos de caja ("Box plot") para mostrar las medias y medianas (Me) de los niveles máximos de crecimiento, medidos como DO_{560nm} , a 24 h de incubación a 37 °C, en cultivo control (sin SLC) y cultivos tratados con SLC ó SLCN (SLC neutralizado) para cada cepa.

Las cepas en estudio y sus códigos de identificación se describen en la Tabla 1.8. A continuación, se detallan los resultados obtenidos para cada cepa indicadora cuyos códigos de identificación también se incluyeron en la Tabla 1.8.

Tabla 1.8. Codificación de BAL para ensayo de actividad antimicrobiana empleando SLC sin tratar o tratado bajo diferentes condiciones de tratamiento

Código de identificación	Fruta/EF	Hortaliza/EH
1	<i>L. plantarum</i> N4	<i>L. plantarum</i> SLGR1
2	<i>L. plantarum</i> N8	<i>L. plantarum</i> SLGR2
3	<i>L. plantarum</i> JNB25	<i>L. plantarum</i> SLGR6
4	<i>L. plantarum</i> EFj1	<i>L. plantarum</i> JLM1
5	<i>L. plantarum</i> EFj3	<i>L. plantarum</i> SB2
6	<i>L. plantarum</i> EFj16	<i>L. plantarum</i> SB5
7	<i>L. plantarum</i> EFj18	<i>L. plantarum</i> SB6
8	<i>L. plantarum</i> EFj21	<i>L. plantarum</i> SB8
9	<i>L. plantarum</i> EFj24	<i>L. plantarum</i> JB1
10	<i>L. plantarum</i> EFj30	<i>L. plantarum</i> JB2
11	<i>L. plantarum</i> EFj36	<i>L. plantarum</i> JB3
12	<i>L. plantarum</i> EFj37	<i>L. plantarum</i> JP11
13	<i>L. brevis</i> EFj39	<i>L. plantarum</i> SP33
14	<i>L. plantarum</i> EFj47	<i>Lactococcus</i> sp EH2
15	<i>L. plantarum</i> EFj51	<i>L. brevis</i> EH3
16	<i>L. plantarum</i> EFj53	<i>Leuconoctoc.</i> spp. EH6
17	<i>L. plantarum</i> EFF2	<i>Leuconoctoc.</i> spp. EH8
18	<i>L. plantarum</i> EFF3	<i>L. brevis</i> EH13
19	<i>Leuconostoc</i> spp. EFF6	<i>Leuconoctoc</i> spp. EH20
20	<i>L. plantarum</i> EFF15	<i>Leuconoctoc</i> spp. EH23
21	<i>L. plantarum</i> EFF20	
22	<i>L. plantarum</i> EFF27	
23	<i>L. plantarum</i> EFF29	
24	<i>L. brevis</i> EFF34	
25	<i>Lactococcus</i> spp EFF38	
26	<i>L. plantarum</i> EFF49	
27	<i>L. plantarum</i> EFF51	
28	<i>L. plantarum</i> EFF53	
29	<i>S. Typhimurium</i>	
30	<i>L. monocytogenes</i>	
31	<i>E. faecalis</i>	

Los SCL sin tratar y tratados bajo diferentes condiciones fueron obtenidos de cultivos activos en medio MRS a 24 h de incubación a 30 °C. Los ensayos se realizaron frente a *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *E. faecalis* cuyos códigos se incluyeron en esta Tabla. Abreviaturas: EF: ensalada de frutas, EH: ensalada de hortalizas.

S. Typhimurium

En ausencia de SLC (control), *S. Typhimurium* creció hasta alcanzar una DO_{560nm} de 0,51 (valor medio y de Me fueron similares, prueba de KW, $P < 0,0001$).

En presencia de SLC sin tratar la media y Me, fueron en general, similares entre sí, mostrando una distribución bastante simétrica de los datos. En esta condición, el crecimiento de la cepa indicadora varió desde 0,00 a 0,32 manifestándose, en general, diferencias significativas con respecto al control de crecimiento lo que indicó un claro efecto antagónico en concordancia con lo observado por el método de la gota para estas cepas (Figuras 1.8). Las mayores diferencias significativas entre el control y grupo tratado con SLC se observaron, en orden decreciente, para los siguientes códigos de cepas de F/EF: 4, 7, 14 ó 9 (test de Conover, $p=0,0004$); 3 ó 19 ($p=0,0006$); 8, 25, 26, 28, 2 ó 13 ($p=0,0008$); 16 ó 23 ($p=0,001$) y 5 ($p=0,02$) y correspondieron a *L. plantarum* EFj1, EFj18, EFj47 ó EFl24; JNB25 ó EFl6; EFj21, EFl53, EFl38, EFl49, N8 ó *L. brevis* EFj39; *L. plantarum* EFj24 ó EFl29 y EFj3 respectivamente (Figura 1.8 A). Entre las cepas de H/EH se distinguieron los códigos: 1, 4, 10 ó 14 ($p=0,0009$); 6, 8 ó 13 ($p=0,01$); 11 ó 15 ($p=0,03$) y 2 ($p=0,03$) identificados como *L. plantarum* SLGR1, *L. brevis* JLM1 *Lactococcus* sp. EH3 ó EH2; *L. plantarum* SB2, SB8 o SP33; *L. plantarum* JB2 ó JB3 y SLGR2 respectivamente (Figura 1.8B). Todos los SLC de dichas cepas alcanzaron porcentajes de inhibición superiores a 90% y se clasificaron como inhibidores fuertes (IF), coincidiendo en general con lo observado en el ensayo de la gota (Tablas 1.9 y 1.10). También, otros SLC presentaron efectos inhibitorios (F) pero con porcentajes comprendidos entre 75 - 88%. De este modo, un 75,0% del total de los SLS de las cepas en estudio presentaron efecto inhibitorio fuerte frente a *S. Typhimurium*, lo que correspondió a un 100%, 93%, 77%, y 7% del total de cepas evaluadas de frutas (3), hortalizas (13), EF (22) y EH (6) respectivamente. Así, la baja proporción de cepas de EH con actividad (IF) estuvo de acuerdo con resultados obtenidos

en la prueba de la gota. Considerando que la mayoría de ellas presentaron un comportamiento homofermentativo se podría deducir que la naturaleza del ácido orgánico producido, principalmente ácido láctico, podría influir significativamente sobre la inactivación de *S. Typhimurium*. De acuerdo a Kennedy y col. (2018) la tolerancia a la acidez depende del tipo de ácido utilizado y de la propia naturaleza del microorganismo.

La comparación de a pares (prueba Kruskal Wallis, $P < 0,05$) entre el control positivo de crecimiento y grupo tratado con SLCN no manifestó diferencias significativas en un 75% y 90% del total de las cepas ensayadas de F/EF y H/EH respectivamente (Figuras 1.8). Estas cepas presentaron porcentajes de inhibición comprendidos entre 0 – 51% y fueron clasificadas como sin inhibición (SI), inhibición baja (IB) o moderada (IM) dependiendo de su origen (Tabla 1.10, 1.11), indicando que la acción antagónica sobre *S. Typhimurium* estuvo asociada principalmente a acidez, especialmente para aquellas clasificadas como SI o IB. De este modo, se podrían distinguir distintos grados de efectividad antibacteriana asociada a sus capacidades acidificantes dependiendo del tipo de efecto inhibitorio entre SLC y SLCN en el siguiente orden decreciente: de IF a SI > IF a IB > IM a SI o IB, destacándose en el primer grupo *L. plantarum* EFj1, EFj3, EFj18, EFj21, EFj24 y EFj47 de F/EF ó *L. brevis* EFj59 y *L. plantarum* SLGR1, SLGR2, SP33, SB8, JB3 ó *L. brevis* JLM1 de H/EH. En este contexto, las cepas con mayor efectividad antimicrobiana serían las más apropiadas para su aplicación como agente de biocontrol de vegetales MP.

Dentro del grupo de cepas cuyos SLCN mantuvieron una acción antagónica significativa sobre *S. Typhimurium* se destacaron las cepas *L. plantarum* N4 (1), N8 (2), JNB25 (3), EFf29 (23) y EFj47 (14) de F/EF cuyos SLCN mostraron un comportamiento similar al control (^{A, ABC}) luego del tratamiento con catalasa y tripsina respectivamente. Este efecto fue más pronunciado en las cepas N8 y JNB25 de naranjas que cambiaron de IF a SI (Tablas 1.10),

indicando que sus efectos antagónicos sobre *S. Typhimurium* estuvieron asociados principalmente a la producción de peróxido de hidrógeno (inhibido por catalasa). Similar resultado fue observado en *L. plantarum* N4, aunque en menor magnitud (de IM a SI), mientras que la actividad antimicrobiana de las cepas EFf29 y EFj47 estuvo asociada principalmente a acidez (de IF a IB) en sinergismo con una sustancia de naturaleza proteica inhibida por tripsina (de IB a SI). En tres y dos cepas (códigos 16, 24, 25 y 16, 19) de EF y EH no se pudo establecer, además, de acidez, la naturaleza de la acción antimicrobiana contra *S. Typhimurium* en las condiciones de ensayo, aun cuando se descartó la producción de peróxido de hidrógeno en las condiciones de ensayo.

En resumen, la actividad antagónica de BAL sobre *S. Typhimurium* estuvo asociada principalmente a acidez, y en menor medida a la producción de peróxido de hidrógeno u otro tipo de sustancia inhibitoria. Cabe destacar que la producción de peróxido de hidrógeno fue demostrada para el 100% de las cepas aisladas de naranjas (N4, N8, JNB25) sugiriendo que esta sería una característica bastante uniformemente distribuida en estas bacterias. Kong y Davidson (1980) informaron que el efecto bactericida o bacteriostático del peróxido de hidrógeno es debido a su elevado poder oxidante, que provoca la peroxidación de los lípidos de la membrana, incrementando de este modo la permeabilidad celular y; la inactivación de enzimas y coenzimas mediante la oxidación de sus grupos sulfhidrilo. Por el contrario, la producción de una sustancia de naturaleza proteica inhibida por tripsina activa frente a *S. Typhimurium* sería una propiedad muy poco distribuida entre cepas de BAL frutas y hortalizas frescas o MP de la región. Gerez y col. (2009) analizaron diferentes especies de bacterias, encontrando cuatro cepas que presentaban actividad antimicrobiana: *L. plantarum* CRL778, *Lactobacillus reuteri* CRL 1100 y dos subespecies de *L. brevis*. Los compuestos activos de estas bacterias fueron ácidos orgánicos como láctico, acético, propiónico y fenilacético. En este sentido, otros autores (Daeschel, 1989;

Capítulo 1

Lindgren y Dobrogosz, 1990) han reportado que la acción antimicrobiana de las BAL es principalmente ejercida por el efecto combinado de la competencia por los nutrientes del medio donde crecen y el descenso de pH del mismo causado por la producción de ácidos orgánicos.

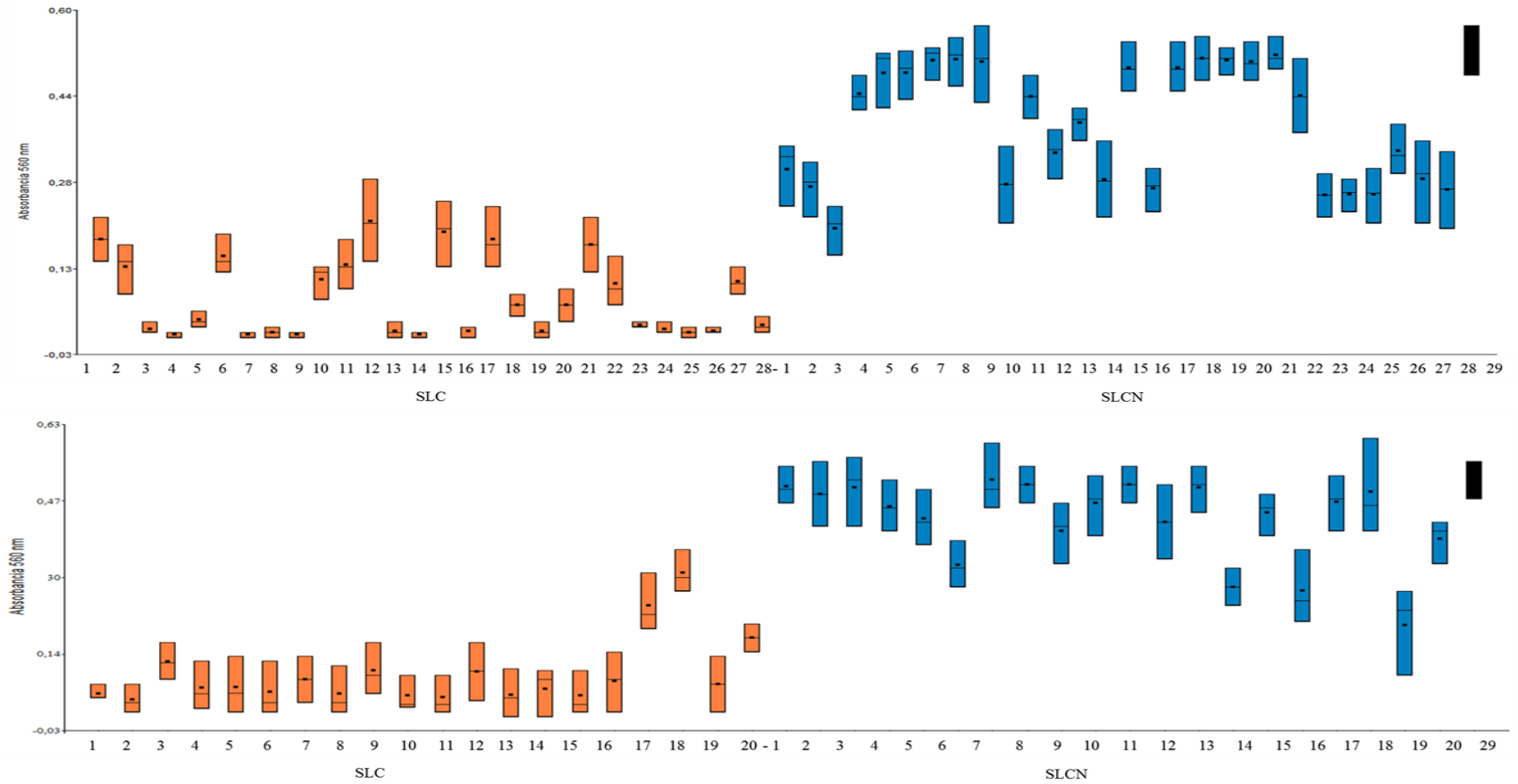


Figura 1.8. Crecimiento de *S. Typhimurium*, medido a 24 h de incubación, en presencia de SLC tratar () y SLC neutralizado, SLCN, () de BAL aisladas de frutas y EF (A) o de hortalizas y EH (B). Control sin SLC (). Inoculo inicial de *S. Typhimurium*: $0,01 \pm 0,002$

Tabla 1.9 Porcentajes de inhibición de sobrenadantes libres de células (SLC) sin tratar y tratados, bajo diferentes condiciones, de BAL aisladas de frutas (F) y ensalada de frutas (EF) sobre *S. Typhimurium*

Tratamiento	Código de cepa ^a	Porcentaje de inhibición (%) ^b	Tipo de efecto
–	29 ^{A,B,C}	0	SI
SLC	12 ^{C,D,E,F,G,H,I,J} ; 15 ^{D,E,F,G,H,I,J} ; 17 ^{D,E,F,G,H,I,J,K} ; 21 ^{D,E,F,G,H,I,J,K} ; 1 ^{E,F,G,H,I,J,K} ; 6 ^{E,F,G,H,I,J,K}	56 - 69	M
	2 ^{F,G,H,I,J,K} ; 22 ^{F,G,H,I,J,K,L} ; 11 ^{F,G,H,I,J,K,L} ; 27 ^{G,H,I,J,K} ; 10 ^{G,H,I,J,K} ; 20 ^{H,I,J,K,L} ; 18 ^{L,I,J,K,L}	74 - 88	F
	5 ^{J,K,L} ; 23 ^{J,K,L} ; 24 ^{K,L} ; 28 ^{K,L} ; 8 ^{K,L} ; 13 ^{K,L} ; 3 ^{K,L} ; 25 ^L ; 26 ^L ; 16 ^L ; 19 ^L ; 9 ^L ; 7 ^L ; 14 ^L ; 4 ^L	94 - 100	F
SLCN	21 ^A ; 18 ^A ; 7 ^A ; 19 ^A ; 9 ^A ; 20 ^A ; 8 ^{A,B} ; 17 ^{A,B} ; 15 ^{A,B} ; 5 ^{A,B,C} ; 6 ^{A,B,C} ; 4 ^{A,B,C,D} ; 22 ^{A,B,C,D} ; 11 ^{A,B,C,D}	< 8	SI
	13 ^{A,B,C,D} ; 26 ^{B,C,D,E} ; 12 ^{C,D,E,F}	25 - 34	B
	14 ^{C,D,E,F,G} ; 27 ^{C,D,E,F,G} ; 10 ^{C,D,E,F,G,H} ; 28 ^{C,D,E,F,G,H} ; 1 ^{D,E,F,G,H} ; 16 ^{E,F,G,H} ; 25 ^{E,F,G,H} ; 23 ^{E,F,G,H} ; 24 ^{E,F,G,H}	40 - 65	M
	2 ^{E,F,G,H} ; 3 ^{F,G,H,I,J}	73	F
SLCN+Catalasa ^c	1 ^A ; 2 ^A ; 3 ^{A,B}	<3	SI
SLCN+Tripsina ^c	14 ^{A,B,C,D} ; 23 ^{A,B,C,D}	8	SI

^a: En Tabla 1.9 se indica el nombre correspondiente de cada cepa según su código de identificación.

^b: Calculado a partir del crecimiento, medido como DO_{560nm} a 24 h, según se indica en Materiales y Métodos.

^c: Se muestran los resultados de cepas cuyos SLCN mantuvieron un efecto antagonístico significativo relativo al control^(A,B,C), excepto cuando el SLCN fue tratado con catalasa o tripsina.

En negrita se destacan aquellas cepas cuyos SLC clasificados como IF, especialmente (1^{J,K,L}; 3^{J,K,L}; 8^{K,L}; 13^L) revirtieron completamente sus efectos antagonísticos por acidez y/o por peróxido de hidrógeno o tripsina en las condiciones de ensayo.

Abreviaciones: SI (sin inhibición), B (bajo), M (moderado), F (fuerte)

Los valores son el promedio de tres determinaciones independientes medidas por duplicado. Letras diferentes indican variaciones significativas (P < 0,05).

Tabla 1.10 Porcentajes de inhibición de sobrenadantes libres de células (SLC), sin tratar y tratados bajo diferentes condiciones de BAL aisladas de hortalizas (H) y ensalada de hortalizas (EH) sobre *S. Typhimurium*.

Tratamiento	Código de cepa ^a	Porcentaje de inhibición (%) ^b	Tipo de efecto
–	29 ^A	0	SI
SLC	18 ^{B,C,D,E,F} ; 17 ^{D,E,F,G} ; 20 ^{F,G,H,I}	45 - 66	M
	12 ^{G,H,I} ; 9 ^{G,H,I} ; 3 ^{G,H,I} ; 19 ^{H,I} ; 16 ^{H,I}	76 - 88	F
	7^{H,I} ; 2^I ; 11^I ; 15 ^I ; 10^I ; 13 ^I ; 1^I ; 8^I ; 5^I ; 6 ^I ; 4^I ; 14 ^I	90 - 98	F
SLCN	7^A ; 8^A ; 1^A ; 3 ^A ; 13 ^A ; 11 ^A ; 12 ^{A,B} ; 5^{A,B} ; 20 ^{A,B} ; 17 ^{A,B} ; 4^{A,B} ; 10^{A,B} ; 2^{A,B} ; 18 ^{A,B}	2 - 10	SI
	9 ^{A,B,C} ; 15 ^{A,B,C} ; 14 ^{A,B,C,D} ; 6 ^{A,B,C,D,E}	13 - 26	B
	16 ^{C,D,E,F,G} ; 19 ^{E,F,G,H,I}	47- 61	M ^c

^a: En Tabla 1.8 se indica el nombre correspondiente de cada cepa según su código de identificación.

^b: Calculado a partir del crecimiento, medido como DO_{560nm} a 24 h, según se indica en Materiales y Métodos.

^c: No se muestran resultados de las cepas codificadas 16, 19 cuyos SLCN tampoco revirtieron completamente sus efectos antagónicos relativo al control(^A), cuando fueron tratados con catalasa o tripsina.

En negrita se destacan aquellas cepas cuyos SLC clasificados como IF, especialmente (^{H,I}; ^I) revirtieron completamente sus efectos antagónicos por acidez en las condiciones de ensayo.

Abreviaciones: SI (sin inhibición), B (bajo), M (moderado), F (fuerte)

Los valores son el promedio de tres determinaciones independientes medidos por duplicado. Letras diferentes indican variaciones significativas ($P < 0,05$).

L. monocytogenes

En ausencia de SLC, el microorganismo en estudio creció hasta alcanzar un valor medio de DO_{560nm} de 0,53, cuya Me manifestó un valor similar (prueba de KW, $P < 0,0001$). En presencia de SLC sin tratar o neutralizados las medias y Me, también similares entre sí, variaron desde 0,01 a 0,54 y 0,01 a 0,56 respectivamente (Figura 1.9).

Capítulo 1

La comparación de a pares (prueba Kruskal Wallis, $P < 0,05$) entre el control y grupo tratado con SLC mostraron diferencias significativas en un porcentaje menor que lo observado para *S. Typhimurium* (67,8 y 35% para BAL de EF/F y H/EH respectivamente), lo que se relacionó con la mayor resistencia del patógeno detectada en el ensayo de la gota. Nuevamente, el mayor porcentaje de SLC con actividad antibacteriana correspondió a cepas de F/EF comparado a H/EH, aunque si se considera por cada tipo de matriz alimenticia esta propiedad fue observada a razón de un 100%, 56% y 0% de los SLC de las cepas de frutas u hortalizas enteras, EF y EH respectivamente, en concordancia con lo determinado por el ensayo de la gota. Las mayores diferencias significativas entre el control y grupo tratado con SLC se observaron para los códigos de cepas: 3 ($p=0,0004$), 1 ó 24 ($p=0,0003$), 2 (test Conover $p=0,0008$) 25, 23 o 14 ($p=0,002$) y 2, 3, 4, 8, 9, 12, 13, 10 ó 1 ($p=0,0003$) identificados como *L. plantarum* JNB25 o N4, *L. brevis* EFf34, *L. plantarum* N8, *Ln. spp* EFf38, *L. plantarum* EFf29 o EFj47 y; *L. plantarum* SLGR2, SLGR6, JLM1, SB8, JB1, JP11, SP33, SLGR1 ó JB2 de F/EF y H/EH respectivamente (Figura 1.9); cuyos porcentajes de inhibición de crecimiento fueron clasificados como (F). SLC de las cepas codificadas como 6, 9, 17, 20, 21, 8, 7, 18, 19, 11 y 6, 7, 5 de F/EF y H/EH también se diferenciaron del control, aunque con porcentajes de inhibición menor y, fueron clasificados como F, M o B y F o B respectivamente; mientras que los SLC restantes no presentaron diferencias significativas con respecto al control (Tablas 1.11, 1.12).

La comparación de a pares de Me (prueba de Conover, $p=0,002$) entre el control de crecimiento y grupo tratado con SLCN no manifestaron diferencias significativas en la mayoría de las cepas ensayadas (Figura 1.9), indicando que el efecto inhibitorio estuvo asociado principalmente a acidez, sin la presencia de otra sustancia antagónica. Dentro del grupo de SLCN que manifestaron, aunque en menor grado, diferencias significativas con respecto al control se destacaron los códigos 1 y 2 correspondientes a *L. plantarum* N4 y N8 de naranjas

cuyas actividades anti-listeria fueron revertidas completamente cuando el SLCN fue tratado con catalasa, indicando un efecto sinérgico entre acidez y en menor grado peróxido de hidrógeno.

En resumen, las cepas de F/EF y H/EH, en menor medida que lo observado para *S. Typhimurium* inhibieron significativamente el crecimiento de *L. monocytogenes*, siendo su naturaleza asociada principalmente a acidez. En *L. plantarum* N4 y N8 de naranjas se demostró un sinergismo entre acidez y peróxido de hidrógeno, similarmente como observado para *S. Typhimurium*, aunque en este caso la acidez sería el principal factor responsable. En las cepas de hortalizas la actividad inhibitoria estuvo relacionada a la producción de ácidos, sin embargo en *L. plantarum* JP11 aislado de pimiento el efecto IB de SLCN revirtió a SI en presencia de tripsina. Este resultado sugirió que el microorganismo podría producir una sustancia de tipo bacteriocina inhibida por tripsina favoreciendo sus actividades antimicrobianas contra *L. monocytogenes*.

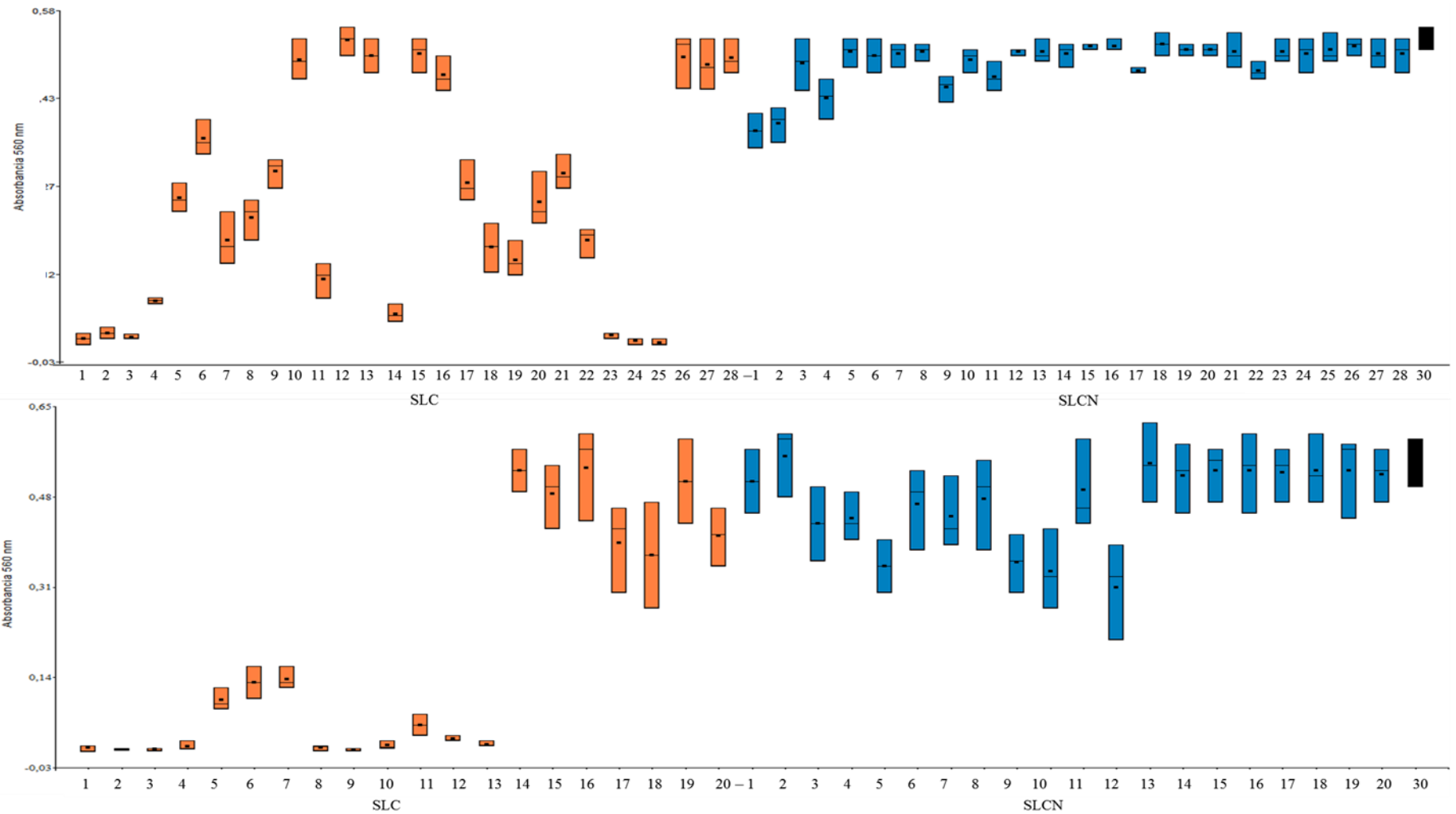


Figura 1.9. Crecimiento de *L. monocytogenes*, medido a 24 h de incubación, en presencia de SLC sin tratar (■) y neutralizado, SLCN (■) de BAL aisladas de frutas o ensalada de frutas (A) y hortalizas o ensalada de hortalizas (B). Control sin SLC, sin tratar o neutralizado (■). Inoculo inicial de *L. monocytogenes*: $0,01 \pm 0,002$.

Tabla 1.11 Porcentajes de inhibición de fracciones de sobrenadantes libres de células de BAL aisladas de frutas y ensaladas de frutas (EF) sobre *L. monocytogenes*.

Tratamiento	Código de cepa ^a	Porcentaje de inhibición (%) ^b	Tipo de efecto
–	30 ^A	0	SI
SLC	15 ^A ; 13 ^A ; 20 ^A ; 26 ^A ; 27 ^A ; 28 ^A ; 16 ^{A,B} ; 12 ^{A,B} ; 10 ^{A,B}	< 8	SI
	6 ^{B,C}	30	B
	9 ^{C,D,E} ; 5 ^{C,D,E} ; 17 ^{C,D,E} ; 20 ^{C,D,E} ; 21 ^{C,D,E} ; 7 ^{C,D,E} ; 8 ^{C,D,E,F}	40 - 65	M
	18 ^{C,D,E,F,G} ; 19 ^{C,D,E,F,G} ; 11 ^{E,F,G,H} / 4 ^{G,H} / 14 ^H	70 - 86	F
	1^{H,I} ; 2^{H,I} ; 3^{H,I} ; 23^{H,I} ; 24^{H,I} ; 25^{H,I}	90 - 100	F
SLCN	21 ^A ; 18 ^A ; 5 ^A ; 6 ^A ; 7 ^A ; 8 ^A ; 13 ^A ; 14^A ; 16 ^A ; 19 ^A ; 20 ^A ; 10 ^A ; 15 ^A ; 25^{A,B} ; 24^{A,B} ; 27 ^{A,B} ; 26 ^{A,B} ; 28 ^{A,B} ; 3^{A,B} ; 11 ^{A,B,C} ; 12 ^{A,B,C} ; 23^{A,B,C}	< 10	SI
	9 ^{A,B,C} ; 4 ^{A,B,C,D} ; 1 ^{C,D,E} ; 2 ^{C,D,E}	11 - 32	B
SLCN+Catalasa ^c	1 ; 2^A	2	SI

^a: En Tabla 1.8 se indica el nombre correspondiente de cada cepa según su código de identificación.

^b: Calculado a partir del crecimiento, medido como DO_{560nm} a 24 h, según se indica en Materiales y Métodos.

^c: Se muestran los resultados de SLCN cuyos efectos antagónicos fueron revertidos completamente en presencia de catalasa.

En negrita se destacan cepas con efectos IF por acidez o efecto sinérgico entre acidez y peróxido de hidrógeno.

Abreviaciones: SI (sin inhibición), B (bajo), M (moderado), A (alto)

Los valores son el promedio de tres determinaciones independientes medidas por triplicado. Letras diferentes indican variaciones significativas (P < 0,05).

Tabla 1.12 Porcentajes de inhibición de fracciones de sobrenadantes libres de células de BAL aisladas de hortalizas y ensaladas de hortalizas (EH) sobre *L. monocytogenes*.

Tratamiento	Código de cepa ^a	Porcentaje de inhibición (%) ^b	Tipo de efecto
–	30 ^{A,B,C}	0	SI
SLC	14 ^{A,B,C} ; 16 ^{A,B,C} ; 19 ^{A,B,C} ; 15 ^{A,B,C,D}	<8	SI
	20 ^{A,B,C,D,E} ; 17 ^{B,C,D,E,F} ; 18 ^{B,C,D,E,F,G} ;	26-32	B
	6 ^{F,G,H} ; 7 ^{G,H} ; 5 ^H	73-81	F
	11^{H,I} ; 1^I ; 2^I ; 3^I ; 4 ^I ; 8^I ; 9^I ; 10^I ; 12^I ; 13^I	> 90	F
SLCN	2^A ; 3^{A,B} ; 18 ^{A,B} ; 19 ^{A,B} ; 13^{A,B} ; 20 ^{A,B} ; 1^{A,B,C} ;	< 8	SI
	14 ^{A,B,C} ; 15 ^{A,B,C} ; 16 ^{A,B,C} ; 17 ^{A,B,C} ; 8^{A,B,C,D} ;		
	11^{A,B,C,D}		
	4 ^{B,C,D,E} ; 6 ^{B,C,D,E} ; 7 ^{B,C,D,E} ; 10 ^{B,C,D,E,F} ;	11- 38	B
	5 ^{C,D,E,F} ; 9 ^{C,D,E,f} ; 12 ^{D,E,F,G}		
SLCN+Tripsina ^c	12^{B,C}	10	SI

^a: En Tabla 1.8 se indica el nombre correspondiente de cada cepa según su código de identificación.

^b: Calculado a partir del crecimiento, medido como DO_{560nm} a 24 h, según se indica en Materiales y Métodos.

^c: Se muestran le resultado del SLCN cuyo efecto antagónico fue revertido completamente en presencia de Tripsina.

En negrita se destacan cepas con actividad antagónica fuerte principalmente por acidez

Abreviaciones: SI (sin inhibición), B (bajo), M (moderado), A (alto)

Los valores son el promedio de tres determinaciones independientes medidas por triplicado. Letras diferentes indican variaciones significativas (P < 0,05).

E. faecalis

En ausencia de SLC el microorganismo en estudio creció hasta alcanzar un valor medio de DO_{560nm} de 0,63, cuya Me manifestó un valor similar (prueba de KW, $P < 0,0001$). En presencia de SLC sin tratar o neutralizado las DO_{560nm} medias y Me, también similares entre sí, variaron desde 0,01 a 0,54 y 0,01 a 0,56 respectivamente (Figura 1.10). La comparación de a pares de las Me entre grupos control, sin SLC, y tratado con SLC (prueba de Conover, $p=0,02$), en general, no difirieron significativamente dependiendo del origen de la cepa, en oposición a lo observado para *S. Typhimurium* y en menor medida para *L. monocytogenes*. Solamente 25 y 40% de SLC de las cepas de F/EF y H/EH presentaron un efecto antagónico significativo lo que estuvo de acuerdo con la mayor resistencia observada para esta bacteria en el ensayo de la gota, siendo el crecimiento del patógeno inhibido en orden decreciente por los siguientes códigos de cepas: 2 (test de Conover, $p=0,003$), 1 ($p=0,004$); 14 ó 23 ($p=0,005$), 11 o 22 ($p=0,01$) identificados como *L. plantarum* N8, N4, EFf29, EFj47, EFj36 y EFf27 de EF/F y, por 12 ($p=0,0003$); 3 ó 1 ($p= 0,0005$); 11 ($p=0,0015$); 7 ($p=0,0013$); 6 ($p=0,0012$) y 5 ($p=0,0021$) identificados como *L. plantarum* JP11, SLGR6, JLM1, JB3, SB6 y SB2 para las cepas de H/EH respectivamente (Figura 1.10). Dentro de este grupo, un 11% del total de SLC de BAL analizados de F/EF presentaron un efecto antagónico (F) y, >90% solamente la cepa N8 (Tabla 1.13); mientras que, este comportamiento solamente fue observado en un 30% de las cepas de hortalizas, y en todo los casos con porcentajes de inhibición >90%, indicando que las últimas mostraron mayor efectividad antibacteriana frente a *E. faecalis* (Tabla 1.14).

La comparación de a pares de Me (prueba de Conover, $p=0,002$) entre el control sin SLC, y el grupo tratado con SLCN no manifestó diferencias significativas, excepto para los códigos de cepas 5 y 6 de H/EH que mantuvieron una IB (Figura 1.9). De este modo el efecto inhibitorio (F), (M) ó (B) de los SLC de las BAL en estudio sobre el crecimiento de *E. faecalis*,

en general, estuvo asociado a acidez. Solamente en el caso de las cepas *L. plantarum* SB2 y SB6 de berenjenas (5 y 6 respectivamente) se observó un efecto sinérgico asociado a acidez y, en menor medida, a la producción de una sustancia inhibida por tripsina, indicando su naturaleza proteica.(Tabla1.14).

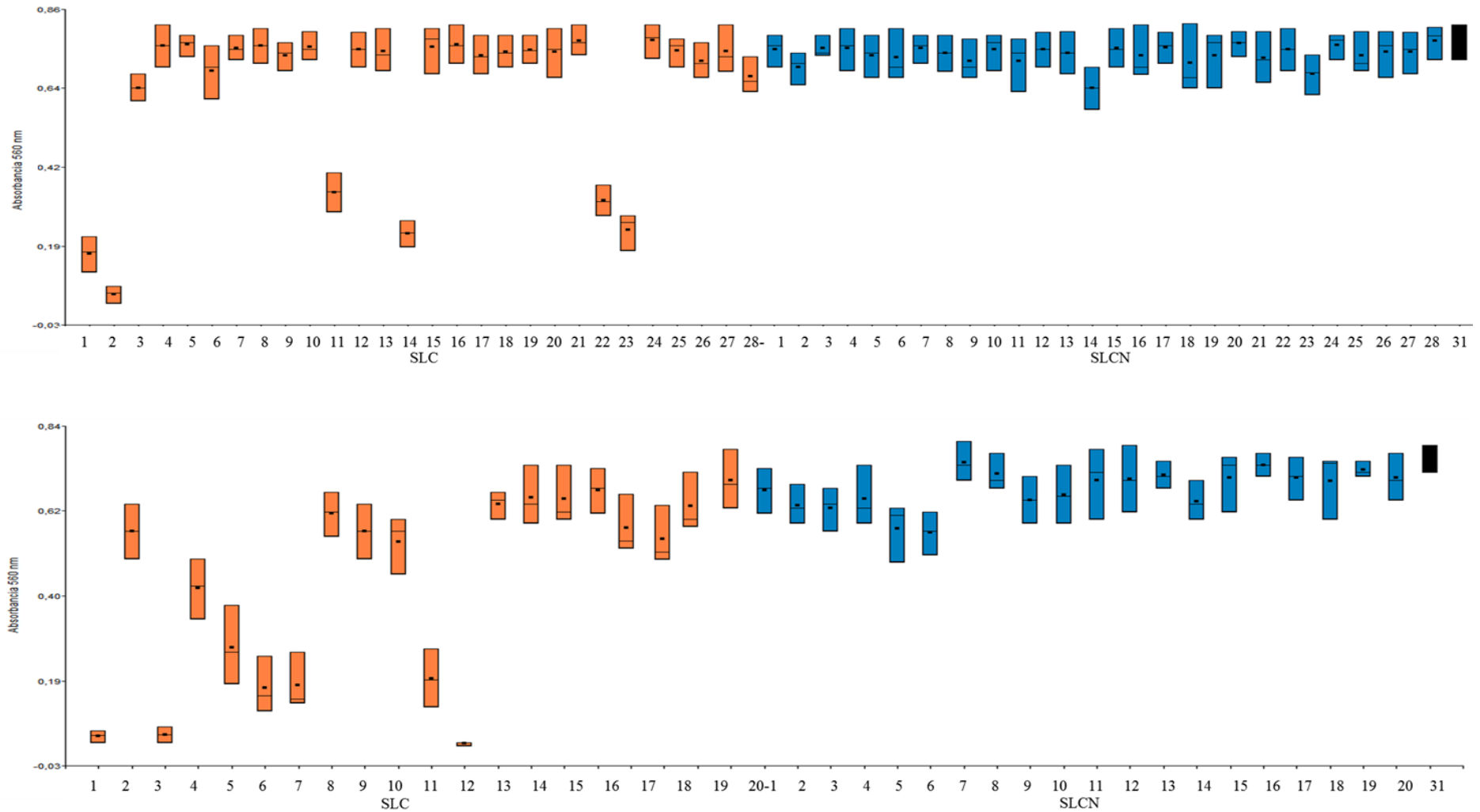


Figura 1.10. Crecimiento de *E. faecalis*, medido a 24 h de incubación, en presencia de SLC sin tratar () y neutralizado, SLCN () de BAL aisladas de frutas o ensalada de frutas (A) y hortalizas o ensalada de hortalizas (B). Control sin SLC, sin tratar o neutralizado (). Inóculo inicial de *E. faecalis*: $0,01 \pm 0,002$

Tabla 1.13 Porcentajes de inhibición de fracciones de sobrenadantes libres de células de BAL aisladas de frutas y ensaladas de frutas (EF) sobre *E. faecalis*

Tratamiento	Código de cepa ^a	Porcentaje de inhibición (%) ^a	Tipo de efecto
–	31 ^A	0	SI
SLC	4 ^A ; 5 ^A , 6 ^A , 7 ^A , 8 ^A , 9 ^A , 10 ^A ; 12 ^A ; 13 ^A ; 15 ^A ; 16 ^A ; 17 ^A ; 18 ^A ; 19 ^A ; 20 ^A ; 21 ^A ; 24 ^A ; 25 ^A ; 26 ^A ; 27 ^A	<10	SI
	3 ^A ; 28 ^A	12 -16	B
	11 ^B ; 22 ^B	54 – 53	M
	23^{BC}, 14^{BC}, 1^{BC}	70 -73	F
	2^C	92	F
SLCN ^c	1^A; 2^A ; 3 ^A , 4 ^A , 5 ^A , 6 ^A , 7 ^A , 8 ^A , 9 ^A ; 10 ^A ; 11 ^A , 12 ^A ; 13 ^A ; 15 ^A ; 16 ^A ; 17 ^A ; 18 ^A ; 19 ^A ; 20 ^A ; 21 ^A ; 22 ^A ; 24 ^A ; 25 ^A ; 26 ^A ; 27 ^A ; 28 ^A	<10	SI
	14^A, 23^A	11-16	B

^a: En Tabla 1.8 se indica el nombre correspondiente de cada cepa según su código de identificación.

^b: Calculado a partir del crecimiento, medido como DO_{560nm} a 24 h, según se indica en Materiales y Métodos.

^c: Ninguno mantuvo efecto antagónico con respecto al control. Por lo tanto, no se muestran resultados en presencia de catalasa o tripsina.

En negrita se destacan cepas que presentaron actividad antagónica fuerte y revirtieron completamente su efecto inhibitorio debido a acidez.

Abreviaciones: SI (sin inhibición), B (bajo), M (moderado), A (alto)

Los valores son el promedio de tres determinaciones independientes medidas por triplicado. Letras diferentes indican variaciones significativas (P < 0,05).

Tabla 1.14 Porcentajes de inhibición de fracciones de sobrenadantes libres de células de BAL aisladas de hortalizas y ensalada de hortalizas (EF) sobre *E. faecalis*

Tratamiento	Código de cepa ^a	Porcentaje de inhibición (%) ^b	Tipo de efecto
–	31 ^A	0	SI
SLC	16 ^A ; 20 ^A	<10	SI
	13 ^A ; 14 ^A ; 15 ^A ; 17 ^A ; 19 ^A ; 2 ^{AB} ; 8 ^{AB} ; 9 ^{AB} ; 10 ^{AB} ; 18 ^{A,B}	11-28	B
	4 ^{BC} ; 5 ^{C,D}	44 - 64	M
	6^D; 7^D; 11^D; 12^{DE}; 1^E; 3^E	90 - 98	F
SLCN	1 ^A ; 7 ^A ; 8 ^A ; 11 ^A ; 12 ^A ; 13 ^A ; 14 ^A ; 15 ^A ; 16 ^A ; 17 ^A	< 10	SI
	18 ^A ; 19 ^A ; 20 ^A ; 2 ^A ; 4 ^A ; 9 ^A ; 10 ^A ; 3 ^{AB} ; 6 ^{BC} ; 5 ^{B,C}	12 - 25	B
SLCN+Catalasa ^c	6 ^{BC} ; 5 ^{B,C}	22-24	B
SLCN+Tripsina ^c	6^A	<10	SI
	5 ^B	15	B

^a: En Tabla 1.8 se indica el nombre correspondiente de cada cepa según su código de identificación.

^b: Calculado a partir del crecimiento, medido como DO_{560nm} a 24 h, según se indica en Materiales y Métodos.

^c: Mantuvieron efecto antagónico con respecto al control. Por lo tanto, se muestran resultados en presencia de tripsina. En esta condición, 6, revirtió su efecto inhibitorio.

En negrita se destacan cepas que presentaron actividad antagónica fuerte y revirtieron completamente su efecto inhibitorio por acidez o principalmente por acidez y producción de sustancia tipo bacteriocina.

Abreviaciones: SI (sin inhibición), B (bajo), M (moderado), A (alto)

Los valores son el promedio de tres determinaciones independientes medidas por triplicado. Letras diferentes indican variaciones significativas (P < 0,05).

En resumen, un menor número de cepas presentó actividad antagónica frente a *E. faecalis*, la cual estuvo asociada a acidez siendo este efecto más pronunciado, en general, para las cepas de hortalizas.

Las figuras 1.8, 1.9 y 1.10 representan los gráficos de dispersión de la actividad antimicrobiana de los diferentes SLC de BAL de hortalizas y frutas (A) y EH y EF (B) frente a *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *E. faecalis*, respectivamente. Estos gráficos representan la posible relación entre dos variables, en este caso la fracción del SLC con el porcentaje de inhibición de crecimiento para cada microorganismo indicador teniendo en cuenta el origen de

El análisis comparativo global entre las tres cepas indicadoras y SLC de las BAL en estudio demostró que, en general, los SLC sin tratar de bacterias provenientes de EF/F mostraron mayores porcentajes de inhibición (F ó M) especialmente frente a *S. Typhimurium*, aunque si se discrimina por cada tipo de matriz alimenticia ensayadas, los de hortalizas y frutas enteras seguido por EF presentaron la mayor efectividad, correspondiendo la mayoría de ellos a cepas de *L. plantarum*. Las de EH presentaron la más baja efectividad antimicrobiana frente a las tres cepas indicadoras ensayadas, posiblemente relacionado con la predominancia de *Ln ssp.* A su vez, entre las cepas indicadoras, *E. faecalis* fue la más resistente a la acción antibacteriana de los SLC ensayados, en concordancia con lo observado en el ensayo de la gota, mostrando en este último caso las cepas de H la mayor efectividad.

En general, el efecto antagónico de los SLC estuvo relacionado a acidez, destacándose aquellos clasificados como (IA) que revirtieron a (SI) cuando fueron neutralizados. En concordancia con nuestros resultados, Trias y col. (2008) encontraron en cepas de *Leuconostoc* aisladas de frutas frescas y productos vegetales que la producción de ácidos orgánicos fue responsable de su actividad antagónica siendo el mecanismo más frecuentemente usado entre las cepa evaluadas y que la actividad debida a la producción de compuestos de naturaleza

proteica fue encontrada solamente en dos cepas (CM135 y CM160) frente a *L. monocytogenes*.

Recientemente, Almeida da Costa y col. (2018) evaluaron la naturaleza de la actividad antimicrobiana mediante SLC tratados de BAL derivados de diversas frutas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 952806, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *L. monocytogenes* ATCC 19115 y detectaron similarmente a lo encontrado en el presente estudio que, la mayoría de las BAL ensayadas mostraron efecto inhibitorio debido a la producción de ácidos. Estudios previos también informaron la inhibición de estos patógenos debido a la producción de ácidos orgánicos por BAL de diversos orígenes (Hartmann y col., 201; Fatma y Benmechernene, 2013). Sin embargo, Assouhoun-Djeni y col. (2016) estudiando la naturaleza de la actividad antimicrobiana de BAL contra *Listeria innocua* ATCC 33090, *L. monocytogenes* CIP 7835, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* CIP 78.3 y *E. coli* ATCC 25922 detectaron la presencia de sustancias inhibitorias de origen proteico. Sin embargo, existe poca referencia bibliográfica disponible respecto a la detección y uso de bacteriocinas u otra sustancia en frutas y verduras recién cortadas (Ma y col., 2017).

En este sentido, resulta muy interesante el descubrimiento, aunque en baja proporción, de cepas con actividades antagónicas asociadas a la producción de una sustancia de otra naturaleza diferente a ácidos orgánicos, las cuales fueron especialmente activas frente a *S. Typhimurium*. Entre ellas, se destacaron cepas aisladas de naranjas con capacidad para producir peróxido de hidrógeno y cinco de EF, pimiento y berenjena con potencialidad para producir una sustancia de naturaleza proteica inhibida por tripsina activas contra *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* y/o *E. faecalis*. En base a los resultados obtenidos se seleccionaron 19 cepas de BAL, por presentar actividad inhibitoria (F) asociada sólo a acidez, actividad inhibitoria (F o M) asociada a acidez y una sustancia de otra naturaleza, y actividad inhibitoria (F o M) contra por lo menos dos cepas indicadoras incluyendo una Gram positiva y una Gram negativa

(principalmente de frutas y hortalizas enteras) (Tablas 1.15 y 1.16).

Tabla 1.15. Cepas de BAL de F/EF seleccionadas por sus propiedades antagónicas

Cepas seleccionadas	Tipo de actividad antagónica:		
	<i>S. Typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>L. plantarum</i> N4 (1)	M*	F>90*	F
<i>L. plantarum</i> N8 (2)	F >90*	F >90*	F >90
<i>L. plantarum</i> JNB25 (3)	F >90*	F >90	B
<i>L. plantarum</i> EFj1 (4)	F >90	F	SI
<i>L. plantarum</i> EFj18 (7)	F >90	M	SI
<i>L. plantarum</i> EFj21 (8)	F >90	M	SI
<i>L. plantarum</i> EFj24 (9)	F >90	M	SI
<i>L. plantarum</i> EFj47 (14)	F >90**	F	F
<i>L. plantarum</i> EFF3 (18)	F >90	F	SI
<i>L. plantarum</i> EFF29 (23)	F >90**	F >90	F
<i>Leucnostonoc spp</i> EFF6 (19)	F >90	F	SI

*: Actividad inhibitoria debida a acidez y peróxido de hidrógeno (Inhibido por catalasa)

** : Actividad inhibitoria debida a acidez y sustancia tipo bacteriocina (Inhibido por Tripsina)

() Código de la cepa

Tabla 1.16. Cepas de BAL de H/EH seleccionadas por sus propiedades antagónicas

Cepas seleccionadas	Actividad antagónica:		
	<i>S. Typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>L. plantarum</i> SLGR1 (1)	F >90	F >90	F >90
<i>L. plantarum</i> SLGR6 (3)	F	F >90	F >90
<i>L. plantarum</i> JLM1 (4)	F >90	F >90	M
<i>L. plantarum</i> SB2 (5)	F >90	F	M**
<i>L. plantarum</i> SB5 (6)	F >90	F	F >90**
<i>L. plantarum</i> JB1 (9)	F	F >90	B
<i>L. plantarum</i> JP11 (12)	F	F >90**	F >90
<i>L. plantarum</i> SP33 (13)	F >90	F >90	B

*: Actividad inhibitoria debida a acidez y peróxido de hidrógeno (Inhibido por catalasa)

** : Actividad inhibitoria debida a acidez y sustancia tipo bacteriocina (Inhibido por Tripsina)

() código de la cepa

1.4.6 Modo de acción de SLC y SLCN de cepas seleccionadas

Se determinó el modo de acción antibacteriano de las 19 cepas seleccionadas sobre los tres microorganismos indicadores usados anteriormente midiendo el crecimiento (ufc/mL) a 24 h de incubación a 37 °C en presencia de sus respectivos SLC sin tratar y neutralizado. Como control positivo se empleó medio estéril (BHI) en lugar de SLC (Figura 1.11).

Los resultados demostraron que la mayoría de las cepas ensayadas presentaron un efecto bactericida, excepto *L. plantarum* EFj18 y SB5 de EF y hortalizas cuyos efectos fueron bacteriostáticos, inhibiendo completamente el crecimiento de *S. Typhimurium* o *E. faecalis* y las tres cepas indicadoras respectivamente. Es interesante destacar que un 33% y 61% del total de las BAL de F/EF presentaron efecto bactericida total y parcial sobre las cepas indicadoras ensayadas mientras que esta propiedad solamente ocurrió en un 8,35% y 79,2% de las cepas de H/EH respectivamente. Esta diferencia podría estar relacionada con el efecto sinérgico encontrado mayoritariamente en BAL de F/EF como se mencionó anteriormente.

En el caso de *S. Typhimurium*, el efecto bactericida de los SLC sin tratar ocurrió en forma total y parcial a razón del 45,0 y 45,5% ó 12,5 y 75,0% del total de las cepas de F/EF ó H/EH ensayadas respectivamente (Figura 1.11 A, B) mientras que, sobre *L. monocytogenes*, esta propiedad ocurrió a razón de un 9% y 91% para las cepas de F/EF pero no para las de H/EH. Las últimas solamente mostraron efecto bactericida parcial a razón de un 87,5%, sin observarse efecto bactericida total (Figura 1.11 C, D). Respecto a *E. faecalis* un 45,5% y 45,5% o 17,5 y 75% de cepas de F/EF o H/EH presentaron efecto bactericida total y parcial, respectivamente (Figura 1.11 E, F). De este modo las cepas de F/EF fueron más efectivas en general que las de H/EH, presentando un mayor porcentaje de cepas cuyos SLC presentaron un efecto bactericida tota frente a las tres cepas indicadoras ensayadas. En concordancia con nuestros resultados, Rodríguez Vaquero y col. (2014) reportaron que SLC sin tratar de BAL homofermentativas

aisladas de berenjena tuvieron efecto bactericida parcial en 100% de las cepas ensayadas contra *S. aureus* 23922.

En el presente ensayo se puso en evidencia que los metabolitos producidos por las BAL seleccionadas, especialmente de F/EF poseen un modo de acción bactericida contra bacterias patógenas transmitidas por alimentos tales como las ensayadas en este estudio en 24 h de incubación, lo que les da un valor adicional para su uso como agentes de biocontrol.

Cuando los SLC fueron neutralizados, en general se revirtió el efecto antagónico, excepto para las cepas de *L. plantarum* N8 y JNB25 de naranjas frente a *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *E. faecalis*, y para las cepas 4 y 5 de hortalizas confirmando sus efectos sinérgicos entre acidez y producción de peróxido de hidrógeno u sustancia tipo bacteriocina, respectivamente.

Teniendo en cuenta que la mayoría de cepas provenientes de frutas y EF mostraron efecto bactericida total o parcial frente a las tres patógenas ensayadas y en algunas de ellas no solamente por acidez se seleccionó este grupo de bacterias para continuar con las investigaciones propuestas, más allá que las de hortalizas también resultaron de gran interés.

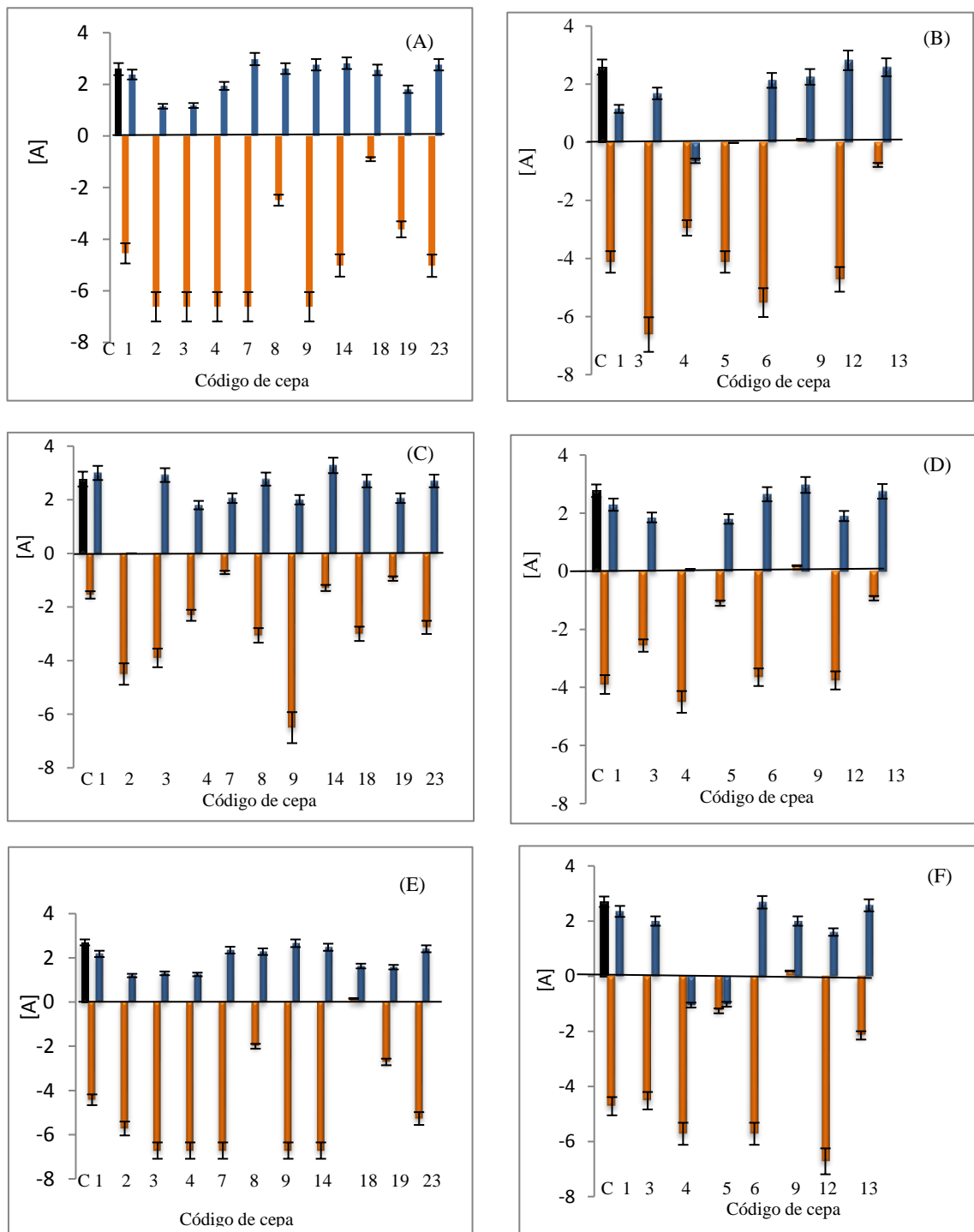


Figura 1.11 Diferencia en la concentración de células viables entre el inóculo (0 h) y tras 24 horas de incubación (fase estacionaria) de *S. Typhimurium* (A, B), *L. monocytogenes* (C, D) y *E. faecalis* (E, F) en medio control (sin SLC) y suplementado con SLC sin tratar (SLC) y neutralizado (SLCN) de cada BAL seleccionada de F/EF (A, C, E) y H/EH (B, D, F). Inóculo inicial promedio: 6,72 log ufc/mL. SLC sin tratar (■) y SLC neutralizado, SLCN, (■).

1.5 CONCLUSIONES PARCIALES

- La carga microbiana en EF fue significativamente mayor que en EH, independientemente del origen de la muestra.

- En EF, las BAL fueron predominante, aun cuando se aislaron levaduras y bacterias Gram negativas, catalasas positivas en medio PCA y Mac Conkey. En ensalada de hortalizas se encontró una mayor proporción de levaduras que de bacterias Gram negativas, catalasas positivas y BAL.

- En ambas matrices alimentarias se obtuvieron recuentos positivos en medios PCA y Mac Conkey de microorganismos potencialmente alterantes y patógenos. Este resultado resalta la importancia de caracterizar BAL autóctonas de frutas y hortalizas frescas o MP para su potencial aplicación de agentes de biocontrol de dichos alimentos.

- La identificación fenotípica de 81 aislados de muestras de EF y EH de elaboración local, demostró por primera vez, la presencia de cuatro géneros comunes de BAL con aptitud para crecer eficientemente a pH 4,5; siendo *Lactobacillus* y *Leuconostoc* predominantes en cada una de ellas respectivamente.

- Se evaluó la actividad antimicrobiana de los 81 aislados caracterizados fenotípicamente en esta Tesis Doctoral y, de 23 BAL de frutas y hortalizas frescas a través del ensayo de la gota frente a cinco cepas indicadoras.

- Del total de bacterias analizadas, independientemente de su origen, 47,1% presentó actividad antagónica fuerte al menos frente a tres de las cinco bacterias indicadoras ensayadas.

- En términos cuantitativos, las cepas de EH resultaron menos eficientes en relación a sus propiedades antibacterianas en oposición a las de hortalizas enteras y de F/EF que mostraron un comportamiento bastante homogéneo. Este hecho podría explicar la menor proporción de BAL aisladas de EH en comparación con EF.
- En base a los resultados obtenidos se seleccionaron 48 cepas por sus actividades inhibitoria fuerte frente a dos o tres cepas indicadoras. Se evaluó su naturaleza antimicrobiana, empleando SLC, frente a *S. Typhimurium* (sensibilidad alta) *E. coli* (sensibilidad intermedia) y *E. faecalis* (sensibilidad baja).
- **Frente a *S. Typhimurium*:**
 - La mayoría de los SLC presentaron efecto IF, excepto los de EH, lo que estuvo de acuerdo con resultados obtenidos en la prueba de la gota.
 - La actividad antimicrobiana de la mayoría de las cepas, especialmente de H/EH estuvo asociado a acidez, siendo este efecto más pronunciado en las que revirtieron su efecto de IF a IB o SI cuando fueron neutralizados, lo que se relacionaría con su mayor capacidad acidificante.
 - Dentro del grupo de cepas cuyos efectos inhibitorios estuvieron asociado a otro tipo de sustancia, además de acidez, se destacó la producción de peróxido de hidrógeno (inhibido por catalasa) por *L. plantarum* N4, N8, JNB25, y de una sustancia de naturaleza proteica inhibida por tripsina en *L. plantarum* EFl29 y EFj47 de F/EF, siendo el primero más significativo en las condiciones de ensayo.
 - Cabe destacar que la producción de peróxido de hidrógeno fue demostrada en el 100% de las cepas aisladas de naranjas.
- **Frente a *L. monocytogenes*:**
 - Los SLC mostraron efecto antagónico en un porcentaje menor de cepas que lo

observado para *S. Typhimurium*, lo que se relacionó con la mayor resistencia del patógeno detectada en el ensayo de la gota.

- Nuevamente las cepas de EH presentaron la menor actividad antibacteriana, mientras que las de hortalizas o frutas enteras fueron las más efectivas.

- El efecto inhibitorio estuvo asociado principalmente a acidez, excepto para las cepas de naranjas (acidez y producción de peróxido de hidrógeno) y la de pimiento, *L. plantarum* JP11, (sustancia inhibida por tripsina).

➤ **Frente a *E. faecalis*:**

- La minoría de los SLC ensayados presentó un efecto antagónico significativo, siendo los más efectivos de cepas de hortalizas.

- La naturaleza de la actividad antimicrobiana estuvo asociada a acidez, y solamente en dos cepas de hortalizas podría ser débilmente atribuída a otro tipo de sustancia, una de ellas inhibida por tripsina.

➤ El análisis comparativo global demostró que, en general, los SLC sin tratar de bacterias provenientes de hortalizas, frutas y EF mostraron los mayores porcentajes de inhibición (F ó M) especialmente frente a *S. Typhimurium*. En general, el efecto antagónico de los mismos estuvo relacionada a acidez y en baja proporción, además, a la producción de peróxido de hidrógeno y en algunas cepas de EF u hortaliza a una sustancia de naturaleza proteica inhibida por tripsina.

➤ Se seleccionaron 19 cepas por presentar actividad inhibitoria (F) asociada a acidez, (F o M) asociada a acidez y una sustancia de otra naturaleza, y (F o M) contra dos cepas indicadoras incluyendo una Gram positiva y otra Gram negativa.



CAPÍTULO 2

CRECIMIENTO Y PROPIEDADES DE INTERÉS TECNOLÓGICO EN CEPAS SELECCIONADAS. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR



2.1 INTRODUCCIÓN

Las BAL constituyen un grupo particular de interés en la industria de los alimentos debido a sus propiedades tecnológicas, siendo ampliamente usadas como cultivos iniciadores para producir alimentos fermentados (Lahtinem y col., 2012; Limón-Martínez y col. 2018). Por otro lado, los vegetales frescos y MP son fuertemente recomendados en la dieta humana, sin embargo, están sujetos a rápido deterioro microbiano. En este contexto, la fermentación láctica resulta una herramienta biotecnológica simple y valiosa para mejorar su seguridad y calidad.

Para conseguir propiedades deseables del producto fermentado, las BAL deben ser capaces de adaptarse y crecer en las condiciones fisicoquímicas propias de la materia prima. El pH de frutas y vegetales, generalmente ácido (entre 4,0 y 4,6) y la naturaleza de los ácidos orgánicos por sí mismos seleccionan el crecimiento de microorganismos ácidos tolerantes tales como BAL (Brackett, 1999), levaduras y hongos filamentosos (Splittstoesser, 1987; Sajur y col., 2007; Savino y col., 2012). En ese contexto, en el Capítulo 1 del presente trabajo de Tesis Doctoral evaluamos las respuestas de crecimiento de 81 aislados de EF y EH a pH ácido como primer criterio de selección. Luego, los caracterizamos fenotípicamente y evaluamos sus propiedades antimicrobianas lo que permitió la selección de 11 cepas aisladas de frutas frescas y EF para continuar con las investigaciones propuestas.

Considerando que fermentaciones espontáneas, resultantes de las actividades competitivas de una variedad de microorganismos autóctonos y contaminantes corren el alto riesgo de fallar y, ocasionar daños inesperados para la salud del consumidor el uso de cultivos iniciadores o “starters”, capaces de adaptarse y crecer en la matriz alimenticia es recomendado, desde el punto de vista de higiene y seguridad (Sajur y col., 2007). En este contexto evaluamos las repuestas de crecimiento de las BAL en estudio en un medio complejo de laboratorio y un medio natural a fin de aproximarnos a las condiciones propias de las potenciales matrices alimentarias. Al mismo tiempo determinamos sus capacidades

CAPÍTULO 2

acidificantes en relación con sus propiedades antimicrobianas y potencialidades de uso como agente biopreservativo.

Un grupo muy importante de constituyentes de los alimentos vegetales son los compuestos fenólicos cuya presencia en productos frescos y MP ha sido asociada inversamente a la morbilidad y mortalidad por enfermedades degenerativas y coronarias (Gillman y col., 1995). Sin embargo, la influencia de estos compuestos sobre el crecimiento y viabilidad de las BAL no está clara, mientras algunos presentan efectos estimulatorios, otros las afectan negativamente (Stead, 1993; Reguant y col., 2000; Campos y col., 2003; Figueiredo y col., 2008; Rodríguez Vaquero y Manca de Nadra, 2008; Rodríguez Vaquero y col., 2010; 2011; 2014). Por lo tanto, investigamos la influencia de compuestos fenólicos puros sobre el crecimiento y viabilidad celular de las BAL seleccionadas a fin de establecer sus competencias para crecer en los medios naturales y metabolizar dichos compuestos.

Por otro lado, identificar a nivel molecular las cepas aisladas e identificadas fenotípicamente de EF. Tradicionalmente, la identificación microbiana ha estado basada en el estudio de caracteres fenotípicos, fisiológicos y/o bioquímicos. Estos métodos, aunque presentan algunos inconvenientes, como por ejemplo su escaso poder discriminante (Kandler y Weiss, 1986) o el que son muy laboriosos y en ocasiones económicamente costosos, son todavía muy utilizados, aunque en ningún caso como único método de identificación. El avance y la simplificación de las técnicas moleculares han permitido que éstas se utilicen como una herramienta de rutina en la identificación de microorganismos, sobre todo en investigación, entre otras ventajas por su universalidad, sensibilidad, resolución y poder discriminante. Entre ellos, el análisis de la secuencia de bases de los ácidos nucleicos es un marcador genético que puede ser utilizado para la diferenciación de especies y cepas. En estos ensayos se utiliza bien el genoma entero o una parte del mismo, como ocurre en la secuenciación de los ARNs ribosomales (ARNr). Los ARNr poseen secuencias variables y secuencias constantes, que pueden ser utilizadas para comparar tanto microorganismos muy próximos como muy alejados filogenéticamente. Las bacterias poseen tres tipos de ARNr,

CAPÍTULO 2

designados por su coeficiente de sedimentación, 23S, 16S y 5S, cuyos genes se encuentran normalmente organizados en un operón y separados entre sí por secuencias intergénicas llamadas ITS (internal transcribed spacer). La fracción 16S del ARN ha sido la más estudiada ya que su tamaño permite una secuenciación rápida y suministra además mucha información. Actualmente se dispone de numerosas secuencias del ARNr 16S en las bases de datos mundiales. Un microorganismo desconocido puede ser identificado en función del alineamiento de la secuencia de su ARNr 16S con las secuencias disponibles en estas bases de datos. Para especies de un mismo género existe un alineamiento en las secuencias superior al 90% y para cepas de una misma especie este valor es superior al 99% (Betlz et al., 1990). Este método ha sido utilizado para confirmar la identificación fenotípica y caracterizar genéticamente los aislados seleccionados de EF.

Por otro lado, alimentos vegetales biopreservados podrían ser vehículos de BAL como una alternativa para la producción de probióticos no-lácticos (Liu y col., 2011; Perez y Saguir, 2012; Favaro y col., 2014; Palomino y col., 2015; Gomez y col., 2016). Por ejemplo, jugos de frutas podrían ser matrices deseables para el cultivo de BAL probióticas ya que contienen nutrientes beneficiosos (Shah y col., 2001) y un sabor agradable, siendo percibidos como un alimento saludable y diferente (Sheenhan y col., 2007). Perez y Saguir (2012) demostraron la capacidad de la cepa *L. plantarum* N4, seleccionada en el Capítulo 1, para sobrevivir en jugo de naranja durante un período prolongado de tiempo a 4 °C, sin afectar su composición química ni cualidades organolépticas. Este comportamiento, sumado a la caracterización parcial de algunas propiedades probióticas tales como tolerancia a acidez y sal biliar y la resistencia a la exposición a condiciones gastrointestinales simuladas (Perez, 2013), la posicionan como buena candidata para usarse en la elaboración de un jugo natural con valor agregado para el consumidor. Otra propiedad de interés en este sentido es la capacidad para formar “biofilm”, ya que la modulación de la microbiota en muchas condiciones ocurre a través de exclusión competitiva por adhesión a sitios y nutrientes.

CAPÍTULO 2

Entre los principales beneficios para la salud atribuidos al consumo de probióticos se encuentra sus propiedades antimicrobianas (Saad y col., 2013), propiedad valorada en las BAL seleccionadas en el Capítulo 1. En este aspecto, profundizamos los estudios al respecto determinando la actividad antimicrobiana en una cepa aislada de una matriz alimenticia de elaboración local.

Por otro lado, se ha descrito que el uso de BAL mejora el balance o disponibilidad de aminoácidos esenciales y vitaminas tales como tiamina, riboflavina, niacina o ácido fólico y la utilización de hierro en presencia de vitamina C en productos vegetales (Di Cagno y col. 2010, 2011; 2013). Sin embargo, las BAL son muy exigentes desde el punto de vista nutricional, especialmente en factores de crecimiento (Amoroso y col., 1992; Saguir y Manca de Nadra, 2002; Manca de Nadra y col., 2003; Aredes Fernández y col., 2003; 2004; Saguir y Manca de Nadra, 2007). Por lo tanto, realizamos estudios nutricionales en las cepas seleccionadas a fin de establecer sus competencias para el adecuado crecimiento en el medio natural, así como sus potenciales capacidades biosintéticas.

La disponibilidad de aminoácidos libres y presencia de microorganismos pueden influir en la formación de aminos biógenas (AB) en alimentos. Las AB son bases orgánicas de bajo peso molecular que poseen actividad biológica, y son normalmente producidas por decarboxilación de aminoácidos o por aminación y transaminación de aldehídos y cetonas. Su ingestión en altas cantidades constituye un riesgo potencial para la salud humana debido a sus efectos tóxicos (Alvarez-Cisneros y col., 2017). Se ha reportado una alta incidencia de presencia de aminoácido-decarboxilasas especialmente en ciertas especies de *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* y *Pseudomonas* (Linares y col., 2009).

Considerando la importancia de la actividad bacteriana en frutas frescas y MP, así como las exigencias en cuanto a patrones de calidad por parte del consumidor, es fundamental seleccionar cepas de BAL identificadas fenotípica y genotípicamente con elevadas cualidades para su potencial aplicación biotecnológica. Más aún, cuando en el mercado local no se

encuentran disponibles cultivos iniciadores autóctonos para ser inoculados en la fermentación de matrices alimenticias vegetales, listas para consumo, que puedan agregar valor adicional, evitando alteraciones por deterioro microbiano, y redundando en beneficios para la industria y el consumidor.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Crecimiento y capacidad acidificante en diferentes condiciones de cultivo. Influencia de compuestos fenólicos puros.
- Identificación molecular de cepas seleccionadas
- Propiedades de interés tecnológicos como criterio adicional de selección.
- Evaluación de propiedades antimicrobianas frente a una cepa patógena aislada de EF

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Microorganismos

Se incluyeron las 11 cepas de frutas y EF seleccionadas en el Capítulo 1 por sus propiedades antagónicas (Tablas 1.15; 1.1).

Para ensayos de inactivación en jugo multifruta comercial (JMC), cuya composición se describe en el apartado 2.3.2 se emplearon las cepas *S. Typhimurium* (ATTC 14028) y *L. monocytogenes* descritas en el Capítulo 1. Las mismas se eligieron por presentar diferentes perfiles de sensibilidad antimicrobiana y además, por tratarse de una bacteria Gram (+) y otra Gram (-).

2.3.2 Medios de cultivos

- **Medio MRS** (de Man y col., 1960), cuya composición ha sido descrito en el apartado 1.3.3 del Capítulo 1.

- **Medio BHI**, cuya composición ha sido descrito en el apartado 1.3.3 del capítulo 1.

CAPÍTULO 2

- **Jugo comercial multifruta**, marca La Campagnola BC[®], obtenido de un local comercial. Este producto de bajas calorías tiene alta aceptación por parte del consumidor, no posee azúcares agregados, colorantes ni conservantes, y su composición según se describe en la etiqueta es la siguiente: pulpa de banana (5%), pulpa de durazno (10%), jugo de manzana (15%), jugo de naranja (20%), pH= 3,49. El jugo pasteurizado se encontraban en recipiente cerrado y refrigerado al momento de su compra y, de esta manera se trasladó al laboratorio donde fue mantenido a 4 °C hasta su procesamiento y uso en los ensayos experimentales. El procesamiento consistió en la clarificación del jugo por centrifugación a 7500 g durante 15 min a 4 °C (**JMC**) y, dependiendo del ensayo experimental, su posterior neutralización a pH 6,5 con NaOH 0,1 N.

- **Medio semisintético adicionado con compuestos fenólicos puros**, con la siguiente composición basal (MB) en g/L: glucosa, 2; citrato trisódico dihidratado, 0,5; ácido D-L málico, 5; casaminoácidos, 1; extracto de levadura 6,7. El pH se ajustó a 5,5 con HCl 0,1. El MB se adicionó con una mezcla de ácido ferúlico (10 mg/L), ácido gálico (50 mg/L) y catequina (20 mg/L) disueltos en etanol. El MB se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C y 1 atmósfera de sobrepresión. Los compuestos fenólicos se esterizaron por filtración a través de membranas de 0,22 µm (Millipore) y se adicionaron al MB estéril en condiciones asépticas. El medio se empleó para evaluar la influencia de la mezcla compuestos fenólicos puros sobre el crecimiento de BAL seleccionadas.

- **Agar base PALCALM** (Merck), medio selectivo y diferencial para *L. monocytogenes* compuesto por (g/L): agar base Columbia, 39,0; D-glucosa, 0,5; D-manitol, 10,0; esculina, 0,8; citrato de hierro y amonio, 0,5; rojo fenol, 0,08; cloruro de litio, 15,0, pH final: 7,2 ± 0,2. El suplemento selectivo para el agar base contiene: Polimixina B 5000,0 UI; Acriflavina HCl 0,0025 g, Cefotaxidima 0,01. *L. monocytogenes* desarrolló formando colonias lisas, verdosas con un halo negro sobre fondo rojo. Este medio fue empleado para el recuento de *L. monocytogenes* en ensayo de inactivación en JMC.

CAPÍTULO 2

- **Medio Salmonella-Shigella agar (SSA)** (Difco), constituido en (g/L) por: pluripectona 5,0; extracto de carne, 5,0; lactosa, 10; mezcla de sales biliares, 8,5; citrato de sodio, 8,5; tiosulfato de sodio, 8,5; citrato férrico, 1,0; agar 13,5; verde brillante 0,00033; rojo neutro, 0,025. No se esterilizó en autoclave, se calentó a ebullición 3 minutos y se dejó enfriar a 50 °C y se distribuyó en placas de Petri. pH final $7,0 \pm 0,2$. Este medio fue empleado para el recuento de *S. Typhimurium* en ensayo de inactivación en JMC.

- **Medio mínimo decarboxilasa**, con la siguiente composición basal (MB) en g/L: peptona de carne, 5; extracto de carne, 5; glucosa, 0,5; piridoxal 5-fosfato, 0,005; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,05; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; tiamina, 0,01; el indicador de pH púrpura de bromo cresol, 0,06 y Tween 80, 1 mL. El medio se llevó a pH $5,3 \pm 0,2$ y se esterilizó en autoclave. Luego, se adicionó el aminoácido precursor (1%, p/v) esterilizado por filtración a través de membrana filtrante de 0,22 μm (Millipore) en condición de esterilidad. El medio se empleó para determinar cualitativamente la formación de AB a partir de la decarboxilación del aminoácido precursor, lo que produce su alcalinización y cambio de color de amarillo a violeta (Bover-Cid y Holzapfel, 1999).

- **Medio químicamente definido optimizado para *L. plantarum* (MSLP)**, descrito por Saguir y col. (2007), cuya composición de aminoácidos y vitaminas se indica en la Tabla 2.1. El medio sintético, usado como medio basal (MB), fue esterilizado en autoclave, cuyo calentamiento fue detenido inmediatamente se alcanzó la temperatura de 121 °C, excepto el aminoácido cysteina-HCl que se esterilizó por filtración a través de membrana filtrante de 0,22 μm de tamaño de poro (Merck) y luego se añadió al medio estéril. Este medio fue empleado para determinar los requerimientos en vitaminas de las cepas seleccionadas.

Tabla 2.1 Concentración de vitaminas y aminoácidos en MSLP

Constituyente	Concentración (g/L)	Constituyente	Concentración (g/L)
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	0.01	L-ácido glutámico	0.15
Vitamina B ₁₂	0.001	L-histidina-HCl	0.20
Pantotenato de calcio	0.001	L-isoleucina	0.20
D-biotina	0.01	L-leucina	0.3
Ácido fólico	0.001	L-lisina-HCl	0.3
Niacina	0.001	L-metionina	0.2
Pixidoxal etil acetal-HCl	0.001	L-fenilalanina	0.2
Riboflavina	0.001	L-prolina	0.3
Thiamina-HCl	0.001	L-serina	0.3
DL-alanina	0.20	L-treonina	0.2
L-arginina	0.3	L-triptófano	0.2
Ácido L-aspártico	0.20	L-tirosina	0.3
L-cisteina- HCl	0.20	L-valina	0.3

El MB estuvo en agua destilada (L⁻¹): glucosa, 10 g; acetato de potasio, 10 g; dihidrógeno ortofosfato de potasio, 2 g; tioglicolato de sodio, 0.5 g; sulfato de magnesio 7.H₂O, 0,15 g; sulfato de manganeso 4.H₂O, 0,02 g; sulfato ferroso 7.H₂O, 0,01 g; Tween, 80, 1 mg; adenina, 50 mg; ácido citidílico, 50 mg; desoxiguanosina, 50 mg; guanina-HCl, 50 mg (Saguir y Manca de Nadra, 2007).

- **Medio TSI** (Triple azúcar hierro) con la siguiente composición en (g/L): extracto de carne, 3; extracto de levadura, 3; peptona, 20; cloruro de sodio, 5; lactosa, 10; sacarosa, 10; glucosa, 1; sulfato de hierro y amonio, 0,2; tiosulfato de sodio, 0,2; rojo fenol 2,5 mg%; agar, 13; pH final. 7,3 ± 0,2. Este medio se empleó para estudiar utilización de azúcares y producción de sulfuro de hidrógeno durante la identificación de *Enterobacteriaceae*

- **Urea agar de Christensen** con la siguiente composición en (g/L), peptona, 1; NaCl, 5; glucosa, 1; KHPO₄, 2; solución alcohólica de rojo fenol 0,2 %; agar, 20. Se ajustó a pH 6,7± 0,2. Se esterilizó a 121°C 15 minutos, luego se añadió 100 ml de urea al 20%

previamente esterilizada por filtración. Se fraccionó en tubos y se solidificó en bisel. El color del indicador en el medio es amarillo. Este medio se utilizó para la prueba de la ureasa.

- **Citrato de Simmons agar** compuesto por (g/L), citrato de sodio, 2; MgSO₄, 0,2; NaCl, 5; NH₄H₂PO₄, 1; K₂HPO₄, 1; azul de bromotimol, 0,08; agar, 15. El pH final se ajustó a $6,9 \pm 0,2$. Luego de esterilizar se dejó solidificar los tubos en bisel. Este medio se utilizó para la prueba de utilización de citrato como única fuente de carbono.

- **Caldo peptona glucosa fosfato (APGP)** compuesto por (g/L), peptona, 7; K₂HPO₄, 5; glucosa, 5; pH final: $6,9 \pm 0,2$. Este medio se usó para realizar las pruebas de Rojo Metilo y Voges Proskauer (VP).

- **Medio Rappaport-Vassiliadis con soja** con la siguiente composición en g/L: peptona de soja 4,5; cloruro de magnesio 6H₂O 29; cloruro de sodio 8; fosfato dipotásico 0,4, fosfato monopotásico 0,6; verde de malaquita 0,036, pH final $5,2 \pm 0,2$.

2.3.3 Crecimiento de BAL en diferentes condiciones de cultivo

2.3.3.1 Preparación del inóculo y condiciones de cultivo

Cultivos puros de las cepas de BAL se activaron por dos transferencias sucesivas en medio MRS, pH 6,5. A final de fase exponencial tardía (~12 h) las células de la última transferencia se cosecharon por centrifugación a 4600 g durante 20 min a 4 °C, se lavaron dos veces con solución fisiológica estéril, y se re-suspendieron en la misma disolución a una DO_{560nm}: 1,0. Las suspensiones celulares se usaron para inocular, a una tasa de 2 % (v/v) los medios de pruebas equivalente a una densidad celular de orden 10⁷ ufc/mL.

Los medios de pruebas inoculados y sus respectivos controles: - caldo MRS, - JMC, - Medio semisintético adicionado con una mezcla de compuestos fenólicos puros (MFP) se almacenaron a 30 y/o 37 °C durante 1, 2, 3 o 7 días dependiendo del ensayo experimental según se describe en la sección Resultados y Discusión. A intervalos regulares de tiempo se midió el crecimiento celular por medidas de turbidez (DO_{560nm}) y/o recuento de células viables (ufc/mL) y se tomaron muestras de sobrenadantes de cultivos libres de células (SLC) para

determinaciones analíticas y de pH. A partir de los valores obtenidos de DO_{560nm} se graficaron las curvas de crecimiento ($\ln DO_{560}$ vs tiempo) y se calcularon las velocidades máximas de crecimiento (μ_{max}) en la fase exponencial de crecimiento donde ésta es constante y máxima de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\mu_{max} = \frac{\ln DO_2 - \ln DO_1}{t_2 - t_1}$$

Donde, DO: densidad óptica a 560nm; t: tiempo

2.3.3.2 Medidas de pH y velocidad de acidificación

Las medidas de pH se realizaron en SLC con pHmetro (Microprocesador pH Meter, Hanna Instruments). A partir de los valores obtenidos durante el crecimiento microbiano se determinó la capacidad acidificante (ΔpH) a distintos tiempos:

- En medio líquido MRS:

$$\Delta pH_{12h} = pH(0 h) - pH(12 h)$$

- En JMC:

$$\Delta pH_{2d} = pH(0 d) - pH(2 d)$$

$$\Delta pH_{7d} = pH(0 d) - pH(7 d), \text{ donde } t = 2d \text{ o } 7d \times 24 h = 48 h \text{ o } 168 h, \text{ respectivamente}$$

Además, se calculó la velocidad máxima de acidificación (V_{maxac}) como la pendiente de la curva donde el descenso fue lineal y máximo según la siguiente fórmula:

$$\frac{\Delta pH}{\Delta t} = \frac{(pH_2 - pH_1)}{(t_2 - t_1)}$$

Donde, t: tiempo

2.3.3.3 Determinaciones analíticas

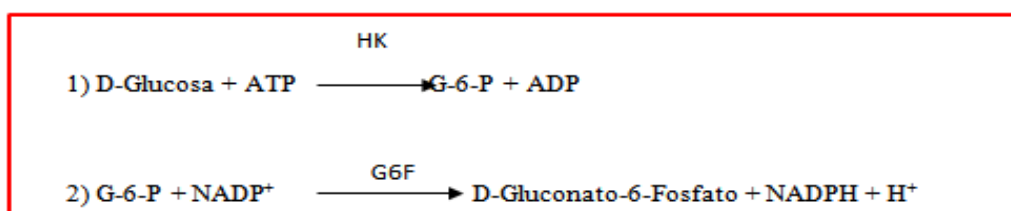
Las determinaciones se realizaron en muestras de SLC obtenidos por centrifugación a 4600 g durante 15 minutos a 4 °C a intervalos regulares de tiempo. Los SLC fueron filtrados a través de membranas filtrantes de 0,22 μm y mantenidos a -20 °C hasta su utilización.

2.3.3.3.1 Métodos enzimáticos

Los metabolitos fueron determinados por métodos enzimáticos, empleando kits de Boehringer (Mannheim, Alemania). A continuación se describen sus fundamentos.

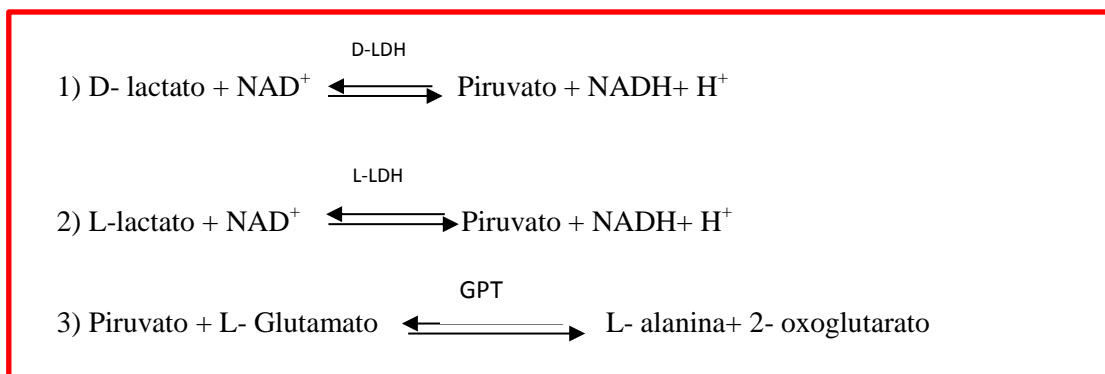
2.3.3.3.1.1 Glucosa residual

El método enzimático se basa en la fosforilación de D-glucosa a D-glucosa-6-fosfato (G-6-P) en presencia de la enzima hexokinasa (HK) y adenosina-5-trifosfato (ATP) con la formación simultánea de adenosina-5-difosfato (reacción 1). En presencia de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH), la G-6-P es oxidada en presencia de NADP a D-gluconato-6-fosfato con la formación de NADPH (2). La cantidad de NADPH formado (reacción 2) es directamente proporcional a la cantidad de D-glucosa presente en la muestra y, se determina espectrofotométricamente a 340 nm.



2.3.3.3.1.2 Ácido D y L- láctico

En presencia de D-Lactato deshidrogenasa (D-DLH), el ácido D-láctico es oxidado en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) a piruvato. La oxidación de L-Láctico requiere la presencia de la enzima L-lactato deshidrogenasa (L-LDH). Luego, el piruvato es transformado a L-alanina en una reacción catalizada por la enzima glutamato piruvato transaminasa (GPT) en presencia del L-glutamato. La GPT favorece el desplazamiento del equilibrio de la reacción a favor del piruvato y NADH. La cantidad de NADH formada es estequiométrica a la cantidad de ácidos D y L- Láctico. El incremento en NADH es determinado por medida de la absorbancia a 340 nm.



2.3.3.3.2 HPLC

Azúcares, ácidos L-málico, cítrico, D y L- Láctico, acético y propiónico y etanol se determinaron por HPLC usando un cromatógrafo Agilent (1260, Agilent Technologies, EU) equipado con una bomba de gradiente cuaternario (Quat Pump VL), inyector automático (ALS), termostato de columnas (modelo TTC), muestreador automático (modelo G1329B), y acoplado con un detector arreglo de Diodos (DAD) (modelo G1315D) y un detector de índice de refracción (RID) (Modelo G1362A).

Las condiciones analíticas incluyeron una columna Agilent HiPlex H con una columna (7.7 × 300 mm, 8 μm) y; una fase móvil compuesta por: un gradiente isocrático de H₂SO₄ 100%, 0,001M en agua ultrapura; y un flujo de 0,4 ml/m. La temperatura de la columna fue de 75 °C y el volumen de inyección de 20 μL. Los datos fueron procesados utilizando el Software Open LAB CDS ChemStation Edition TM (Agilent Technologies). Los picos obtenidos se compararon con los estándares (pureza de 99%; Sigma-Aldrich, St. Louis, EU).

2.3.4. Inactivación de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* en JMC

Para ensayos de inactivación en jugo multifruta, los cultivos puros de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*, se activaron por dos transferencias sucesivas en medio BHI incubado a 37 °C. A final de fase exponencial (6 y 12 h respectivamente) las células se recolectaron por centrifugación a 4600 g por 20 min, se lavaron y resuspendieron en solución fisiológica estéril hasta obtener DO_{560nm}= 1,5. Luego, las suspensiones celulares se emplearon

CAPÍTULO 2

para inocular los medios de prueba a una concentración inicial en el orden de 10^6 - 10^7 ufc/mL en cultivos individuales y co-cultivos con las cepas de BAL en estudio.

La exactitud del inóculo fue confirmada por sembrar en superficie 0,1 mL de las diluciones apropiadas de cada una de las suspensiones bacterianas sobre los medios solidos MRS (BAL) y BHI (cepas patógenas) incubados a 30 y 37 °C durante 24 y 48 h respectivamente. Cabe destacar que los recuentos de células viables (ufc/mL) en JMC se determinaron por triplicado en SSA y Medio Palcam incubados a 37 °C durante 48 h para *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* respectivamente. Figura 2.1.

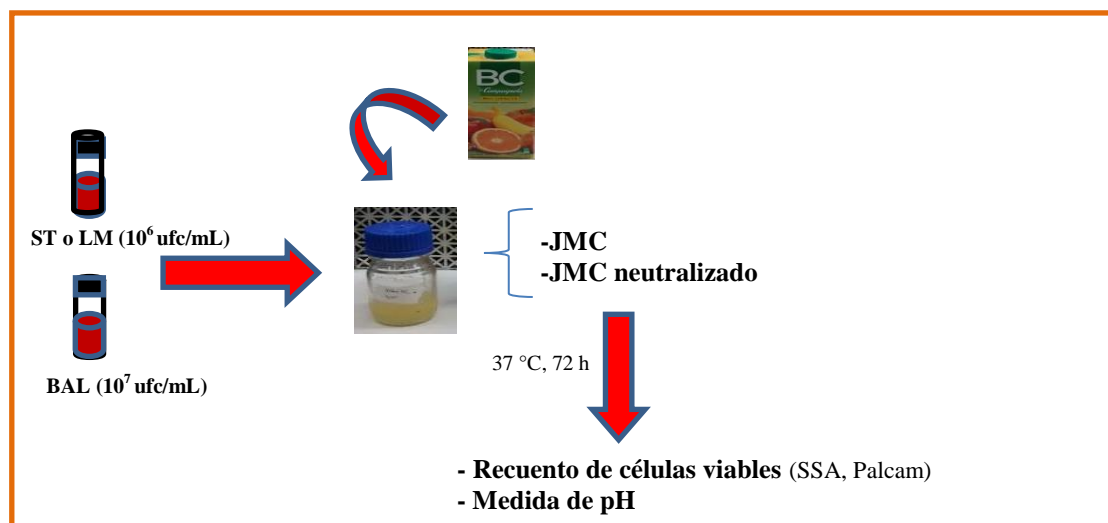


Figura 2.1 Diagrama del procedimiento empleado para evaluar el crecimiento de cepas de BAL en JMC y ensayos de inactivación de *S. Typhimurium* (ST) o *L. monocytogenes* (LM)

2.3.5 Identificación molecular de BAL seleccionadas aisladas de EF

Se identificaron cepas seleccionadas provenientes de EF identificadas fenotípicamente tales como: *L. plantarum* EFj18, EFj24, EFj47 y EFf29, *Ln ssp.* EFj6. Como control positivo se empleó la cepa *L. plantarum* N8 identificada fenotípicamente y genotípicamente en estudios previos (Arena y col., 1996), (Número de acceso a Genbank: AY082883).

2.3.5.1 Extracción de ADN

El ADN genómico de los cultivos bacterianos en estudio se extrajo de acuerdo al método descrito por Reguant y Bordons (2003) con ligeras modificaciones cuyo protocolo estandarizado en el laboratorio consistió de tres fases: - lisis celular, - eliminación de proteínas y, - precipitación de ADN. Para ello, las BAL seleccionadas se cultivaron en medio líquido MRS, pH 6,5 hasta final de fase exponencial de crecimiento. A continuación, las células obtenidas por centrifugación (8000 g, 15 min a 4°C) se lavaron con 500 µL de SSC 0,1x y se resuspendieron en 60 µL de la solución de lisis (0,01M Na₂HPO₄; 20% sacarosa y 2,5 mg/L lisozima). La suspensión celular resultante se incubó durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente se adicionó 507 µL de buffer TE, pH 8 (10 mM Tris, 1 M EDTA), 30 µL de SDS 10% y 3 µL de una solución acuosa de proteinasa K (20 mg/mL) y se incubó durante 1 hora a 37 °C, obteniéndose una solución viscosa. Luego se agregó 100 µL de NaCl 5 M y 250 µL de acetato de amonio 7,5 M y se mantuvo a 65 °C durante 10 min. El ADN se extrajo empleando una mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v). El material genético recuperado de la fase acuosa fue precipitado con isopropanol y lavado con una solución de etanol 70% mantenida en refrigeración. Posteriormente se conservó a -20 °C en 100 µL de buffer TE con RNAsa (50 µg/mL), la cual se dejó actuar previamente a su conservación durante 10 minutos a 37 °C. Las muestras obtenidas se emplearon para la técnica de PCR múltiple y secuenciación del ARNr 16S.

2.3.5.2 PCR multiplex para identificación de *L. plantarum*, *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus paraplantarum*

Estas tres especies se encuentran fenotípicamente estrechamente relacionadas entre sí, especialmente *L. plantarum* y *L. pentosus* que comparten un elevado índice de identidad (> 99%), por lo que no es adecuado el empleo solamente de secuencias de ADNr 16S para su identificación. Como complemento, se empleó la técnica de PCR múltiple descrita por Torriani y col. (2001). Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Biometra TRIO-Thermoblock. Se emplearon los siguientes cebadores específicos de especie:

planF (5'-CCGTTTATGCGGAACACCTA-3'), para *L. plantarum*;

paraF (5'-GTCACAGGCATTACGAAAAC-3') para *L. paraplantarum*;

pentF (5'-CAGTGGCGCGGTTGATATC-3') para *L. pentosus* y,

pREV (5'-TCGGGATTACCAAACATCAC-3').

Las cantidades de los componentes de la mezcla de reacción de PCR y el programa de amplificación fueron optimizados y las condiciones finalmente utilizadas se detallan en las Tabla 2.2 y 2.3.

Tabla 2.2. Concentración de los componentes de la mezcla de reacción de PCR

Componente	Concentración ^a
Tampón 10x	1x
dNTP mezcla (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.)	12 µM (mix)
MgCl ₂	1,5 mM
Primer planF	0,12 µM
Primer paraF	0,25 µM
Primer pentF	0,25 µM
Primer pRev	0,25 µM
Taq DNA polimerasa (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.)	0,5 U
ADN molde	5 ng/µL
Agua Milli-Q	hasta completar VF

^a: Volumen final (VF), 20 µL

Tabla 2.3 Programa de amplificación utilizado en la reacción de PCR

Nº de ciclos	Fase de desnaturalización	Fase de hibridación	Fase de extensión
1	3', 94 °C	1', 45 °C	1', 72 °C
30	30'', 94 °C	10'', 56 °C	30'', 72 °C
1			10'', 72 °C

CAPÍTULO 2

En todos los ensayos se incluyó una muestra-control negativa que no contenía ADN, para confirmar el buen funcionamiento de la técnica y comprobar si se producían amplificaciones inespecíficas. Al término de la reacción los tubos con los amplificadores se mantuvieron a 4 °C hasta que se realizó la electroforesis.

Los productos de amplificación esperados presentan un tamaño de 318 pb para *L. plantarum*, 218 pb para *L. pentosus* y 107 pb para *L. paraplantarum*.

La **separación y visualización** de los productos de amplificación se realizó mediante **electroforesis horizontal en geles de agarosa**. Los geles se prepararon con agarosa tipo D-1 (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) al 1,5% (p/v) en tampón TBE 1× [54 g/L Tris(hidroximetil)aminometano; 27,5 g/L ácido bórico; 20 mL EDTA 0,5 M, pH 8].

Las muestras (10 µL del amplificado con 2 µL de tampón de carga 6× [0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol; 30% v/v glicerol]) fueron cargadas en el gel y seguidamente éste se sumergió en tampón TBE 1× en la cubeta de electroforesis (Bio-Rad, EU)). La electroforesis se realizó a una intensidad constante de 70 A durante 2 horas.

Los geles se visualizaron en un transiluminador ultravioleta (3 UVTM Model LMS-20E, UVP, Upland CA91786 U.S.A) a 254 nm, y sus imágenes fueron fotografiadas. El tamaño de los fragmentos se estimó por comparación con el marcador de pesos moleculares, 100 bp-ladder (Invitrogen). Este marcador tiene 11 fragmentos de ADN, de tamaños comprendidos entre 80 y 1031 pb.

2.3.5.3 Secuenciación del gen del ADNr 16S, alineamientos y análisis de secuencias

La identificación fenotípica se confirmó también a través del análisis de segmentos de secuencias del ADNr 16S (Lane, 1991). La amplificación se realizó empleando el par de cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

Las cantidades de los componentes de la mezcla de reacción de PCR y el programa de amplificación y las condiciones utilizadas se detallan en las Tabla 2.4 y 2.5.

Tabla 2.4. Concentración de los componentes de la mezcla de reacción de PCR

Componente	Concentración ^a
10X PCR buffer	0,2x
Dntp	100 µM
MgCl ₂	1,5 mM
Primer 27F	0,5 µM
Primer 1492R	0,5 µM
Taq DNA polimerasa	1,5 U
ADN molde	5ng/µL
Agua Milli-Q	hasta completar VF

^a: volumen final (VF), 50µL

Tabla 2.5 Programa de amplificación utilizado en la reacción de PCR

Nº de ciclos	Fase de desnaturalización	Fase de hibridación	Fase de extensión
1	5', 95 °C	1', 45 °C	1', 72 °C
30	1', 94 °C	2', 52 °C	1', 72 °C
1			7', 72 °C

El producto de amplificación de aproximadamente 1465 pb se visualizó en gel de agarosa (1,5%) luego de corrida electroforética y tinción del mismo de acuerdo a lo detallado anteriormente. El tamaño de los fragmentos se estimó por comparación con el marcador de pesos moleculares, 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen). La visualización de los amplicones se realizó por exposición a luz ultravioleta en un transiluminador (3 UVTM Model LMS-20E, UVP, Upland CA91786 U.S.A).

La secuenciación de los fragmentos amplificados, luego de su purificación mediante el "kit" comercial Prep-A-Gene kit de Biorad (USA), se realizó por el método de cadena terminal didesoxi por Macrogen Inc. (908 World Meridian Venture Center, #60-24, Gasan-

dong, Geumchun-gu, Seoul 153-781, Korea) empleando un secuenciador Applied Biosystems 3730 XL (USA).

Las cepas se identificaron taxonómicamente por comparación de sus secuencias con cepas de referencia publicadas en Bases de datos GenBank, NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory) y RDP (Ribosomal Database Project). Se utilizó el programa informático de alineamiento de secuencias: Basic Local Alignment Search Tool (BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para determinar las afiliaciones filogenéticas de las BAL aisladas (Altschul y col., 1990 y 1997).

Las cepas aisladas que mostraban una homología $\geq 97\%$ con la cepa de referencia fueron consideradas de la misma especie (Stackebrandt y Goebel 1994).

2.3.6 Propiedades de interés tecnológico de cepas seleccionadas

2.3.6.1 Preparación del inóculo

Se procedió de acuerdo a lo explicado en el apartado 2.3.3.1

2.3.6.2 Susceptibilidad a antibióticos. Determinación de CIM

Como una propiedad de seguridad, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las BAL en estudio frente a diferentes antibióticos a través del método de microtitulación en caldo (Carson y col., 1995). Se define CIM como la menor concentración del antibiótico que mantiene o reduce la viabilidad del inóculo luego de 24 h de incubación. En el presente estudio se prepararon diluciones del producto a evaluar en progresión geométrica en base 2 utilizando MRS como medio de cultivo. Se evaluó el efecto de cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, amoxicilina y ciprofloxacina en concentraciones finales de 2,0; 4,0; 8,0; 16; 32; 64; 128 $\mu\text{g/mL}$. Como controles negativos y de esterilidad se utilizó medio MRS sin antibiótico y sin sembrar respectivamente. El crecimiento se determinó por triplicado en lector de microplaca midiendo $\text{DO}_{610\text{nm}}$ durante 24 h a 30 °C. Una cepa se consideró susceptible cuando la CIM fue igual o inferior al valor de corte establecido por la

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2012) mientras que, se consideró resistente cuando fue inhibido a una concentración del antibiótico superior a dicho valor.

2.3.6.3 Ensayo de compatibilidad entre cepas de BAL

A fin de evaluar un posible comportamiento antagónico entre las cepas seleccionadas, se enfrentaron cultivos bacterianos activos en agar MRS, pH 6,5. La siembra se realizó por estría, entrecruzándose las diferentes cepas en sentido perpendicular. Las placas sembradas se incubaron a 30 °C durante 48 h. Luego de la incubación, la ausencia de desarrollo uniforme de la cepa sensible a lo largo de la estría correspondiente indicó resultado positivo (antagonismo).

2.3.6.4 Evaluación cualitativa de producción de aminas biógenas (AB)

Se utilizó la técnica descrita por Holzapfel (1999) con ligeras modificaciones. Las BAL seleccionadas se inocularon al 2% (v/v) en medio mínimo decarboxilasa suplementado individualmente con: lisina, ornitina, histidina, tirosina o arginina (0,1%, p/v) para evaluar la producción de cadaverina, putrescina, histamina, y tiramina respectivamente. Antes de inocular a los microorganismos en el medio de prueba, las células se pre-adaptaron mediante tres pases sucesivos en dicho medio suplementado con el aminoácido precursor. Como control negativo se utilizó el medio decarboxilasa sin aminoácido. Los cultivos se incubaron durante 7 días a 30 °C. La producción de AB se relacionó con el viraje del indicador púrpura de bromo cresol de amarillo a púrpura debido a la alcalinización del medio. Se utilizó *Lactobacillus hilgardii* X1B como control positivo (Arena y col., 2001).

2.3.6.5 Hidrofobicidad

La hidrofobicidad de las células se determinó de acuerdo al protocolo propuesto por Kos y col. (2003) con ligeras modificaciones. Se determinó la partición de las células entre fase orgánica (p-xileno) (Cicarelli, Argentina) y fase acuosa. Para ello, se mezclaron 500 µL de la suspensión celular con el mismo volumen de p-xileno e incubó durante 120 seg. a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se eliminó cuidadosamente la fase acuosa y se midió absorbancia (A) a 560nm. La disminución de la (A) de la fase acuosa se consideró como

una medida de la hidrofobicidad de la superficie celular (H%), que se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$H (\%) = [(A_0) - A] / A_0 \times 100$$

Donde, A_0 y A son la absorbancia antes y después de la extracción con p-xileno, respectivamente.

2.3.6.6 Formación de biofilm en BAL

La técnica se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Borges y col. (2012) con ligeras modificaciones. Las BAL se inocularon en medio MRS en microplaca de poliestireno de 96 pocillos e incubaron a 30 °C durante 48 h. Para cuantificar la formación de biofilm, los pocillos se lavaron dos veces con agua destilada estéril y las bacterias adheridas se fijaron con metanol durante 15 min, luego los pocillos de la microplaca se vaciaron y se secaron a temperatura ambiente. Posteriormente las bacterias adheridas se tiñeron con 200 µL de cristal violeta (CV) al 0,1% (p/v) y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 min. El exceso de tinción se eliminó lavando dos veces con 200 µL de agua bidestilada. Posteriormente, las células adheridas se extrajeron con 200 µL de ácido acético glacial al 30% (v/v) y se midió DO_{595nm} . Se incluyó medio sin inocular como control negativo. Cada ensayo se realizó por triplicado. El punto de corte (CDO) se definió como el valor de DO_{595nm} del control negativo. Las BAL se clasificaron como no productoras de biofilm ($DO_{595nm} \leq CDO$), débilmente productoras ($CDO < DO_{595nm} \leq 2 CDO$), moderadamente productoras ($2 CDO < DO_{595nm} \leq 4 CDO$) y fuertemente productoras de biofilm ($4 CDO < DO_{595nm}$).

2.3.6.7 Inhibición de la formación de biofilm de microorganismos patógenos en presencia de SLC

El ensayo de inhibición de formación de biofilm se realizó siguiendo el protocolo de O'Toole y Kolter (2012) con algunas modificaciones. Para ello, la suspensión celular de *S.*

Typhimurium o *L. monocytogenes* se inoculó en 100 µL de medio BHI conteniendo 100 µL de SLC de cada cepa de BAL en estudio en pocillos de microplaca de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano estéril e incubaron durante 48 horas a 37 °C. Luego, las células no adheridas se retiraron y los pocillos se lavaron dos veces con agua destilada estéril para su total eliminación. Se agregó 200 µL de CV al 0.1% (p/v) e incubó durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Luego, los biofilm teñidos se enjuagaron dos veces con agua destilada y se extrajeron con 200 µL de etanol 96%. La cantidad de biofilm se cuantificó midiendo la DO_{595nm} en lector de microplaca (Versa Max, Molecular Devices).

Como control positivo se realizó la misma experiencia sin la adición de SLC y como control negativo solamente se adicionó el medio BHI (sin SLC).

2.3.6.8 Requerimientos nutricionales en vitaminas

Los requerimientos nutricionales en vitaminas de BAL seleccionadas se evaluaron en el medio sintético MSLP (Saguir y col., 2007).

Para la preparación del inóculo, las cepas cultivadas en medio MRS, pH 6,5 e incubados sin agitación a 30 ° C se cosecharon al final de fase de crecimiento exponencial, se lavaron con solución fisiológica estéril dos veces para evitar arrastrar nutrientes esenciales y se precultivaron, bajo las mismas condiciones en un medio semisintético de adaptación, cuya composición fue similar a la del MB excepto que la fuente de aminoácidos, con excepción de cisteína-HCl, fue sustituida por triptona (4 g/L). Luego de tres pases sucesivos, las células se cosecharon por centrifugación (4600 g, 20 min), se lavaron dos veces con solución fisiológica estéril y se resuspendieron en el mismo disolvente a $DO_{560nm} = 1,0$. Las suspensiones celulares se usaron para inocular a una tasa del 2% el MB (control) y MB privado de: - ácido p-aminobenzoico (MS1), - pantotenato de calcio (MS2); - D-biotina (MS3); - ácido fólico (MS4); - niacina (MS5); - piridoxal (MS6); - riboflavina (MS7) y - tiamina (MS8). Los medios inoculados y sin inocular (control de esterilidad) se incubaron a 30 ° C durante 24 h. El crecimiento bacteriano se monitoreó espectrofotométricamente a DO_{560nm} usando un

espectrofotómetro Bausch and Lomb Spectronic-20 y el pH se determinó con pHmetro a distintos intervalos de tiempo (0, 6, 12 y 24 h).

Las vitaminas se clasificaron en tres grupos según el crecimiento de la BAL (%) en cada medio deficiente con respecto al MB: De 0 a 30% la vitamina se consideró esencial (E); de 30 a 70% estimuladora (S), y > 71% no esencial (NE). Los experimentos se realizaron por triplicado.

2.3.7 Actividad antimicrobiana de cepas seleccionadas frente a una bacteria potencialmente patógenas aislada de ensalada de frutas

2.3.7.1 Aislamiento e identificación

2.3.7.1.1 Muestra

Las muestras de ensaladas de frutas (EF) compuesta por manzana, banana, durazno, naranja, uva, frutilla y jugo de naranja fueron obtenidas del mismo puesto de venta al público de frutas y verduras mencionado en el apartado 1.3.3 del Capítulo 1 de esta ciudad. Las muestras se conservaron a 4°C hasta el momento de su procesamiento por duplicado.

2.3.7.1.2 Aislamiento de bacterias Gram (-), catalasa (+)

Para el aislamiento de bacterias potencialmente patógenas pertenecientes al género *Enterobacteriaceae*, con particular interés en *Salmonella* ssp. se usó el protocolo descrito por ANMAT según el procedimiento establecido por BAM-FDA 2007 (Manual Analítico de Bacteriología-Administración de alimentos y medicamentos, 2007). Para ello se realizó un pre-enriquecimiento en agua peptona bufferada (APB), inoculando 25 mL de la muestra en 225 mL de APB, la cual se homogeneizó durante 60 min a 25 °C y se incubó a 35 °C durante 24 h. Luego se tomó una alícuota y se sembró en el medio de enriquecimiento caldo Rappaport-Vassiliadis con soja (RVS) e incubó a 41 °C durante 24 h. Posteriormente se realizaron diluciones sucesivas, las cuales se plaquearon en medios selectivos agar MacConkey y SSA e incubaron a 37 °C durante 24 h. Tras la incubación, se realizaron los recuentos microbianos en las placas conteniendo entre 30 y 300 colonias.

CAPÍTULO 2

Un total de 20 colonias que presentaron morfología (color, tamaño, forma) diferentes se seleccionaron al azar a partir de los medios de aislamiento, se transfirieron a medio BHI sólido y se purificaron por trasplantes sucesivos en el mismo medio a 37 °C durante 24 h. Esta operación se realizó por lo menos tres veces a fin de asegurar la pureza de los cultivos. Los cultivos puros se conservaron en medio BHI, pH 6,5 de acuerdo a lo descrito en el apartado 1.3.3.

Los cultivos puros que exhibieron morfología celular de bacilos, reacción de Gram negativa y catalasa positiva, no formadores de esporas se consideraron como pertenecientes al género *Enterobacteriaceae* y se identificaron fenotípicamente mediante un conjunto de pruebas bioquímicas.

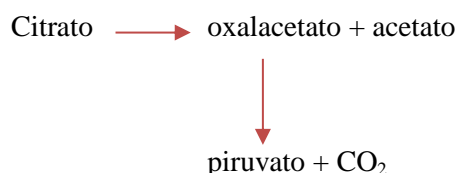
2.3.7.1.3 Identificación fenotípica de los aislados

Se preparó una suspensión celular a partir de 3-4 colonias de cada cultivo puro que fueron inoculadas en 5 mL de medio BHI pH 6,5. Los tubos así preparados se incubaron a 37 °C hasta observar turbidez (~ 12 h, en general), luego se tomó una alícuota y se inoculó bajo las mismas condiciones. Después de 12 h de incubación a 37 °C, las células se recolectaron por centrifugación (4000 g, durante 10 min), se lavaron dos veces con solución fisiológica estéril y, se resuspendieron en el mismo diluyente a fin de obtener una $DO_{560nm} = 0.8$. Esta suspensión celular se utilizó para inocular los medios de pruebas. Para la identificación fenotípica se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas:

2.3.7.1.3.1 Fermentación de azúcares en medio TSI (agar hierro triple azúcar): los aislados se inocularon con aguja por punción en el fondo y estría sobre el pico de flauta e inocularon a 37 °C durante 24 h. Tras la incubación se observaron los diferentes resultados: - Fondo amarillo se relacionó con fermentación de glucosa positiva; - Fondo rojo o sin cambio, glucosa negativa; Fondo negro con formación de sulfuro de hidrógeno; - Burbujas o ruptura del agar con producción de gas a partir de glucosa; - Pico de flauta amarillo se relacionó con fermentación de lactosa y/o sacarosa positiva; - Pico de flauta rojo o sin cambio, lactosa y

sacarosa negativo. Las cepas típicas de *Salmonella* dan reacción alcalina (color rojo, 90% de los casos) y formación de H₂S (ennegrecimiento del agar).

2.3.7.1.3.2 Utilización de citrato como única fuente de carbono: Los microorganismos se sembraron con ansa por estría en medio citrato de Simmons e incubaron a 37 °C. Luego de la incubación se observó el viraje indicador del indicador de pH. Un microorganismo capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y energía debe contar con citrato permeasa entre sus enzimas constitutivas, que le permita incorporar este ácido orgánico desde el medio externo. Un ejemplo positivo es *Enterobacter aerogenes* quien descompone el citrato según las siguientes reacciones:



La utilización de citrato permite la liberación de iones sodio (Na⁺) los cuales desplazan a los iones amonio del NH₄H₂PO₄. Parte de estos iones amonio son utilizados como fuente de N₂ y parte se combina con el agua del medio de cultivo formando NH₄OH, lo que determina un aumento de pH y cambio de color del indicador de verde a azul, característico de resultado positivo. Los resultados negativos se incubaron hasta 7 días, para evitar falsos resultados.

2.3.7.1.3.3 Hidrólisis de urea: los aislados se sembraron con ansa estriando el pico de flauta. Luego se incubaron a 37 °C durante 24 horas, examinándolos durante intervalos más cortos de tiempo. La reacción positiva se evidenció por cambio de color del indicador rojo fenol de amarillo a rosa por alcalinización del medio. Algunas bacterias poseen la capacidad de sintetizar ureasa, enzima hidrolítica que desdobra la urea con liberación de amonio, lo que produce el viraje del indicador de pH.

2.3.7.1.3.4 Fermentación ácido mixta (FAM) o butilenglicólica (BG) a partir de glucosa: El medio APGF descrito en el apartado 2.3.3 fue sembrado con pipeta a partir de la suspensión celular de cada aislado. Luego de 2 días de incubación a 37 °C, se separó 1 mL del cultivo en

otro tubo y se realizó la reacción de VP para evidenciar si el microorganismo llevó a cabo FBG. En este caso, el acetil-metil-carbinol (o acetoína), producto intermediario de la biosíntesis de butanodiol, en medio alcalino y presencia de oxígeno es oxidado a diaceto, cuya formación se revela con α -naftol-creatina dando un color rojo-fucsia. Para poner en evidencia si el microorganismo llevó a cabo una FAM, al cultivo se lo dejó incubar 3 días más, luego se realizó la reacción con rojo de metilo, un indicador de pH con un intervalo entre 6 (amarillo) y 4,4 (rojo). El viraje de amarillo a rojo reveló reacción positiva. Un color anaranjado, intermedio entre el rojo y el amarillo no se consideró positivo.

2.3.7.1.4 Identificación genotípica de *Enterobacter cloacae*: La identificación molecular se realizó por secuenciación del ARNr 16S de acuerdo al protocolo descrito en apartado 2.3.5 del presente Capítulo.

2.3.7.2 Actividad antimicrobiana de BAL frente a *Enterobacter cloacae*

La actividad antimicrobiana de las 6 cepas en estudio frente a *Enterobacter cloacae* aislado de EF en el presente estudio se evaluó mediante el ensayo de difusión en agar de acuerdo al protocolo descrito por Schillinger and Lucke (1989) y, puesto a punto en el laboratorio. Los SLC se obtuvieron de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 1.3.7.2 del Capítulo 1.

Placas de agar BHI se cubrieron con 15 ml de medio BHI semisólido inoculado en orden $7 \log \text{ ufc/mL}$ con el microorganismo indicador, proveniente de un cultivo activo en el mismo medio de 12 h ("overnight"). Después se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 15 min, se realizaron pocillos de 10 mm de diámetro con un sacabocado estéril y 75 μL de cada SLC fue inoculado en cada pocillo. Las placas se colocaron a 4 °C durante 2 horas para favorecer la difusión de los SLC. Posteriormente, se incubaron a 37 °C durante 24 h. La interpretación de los resultados se realizó de acuerdo a lo descrito para la prueba de la gota, en el apartado 1.3.7.1 del Capítulo 1.

2.3.8 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos a partir de tres o dos experiencias independientes fueron sometidos a análisis de la varianza (ANOVA) empleando el programa Infostat. Las diferencias significativas se determinaron por el test de Tukey ($P < 0,05$).

Los Datos de crecimiento en presencia de compuestos fenólicos, hidrofobicidad, inhibición de biofilm, formación de biofilm, CIM, y requerimientos nutricionales fueron sometidos a un análisis de permutación usando programa PermutMatrix.

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Crecimiento y capacidad acidificante de BAL en diferentes condiciones de cultivo

2.4.1.1 Medio complejo MRS

El crecimiento de las once cepas de BAL seleccionadas en el Capítulo 1 por sus propiedades antimicrobianas, se determinó en medio MRS, pH 6,5 incubado a 30 °C durante 24 h. Al mismo tiempo se estableció la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) y de acidificación (V_{maxac}) (Tabla 2.6). El crecimiento, medido como DO_{560nm} , alcanzó valores máximos comprendidos entre 1,25 y 1,65 en 12 h de incubación (Tabla 2.2). Del total de BAL analizadas, cinco cepas que no presentaron diferencias significativas entre sí (^{A, B; B}) alcanzaron los niveles máximos de población bacteriana con un valor promedio de DO_{560nm} : 1,60. Una cepa que no mostró diferencias significativas con aquellas clasificadas como ^{C, D; D} alcanzó el valor más bajo de DO (*Ln. ssp. EFf6*) Coincidentemente, las cepas *L. plantarum* EFf29, EFf24, EFf18, N8, JNB25, y N4 que mostraron los valores más altos de DO_{560nm} también presentaron los mayores valores de μ_{max} , capacidad acidificante y V_{maxac} a 12 de incubación (Tabla 2.6). Por lo tanto, sus curvas de crecimiento se muestran en la Figura 2.2. Es interesante destacar que estas cepas mostraron las mayores efectividades antimicrobianas descritas en el Capítulo 1. Cabe destacar que Ruiz Rodríguez y col. (2016) encontraron en cepas de BAL aisladas de diferentes flores y frutas del noroeste argentino, valores de μ_{max} , ΔpH_{24} y V_{maxac} más bajos que los determinados en el presente estudio, posiblemente

CAPÍTULO 2

relacionado con el origen de las cepas. En nuestro estudio las BAL fueron aisladas de medios naturales con elevada acidez, y por lo tanto podrían estar mejor adaptadas tolerar y crecer en dichas condiciones.

De este modo, las cepas de *L. plantarum* aisladas de EF durante este estudio y provenientes de naranjas de nuestro cepario presentaron los mejores comportamientos en relación con sus respuestas de crecimiento y capacidad acidificante en medio MRS, lo que se asoció, al mismo tiempo, con sus propiedades antimicrobianas. Por el contrario, los valores significativamente más bajo encontrados para *Ln. ssp. EFl6* estarían relacionados a su metabolismo heterofermentativo obligado de glucosa. De acuerdo a Di Cagno y col (2013) un cultivo starter autóctono para ser aplicado en vegetales debe cumplir, en forma indispensable con la condición de bajar rápidamente el pH del medio hasta valores de por lo menos 4.5, para inhibir microorganismos indeseables desde la etapa temprana de la fermentación. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio resultan de especial interés en función de una potencial aplicación biotecnológica y, se relacionan con aquellos obtenidos en los ensayos de actividad antimicrobiana descritos en el Capítulo 1.

En relación con el crecimiento y capacidad acidificante de las BAL en estudio se evaluó por HPLC y/ métodos enzimáticos el consumo de glucosa y metabolitos formados (ácidos orgánicos, etanol) en medio MRS al final del crecimiento exponencial (12 h). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.7. El consumo de glucosa varió entre 4,58 y 7,51 g/ L, lo que correspondió a 23% y 37,5% de su concentración inicial respectivamente. Las cepas *L. plantarum* EFj24, EFj47, EFl29 y *Ln. ssp. EFl6* presentaron los mayores consumos del azúcar, aun cuando la última cepa alcanzó el más nivel de población bacteriana. Todas las cepas de *L. plantarum* ensayadas produjeron ambos isómeros del ácido láctico, aunque el isómero (L) fue principalmente formado, lo que representa una ventaja en función de su potencial aplicación en alimentos. El isómero L (+) es conocido como el “isómero fisiológico” ya que al ser similar al encontrado en el organismo humano, es mejor asimilado o más rápidamente metabolizado (Montaño y col., 1992). Por el contrario, la cepa EFl6 produjo

CAPÍTULO 2

exclusivamente al isómero de D- del ácido láctico lo que es una característica distintiva de este género.

La producción total de ácido láctico varió entre 3,03 y 7,40 g/L dependiendo de la cepa, siendo producido principalmente por *L. plantarum* N8, EFf29, EFj18, EFj24, EFj47 y JNB25 mientras que la cepa EFf6 produjo la menor concentración. Además, ésta última cepa produjo ácido acético y etanol lo que se relacionó con su metabolismo heterofermentativo obligado de glucosa. Este hecho explicaría sus menores valores de biomasa, μ_{\max} y capacidad de acidificación, ya que como se describió en la Introducción las bacterias homofermentativas u heterofermentativas facultativas como en el caso de *L. plantarum* son capaces de extraer doble cantidad de energía de la fermentación de la glucosa que la que genera la ruta heterofermentativa. Del mismo modo, que la cantidad de ácido láctico producida es mayor en la ruta homofermentativa que en la heterofermentativa.

Es interesante destacar que los rendimientos de producción de ácido láctico por glucosa consumida (mmoL: mmoL) fueron máximos en aquellas cepas que mostraron los mayores valores de μ_{\max} y V_{maxac} , confirmando sus mayores potenciales láctico tales como: *L. plantarum* N8, JBN25, EFj18, EFj24, EFf29, EFj47. De este modo sus efectos inhibitorios fuertes frente a los tres patógenos ensayados se relacionó con sus respuestas de crecimiento, capacidad acidificante y potencial láctico; aun cuando en las cepas N8 y JNB25 se demostró un efecto sinérgico con la producción de peróxido de hidrógeno y en EFf29 la posible presencia de una sustancia de naturaleza peptídica o de otra naturaleza.

Tabla 2.6 Crecimiento, capacidad y velocidad máxima de acidificación de cepas de BAL en medio MRS incubado a 30 °C

Cepa	Máxima población	μ_{\max}	ΔpH_{12}	$V_{\max\text{ac}}$
<i>L. plantarum</i> N4	1,45±0,07 ^{A,C}	0,55±0,03 ^A	0,55±0,03 ^{A,C}	0,16±0,01 ^A
<i>L. plantarum</i> N8	1,55±0,08 ^{A,B}	0,72 ± 0,03 ^B	0,72 ± 0,03 ^B	0,22±0,01 ^B
<i>L. plantarum</i> JNB25	1,62±0,07 ^B	0,63±0,04 ^{A,B}	0,63±0,04 ^B	0,28±0,01 ^C
<i>L. plantarum</i> EFj1	1,35±0,05 ^{C,D}	0,60±0,03 ^A	0,60±0,03 ^C	0,18±0,01 ^{A,B}
<i>L. plantarum</i> EFj18	1,50±0,06 ^A	0,76±0,05 ^B	0,76±0,05 ^B	0,33±0,01 ^C
<i>L. plantarum</i> EFj16	1,35±0,07 ^{C,D}	0,43±0,02 ^C	0,43±0,02 ^D	0,16±0,01 ^A
<i>L. plantarum</i> EFj21	1,37±0,04 ^{C,D}	0,58±0,03 ^A	0,58±0,03 ^{A,C}	0,21±0,01 ^B
<i>L. plantarum</i> EFj24	1,60±0,05 ^B	0,73±0,03 ^B	0,73±0,03 ^B	0,33±0,02 ^C
<i>L. plantarum</i> EFf29	1,65±0,06 ^B	1,10±0,06 ^D	1,10±0,07 ^E	0,69±0,01 ^E
<i>L. plantarum</i> EFj47	1,60±0,08 ^{A,B}	0,44±0,02 ^C	0,44±0,02 ^D	0,37±0,01 ^C
<i>Ln. spp.</i> EFf6	1,27±0,06 ^D	0,45±0,02 ^C	0,45±0,02 ^D	0,11±0,01 ^D

^a: Los valores de absorbancia (DO a 560 nm) alcanzados a final de la fase de crecimiento exponencial se utilizaron para determinar la población bacteriana máxima. En general las cepas ensayadas alcanzaron el final de fase exponencial de crecimiento a 12 h de incubación. El menor tiempo requerido fue 10 h. DO inicial promedio: 0,05 ± 0,003. Los valores son las medias de tres experimentos independientes ± desviación estándar. Diferentes letras dentro de las columnas indican diferencias significativas para un valor de $P < 0.05$.

CAPÍTULO 2

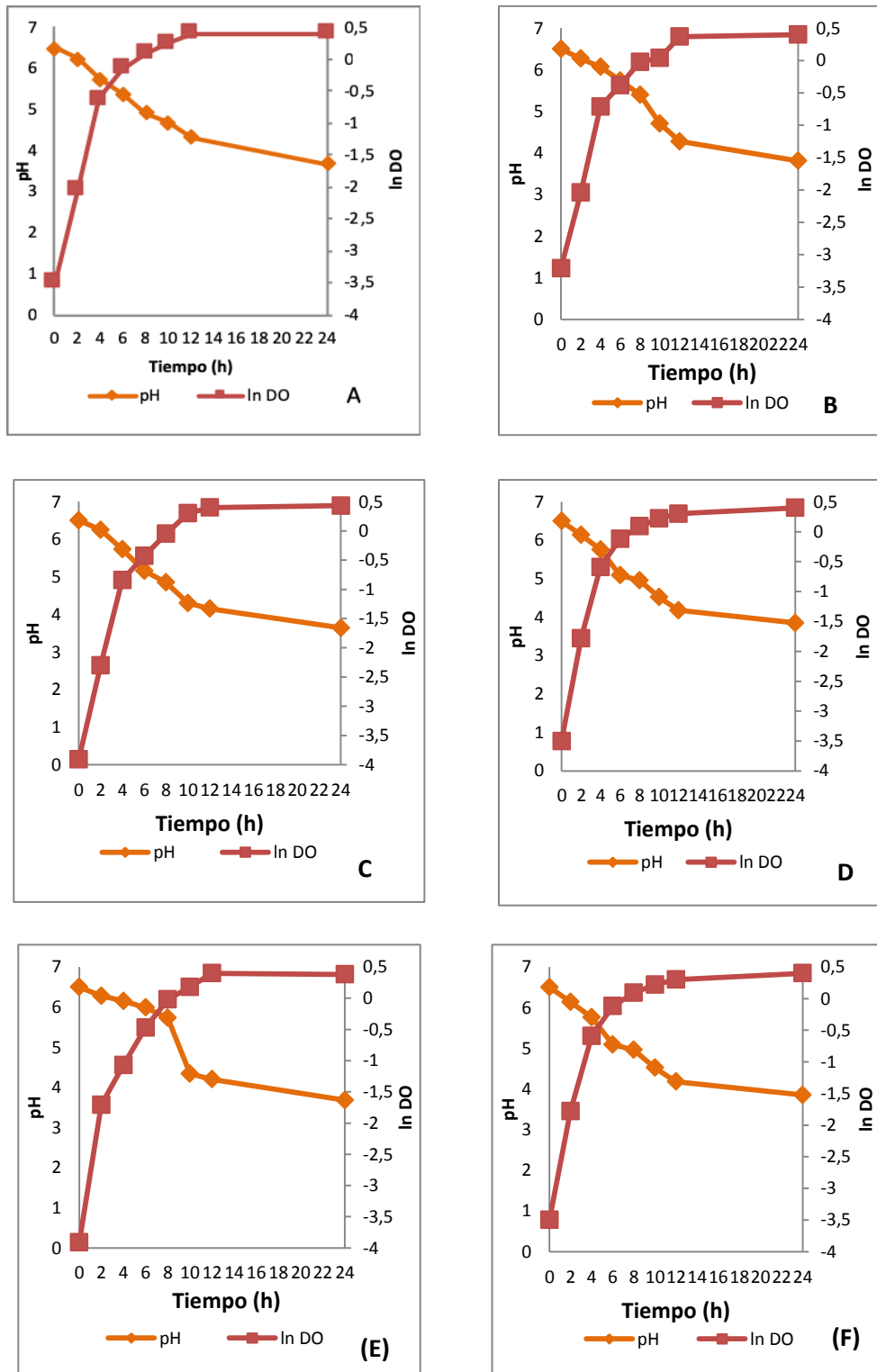


Figura 2.2 Curvas de crecimiento (ln DO vs tpo) y variación de pH de las cepas que mostraron las respuestas de crecimiento y mayores valores de V_{maxac} . Cepas N8 (A), JNB25 (B), EFj18 (C), EFj24 (D), EFj29 (E) y EFj47(F).

Tabla 2.7 Consumo de glucosa y producción de ácido láctico por cepas de BAL en medio MRS incubado a 30 °C.

Cepa	Glucosa ^a (g/L)	Ácido láctico ^a (g/L)	Y ^c
<i>L. plantarum</i> N4	5,14± 0,2 ^{A,B}	4,83±0,5 ^{A,B} (1,21)	1,88
<i>L. plantarum</i> N8	6,73±0,5 ^{A,C}	7,31±0,6 ^{B,C} (2,12)	2,17
<i>L. plantarum</i> JNB25	6,12±0,4 ^A	6,31±0,5 ^{B,C} (2,04)	2,06
<i>L. plantarum</i> EFj1	4,75±0,3 ^B	4,54±0,3 ^{A,B} (1,11)	1,91
<i>L. plantarum</i> EFj16	6,23±0,3 ^A	4,82±0,3 ^{A,B} (1,26)	1,75
<i>L. plantarum</i> EFj18	6,38±0,3 ^{A,C}	6,48±0,5 ^{B,C} (2,89)	2,03
<i>L. plantarum</i> EFj21	4,58±0,24 ^B	4,33±0,3 ^A (1,23)	1,89
<i>L. plantarum</i> EFj24	7,14±0,5 ^A	7,07±0,5 ^{B,C} (2,53)	1,98
<i>L. plantarum</i> EFj47	7,28±0,5 ^C	7,10±0,8 ^C (2,56)	1,95
<i>L. plantarum</i> EFf29	7,51±0,4 ^C	7,40±0,5 ^C (2,38)	1,99
<i>Ln. spp</i> EFf6	7,38±0,5 ^C	3,03±0,2 ^A (2,99)	0,82

^a: Las determinaciones corresponden a 12 h de incubación a 30 °C
Concentración inicial promedio de glucosa: 19,2±1,8 g/L

Ácidos L-málico, cítrico y succínico no fueron detectados (< límite de cuantificación). Etanol y ácido acético fueron detectados en SLC de *Ln. ssp.* (2,28 y 0,28 g/L respectivamente) lo que se relacionó con su metabolismo heterofermentativo.

(): Concentración del isómero D del ácido láctico, cuantificado por método enzimático

Y^c rendimiento de ácido láctico producido por glucosa consumida: [total ácido láctico formado (mmol/L)]/[total de D-glucosa consumida (mmol/L)].

Las determinaciones corresponden a tres ensayos independientes por duplicados. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

2.4.1.2 Medio natural: jugo multifruta comercial

En jugo de frutas, en general, las BAL se consideraban microorganismos deteriorantes. Sin embargo, este concepto se ha visto modificado con el advenimiento de las bacterias probióticas y el empleo de jugos de frutas como vehículos alternativos para su distribución, así como con la aplicación del proceso de fermentación láctica como una alternativa para la bio-preservación de frutas y sus derivados (Perez y Saguir, 2012). En este contexto se evaluó el crecimiento de las 11 cepas de BAL seleccionadas en un jugo multifruta comercial clarificado a fin de determinar sus competencias para adaptarse y crecer en un medio natural (JMC). Para ello, las cepas se inocularon en JMC e incubaron durante 7 días a

CAPÍTULO 2

30°C. Al mismo tiempo se determinaron la variación de pH. Es importante destacar que en JMC sin inocular, control, no se observó crecimiento microbiano ni cambios significativos en los parámetros fisicoquímicos durante el período ensayado. Es por ello, que a continuación se describe el comportamiento de las cepas inoculadas y sus efectos en JMC a distintos tiempos de incubación (Figura 2.3). Todas las cepas crecieron en JMC, con valores comprendidos entre 1,0 y 1,7 U log a 2 días, presentando las cepas EFj24 y EFl29 los mayores recuentos en concordancia con lo observado en medio complejo. Similares resultados fueron reportados por Espirito-Santo y col. (2015) quienes evaluaron el comportamiento de diferentes cepas *Lactobacillus* sp. aisladas de alimentos artesanales inoculadas en jugos comerciales de manzana, uva y naranja y, cuyos recuentos celulares incrementaron, en general, alrededor de 2 U log a dos días de incubación a 30 °C. En el presente estudio a 7 días de incubación se observó pérdida de viabilidad celular que varió entre 0,24 y 1,6 U log dependiendo de la cepa, siendo máxima para EFj1 y EFj47 (Figura 2.3A). Este hecho estaría relacionado con la disminución del pH y elevada acidez del medio fermentado. Similares resultados fueron descritos por Sajur y col. (2007) y Perez y Saguir (2012) en *Ln. mesenteroides* Tsc y *L. plantarum* N4 creciendo en puré de tomate y jugo de naranja recién exprimido almacenado a 30 °C respectivamente. Por otro lado, Vinderola y col. (2002) informaron que los jugos de frutas comerciales pueden contener inhibidores naturales del crecimiento microbiano o aditivos, tales como colorantes, que pueden estar asociados con la pérdida de viabilidad microbiana. Sin embargo, en nuestro estudio cabe destacar que las cepas N8, EFl29 y EFj18 permanecieron viables, sin presentar variaciones significativas entre 2 y 7 días de incubación (Figura. 2.3A). En este sentido, Perez y Saguir (2012) demostraron que *L. plantarum* N4 fue capaz de permanecer viable en jugo de naranja fresco almacenado a 4 °C durante cuatro semanas.

Con respecto a la variación de pH del JMC, éste disminuyó, en general alrededor de 0,2 unidades a dos días de incubación, excepto en los medios inoculados con las cepas N8, JNB25, EFj18 y EFl29. En estos casos disminuyó por arriba de 0,3 unidades, mostrando un

mayor poder acidificante en el medio natural. Estos resultados se correlacionaron con lo determinado en medio complejo de laboratorio. A 7 días de incubación el pH, alcanzó una disminución máxima de alrededor 0,4/0,45 unidades con respecto al valor inicial, excepto para la cepa *Ln. ssp.* EFj6 que mostró la menor capacidad acidificante ($\Delta\text{pH}_{7\text{-od}}$: 0,3) (Figura 2.3B). Por otro lado, cabe resaltar que no se observó incremento de pH inicial en ninguna condición. Espirito y col. (2015), reportaron que las cepas de BAL ensayadas incrementaron 0,1 unidad el valor de pH en jugos de manzana y de uva pero no de naranja durante la primera etapa de incubación lo que se relacionó con el mayor contenido de ácido málico de los primeros (Del Campo y col, 2006). La disminución del pH se relacionó con la fermentación láctica en concordancia con lo informado por otros autores (Yanez y col., 2008; Serrazanetti y col., 2009).

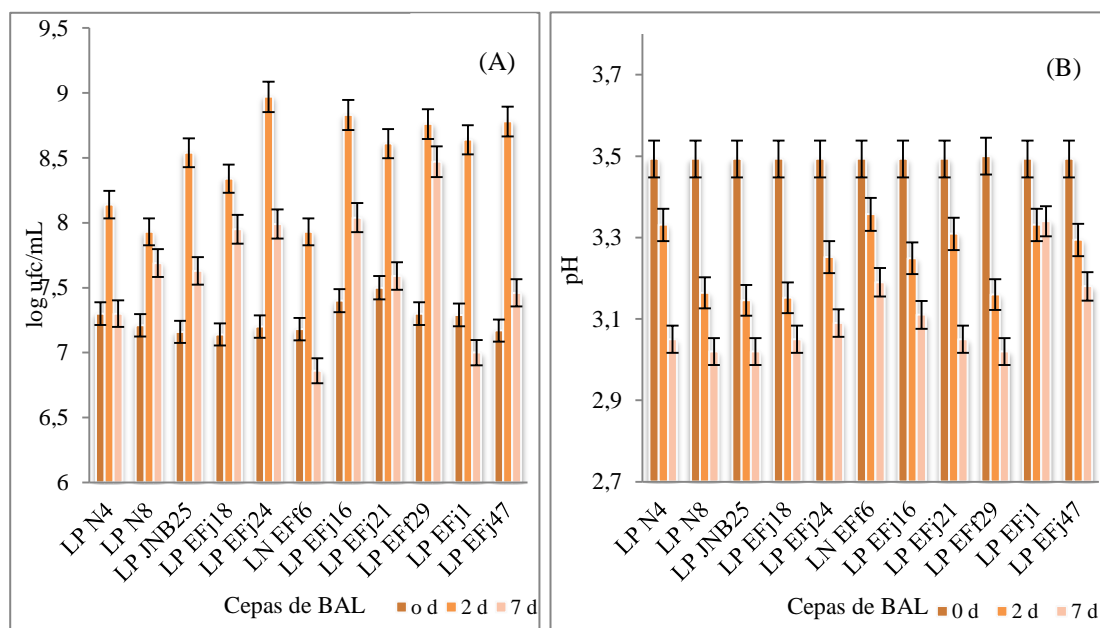


Figura 2.3 Crecimiento de cepas de BAL (A) y variación del pH (B) en JMC incubado a 30 °C. *L. plantarum* (LP)

Los parámetros μ_{max} y V_{maxac} de las cepas en estudio creciendo en JMC, calculados a 48 h de incubación, se muestran en Tabla 2.8.

Tabla 2.8 Velocidad máxima de crecimiento y de acidificación de cepas de BAL en JMC.

Cepas	$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	V_{\max}^{a}
<i>L. plantarum</i> N4	0,42 ±0,02	-0,09±0,003 ^A
<i>L. plantarum</i> N8	0,61 ±0,03	-0,16±0,007 ^B
<i>L. plantarum</i> JNB25	0,53 ±0,02	-0,17±0,006 ^B
<i>L. plantarum</i> EFj1	0,32 ±0,03	-0,08±0,003 ^{AC}
<i>L. plantarum</i> EFj16	0,34 ±0,02	-0,07±0,003 ^C
<i>L. plantarum</i> EFj18	0,56 ±0,03	-0,17±0,008 ^B
<i>L. plantarum</i> EFj21	0,46 ±0,02	-0,07±0,002 ^C
<i>L. plantarum</i> EFj24	0,57 ±0,03	-0,10±0,004 ^A
<i>L. plantarum</i> EFj47	0,63 ±0,03	-0,10±0,005 ^A
<i>L. plantarum</i> EFf29	0,59 ±0,02	-0,07±0,002 ^C
<i>Ln</i> spp EFf6	0,41 ±0,03	-0,07±0,002 ^C

^a: Las determinaciones corresponden a 48 h de incubación a 30 °C. Las determinaciones corresponden a tres ensayos independientes por duplicados. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Se destacaron las cepas *L. plantarum* N8, JNB25, EFj18 y EFf29 por presentar los mayores recuentos en 48 h lo que se relacionaría con una mayor μ_{\max} y máximas V_{\max} en concordancia con los resultados obtenidos en medio MRS. Sin embargo, las cepas EFj47 y EFj24 también fueron muy eficientes en las diferentes condiciones de cultivo ensayos. Por lo tanto, se dichas cepas fueron seleccionadas como representativas para evaluar sus efectos en la inactivación de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* en el JMC, a fin de aproximarnos a las condiciones encontradas en matrices de VMP (en este caso el jugo se encontraba pasteurizado).

2.4.1.3 Crecimiento bacteriano en presencia de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos comprenden una amplia variedad de compuestos formados por uno o varios anillos aromáticos unidos a uno o más grupos hidroxilos. Pueden existir como moléculas simples o grandes macromoléculas (Hannum, 2004). Generalmente, las frutas y las hortalizas son buena fuente de compuestos fenólicos y su contenido depende de varios factores, tales como diferencias genótípicas, condiciones climáticas en la precosecha y

CAPÍTULO 2

procedimientos de manejo postcosecha (Cano y col., 2005, da Silva Pinto y col., 2008). Los compuestos fenólicos están divididos en varias clases, y las más importantes son: los flavonoides, los ácidos fenólicos, los taninos (hidrolizables y condensados), los estilbenos y los lignanos (D'Archivio y col., 2007, Ignat y col., 2011). Los flavonoides y los ácidos fenólicos son los compuestos fenólicos más importantes encontrados en los vegetales. De acuerdo a Scalbert y Williamson (2000), existen cientos de diferentes compuestos fenólicos en los alimentos vegetales, pero dos tercios de los más comúnmente consumidos son flavonoides y el tercio restante corresponde a ácidos fenólicos.

En el presente estudio, se evaluó el efecto de una mezcla de compuestos fenólicos puros (MCF) constituida por: ácidos ferúlico y gálico (ácidos fenólicos) y catequina (flavonoide) en concentraciones normalmente encontrada en frutas sobre el crecimiento de las cepas seleccionadas en un medio basal semisintético (MB). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 2.4.

En MB, excepto la cepa EFJ47, el resto de las bacterias ensayadas crecieron entre 1,1 y 1,6 U log relativos a su valor inicial en 24 horas de incubación. Las cepas N8 y JNB25 de naranjas mostraron los mayores recuentos correspondientes a un valor promedio de $9,0 \pm 0,42$ U log, lo que podría estar relacionado con un menor número de exigencias nutricionales (Saguir y Manca de Nadra, 2007). En general, la presencia de la MCP no afectó significativamente el crecimiento de las cepas ensayadas, excepto en la cepa EFj47 que produjo un marcado efecto estimulador. Más aún, en esta condición, la cepa EFj47 fue capaz de revertir su efecto inhibitorio, posiblemente causado por las deficiencias nutricionales del MB, especialmente en azúcares y factores de crecimiento y, crecer 1 U log, indicando q los compuestos fenólicos fueron metabolizados (Figura 2.4 A, C, E). Diversos autores realizaron estudios para evaluar el efecto de compuestos fenólicos sobre el crecimiento de BAL. Tabasco y col. (2011) investigando el efecto de compuestos fenólicos presentes en extractos de uva, ácido gálico, catequina, procianidina en tres concentraciones diferentes (0,25; 0,5 y 1,0 mg/mL) encontraron, en general, un efecto inhibitorio sobre sus crecimientos, excepto para

CAPÍTULO 2

algunas cepas de *L. plantarum* y *L. casei*. Dichos autores también consideraron que la resistencia a la acción antimicrobiana de los mismos es el primer paso de las bacterias para metabolizarlos. En ese sentido, varias cepas de *Lactobacillus* sp. han sido identificadas como competentes para metabolizar ácidos fenólicos tales como, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido protocatecuico en medios nutritivos, jugos de frutas, puré de vegetales o sorgo (Svensson y col., 2010; Sanchez-Maldonado y col., 2011; Filannino y col., 2015). Además, se ha descrito la presencia de enzimas microbianas como cinamoil esterasas en diferentes lactobacilos capaces de hidrolizar el enlace éster del ácido clorogénico, (Couteau y col., 2001; Guglielmetti y col., 2008; Lai y col., 2009; Esteban-Torres y col., 2013; Raimondi y col., 2015). Rodríguez y col. (2009). Mousavi y col. (2011) informaron que el jugo de granada, rico en fenólicos antioxidantes, son sustratos adecuados para la fermentación láctica. Sin embargo, otros autores (García-Ruiz y col., 2008) demostraron que polifenoles del vino controlan completamente el crecimiento de BAL indeseables durante su elaboración.

En el presente estudio, al final del crecimiento microbiano el pH inicial disminuyó, en general, 1 unidad, sin observarse diferencias significativas entre MB y MB+MCP, excepto para EFj47, lo que se correlacionó con las respuestas de crecimiento (Figuras. 2.4 B, D, E).

En resumen, las cepas en estudio, especialmente EFj47, serían capaces de metabolizar los compuestos fenólicos ensayados lo cual puede resultar de interés en función de su aplicación tecnológica al producir metabolitos bioactivos con propiedades beneficiosas mejoradas para el consumidor. Por otro lado sus resistencias a la acción antimicrobiana o su efecto estimulador les confiere a las células una ventaja competitiva para adaptarse y crecer en las matrices alimenticias de origen vegetal, ricas en estos compuestos.

CAPÍTULO 2

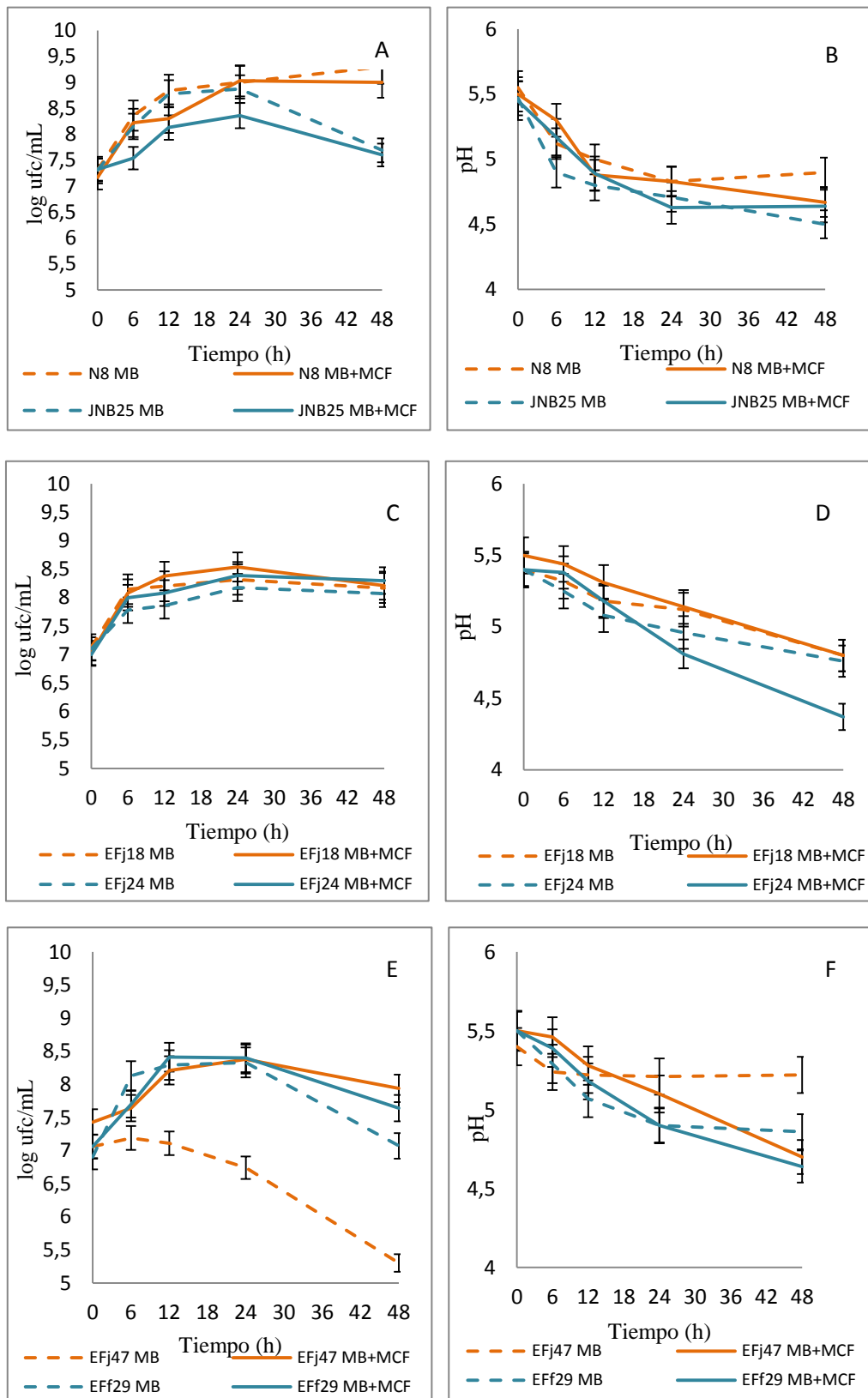


Figura 2.4. Crecimiento de cepas de *L. plantarum* (A, C, E) y variación de pH (B, D, F) en medio semisintético (MB) y MB adicionado con mezcla de compuestos fenólicos (MCF). MB (línea llena), MB+MCF (línea punteada). Valor promedio de inóculo inicial: $7,15 \pm 0,3$ U log

2.4.2 Inactivación de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* en JMC inoculado con cepas seleccionadas

Las Figuras 2.5; 2.6; 2.7 y 2.8 muestran los recuentos *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* inoculados en JMC natural (3,4) y con pH ajustado (6,5) en cultivos individuales y co-cultivos con cada cepa de *L. plantarum* a 30 °C durante 72 h. La concentración inicial de las cepas indicadoras estuvo en el orden de 10^6 ufc/mL. Los valores representados son la media de los obtenidos en dos experiencias independientes.

En JMC natural, *S. Typhimurium* no creció, permaneciendo viable hasta 12 h de incubación. En presencia de las BAL su tasa de inactivación aumentó significativamente, encontrándose una reducción de ~ 2,0 U log en 12 h, excepto para las cepas EFj24 y EFj47. A 24 h se alcanzó una completa inactivación en todas las condiciones ensayadas (Figura 2.5 A). En esta condición, el pH inicial disminuyó entre 0,5 y 1,3 unidades, dependiendo de la cepa de BAL en estudio, alcanzándose, en general la acidificación máxima a 72 h, siendo el efecto más pronunciado para las cepas N8, JNB25, EFj18 y EFf29. Por el contrario, el pH inicial del control no se modificó significativamente durante el período de incubación ensayado (Figura 2.5 B).

Cuando el JMC fue ajustado a pH neutro, *S. Typhimurium* creció 2,3 U log en 24 h de incubación en oposición a lo observado en el jugo natural, luego los recuentos disminuyeron solamente 0,5 U log en 72 h. Este hecho confirmó el efecto bactericida del pH ácido del jugo sobre la viabilidad de *S. Typhimurium*.

En presencia de las cepas de *L. plantarum*, el crecimiento de *S. Typhimurium* fue inhibido 100%, sin detectarse células viables en 48 h de incubación (Figura 2.6A). De este modo las cepas seleccionadas produjeron rápidamente una completa inactivación del patógeno. En esta condición, la disminución del pH fue significativamente mayor y más rápidamente que en jugo sin neutralizar (hasta 4 unidades menores que el valor inicial en 72 h), lo que se relacionó con sus efectos bactericida, especialmente para las cepas EFf29 y EFj47. Por el contrario, en medio control el pH se mantuvo constante (Figura 2.6B). Ha sido

CAPÍTULO 2

reportado que la interacción del ácido láctico con la membrana externa de las bacterias patógenas Gram (-) aumenta su permeabilidad favoreciendo, en consecuencia, que otros compuestos antibacterianos ingresen a la célula (Alakomi y col., 2000).

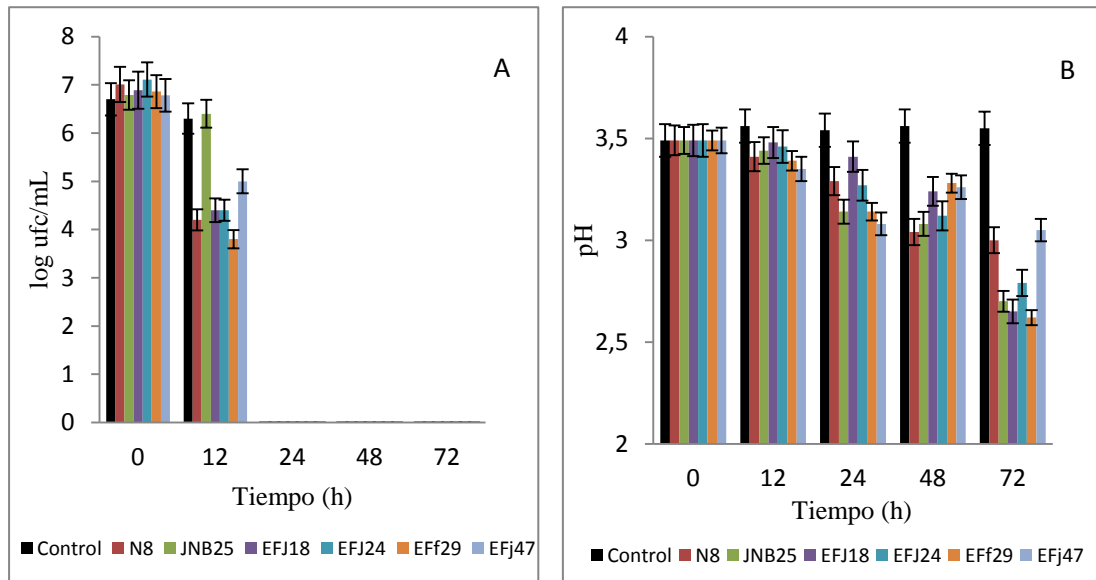


Figura 2.5 Viabilidad de *S. Typhimurium* luego de 72 h de incubación co-inoculada con BAL en JMC sin ajustar pH (A). Variación de pH (B).

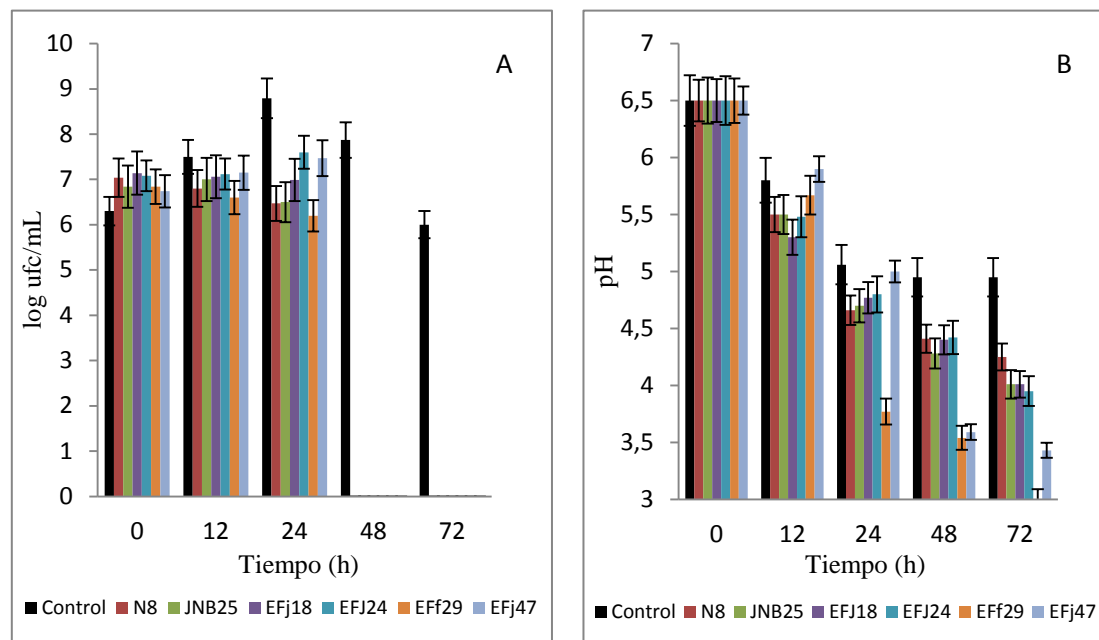


Figura 2.6 Viabilidad de *S. Typhimurium* luego de 72 h de incubación co-inoculada con BAL en JMC a pH neutralizado (A). Variación de pH (B).

CAPÍTULO 2

Cuando el JMC se inoculó individualmente con *L. monocytogenes*, a diferencia de lo observado para la bacteria Gram (-), se produjo una marcada pérdida de viabilidad celular en las primeras 12 h de incubación, luego se mantuvo viable hasta alcanzar una completa inactivación a 72 h de incubación.

Cuando el patógeno fue co-inoculado con las BAL su inactivación ocurrió más rápidamente especialmente en presencia de las cepas N8, EFj18, y EFf29. En esta condición, *L. monocytogenes* alcanzó completa inactivación a 12 y 24 h respectivamente la que fue acompañada por la acidificación del medio comparado al control (Figura 2.7 A, B). Sin embargo, este efecto debería ser atribuido a otra propiedad, además de la acidificación del medio, especialmente para la cepa EFf29, ya que ésta no fue tan marcada a 24 h comparada con la obtenida para los demás cultivos co-inoculados. En este contexto, es importante recordar que la actividad antimicrobiana de las cepas N8 o EFf29 frente a *L. monocytogenes* fue asociada a acidez y producción de peróxido de hidrógeno o una sustancia de naturaleza proteica inhibida por tripsina respectivamente.

En el JMC neutralizado, la bacteria patógena incrementó alrededor de 2 unidades a 12 h, luego los recuentos comenzaron a disminuir progresivamente hasta alcanzar un valor de 5,2 U log en 72 h de incubación.

En presencia de las cepas de BAL, el crecimiento de *L. monocytogenes* fue completamente inhibido en forma similar a lo observado para *S. Typhimurium*, alcanzándose en la mayoría de los casos una completa o una significativa inactivación, especialmente para las cepas N8, JNB25 y EFf29 (Figura 2.8 A). En esta condición, en presencia de las BAL también se observó una marcada acidificación del medio, la cual resultó significativamente mayor en jugo neutralizado, siendo el efecto más pronunciado para las cepas JNB25 y EFf29 lo que se relacionó con su elevada efectividad antibacteriana (Figura 2.8 B).

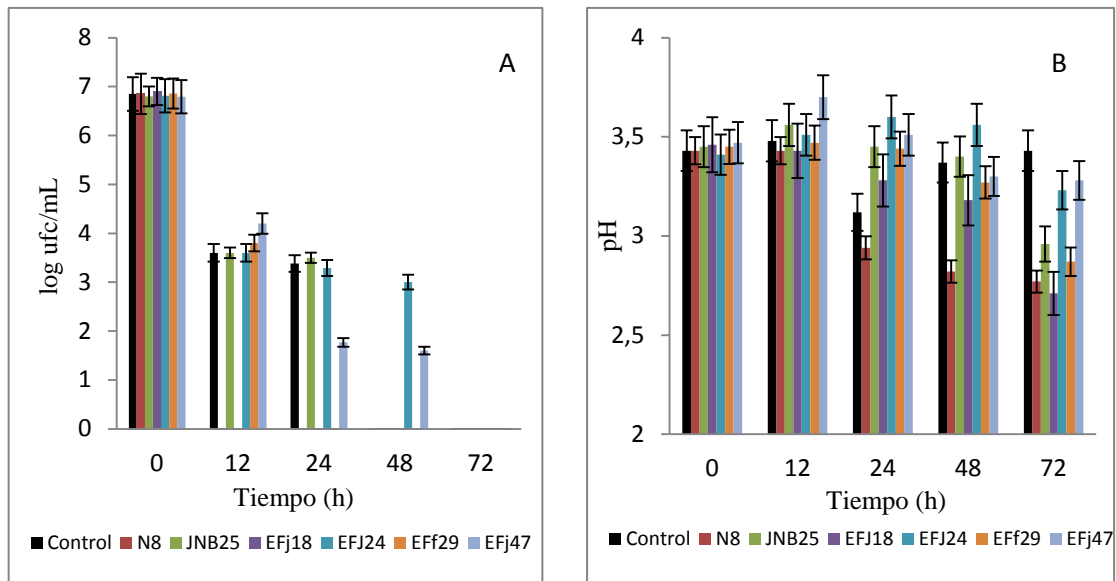


Figura 2.7 Viabilidad de *L. monocytogenes* luego de 72 h de incubación co-inoculada con BAL en JMC sin ajustar pH (A). Variación de pH (B)

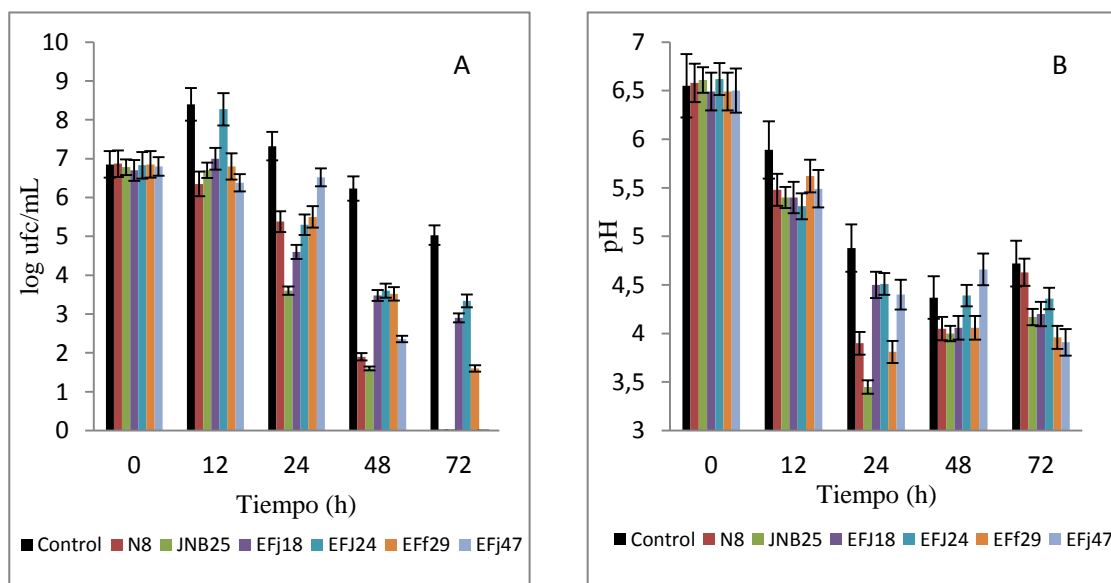


Figura 2.8 Viabilidad de *L. monocytogenes* luego de 72 h de incubación co-inoculada con BAL en JMC a pH neutralizado (A). Variación de pH (B)

Los resultados obtenidos resultan muy interesantes ya que por primera vez se caracterizó el efecto biopreservativo de BAL aisladas de frutas y EF de la región sobre *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* en un jugo multifruta comercial. En todos los casos las bacterias patógenas inoculadas fueron significativamente inactivadas en el jugo fermentado, siendo el efecto

bactericida, en general, mayor para las cepas JNB25, N8, EFj18 y EFf29. En concordancia con nuestros resultados Hashemi y col. (2017) demostraron el efecto antibacteriano de *L. plantarum* LS5 aislado de queso sobre *E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium* en jugo de limón fermentado. Los resultados también mostraron que el jugo fermentado tenía mayores propiedades antagónicas sobre *S. Typhimurium* en comparación con *E. coli* O157: H7. Por otro lado, Filaninno y col. (2017) reportaron el efecto antibacteriano de jugo de granada fermentado con diferentes BAL sobre *E. coli* 30083, *Bacillus megaterium* F6, *Yersinia enterocolitica* 4780 y *Enterococcus aerogenes* DSM 30053.

En base a los resultados obtenidos en términos de crecimiento, capacidad acidificante, utilización de glucosa y potencial láctico en medio MRS y JMC, así como poder antimicrobiano (Capítulo 1) se seleccionaron las siguientes cepas para continuar con las investigaciones propuestas sobre sus potenciales propiedades tecnológicas, nutricionales y antimicrobianas:

- ✓ *L. plantarum* N8 y JNB25. aislados de naranjas
- ✓ *L. plantarum* EFj18, EFj24, EFj47 y EFf29, aislados de EF durante este estudio

Considerando que las cepas seleccionadas de EF hasta aquí, solamente había sido identificadas fenotípicamente, como primera medida y, antes de continuar con su caracterización, se procedió a la identificación genotípica.

2.4.3 Identificación molecular de cepas seleccionadas de BAL aisladas de EF

2.4.3.1 PCR múltiple para identificación de *L. plantarum*, *L. pentosus* y *L. paraplantarum*

Se identificaron las cepas EFj18, EFj24, EFj47 y EFf29 de EF, y se incluyeron, además, aquellas que formaron parte de las 11 BAL seleccionadas al final del Capítulo 1 por sus propiedades antagónicas. Al mismo tiempo se evaluó como controles negativos *L. brevis* EFj3 aislada de EF y cepas de *O. oeni*.

Los resultados obtenidos por la técnica de PCR múltiple confirmaron la identificación fenotípica de todas las cepas de *L. plantarum* aisladas de EF en estudio, incluida

la de referencia, al obtenerse un único producto de amplificación del tamaño esperado (318 pb) (Figura 2.9).

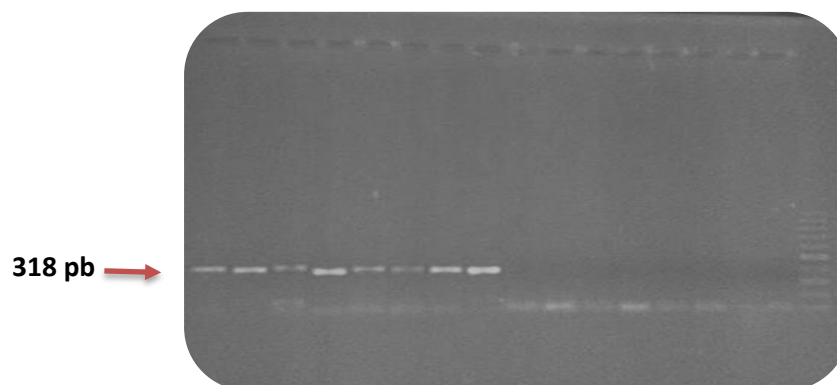


Figura 2.9 Perfiles de amplificación de cepas seleccionadas de EF identificadas fenotípicamente como *L. plantarum*, *L. brevis* y *Ln. ssp.* Línea 1: cepa de referencia *L. plantarum* N8, Línea 2: *L. plantarum* EFj1, Línea 3: *L. plantarum* EFj18, Línea 4: *L. plantarum* EFj21, Línea 5: *L. plantarum* EFj24, Línea 6: *L. plantarum* EFj47, Línea 7: *L. plantarum* EFf3, Línea 8: *L. plantarum* EFf29, Línea 9: *Ln ssp.* EFf6, Línea 10: *L. brevis* EFj3, Líneas 11-14: cepas de *O. oeni*, Líneas 15-16: controles negativos, Línea 17: Marcador de PM (100 bp ladder).

De este modo la especie *L. plantarum* identificada fenotípica y genotípicamente fue dominante en EF. Savino y col. (2012) describieron que las características inherentes a la variedad de manzanas fueron determinantes en la predominancia de los géneros de BAL. Así, la composición de la variedad Golden Delicious permitió la prevalencia de la especie *L. plantarum*.

2.4.3.2 Secuenciación del ADNr 16S

Además, de la técnica de PCR convencional empleada para diferenciar las tres especies de *Lactobacillus*, se caracterizaron las cepas EFj18, EFj24, EFj47 y EFf29 seleccionadas de EF, más las cepas *L. brevis* EFj3 y *Ln. ssp.* EFf6 mediante la secuenciación parcial del ADNr 16S. Este método de identificación resulta de alto poder discriminativo y rápido para tal fin.

La alineación de las secuencias de las 4 cepas de *L. plantarum* con secuencias de referencia depositadas en las bases de datos confirmó también la identificación fenotípica. Así

estas bacterias presentaron altos porcentajes de homología, superiores a 97% con las cepas *L. plantarum* NF3 y ZJ-174 (números de acceso MK418664 y MK334650 respectivamente). Las secuencias de las cepas EFj18 y EFl29 fueron ingresadas a Genbank asignándose los siguientes números de acceso: MK504440 y MK504441 (Figura 2.10), respectivamente.

Similares resultados se obtuvieron para las cepas *L. brevis* y *Ln. ssp.* De este modo, *L. brevis* EFj3 presentó elevada similitud (>97%) con *L. brevis* RL 1165 (número de acceso MH704159) mientras que, *Ln. ssp.* EFl6 lo hizo con cepas de referencia de *Ln. mesenteroides* (número de acceso XL 1558 y número de acceso MH704134). Ambas secuencias fueron depositadas en Gen Bank con los siguientes números de acceso: MK504369 y MK504634. En la Figura 2.2 se observa la secuencia en formato FASTA de *L. plantarum* EFl29.

De este modo los resultados obtenidos confirmaron la identificación fenotípica de aislados de EF, soportando la división entre los 4 grupos descritos en el Capítulo 1. Por otro lado, estos resultados permitieron la identificación molecular de todas las cepas seleccionadas mediante el análisis de sus secuencias parciales del ADNr 16S.

Lactobacillus plantarum strain EFl29 16S ribosomal RNA gene Partial sequence

GenBank: MK504441.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>MK504441.1 Lactobacillus plantarum strain EFl29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
TGCTTGCATCATGATTACATTTGAGTGAGTGCGCAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAA
GCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAA
AGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACC
ATGGCAATGATTACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACCGGCCAAACTC
CTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGGATGGAGCAACGCCCGGTGAGTG
AAGAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTGTGTAAAGAAGAACAATATCTGAGAGTAACGTTCAGGTATTGT
CGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAGGTGCCAGCAGCCCGGTAATTCGTAGGTGGCAAGCGTT
GTCCGGCTTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAA
CCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGC
TCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTG
TTGGAGGGTTCCGCCTTCAGTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA
GGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCTACG
CGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGG
ATACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTGAGCTGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGCTGCTACAATGGATGGTACAAC
GAGTTCCGAACCTCGGAGAGTAAGCTAATCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGATAGGCTGCAACT
CGCTACATGAAGTCCGAAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
GTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTGTA
```

Figura 2.10 Secuencia parcial del ADNr 16S de *L. plantarum* EFl29, ingresada en la base de datos Genbank con el número de acceso MK504369

2.4.4 Propiedades Tecnológicas

2.4.4.1 Susceptibilidad a antibióticos. Determinación de la CIM

La Tabla 2.9. muestra las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de las 6 cepas seleccionadas frente a diferentes grupos de antibióticos ensayados: i) inhibidor de síntesis pared celular (amoxicilina), ii) inhibidores de síntesis de proteínas (tetraciclina, eritromicina y cloranfenicol) y, iii) inhibidor de síntesis de ADN (ciprofloxacina). Las cepas fueron consideradas resistentes cuando mostraron valores CIM superiores a los Puntos de corte establecidos por EFSA (2012). Cabe destacar que los valores de corte representan una línea arbitraria con el objetivo de introducir consistencia en la separación de cepas con resistencia adquirida y susceptible.

Según esta clasificación, la mayoría de las cepas de BAL evaluadas resultaron sensibles a la mayoría de los antibióticos ensayados, específicamente a tetraciclina, ciprofloxacina y cloranfenicol; en este último caso N8, EFj18, EFj24, EFf29 y EFj47 mostraron la mayor sensibilidad. Solamente las cepas en estudios mostraron una muy baja resistencia a eritromicina, excepto la cepa JNB25 que marco una diferencia mayor y sí todas ellas a concentraciones mayores a 128 µg/mL de amoxicilina.

Tabla 2.9. Resistencia a antibióticos de BAL seleccionadas

Cepa	CIM ^a (µg/ml)				
	T	E	C	A	Ci
<i>L. plantarum</i> . N8	4±0,23	2±0,11 ^R	4±0,22	128±6,67 ^R	4±0,17
<i>L. plantarum</i> . JNB25	4±0,21	4±0,24 ^R	8±0,33	>128±7,5 ^R	4±0,21
<i>L. plantarum</i> . EFj18	4±0,19	2±0,09 ^R	4±0,21	>128±6,9 ^R	4±0,22
<i>L. plantarum</i> EFj24	4±0,25	2±0,14 ^R	4±0,24	>128±7,2 ^R	4±0,19
<i>L. plantarum</i> EFj47	4±0,23	2±0,13 ^R	4±0,21	>128±7,2 ^R	4±0,20
<i>L. plantarum</i> EFf29	4±0,22	2±0,12 ^R	4±0,19	>128±6,9 ^R	4±0,21
Valor de Corte	32	1	8	2	8

^R: Resistente de acuerdo a puntos de corte -según EFSA (2012)

T: Tetraciclina; E: Eritromicina; C: Cloranfenicol; A: Amoxicilina
 Ci: Ciprofloxacina; ^aConcentración inhibitoria mínima (µg/mL)

CAPÍTULO 2

Coincidentemente con nuestros resultados, Ammor y col. (2008) y Ripamonti y col. (2011) confirmaron la baja resistencia hacia tetraciclina y cloranfenicol de diversas especies de lactobacilos de origen lácteo y cárnico. Sin embargo, Sukmarini y col. (2014) encontraron en BAL aisladas de alimentos fermentados un número tres veces mayor de cepas resistentes a cloranfenicol comparado con eritromicina. Por otro lado, Argyri y col. (2013) al evaluar la susceptibilidad de 71 BAL aisladas de aceitunas frente a diversos antibióticos encontraron que cepas de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *Ln. pseudomesenteroides*, así como la cepa probiótica *L. casei Shirota* fueron resistentes a tetraciclina, sólo *L. casei Shirota* a eritromicina y 2/37 cepas de *L. pentosus* y *L. casei Shirota* a cloranfenicol. El uso de cultivos como potenciales agentes de biocontrol en productos MP debe ser altamente controlado, ya que la administración de ciertos antibióticos en algunos consumidores podría ocasionar una posible transmisión de los factores de resistencia a microorganismos patógenos (Pan y col., 2011). Sin embargo, hay que considerar que la resistencia a antibióticos observada en las cepas de BAL es a menudo intrínseca y no transmisible porque está codificada cromosómicamente (Zhou y col., 2005; Mathur y col., 2005) En este sentido, Sukmarini y col. (2014) detectaron la presencia de los genes cromosómicos gen *ermB* en la cepa *L. plantarum* T8 y *ermB* y *ermC* y Tn554 en las cepas *P. acidilactici* S23 y DH7 que codifican resistencia a eritromicina. Zhou y col. (2012) encontraron mediante PCR los genes de resistencia tet(M), ant(6), y aph(3c)-IIIa para tetraciclina, estreptomicina y kanamicina, en una gran variedad de cepas de BAL aisladas de yogurts respectivamente. Teniendo en cuenta que en nuestros estudios detectamos resistencia a amoxicilina es necesario profundizar las investigaciones en este sentido en relación con la posible transferencia de dicha propiedad a otros microorganismos. Sin embargo, en general, las cepas resultaron susceptibles a los antibióticos ensayados, principalmente *L. plantarum* N8 lo que favorecería su uso en alimentos MP.

2.4.4.2. Ensayo de compatibilidad entre cepas seleccionadas

Los resultados mostraron que ninguna de las cepas de BAL ensayadas inhibió el crecimiento de las restantes cuando se enfrentaron entre sí como se observa en la Figura 2.11. por lo tanto, las cepas podrían inocularse en la matriz alimentaria en forma combinada lo que resulta de gran interés; ya que el empleo de cultivos mixtos o multicepas permite lograr efectos deseados cuando las bacterias se usan como agentes de biocontrol o en procesos fermentativos, alcanzándose frecuentemente un efecto más exitoso que cuando se usa una sola cepa. Siroli y col. (2015) señalaron que una combinación adecuada de BAL y la correcta temperatura de almacenamiento mejoran la seguridad microbiológica de VMP. Estudios recientes revelaron que algunos efectos beneficiosos fueron cepa-dependiente (Galdeano y col., 2010). Por lo que la combinación de diferentes cepas con propiedades de interés puede ser más efectivo que el uso de una cepa en particular (Timmerman y col., 2004).

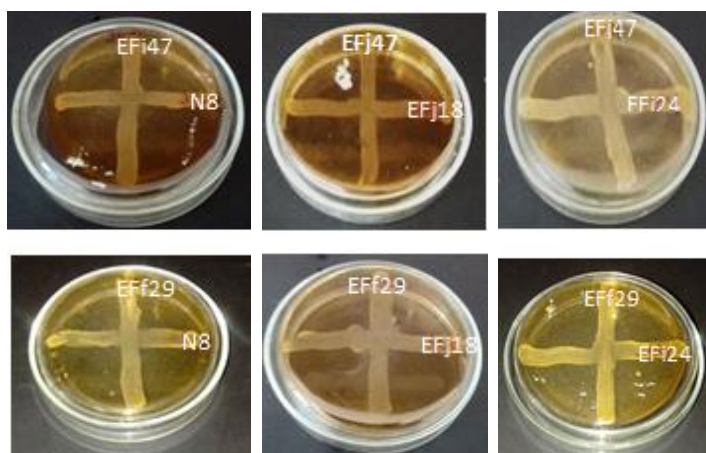


Figura 2.11 Prueba de compatibilidad entre las cepas de BAL seleccionadas: *L. plantarum* N8, JNB25, EFj18, Efj24, EFj47 y EFf29.

2.4.4.3 Evaluación cualitativa de producción de aminas biógenas

Se estudió cualitativamente la capacidad de las cepas seleccionadas de producir aminas biógenas (AB), específicamente putrescina, tiramina, cadaverina e histamina en medio mínimo decarboxilasa descrito en el apartado 2.3.2 de Materiales y Métodos.

CAPÍTULO 2

El total de cepas ensayadas no mostraron producción de AB a partir de los respectivos aminoácidos precursores, ornitina, tirosina, lisina e histidina (Tabla 2.10.). Sin embargo, a partir de arginina todas las BAL mostraron resultado positivo. En la Figura 2.12 se observa la variación de color de amarillo a violeta por alcalinización del medio en presencia de arginina para todas las cepas ensayadas. Teniendo en cuenta que el metabolismo de arginina por las bacterias implica dos vías catabólicas: i) Arginina-ureasa con producción de ornitina y urea y, ii) Arginina dihidrolasa (sistema ADI), con producción de ornitina, ATP, amonio y carbamyl-fosfato (Arena y col., 1999; Savino y col., 2012), los resultados positivos en presencia de arginina estarían relacionados a la producción de amonio, a través de la vía ADI, y no a la producción de la AB putrescina dado que, fueron negativos cuando se usó como ornitina aminoácido precursor. Savino y col. (2012) coincidentemente con nuestros resultados, informaron que cepas de *L. brevis*, *Ln. dextranicum* y *L. plantarum*, aisladas de manzanas, fueron capaces de utilizar arginina mediante vía ADI con producción de amoníaco. Arena y col. (1999) demostraron que el crecimiento de *L. plantarum* N4 fue mejorado en presencia de arginina, la cual fue degradada a ornitina, citrulina y amonio produciendo energía adicional a través de la ADI. Por otro lado, Leuschner y col. (1998) informaron que cepas de *L. plantarum* aisladas de diferentes alimentos no produjeron AB a partir de ornitina, tirosina, lisina e histidina. Por el contrario, Moracanin y col. (2015) detectaron la producción de histamina y tiramina en cepas de *Ln. mesenteroides* y *L. brevis* aisladas de salchichas, pero no de cadaverina y putrescina. Sin embargo, Alan y col. (2018) reportaron en BAL aisladas de pickles que las concentraciones de AB totales se mantuvieron por debajo de los niveles tóxicos y solo el 9% de los aislamientos de *L. plantarum* produjeron niveles significativos en medios suplementados con 0.2% de lisina, ornitina e histidina.

Tabla 2.10. Producción cualitativa de Aminas Biógenas por BAL seleccionadas

Cepas	AMINOACIDOS				
	Arginina	Ornitina	Tirosina	Lisina	Histidina
<i>L. plantarum</i> JNB25	+	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> N8	+	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> EFj18	+	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> EFj24	+	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> EFj47	+	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> EFf29	+	-	-	-	-

Resultado +: viraje del indicador de pH a color violeta

Resultado -: ausencia de viraje del indicador

Los resultados corresponden a tres repeticiones independientes.

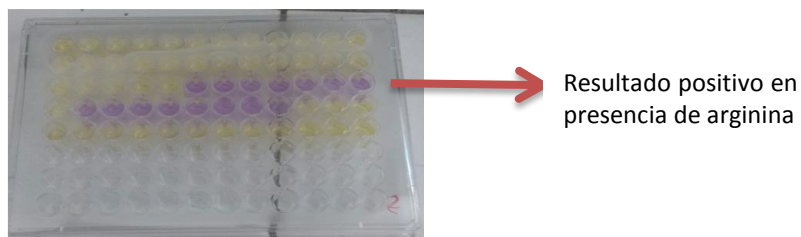


Figura 2.12 Ensayo cualitativo para determinar producción de AB

2.4.4.4 Hidrofobicidad

Se estudió la hidrofobicidad de las cepas seleccionadas como una potencial propiedad probiótica mediante la medición de la afinidad por el disolvente orgánico de las células cultivadas en sistema de dos fases agua-disolvente orgánico, como medida predictiva de su capacidad de adhesión a epitelios. La afinidad de los microorganismos a solventes como cloroformo, acetato de etilo, xileno, tolueno y hexadecano ha sido ampliamente usado para medir la hidrofobicidad de la superficie celular de las BAL (Vinderola y Reinheimer, 2003; Divya y col., 2012). En este estudio, se utilizó como solvente orgánico *p*-xileno, el cual refleja una superficie celular hidrofóbica.

Los resultados se muestran en la Tabla 2.11. La mayoría de las cepas presentaron una hidrofobicidad mayor a 40%; solamente la cepa N8 presentó un porcentaje menor de 12,6%. Las cepas JNB25, EFj18 y EFf29 presentaron valores superiores al 70% y fueron similares a lo observado en las cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus* M92 y *Lactobacillus rhamnosus* GG (ambas aproximadamente 70%) y superiores a los valores de hidrofobicidad, medidos usando el mismo solvente, para las cepas probióticas *L. plantarum* DGK-17, *L. casei* SB93 y *L. mucosae* (Kos y col, 2003; Caggia y col., 2015; Khan y Kang, 2016; Das y col., 2016). Por el contrario, Bautista-Gallego y col. (2013) detectaron que cepas de BAL aisladas de aceitunas de mesa presentaron en su mayoría niveles bajos de hidrofobicidad siendo los valores máximos 25%.

Tabla 2.11. Porcentaje de hidrofobicidad de cepas de BAL seleccionadas.

Cepa	Hidrofobicidad (%)
<i>L. plantarum</i> N8	12,58 ± 0,9
<i>L. plantarum</i> JNB25	68,42 ± 3,6
<i>L. plantarum</i> EFj18	81,83 ± 4,8
<i>L. plantarum</i> EFj24	45,7 ± 2,5
<i>L. plantarum</i> EFj47	54,2 ± 2,9
<i>L. plantarum</i> EFf29	79,12 ± 4,3

Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones

2.4.4.5 Formación de biofilm por BAL

La capacidad de las BAL de formar biofilm resulta de gran interés en la industria de los alimentos, especialmente en frutas y vegetales fermentados, ya que durante el proceso de fermentación, deben sobrevivir a condiciones ambientales adversas tales como diferentes temperaturas, niveles de azúcar, pH y salinidad (Abdallah y col., 2014).

La Figura 2.13 muestra la capacidad de las seis cepas seleccionadas para formar biofilm a 30 °C determinada mediante medidas de absorbancia con CV. En general no se detectó una elevada capacidad para formar biofilm en las condiciones de ensayo. Sin embargo,

las cepas EFj18, EFj24 y EFf29 presentaron una producción moderada mientras que EFj47, N8 y JNB25 mostraron una capacidad débil o nula respectivamente de acuerdo a los puntos de corte propuestos por Borges y col. (2012). Coincidentemente, las tres cepas que presentaron producción moderada de biofilm fueron aisladas de EF, mientras las que presentaron un fenotipo débil de naranjas. Sin embargo, es necesario considerar que diversos factores pueden afectar la formación de biofilm. Muruzović y col. (2018) detectaron una moderada producción de biofilm en BAL aisladas de queso, la cual estuvo influenciada por temperatura, pH y concentración de NaCl. Leccese-Terraf y col. (2012) concluyeron que la composición del medio de cultivo afecta a la formación de biofilm o biopelículas por parte de BAL. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio marcan una tendencia positiva para las cepas EFj18, EFj24 y EFf29, la cual podría mejorar favorablemente, incluso en las cepas clasificadas como débil o no productora, dependiendo de las condiciones de ensayo. Hernández Ramírez y col. (2015) demostraron que el medio BHI suplementado con más glucosa y manganeso proporcionó las condiciones óptimas para la formación de biofilm densos en las cepas de BAL ensayadas.

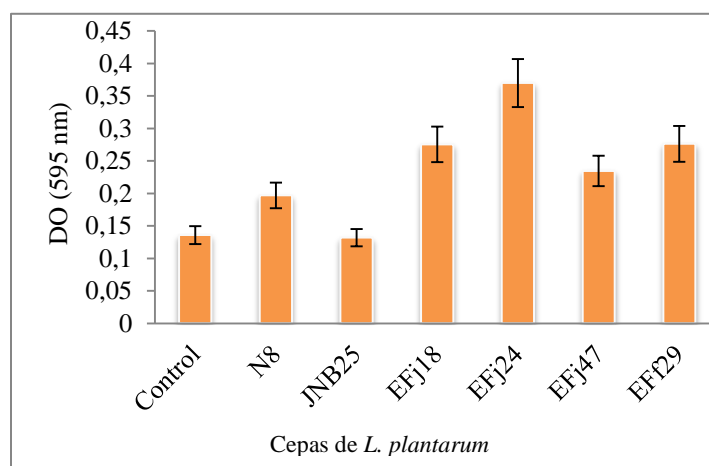


Figura 2.13. Formación de biofilm por cepas de BAL seleccionadas en caldo MRS incubadas a 30 °C durante 48 h. Control: medio sin inocular. Los resultados se expresan como la media de tres repeticiones \pm DE.

2.4.4.6 Inhibición de la formación de biofilm en microorganismos patógenos

Se evaluó la formación de biofilm tras la incubación durante 48 h de *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* o *E. faecalis* en presencia de SLC de las cepas de BAL seleccionadas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2.14. Entre las cepas indicadoras ensayadas, *L. monocytogenes* mostró la mayor capacidad para formar biofilm. En esta condición, las cepas de BAL inhibieron su formación en un rango de 53 a 64%, siendo EFj18, EFf29 y EFj47 las más eficientes (entre 63 y 65% de inhibición, respectivamente). Por el contrario, los porcentajes de inhibición fueron más bajos frente a *E. faecalis* y, variaron en un rango comprendido entre 9 y 66%, siendo nuevamente EFf29 y EFj47 las más efectivas. En el caso de *S. Typhimurium* los valores de inhibición obtenidos fueron similares a los determinados para la bacteria Gram (+), variando entre un 54 y 64%.

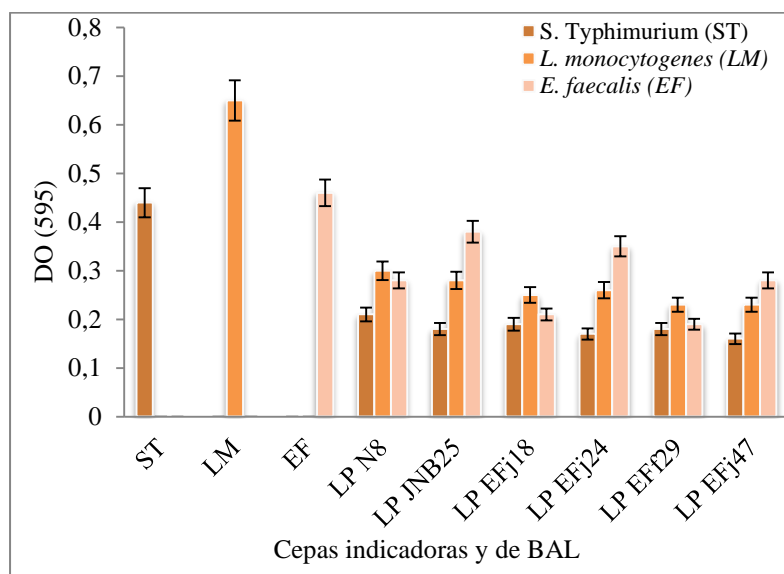


Figura 2.14 Efecto de SLC de BAL (LP) sobre la formación de biofilm de las cepas indicadoras: *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *E. faecalis*. Medio control, sin SLC (barras individuales). Los resultados se expresan como la media \pm DE.

De este modo, las cepas seleccionadas poseen buenas actividades antagonicas tanto frente a células planctónicas como sésiles, lo cual representa una propiedad de gran interés. Esta propiedad constituye un punto crítico de control en la industria de los alimentos, ya que

CAPÍTULO 2

desde el aspecto sanitario la eliminación de patógenos formando biofilm comprende el uso de agentes químicos con potenciales efectos tóxicos para la salud (Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2013).

Similares resultados fueron reportados por Singh y col. (2018) al evaluar la inhibición de biofilm de SLC de 15 cepas de lactobacilos provenientes de leche de cabra frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus*. Por otro lado, Rao y col. (2015) también detectaron buena actividad antibiofilm de SLC de *L. plantarum* y *L. pentosus* frente a *P. aeruginosa* y *Klebsiella pneumonia* mientras que, el biofilm formado por una cepa de *S. enterica* también fue sensible a diversas cepas de *L. plantarum* (Arena y col., 2016). Es bien conocido que la patogénesis de *Salmonella* spp. consiste en el ataque y posterior invasión de las células del epitelio intestinal y está directamente relacionada con la capacidad de formación de biofilm (Thirabunyanon y col., 2012). En este sentido, Dás y col. (2013) demostraron la capacidad de una cepa de *Lactobacillus* para reducir significativamente la adherencia de *Salmonella* a la línea celular del colon epitelial HCT-116 cuando fue co-inoculada con la cepa láctica KSBT 56.

Por otro lado, Annous y col. (2005) han demostrado en dos cepas de *Salmonella* ssp. inoculadas en la corteza de melón, su habilidad para formar rápidamente biopelículas. A través de microfotografía los autores observaron que el material fibrilar fue visible después de solo 2 horas a 20°C, y que las células se incrustaron en material polimérico extracelular después de 24 horas a cualquier temperatura. Estos resultados indicaron que un patógeno humano es capaz de formar una biopelícula en el tejido vegetal y que la formación de biofilm puede ser responsable del aumento de la resistencia de bacterias patógenas a los desinfectantes acuosos.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este aspecto resultan novedosos, y de gran interés ya que, en general, las cepas de *L. plantarum* aisladas de frutas y EF de la región presentaron una buena actividad antibiofilm frente a las tres cepas indicadoras ensayadas.

2.4.4.7 Evaluación de requerimientos vitaminas

Se evaluó los requerimientos en vitaminas de las cepas seleccionadas en medio químicamente definido optimizado para *L. plantarum* (Saguir y Manca de Nadra, 2007).

Cabe destacar que todas las cepas evaluadas fueron capaces de crecer adecuadamente en el medio basal LPSM (MB) a 24 h de incubación, a pesar de ser nutricionalmente más pobre que el medio complejo MRS (Tabla 2.12), en concordancia con lo informado por Saguir y Manca de Nadra (2007).

En los medios deficientes en una vitamina, el crecimiento bacteriano varió dependiendo de la cepa y composición del MB.

En los medios privados de ácido p-aminobenzoico (MB1), D-biotina (MB3), ácido fólico (MB4), piridoxal (MB6), riboflavina (MS7) y tiamina (MS8) las cepas alcanzaron un crecimiento superior al 70%, indicando que estas vitaminas fueron no esenciales para sus crecimientos.

En MB privado de pantotenato de calcio (MB2), las cepas EFf29, N8 y EFj18 crecieron entre un 30 y 70% mientras que JNB25, EFj24 y EFj47 lo hicieron en un rango inferior al 30% por lo que esta vitamina fue considerada estimulante y esencial para sus crecimientos respectivamente.

En ausencia de niacina (MS5), la mayoría de las cepas crecieron entre 30-70% con respecto al MB, por lo que fue considerada estimulante, excepto para EFj24 que la requirió en forma esencial.

CAPÍTULO 2

Tabla 2.12 Requerimientos nutricionales en vitaminas de cepas seleccionadas en medio LPSM

Vitamina omitida	Cepa de <i>L. plantarum</i> \											
	N8		JNB25		JEF18		JEF24		EFj47		EFf29	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
-	1,90±0,05	-	1,90±0,05	-	2,00±0,09	-	1,90±0,06	-	2,10±0,13	-	1,90±0,09	-
Ácido p-aminobenzoico	1,79±0,09	NE	1,78±0,08	NE	1,83±0,99	NE	1,85±0,06	NE	1,89±0,09	NE	1,72±0,03	NE
Pantotenato de calcio	1,10±0,20	S	0,13±0,02	E	1,02±0,04	S	0,24±0,05	E	0,23±0,06	E	0,92±0,02	S
D-biotina	1,86±0,09	NE	1,80±0,08	NE	1,79±0,07	NE	1,83±0,10	NE	1,91±0,07	NE	1,75±0,07	NE
Ácido fólico	1,89±0,20	NE	1,78±0,09	NE	1,82±0,06	NE	1,79±0,04	NE	1,90±0,08	NE	1,79±0,07	NE
Niacina	0,99±0,05	S	1,25±0,03	S	1,30±0,02	S	0,54±0,22	E	0,68±0,02	S	0,78±0,08	S
Piridoxal	1,87±0,03	NE	1,87±0,04	NE	1,82±0,06	NE	1,85±0,05	NE	1,88±0,03	NE	1,77±0,02	NE
Riboflavina	1,90±0,04	NE	1,88±0,03	NE	1,85±0,08	NE	1,82±0,04	NE	2,00±0,05	NE	1,77±0,05	NE
Thiamina	1,78±0,04	NE	1,91±0,08	NE	1,93±0,03	NE	1,92±0,05	NE	1,85±0,07	NE	1,62±0,04	NE

A: diferencia de crecimiento entre fase exponencial del crecimiento e inoculo, medida como DO_{560nm} . Diferentes tiempos fueron requeridos para alcanzar el fin del crecimiento exponencial. El tiempo promedio requerido fue de 24 horas.

C: categorías asignadas a cada vitamina: Esencial, E, (crecimiento <30%); Estimuladorio, S; (crecimiento entre 31-70% relativo al MB); No esencial, NE, (>70%). Los valores expresan como la media ± DE de 3 experimentos independientes.

CAPÍTULO 2

En resumen, las cepas seleccionadas crecieron eficientemente en el medio químicamente definido. Más aún los resultados fueron comparables con los obtenidos en medio complejo MRS en concordancia con lo descrito por Saguir y Manca de Nadra (2007) para *L. plantarum* N4. Los requerimientos absolutos para vitaminas mostraron considerables similitudes. En general, las vitaminas fueron clasificadas como no esenciales y en menor medida estimuladoras para sus crecimientos. Solamente pantotenato de calcio y niacina fueron esenciales para EFj24, EFj47 y JNB25, siendo EFj24 las más exigente al requerir ambos factores de crecimiento. Así estas cepas con auxotrofia hacia una o dos vitaminas resultarían menos favorables para su aplicación en las matrices alimentarias en relación con las demás cepas que no presentaron esta propiedad. Terrade y col. (2009) encontraron que pantotenato de calcio fue esencial para el desarrollo de cepas de *O. oeni*, *L. buchneri* y *L. hilgardii* de vino, mientras que riboflavina sólo fue esencial para las cepas de *Lactobacillus*. Por otro lado, Amoroso y col. (1993) demostraron que la mayoría de las vitaminas del complejo B fueron estimuladoras para el desarrollo de *O. oeni*.

Cabe destacar que la capacidad de una bacteria para desarrollar en ausencia de algún factor de crecimiento está relacionada con su habilidad para sintetizar dicho compuesto. Por lo tanto, las cepas estudiadas en general presentarían potencial para sintetizar las vitaminas del medio LPSMun. En este sentido, Juárez del Valle y col. (2014) encontraron que de total 179 BAL pertenecientes a la Colección de Cultivos de CERELA evaluadas, solamente 42 fueron capaces de crecer en medio libre de riboflavina y que, en estos casos su contenido fue detectado tanto en el medio de cultivo como medio intracelular. En la última década, la tecnología de secuenciación han hecho posible analizar genomas completos de microorganismos (Heard y col., 2010; Edwards y Holt, 2013), de esta manera la identificación de nutrientes esenciales puede acelerarse investigando la presencia de los genes involucrados en distintas vías biosintéticas; asimismo, el análisis de genomas bacterianos ha permitido desarrollar medios de crecimiento específicos para cepas de *L. plantarum* o *Campylobacter jejuni* (Teusink y col., 2005; Saguir y Manca de Nadra, 2007; Alazzam y col., 2011).

2.4.5 Análisis de permutación usando Permutmatrix de las propiedades tecnológicas evaluadas

La influencia de la MCF sobre el crecimiento y las distintas propiedades tecnológicas evaluadas de las seis cepas seleccionadas se sometió a un análisis de permutación, cuyo resultado se muestra en la Figura 2.15. Las BAL se distribuyeron en dos grupos principales (A y B). El grupo A estuvo constituido por cinco cepas que presentaron características comunes tales como: menores requerimientos en vitaminas, sensibilidad a tetraciclina, ciprofloxacina y cloranfenicol, mayores porcentajes de inhibición de biofilm frente a indicadores, débil o moderada capacidad para formar biofilm, elevado porcentaje de hidrofobicidad (excepto N8 y EFj24) y resistencia o estímulo por la MCF. El grupo B estuvo constituido por *L. plantarum* JNB25, la cual presentó valores más bajos, en general, para las propiedades ensayadas en contraste con el grupo A. En base a los resultados las cepas del grupo A presentaron las mejores propiedades tecnológicas y nutricionales. Sin embargo, dentro del grupo A, el subgrupo C compuesto por las cepas N8, EFj18, EFj47y EFf29 resultó ser el más interesante, destacándose especialmente N8 y EFf29 por sus elevadas propiedades antimicrobianas asociadas a su capacidad acidificante tanto en medios de laboratorio como jugo de frutas y la producción de peróxido de hidrógeno y una sustancia de naturaleza proteica activa frente a *S. typhimurium* y *L. monocytogenes*. Por lo tanto serían las más apropiadas para evaluar sus efectos como agente de bio-control en matrices alimenticias, que además aporten valor agregado al consumidor, por ejemplo potencialidad para producir vitaminas.

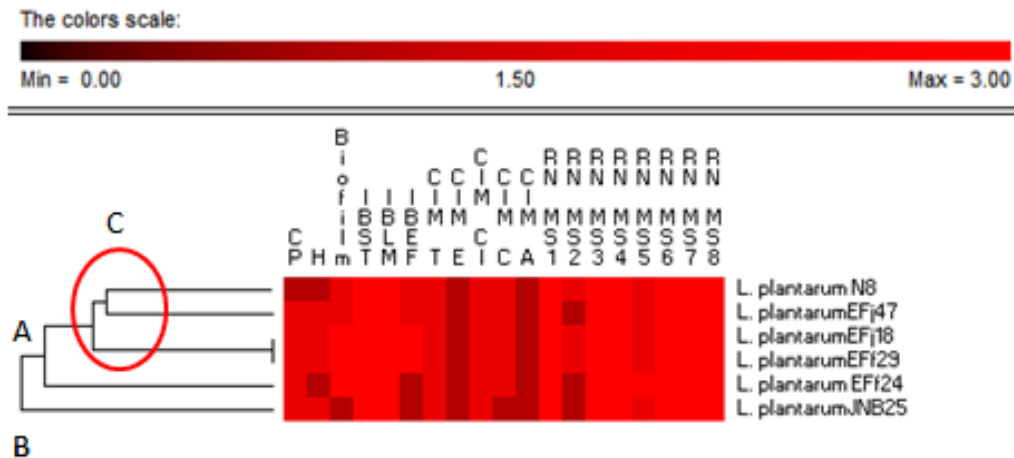


Figura 2.15. Análisis de permutación basado en las propiedades tecnológicas de las cepas de BAL seleccionadas: crecimiento en presencia de la mezcla compuestos fenólicos (MCP); hidrofobicidad (H); formación de biofilm; inhibición de formación de biofilm de *Salmonella* Typhimurium (IBST), *Listeria monocytogenes* (IBLM) y *Enterococcus faecalis* (IBEF); CIM para tetraciclina (T), eritromicina (E), ciprofloxacina (Ci), cloranfenicol (C), amoxicilina (A) y Requerimientos en vitaminas en MS1 (RNMS1), MS2 (RNMS2), MS3 (RNMS3), MS4 (RNMS4), MS5, (RNMS5), MS6 (RNMS6), MS7 (RNMS7) y MS8 (RNMS8). La escala de color se muestra en la parte superior, en donde los colores más oscuros representan los valores más bajos y los colores más claros los valores más altos para las propiedades analizadas.

2.4.6 Actividad antimicrobiana frente a bacteria patógena aislada de EF

2.4.6.1 Aislamiento e identificación

Para el aislamiento de bacterias pertenecientes al género *Enterobacteriaceae*, con particular interés en *Salmonella* ssp. se usó el protocolo descrito por ANMAT según el procedimiento establecido por BAM-FDA 2007 (Manual Analítico de Bacteriología-Administración de alimentos y medicamentos, 2007). En la Tabla 2.13 se muestran los recuentos obtenidos luego del pre-enriquecimiento y enriquecimiento en medio selectivo RVS.

Tabla 2.13. Recuentos microbianos en medios Mac Conkey y SSA de ensalada de frutas de elaboración local

Ensalada de fruta	Recuentos promedios (log ufc/g) en medios de aislamiento	
	Mac Conkey	SSA
Jugo	4,18±0,04	1,88±0,03
Frutas	6,20±0,08	7,10±0,08

En las muestras de jugo se obtuvieron recuentos celulares entre 10^2 y 10^7 ufc/mL en medio Mac Conkey y SSA, lo que indica un elevado número de bacterias potencialmente patógenas, aún mayor que el detectado en el Capítulo 1 en medio Mac Conkey donde no se realizó ningún tratamiento de enriquecimiento, indicando que el mismo permitió recuperar el número de aislados.

De un total de 20 colonias tomadas al azar de ambos medios, todas fueron Gram negativas, catalasas positivas con morfología bacilar, por lo tanto se seleccionaron para la identificación fenotípica a nivel de género mediante pruebas bioquímicas.

Solamente tres aislados pudieron ser claramente identificados a nivel de género por presentar las siguientes características:

- Pico y fondo amarillo en medio TSI indicando fermentación de glucosa y lactosa y/o sacarosa positiva.
- Medio Citrato de Simmons de color azul, lo que evidencia viraje del indicador por utilizar citrato como única fuente de carbono.
- Medio agar urea de Christensen de color amarillo indicando resultado negativo, es decir incapacidad para hidrolizar la urea
- Medio APGP con turbidez como consecuencia del crecimiento bacteriano, la prueba de VP resultado positivo (formación de anillo rojo), indicando que la bacteria llevó a cabo una fermentación butilenglicólica, mientras que la prueba RM dio resultado negativo.
- Fermentación de glucosa y lactosa en medio líquido, positivas al virar el indicador de púrpura a amarillo por la producción de ácido y aparición de una burbuja en el tubo de Durham por producción de gas
- Los aislados restantes Gram (-), catalasas (+), no pudieron ser claramente asociados a ningún género sobre la base de las pruebas realizadas, aunque se descartó la presencia de *Salmonella* ssp., *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp (Figura 2.16). Por lo tanto en base a las pruebas bioquímicas realizadas se identificaron fenotípicamente a tres

aislados como pertenecientes al género *Enterobacter*. Al mismo tiempo se descartó la presencia de *Salmonella* ssp., *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp como se mencionó anteriormente.

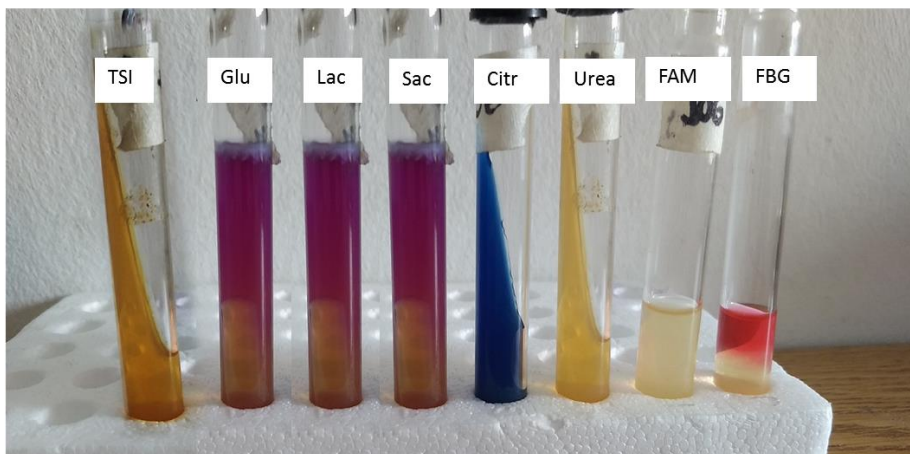


Figura 2.16 Pruebas bioquímicas en diferentes medios de cultivo

La identificación a nivel fenotípico de los aislados perteneciente al género *Enterobacter* se confirmó mediante la secuenciación parcial del ADNr 16S. La secuencia del aislado se alineó con secuencias de cepas de referencia depositadas en la base de datos GenBank; NCBI; EMBL y RDP. Su afiliación se confirmó al obtener porcentajes de homología superiores al 97% con *Enterobacter cloacae* (número de acceso ASM2556V1). Por lo que los aislados se identificaron como *E. cloacae* (EF1, EF2, EF3). La secuencia del aislado identificado como *E. cloacae* EF1 fue ingresada a Genbank asignándose el siguiente número de acceso: MK506242 y se muestra en la Figura 2.17.

Enterobacter cloacae strain EFe1 16S ribosomal RNA gene Partial sequence

GenBank: MK506242.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>MK506242.1 Enterobacter sp. strain 105 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
CTGCCGTGATGGAGGGCATGATAACTACTGGAACGGGTAGCTAATACCGGGCATAAGTCGCAAGACAAA
GACGGGGACCTTCGGGCCCTTCCATCAGATGTGCCGTGATGGCTGATTTAGCTCCAGTAGGTGGGG
TTCACCTAGGGCAGCGTCCCTAGTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACTCTGGAACGAGACACGGTCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGAAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTATGCAGCCATGCCGCGTGTAT
AAAGAAGGCCTTCGGGACTTGTAAGTACTTTAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCA
ATTGATTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCGATTAACCTCCGTGCCAACAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGGC
GGCGTTWACGGAATTACTGGTCTGTAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGG
CTCAACCTGGGAACTGCATTGAAACTGGCAGGCTGGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATCCACGTTGT
AGCGGTTAAATGCGTATAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGC
TCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACATGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGAT
TTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCCACCCCTGGGGAGTACGGC
CACAAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTTACGGGGGCCCGCACAAAGCTGTGGGGCATGTTGGATTACTTCCA
TTCAACCCAAGGAACCTTTACTGGTCTTGACATCCACAGAATTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGG
AACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCACAACG
AGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACCAAAGGCCAGTGATAAACTGGAGGAA
TGTTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAAGTGGCGCATA
CAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATT
```

Figura 2.17. Secuencia parcial de ADNr 16S de *E. cloacae* EFe1 aislado de EF de elaboración local.

Cabe resaltar que *E. cloacae* es una bacteria patógena oportunista, por lo tanto su presencia en EF de elaboración local resulta un riesgo para la salud del consumidor y, confirma la importancia de emplear métodos adecuados de conservación para este tipo de alimentos.

Se seleccionó la cepa *E. cloacae* EFe1 como microorganismo indicador para evaluar las actividades antimicrobianas de las 6 cepas seleccionadas frente a un patógenos aislado de una matriz alimenticia de elaboración (el mismo tipo de muestra que se empleó para el aislamiento de las BAL, Capítulo 1).

2.4.6.2 Actividad antimicrobiana de BAL seleccionadas frente a *E. cloacae*

La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión en agar. En la Tabla 2.14 se muestran los resultados obtenidos. Del total de seis cepas ensayadas solamente tres de ellas (*L. plantarum* N8, EFj18, EFF29) mostraron resultados positivos, siendo *L. plantarum* EFF29 la más efectiva con un halo de inhibición de diámetro significativamente mayor que los obtenidos con N8 y EFj18 (Figura 2.18).

Tabla 2.14 Actividad antimicrobiana de cepas seleccionadas de BAL frente a *E. cloacae* EFe1 aislado de ensalada de frutas.

Cepa	Microorganismo Indicador
	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>L. plantarum</i> N8	8,3 ± 0,06
<i>L. plantarum</i> JNB25	ND
<i>L. plantarum</i> EFj18	7,4 ± 0,08
<i>L. plantarum</i> EFF24	ND
<i>L. plantarum</i> EFj47	ND
<i>L. plantarum</i> EEf29	23 ± 0,08

Diámetros de los halos de inhibición en mm

ND: no detectado. Los resultados se expresan como la media ± DE

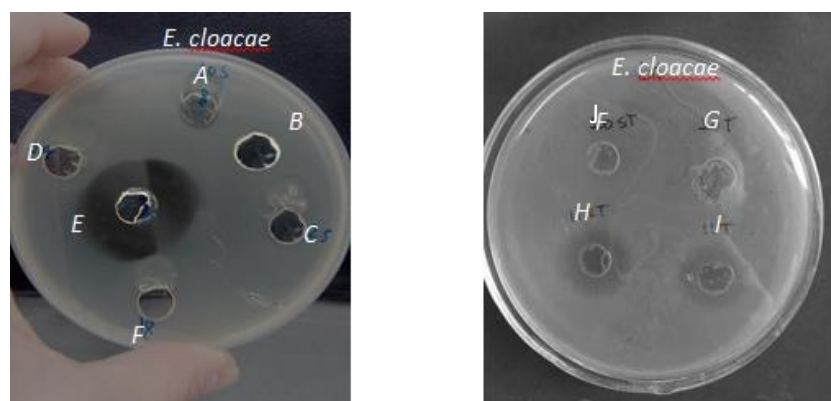


Figura 2.18 Método de difusión en agar. Actividad antimicrobiana frente a *E. cloacae* aislado de Ef de elaboración local. Control negativo MRS (A), control negativo, agua (B), SLC de JNB25 (C), SLC de EFj24 (D), SLC de EEf29(E), SLC de EFj47 (F), Control negativo MRS (G), SLC de EFj18 (H), SLC de N8 (I), control negativo Agua (J).

Los resultados obtenidos demuestran que dentro de las BAL seleccionadas, las que a su vez presentaron las mejores respuestas de crecimiento, propiedades tecnológicas y de inactivación fueron capaces de inhibir el crecimiento de una bacteria patógena aislada del mismo nicho ecológico de donde ellas fueron aisladas, lo que confirma el elevado potencial de las cepas *L. plantarum* EEf29, EFj18 y N8 para ser usadas como agentes de bio-control. Por lo tanto, fueron seleccionadas para realizar los ensayos de biopreservación "in situ" usando diferentes matrices alimentarias.

2.5 CONCLUSIONES PARCIALES

- Las 11 cepas de *L. plantarum* y *Leuconostoc* spp ensayadas mostraron buen crecimiento en medio MRS, pH 6,5, sin embargo seis cepas se destacaron por presentar las mayores μ_{\max} , capacidad acidificante y $V_{\max ac}$, todas ellas pertenecientes a la especie *L. plantarum* lo que se relacionó con su metabolismo homofermentativo. Entre ellas se destacaron: N8, JNB25, EFj18, EFj24, EFj47 y EFf29. Además, presentaron elevado rendimiento láctico.

- En JMC, todas las cepas ensayadas fueron capaces de crecer, incrementando sus recuentos celulares por arriba a 1,0 unidad logarítmica a 2 días de incubación a 30 °C y permaneciendo viables hasta 7 días de incubación ensayados. Nuevamente se destacaron por sus respuestas de crecimiento y capacidad acidificante las cepas anteriormente mencionadas, especialmente *L. plantarum* N8 y EFf29 que se mantuvieron viables, sin disminuir en sus recuentos hasta los 7 días de incubación a 30 °C.

- En ensayos de inactivación en JMC inoculado con *S. Typhimurium* o *L. monocytogenes* y cada una de cepas: *L. plantarum* N8, JNB25, EFj18, EFj24, EFj47 y EFf29, se demostró el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de microorganismos indicadores especialmente en JMC neutralizado donde inhibieron el crecimiento e incrementaron la tasa de inactivación, siendo este efecto más pronunciado sobre *S. Typhimurium* ya que a 48 h no se detectó células viables.

- La presencia de compuestos fenólicos, naturalmente presentes en los alimentos vegetales no afectó negativamente el crecimiento de las BAL en estudio. Más aún, permitió que la cepa EFj47 pueda desarrollar en el medio semisintético basal, indicando que fueron esenciales para su crecimiento, posiblemente por aportar una fuente adicional de carbono y energía, en un medio deficiente en azúcares.

➤ En base a los resultados obtenidos en términos de crecimiento, capacidad acidificante se seleccionaron *L. plantarum* N8, JNB25, EFj18, EFj24, EFj47 y EFf29 para continuar las investigaciones. En primer lugar, las mismas provenientes de EF fueron identificadas a nivel molecular mediante PCR Múltiple y secuenciación del ADNr 16S confirmando su identificación fenotípica.

➤ Las propiedades tecnológicas evaluadas demostraron que:

- En general todas las cepas ensayadas fueron sensibles a tetraciclina, ciprofloxacina y cloranfenicol, pero no a amoxicilina. La cepa N8 fue la más susceptible a amoxicilina.

- No se detectó producción de AB por el método cualitativo empleado. Si se observó alcalinización del medio en presencia de arginina lo que se relacionaría con su catabolismo a través de sistema ADI. Esta propiedad les ofrecería una ventaja competitiva a las células para crecer en medios ácidos debido a la producción de amoníaco y energía adicional.

- La mayoría de las cepas presentaron elevados porcentajes de hidrofobicidad, excepto *L. plantarum* N8. Sin embargo, ninguna de las cepas ensayadas fue fuertemente productora de biofilm, resultando *L. plantarum* EFj18, EFj24 o EFf29 y EFj47, N8 o JNB25 moderada o débilmente productoras en las condiciones de ensayo.

- Todas las cepas ensayadas fueron capaces de inhibir moderadamente la formación de biofilm de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *E. faecalis*.

- Todas las cepas desarrollaron eficientemente en el medio químicamentemente definido para *L. plantarum*, LPMS, sin mostrar requerimientos en vitaminas, excepto *L. plantarum* JNB25, EFj24 y EFj47 que presentaron auxotrofia para pantotenato de calcio y niacina, siendo EFj24 la más exigentes. Contrariamente las cepas *L. plantarum* N8, EFj18 y EFf29 presentaron las menores exigencias en vitaminas (NE o y en menor grado S) lo que se relacionó con una adecuada capacidad biosintética.

➤ Las cepas *L. plantarum* N8, EFj18 y EFl29 mostraron mediante el ensayo de difusión en agar actividad antimicrobiana frente a *E. cloacae*, una bacteria patógena oportunista aislada t de EF durante esta Tesis Doctoral, este efecto fue más pronunciado para *L. plantarum* EFl29. Las cepas restantes: JNB25, EFj18 y EFj24 no manifestaron esta actividad.

➤ De acuerdo a los resultados obtenidos en términos de crecimiento, capacidad acidificante, propiedades tecnológicas y antimicrobianas se seleccionaron para ensayos "In situ" las cepas: *L. plantarum* N8, EFj18, EFl29, las cuales fueron incluidas en tres tipos de matrices vegetales derivadas de frutas: jugo, y frutas MP listas para consumo.

CAPÍTULO 3

BIOPRESERVACIÓN DE JUGO DE FRUTAS Y FRUTAS MÍNIMAMENTE PROCESADAS CON BAL SELECCIONADAS



3.1 INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, los productos frescos, incluidas las frutas, han surgido como un nuevo vehículo para la transmisión de enfermedades de origen alimentario asociadas a agentes etiológicos que en el pasado se atribuyeron a reservorios animales (Sivapalasingam y col., 2004; Denis y col., 2016). En este contexto, existen varios estudios dirigidos a determinar el potencial biopreservativo de BAL aisladas de frutas y verduras en todo el mundo (Tamang y col., 2009; Lee y col., 2011; Vitali y col., 2012). Originalmente, la fermentación se realizaba para conservar los alimentos, aunque actualmente el uso de cultivos iniciadores de BAL que lleven a cabo fermentaciones controladas resulta de interés (Lai y col., 2013). Sin embargo, existen pocos estudios al respecto en las matrices alimentarias, particularmente en VMP. En el complejo sistema de los VMP la síntesis de diferentes metabolitos estaría reguladas tanto por las interacciones complejas entre los microorganismos iniciadores y la microbioma contaminantes de los vegetales, así como por la interacción entre los microorganismos y los sustratos presentes en el medio (Sajur y col., 2007). De allí surge la importancia de evaluar y corroborar las propiedades de las BAL determinadas en los estudios *in vitro* (Capítulos 1 y 2) con estudios *in situ*. En ciencia, *in situ* designa el análisis de un fenómeno exactamente en el lugar y condiciones donde el mismo se desarrolla (sin modificación de las condiciones usuales o natural).

En base a lo mencionado, en este Capítulo se evaluaron la capacidad de crecimiento, acidificación y propiedades antimicrobianas de las cepas seleccionadas en tres matrices vegetales MP, listas para consumo. Al mismo tiempo se determinaron propiedades beneficiosas para la salud que le aportarían valor agregado al producto final biopreservado.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar fermentaciones en matrices alimentarias inoculadas con las cepas seleccionadas a 4 y 30 °C
- Evaluar los cambios microbiológicos, de pH y fisicoquímicos.
- Determinar propiedades beneficiosas para la salud del consumidor en jugo fermentado.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Microorganismos

Las cepas seleccionadas *L. plantarum* N8, EFj18 y EFf29. Los microorganismos se propagaron rutinariamente en medio de cultivo MRS, se conservaron y activaron de acuerdo a lo que se ha descrito en apartados 1.3.2 y 1.3.1 (Capítulo 1).

3.3.2 Medios de cultivos

- **MRS**, descrito en el apartado 1.2.1
- **YMPG** adicionado con cloranfenicol al 1% (v/v, YMPG-C) con la siguiente composición: en g/L: extracto de levadura, 3; extracto de maltosa, 3; peptona, 5. glucosa, 10. El pH se llevó a 6,5 y se agregó agar 15% (p/v). Este medio se usó para recuento de levaduras. El cloranfenicol inhibe el crecimiento de microorganismos procariotas.

- **Salmonella- Shigella Agar (SSA)**, descrito en el apartado 1.2.1
- **Mac Conkey agar**, descrito en el apartado 1.2.1

3.3.3 Ensayos en matrices alimentarias

Los ensayos se realizaron en tres matrices alimentarias a base de frutas: - frutillas y manzanas cortadas en trozos (MP, listas para consumo) y - jugo mixto de manzana y naranja recién exprimido.

3.3.3.1 Jugo mixto de frutas

3.3.3.1.1 Selección de frutas y preparación del jugo: Se seleccionaron 2 frutas para realizar el jugo mixto recién exprimido: manzana (*Pyrus malus L.*) y naranja (*Citrus X sinensis*); para ello, 2,5 kg de cada fruta de apariencia y características organolépticas agradables, libres de defectos visibles tales como golpes, picaduras, cortes o abrasiones se obtuvieron de un puesto de verdulería y se emplearon para la preparación del jugo mixto. Ambas frutas se eligieron porque tienen gran aceptación por parte del consumidor, en general, y por ser constituyentes comunes del jugo comercial multifruta (JMC) y de la ensalada de frutas usados durante este estudio.

CAPÍTULO 3

El análisis sensorial de la adición de diferentes proporciones de jugos de naranja y de manzana sobre el olor, sabor y aspecto de la mezcla resultante (jugo mixto) fue evaluado por un panel de 10 personas no entrenadas. Ellos clasificaron los jugos mixtos en base a 4 categorías de una escala hedónica: 1, agradable (A); 2, aceptable (AC); 3, no aceptable (NA) y 4, desagradable (D), calificando como agradable los jugos cuyas proporciones en la mezcla modificaron positivamente el olor, sabor y aspecto de ambos jugos de frutas en relación con los jugos individuales. Las muestras de los jugos obtenidas de cada fruta en forma individual fueron también puntuadas según las categorías mencionadas. Las muestras de jugos se consideraron dentro de una categoría cuando el 70% de los panelistas le asignó la puntuación correspondiente (Tabla 3.1).

Para la preparación del jugo fresco las frutas se lavaron con agua corriente, se pelaron y se lavaron nuevamente con agua destilada estéril. Posteriormente se cortaron en trozos pequeños y se procesaron con un extractor de jugo marca Phillips en condiciones de esterilidad. Luego, el jugo obtenido se clarificó por centrifugación a 8000 g durante 15 min a 4 °C para descartar restos de pulpa. **La proporción** de la mezcla del jugo mixto de manzana y de naranja elegida, según el análisis sensorial, como la más aceptable (agradable) consistió de **2:1** (v/v), respectivamente. El jugo mixto, una vez preparado, no fue sometido a ningún tratamiento de esterilización.

Tabla 3.1 Diferentes proporciones de jugos de naranja y manzana ensayadas para elaboración de jugo de frutas mixto.

Proporción de jugo de Naranja-Manzana		
Jugo mixto	Naranja (v)	Manzana (v)
A	1	1
B	1	2
C	2	1
D	1	0
E	0	1

V: volumen

3.3.3.1.2 Fermentación del jugo: El inóculo de cada BAL se preparó de acuerdo a lo descrito en el capítulo 2, apartado 2.3.3.1 El jugo mixto de manzana-naranja (JMN, 2:1), elegido en base al

CAPÍTULO 3

análisis sensorial se separó en fracciones de 30 ml y se colocaron en frascos de poliestireno estériles. Cada suspensión celular de las BAL se usó para inocular en forma individual y combinada las distintas fracciones de JMN al 2% (v/v) a fin de obtener una concentración celular inicial en el orden de 10^7 ufc/mL. La inoculación simultánea con las tres cepas seleccionadas (1:1:1) se realizó para evaluar un posible efecto sinérgico antimicrobiano entre ellas. Por otra parte y, en forma comparativa se usó CaCl_2 a una concentración final de 1,5% (p/v). Los tratamientos con calcio se utilizan para extender la vida útil de frutas y hortalizas ya que ayuda a mantener la integridad celular de la pared vegetal mediante la interacción con la pectina para formar pectato de calcio. Por lo tanto las frutas y hortalizas tratadas con calcio, en general, se mantienen más firmes que sus contrapartes (Rico y col., 2007). También se ha reportado su efecto antimicrobiano, siendo utilizado normalmente en la industria de los alimentos en concentraciones comprendidas entre 0,5 y 2,0% dependiendo de una serie de factores (solubilidad, sabor, interacción con el alimento) (Ayala-Zavala y Gónzales Aguilar, 2011). En este contexto, la concentración de 1,5% de CaCl_2 fue elegida en este estudio en forma arbitraria para su aplicación. Como control negativo se ensayó JMN sin inocular. Los experimentos se realizaron por duplicado a 4 y 30 °C durante 14 días; se evaluaron 2 lotes de cada tratamiento mencionado (Figura 3.1). Durante ese período, se tomaron muestras a distintos tiempos para análisis microbiológicos, determinaciones analíticas y de propiedades antioxidantes.

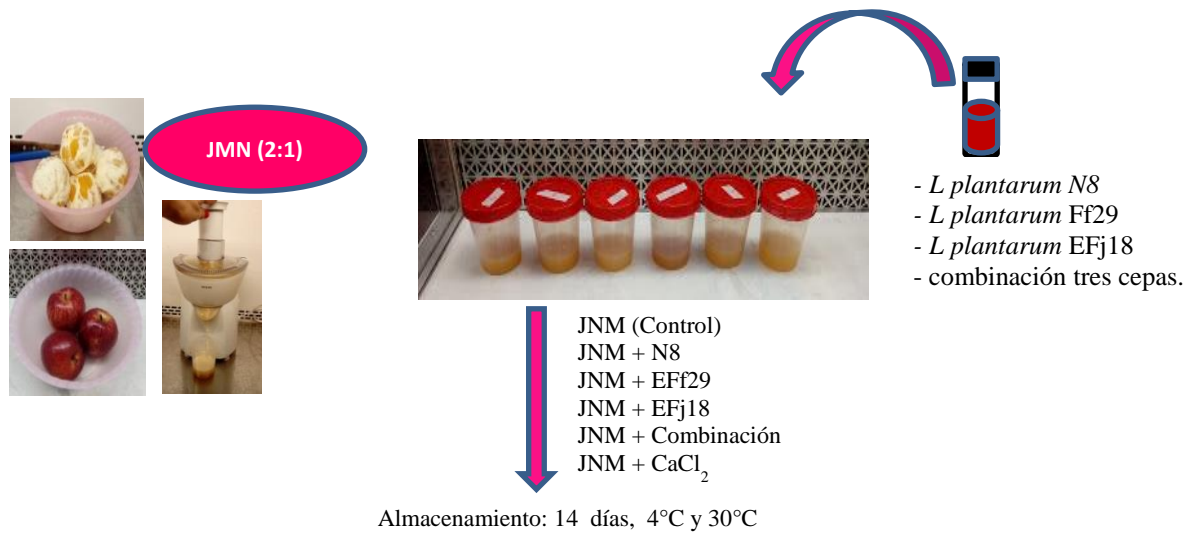


Figura 3.1 Esquema del proceso de obtención y fermentación del jugo mixto de naranja-manzana

3.3.3.1.3 Determinaciones analíticas

3.3.3.1.3.1 Azúcares ácidos orgánicos y pH.

Azúcares, ácidos orgánicos y etanol se cuantificaron en las muestras de JMN de pruebas y control por HPLC de acuerdo a lo descrito en el punto 2.3.4.2 del capítulo 2 a tiempos 0, 2 y 7 días de almacenamiento a 4 y 30 °C. El pH se determinó mediante método potenciométrico usando pHchímetro Hanna Instruments.

3.3.3.1.3.2 Determinación de compuestos fenólicos

Con la finalidad de determinar si las fermentaciones microbianas produjeron cambios significativos en el contenido de compuestos fenólicos (CPT), los mismos fueron determinados utilizando el método de Folin de acuerdo al protocolo descrito por Singleton y Rossi (1965) con modificaciones puestas a punto en el laboratorio. La mezcla de reacción, compuesta por 100 µl de SLC de jugo fermentado, 100 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu se agitó y se incubó durante 2 min a temperatura ambiente; posteriormente, se añadieron 800 µl de una solución saturada de Na₂CO₃ al 5 % (p/v) y las muestras se incubaron a 40 °C durante 20 min. Se tomaron 200 µl de la mezcla de reacción y se colocaron en una microplaca y se midió la absorbancia (A) a 740 nm en un lector de

CAPÍTULO 3

microplaca modelo Versamax. El contenido de fenoles totales se estimó por comparación con los valores de A obtenidos con diferentes concentraciones de ácido gálico y mediante la ecuación de regresión de la curva (Ecuación 1). Las determinaciones se realizaron a 0, 2 y 7 días en SLC de los jugos fermentados incubados a 4 y 30 °C. Los resultados se expresaron en mg/L de equivalente de ácido gálico (GAE). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

$$y = 0,0084 x + 0,1929; \quad r^2 = 0,9842$$

Ecuación 1

3.3.3.1.3.3 Evaluación de actividad antioxidante

3.3.3.1.3.3.1 Actividad reductora del hierro férrico/poder antioxidante FRAP:

Este método se basa en la capacidad de la muestra para reducir un complejo formado por ion férrico con la molécula tripiridil-s-triazina (TPTZ) a su forma ferrosa. La capacidad para reducir el hierro se considera un índice del poder antioxidante de la muestra. La mezcla de reacción compuesta por 6,67 µL de muestra de SLC de jugo fermentado y 200 µL del reactivo FRAP se incubó durante 4 minutos a temperatura ambiente y se midió (A) a 593 nm. El control positivo se realizó con ácido ascórbico y el blanco con H₂O destilada. El reactivo de FRAP se preparó mezclando 50 mL de buffer acetato con 5 mL de TPTZ y 5 ml de FeCl₃. Antes de usar, se incubó a 37 °C en baño de agua. La actividad antioxidante se estimó por comparación con los valores de una curva patrón y se determinó mediante la ecuación de regresión de la curva (Ecuación 2).

$$Y = 0,0007X - 0,0064 \quad R^2 = 0,9963$$

Ecuación 2

3.3.3.1.3.3.2 Captura del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH):

Este método se basa en la reducción del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) por los antioxidantes de la muestra (Brand-Williams y col., 1995). La decoloración del radical se determina espectrofotométricamente a 515 nm y la cuantificación se realiza empleando una solución patrón de ácido ascórbico luego de 15 min, de manera que la mayoría de sustancias

completan la reacción con el DPPH (Schlesier y col., 2002). La mezcla de reacción estuvo compuesta por 5 µl de JNM y 200 µl de DPPH. Como control se empleó ácido ascórbico y agua destilada como blanco de reacción. Las determinaciones se realizaron por triplicado. El porcentaje de depuración del radical DPPH en las muestras se calculó de acuerdo a la fórmula propuesta por Yen y Duht (1994):

$$\% \text{ Depuración del radical DPPH} = [(A \text{ control } t_0 - A \text{ muestra } t_{15}) / A \text{ control } t_0] * 100$$

Donde,

A control t0 = Absorbancia del control (DPPH) a tiempo inicial.

A muestra t15= Absorbancia de la muestra después de 15 min.

3.3.3.1.3.4 Determinación de vitamina C

El contenido de vitamina C se determinó siguiendo el método de AOAC para ácido ascórbico en preparaciones vitamínicas y jugos. Para ello, 200 µL de cada muestra se añadió a un frasco Erlenmeyer de 50 mL y se mezcló con 1,8 mL de agua destilada y 5 mL de una solución de ácido acético-ácido metafosfórico. La mezcla (7 mL) se tituló con solución estándar de 2,6-diclorofenolindofenol, posteriormente el volumen de titulación se recogió y se usó para cuantificar el contenido de vitamina C [mg de equivalente de ácido ascórbico (AAE)/L de muestra]. La solución de indofenol se estandarizó por titulación con solución estándar de ácido ascórbico (1 mg/mL). Para ello se usó 2 mL de solución estándar de ácido ascórbico con 5 mL de solución de ácido acético-ácido metafosfórico, además de las muestras blanco. Los cálculos se realizaron mediante la siguiente ecuación:

$$\text{mg de ácido ascórbico por 100 ml de muestra} = \frac{v.T.100}{V}$$

Ecuación 3

Donde, v= ml de 2,6 diclorofenolindofenol utilizados para titular un volumen de muestra

T= Equivalente en ácido ascórbico de la solución de 2,6 diclorofenolindofenol expresado en mg por ml del colorante.

V= Volumen de la muestra analizada

T= x mg de ácido ascórbico por Y ml de solución de 2,6 diclorofenolindofenol

T=X/Y

3.3.3.1.4 Análisis sensorial cualitativo

El análisis sensorial de jugos tratados bajo diferentes condiciones se realizó utilizando el modelo descriptivo de Demiyr y col. (2006), con algunas modificaciones. Se evaluaron atributos sensoriales de sabor, aroma, color y aspecto mediante el uso de una escala hedónica de 0 a 5 puntos con un panel no entrenado compuesto por 10 jueces. Los resultados se clasificaron como agradable (puntos totales: 14-20), aceptable (puntos totales: 11-13,9), poco aceptable (puntos totales: 8-10,9) y no aceptable (puntos totales: 0-7,9) (Di Cagno y col., 2008).

3.3.3.2 Manzanas y frutillas cortadas en trozos

3.3.3.2.1 Selección y procesamiento de frutas cortadas en trozos: Los beneficios para la salud asociados con el consumo de frutas y hortalizas frescas, en combinación con el continuo interés del consumidor por disponer de una variedad de alimentos listos para el consumo, han contribuido a aumentar considerablemente la popularidad de las frutas y hortalizas precortadas. En este estudio seleccionamos dos tipos de frutas de gran interés por sus cualidades nutritivas y amplia aceptación por parte del consumidor como manzana (*Pyrus malus L.*) y frutilla (*Fragaria x ananassa*). En éste último caso, se destaca que las frutillas son un cultivo relevante en la provincia de Tucumán, como se mencionó en la Introducción de este trabajo de Tesis. En este contexto trabajamos con las frutas frescas listas para el consumo peladas y/o cortadas con respecto a su forma original, pero que se mantuvieron en estado fresco, a fin de determinar el potencial de las BAL seleccionadas como agentes de biopreservación natural durante su almacenamiento. La aplicación de la biopreservación es independiente de dónde se realicen las operaciones (por ejemplo, en el campo, en la explotación agrícola, en los locales del minorista, en los del mayorista, en el establecimiento de elaboración, etc.) **Procesamiento de las frutas:** Las frutas se obtuvieron (1 kg) en un puesto de verdulería, se escogieron aquellas con características organolépticas agradables y libres de defectos visibles tales como golpes, picaduras, cortes o abrasiones. Se lavaron con agua corriente, en el caso de la manzana se pelaron y luego ambas frutas se lavaron con agua destilada estéril. Posteriormente, se cortaron en trozos de 1 cm³ y de aproximadamente 1,0 g en condiciones asépticas.

CAPÍTULO 3

3.3.3.2.2 Inoculación de las frutas cortadas en trozos y condiciones de ensayo: Las cepas de las BAL en estudio provenientes de un cultivo activo en medio MRS, pH 6,5 se inocularon (3%, v/v) en 225 ml del mismo medio para obtener una concentración celular final de 10^7 ufc/mL e incubaron a 30 °C durante 12 h (final de fase exponencial). Al mismo tiempo se preparó 225 mL de una solución acuosa de CaCl_2 al 1,5% (p/v). 25 g de cada fruta (frutilla o manzana) cortadas en trozos se inocularon por inmersión con las cepas en estudios o el agente químico. Para ello, las frutas cortadas fueron completamente sumergidas en los cultivos bacterianos de 12 h de incubación en medio MRS de densidad celular promedio de $9,30 \pm 0,35$ U log o en la solución del preservante químico durante 30 y 60 min en un Shaker a 150 rpm a temperatura ambiente para inocular las frutillas y manzanas cortadas, respectivamente. Luego, se descartó el exceso del cultivo bacteriano o solución acuosa del agente químico usando papel de filtro estéril, se dejó escurrir durante 30 min y las frutas cortadas se colocaron en pequeños recipientes estériles. Se utilizaron como controles negativos, 25 g de cada fruta cortada en trozos sin inocular e inoculadas en medio líquido MRS estéril. Se evaluaron 2 lotes de cada fruta con sus respectivos tratamientos. Las frutas cortadas en trozos tratadas y los controles negativos se incubaron a 4 y 30 °C durante 21 días. Antes de inocular, se separaron 3 g de cada muestra para cuantificar los niveles microbianos de las mismas (Figura 3.2). Durante el período de almacenamiento se tomaron muestras a distintos tiempos (2, 7, 14 y 21 días) para análisis microbiológicos y microscopía electrónica. En las muestras de frutillas se evaluó también firmeza y ° Brix según se detalla posteriormente.

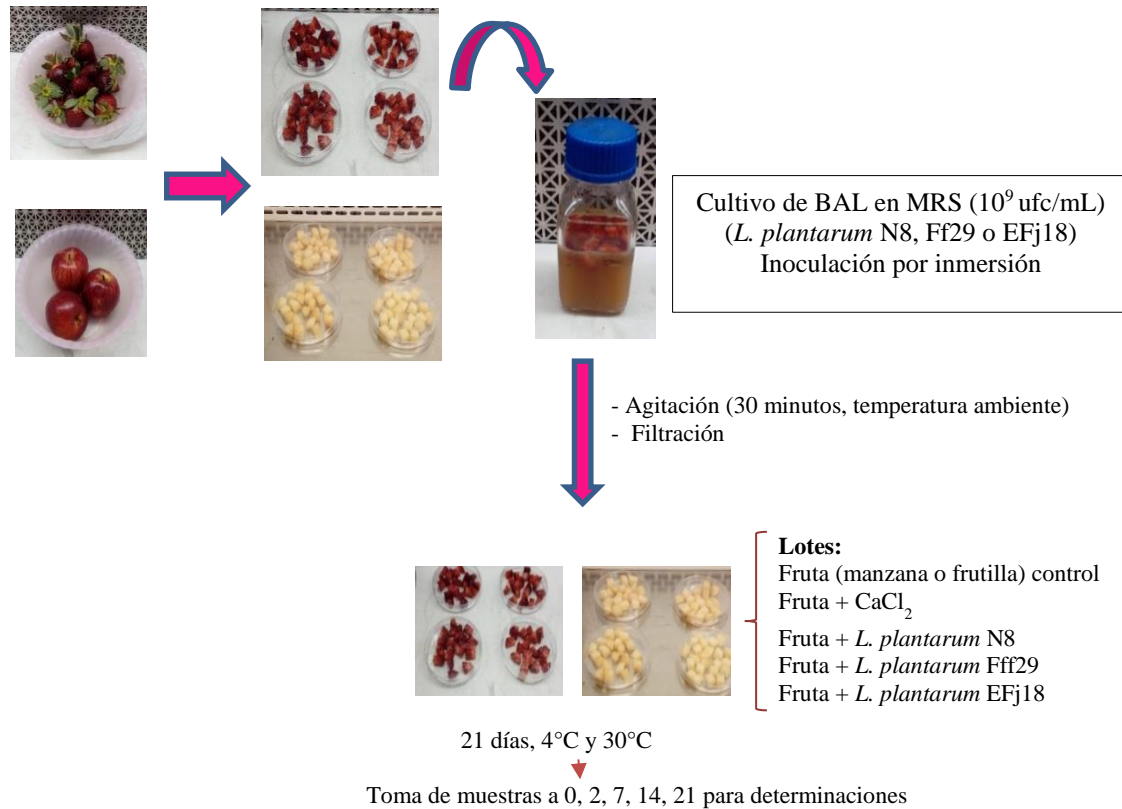


Figura 3.2 Diagrama del proceso de obtención y fermentación de frutilla y manzana trozadas a 4 y 30 °C

3.3.3.2.3 Determinación de firmeza y ° Brix en frutillas

En el mercado de la frutilla, a diferencia de la manzana, Tucumán participa principalmente en la producción de fruta fresca; por otra parte, también produce fruta para la industria de productos congelados destinados a la exportación y al mercado interno. Esta situación genera la necesidad de determinar, además del rendimiento, los parámetros de calidad exigidos por cada destino comercial. La calidad de fruta se define por los siguientes parámetros: forma y tamaño de la fruta, colores interno y externo, oquedad, cualidades organolépticas, ° Brix, firmeza, porcentaje de fruta comercializable y porcentaje de fruta de descarte (Medina y col., 2011). En este estudio, en las muestras de frutillas trozadas e incubadas a 4 °C, donde los efectos de conservación por parte de las BAL seleccionadas fueron notables, se determinó firmeza y grados ° Brix a T 0, 7, 14 y 21 días.

Firmeza: se determinó por medio de tres pinchazos ecuatoriales por fruto, utilizando un

penetrómetro con escala de hasta 500 g con un punzón de 1,5 mm. **Grados Brix**: se determinó con brixómetro digital.

3.3.3.2.4 Microscopía electrónica de frutas cortadas fermentadas

Muestras de frutas cortadas en trozos bajo diferentes condiciones de tratamiento y las muestras control se colocaron en fijador Karnovsky [mezcla de glutaraldehído 1,7 % (v/v) y paraformaldehído 2,7 % (v/v) en Buffer fosfato pH 7,2] durante 24 h. Se deshidrataron con un gradiente de soluciones alcohólicas de distinta graduación. Se comenzó con alcohol 30° seguidamente con alcohol 50°, 70°, 90° hasta alcohol absoluto (100°) en pasajes de 10 min. Posteriormente, se realizaron dos pasajes de 10 min en acetona 100%. Se realizó el punto crítico de secado en equipo Marca Denton Vacuum modelo DCP-1. Se pasó al montaje de las muestras sobre soportes de aluminio adherida con cinta conductora doble faz de carbón, que fueron posteriormente recubiertas con oro en un Ion Sputter Marca JEOL modelo JFC-1100. Por último, se observaron con un microscopio electrónico de barrido (SEM) (Marca Zeiss modelo SUPRA 55VP) en el Centro Integral de Microscopía Electrónica (CIME, UNT-CONICET).

3.3.4 Análisis microbiológico de las matrices alimentarias: Determinación de la carga microbiana

Se determinó la carga microbiana de las matrices alimentarias en estudio por el método de diluciones sucesivas descrito en el apartado 1.3.4 empleando los medios MRS agar; YPG-C agar; SSA y Mc Conkey agar. Las placas de MRS e YPG-C se incubaron a 30 °C durante 72 h, mientras que las restantes a 37 °C durante 48 h. Luego, se realizaron los recuentos en aquellas placas que contuvieron entre 30 y 300 colonias. Para realizar las diluciones sucesivas las matrices alimenticias se procesaron de las siguientes maneras:

- JMN: alícuotas de 1 ml de las diferentes muestras (de pruebas y control) provenientes de distintos tiempos se homogeneizaron con 9 ml de solución fisiológica estéril para obtener dilución 1/10. Luego, se realizaron diluciones decimales sucesivas y se plaquearon 100 µl de distintas diluciones en los medios mencionados.

- Frutas cortadas MP: 3 g de cada fruta proveniente de cada tratamiento y los correspondientes controles se mezclaron en 27 ml de solución fisiológica estéril obteniendo una dilución 1/10, se homogeneizaron en un agitador a 150 rpm a temperatura ambiente durante 15 min, posteriormente se determinaron los recuentos microbianos según se indicó anteriormente para JMN.

La identidad de las cepas de *L. plantarum* inoculadas en las matrices, se confirmó por técnicas de microscopia (coloración de Gram) y en colonias representativas se aplicó la técnica de PCR específica múltiple con la siguiente modificación empleando directamente las colonias como molde (Savino y col., 2012).

3.3.5 Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos a partir de dos o más experiencias independientes se sometieron a análisis estadístico empleando el programa Infostat. Se utilizó el test de Tukey para para realizar comparaciones múltiples de las medias ($p < 0,05$)

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Selección de cepas para ser incluidas en matrices alimentarias

Para realizar la fermentación de las matrices alimentarias a base de frutas, se seleccionaron 3 cepas (*L. plantarum* N8 aislada de superficie de naranja, *L. plantarum* EFj18 y EFl29 aisladas de EF en el presente trabajo de Tesis Doctoral). Las mismas mostraron óptimas propiedades antimicrobianas contra *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *E. faecalis* de acuerdo a lo detallado en el capítulo 1. Además, presentaron capacidad para crecer e inactivar *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* en JMC; mayores μ_{max} , y poder acidificante, buenas propiedades tecnológicas incluidas potenciales propiedades probióticas, bajos requerimientos en vitaminas, actividad antimicrobiana frente a un aislado de EF de elaboración local, todas ellas analizadas en el Capítulo 2.

3.4.2 Jugo Manzana- Naranja fermentado

3.4.2.1 Elección de las proporciones para obtención de jugo de frutas

Para elaborar un jugo fresco con una mezcla de dos frutas se eligió la proporción de manzana: naranja (2:1), esta combinación fue la más aceptable en base a 10 personas no entrenadas teniendo en cuenta los siguientes atributos: olor, aspecto y sabor, asignándole los máximos valores de aceptación al paladar (Tabla 3.2). La combinación se eligió por presentar, en general, sabor más dulce y acidez menos pronunciada en comparación con las otras combinaciones. Ruiz Rodríguez y col. (2017), en un ensayo similar realizaron diferentes combinaciones de jugos individuales provenientes de dos frutas para obtener un jugo mixto agradable al paladar. Esto último resulta novedoso, ya que en el mercado existe una tendencia a elaborar jugos combinando diferentes frutas, lo cual despierta el interés de los consumidores como productos alternativos a los jugos convencionales elaborados con una sola fruta.

Tabla 3.2 Combinaciones con diferentes proporciones de jugos de naranja y manzana

Atributos sensoriales evaluados			
Proporción de jugo de naranja y de manzana (v:v)	Olor	Sabor	Aspecto
1:1	NA	AC	NA
1:2	A	A	A
2:1	NA	AC	NA
1:0	A	A	A
0:1	AC	A	A

Escala: 1, agradable (A); 2, aceptable (AC); 3, no aceptable (NA); 4, desagradable (D). El resultado corresponde a un valor promedio de los puntajes individuales otorgado por cada panelista.

3.4.2.2 Recuentos microbianos y variación de pH en JMN control e inoculado

En Jugo fresco las BAL se inocularon en forma individual y combinada (las tres simultáneamente en la misma proporción). En la Tabla 3.3 se muestran los recuentos obtenidos en distintos medios de cultivos de JNM control (sin inocular), inoculado bajo diferentes condiciones y en presencia de Ca₂CL.

En JMN control, incubado a 30 °C las BAL y levaduras autóctonas, determinadas en medios MRS y YMPG-C, fueron detectadas en el orden de 5 y 6 U log en 2 días de incubación (a tiempo cero no fueron detectadas). A este tiempo, en medio Mac Conkey y SSA la carga inicial del orden de 3 U log y por debajo del límite de detección incrementó alrededor de 1 U log y 6 U log, respectivamente. De este modo se manifestó un significativo incremento de la población láctica, levaduriforme y de potenciales bacterias patógenas en JMN durante las primeras 48 h de incubación. Transcurrido este tiempo, la población bacteriana y levaduriforme autóctona se mantuvo viable, observándose una ligera disminución en los recuentos (no mayor a 1 log) recién a 14 días de almacenamiento. Así el JMN control fue capaz de soportar el crecimiento y la sobrevivencia de BAL, levaduras y bacterias potencialmente patógenos durante el período de tiempo ensayado (14 días). Cabe destacar que el marcado incremento y sobrevivencia determinado en medio SSA, sería debido a otra subespecie bacteriana diferente a *S. Typhimurium*, ya que ésta no fue capaz de crecer en JMC, sin neutralizar (apartado 2.3.3, capítulo 2).

En el JMN inoculado, la población láctica inicial en el orden de 10⁷ ufc/mL determinada en medio MRS, incrementó alrededor de 1,5 U log, y estuvo constituida por las cepas inoculadas, indicando que su crecimiento y metabolismo inhibió el desarrollo de la microbiota láctica autóctona a dos días de incubación. En este tiempo, los recuentos determinados en medios YPG-C, y SSA también disminuyeron significativamente con respecto al control. A los 7 días de incubación, las bacterias inoculadas, determinadas en medio MRS permanecieron casi constantes (N8) o disminuyeron ligeramente. Por el contrario, los recuentos en medio YPG-C disminuyeron 3,2 U log (N8 o EFf29) y 2,52 (EFj18) U log con respecto al

CAPÍTULO 3

control o no fueron detectados (inóculo combinado), mientras que, en medios SSA y Mac Conkey se produjo una completa inactivación (para todas las condiciones inoculadas con BAL). A los 14 días de incubación, en medio YPG-C también se observó completa inactivación de la población levaduriforme autóctona, excepto para EFj18. Así, las BAL inoculadas ejercieron un significativo efecto inhibitorio, inactivando completamente la microbiota autóctona detectada en los medios YPG-C, SSA y Mac Conkey en 7 días o 14 dependiendo principalmente del tipo de microbiota, mientras que ellas permanecieron viables. Por lo que la microbiota levaduriforme detectada en medio YPG-C fue la más resistente a la acción antagónica de las cepas inoculadas aun cuando se produjo su completa inactivación. Cabe destacar que la inoculación combinada de las cepas mostró, en general resultados similares a los determinados con N8 y EFl29, excepto en medio YPG-C donde la inactivación de la población levaduriforme ocurrió más rápidamente (a los 7 días en lugar de 14).

A diferencia de lo observado con las BAL, el CaCl_2 , en general no afectó negativamente a la población autóctona, excepto en medio Mac Conkey, comportándose en forma similar al control (Tabla 3.3).

En medios inoculados, el pH disminuyó rápidamente en los primeros dos días de incubación, lo que se relacionó con el crecimiento de las cepas inoculadas en las diferentes condiciones, confirmando sus capacidades acidificante demostrada en capítulo 2, contrariamente en medio control o tratado con CaCl_2 el pH inicial permaneció casi sin cambiar, aun cuando se detectó crecimiento en medio MRS (Tabla 3.5). Este hecho se relacionó con la inhibición de la microbiota láctica autóctona, posiblemente constituida por otras especies dominantes probablemente con metabolismo heterofermentativo obligado, menor poder acidificante y baja resistencia a acidez. De este modo, las cepas N8, EFj18 y EFl29 inoculadas individualmente o en forma combinada, produjeron completa inactivación de la microbiota autóctona desde el inicio hasta 7 o 14 días de incubación a 30 °C, resultando las levaduras las más resistentes, excepto para el inóculo combinado. La actividad inhibitoria fue acompañada por la acidificación del medio y se diferenció del agente químico que mostró un comportamiento similar al control.

CAPÍTULO 3

En JMN control incubado a 4 °C (Tabla 3.4), se observaron incrementos en los recuentos microbianos determinados en medios MRS, YPG-C, SSA y Mac Conkey de 3,5; 5,0; 5,3 y 1,5 U log U a 2 días de incubación respectivamente. A 7 días, los recuentos en medios YPG-C y SSA permanecieron constantes, en medio MRS incrementaron alrededor de una unidad log y en Mac Conkey disminuyeron ligeramente. A 14 días, no se detectaron células viables en la población levaduriforme, en MRS no se observaron variaciones significativas, mientras que en medios SSA y Mac Conkey disminuyeron alrededor de un log, manteniendo un orden elevado de 10^4 ufc/mL en SSA. En los jugos inoculados, las BAL no crecieron (MRS se detectó el valor del recuento inicial en dos días), a diferencia de lo observado en jugo sin inocular; sin embargo, se mantuvieron viables durante todo el período de incubación ensayado. En esta condición, a 2 días se observó, en medio YGG-C, una disminución en los recuentos con respecto al control en presencia de *L. plantarum* EFl29 y el inóculo combinado (reducción de 3 U log), mientras que en medios SSA y Mac conkey el efecto inhibitorio fue observado en presencia de todas las cepas inoculadas con reducciones entre 1 y 2 U log. A 7 días la cepa de *L. plantarum* N8 y el inóculo combinado fueron capaces de inactivar completamente el crecimiento microbiano de bacterias potencialmente patógenas y levaduras, sin detectarse células viables en medios en medio SSA e YPG-C respectivamente. Sin embargo la cepa EFl29 también presentó un marcado efecto inhibitorio sobre la población levaduriforme, reduciéndola alrededor de 3 U log. A 14 días no se detectaron células viables en los medios SSA y Mac Conkey independientemente de la cepa inoculada y condición a diferencia de lo observado en el jugo control. Nuevamente las cepas N8 y EFl29 mostraron, en general los mejores efectos inhibitorios, aun cuando la efectividad de EFl18 también fue destacable. En esta condición, similarmente a lo observado en jugo almacenado a 30 °C la inhibición comenzó a los 2 días de incubación, mostrando la combinación de cepas resultados similares, en general, a los inóculos individuales, especialmente a la cepa N8, que fue la más efectiva.

Como ocurrió a 30 °C y, a diferencia de lo observado en presencia de BAL inoculadas, el CaCl₂, en general no afectó el crecimiento de la microbiota autóctona en medios

YPG-C y SSA, aunque el comportamiento en medio Mac Conkey fue similar al obtenido en presencia de BAL (Tabla 3.4). En esta condición, las variaciones del pH fueron significativamente menores que las detectadas a la mayor temperatura de incubación, aún en presencia de las cepas inoculadas lo que se correlacionó con la ausencia de crecimiento. Solamente se produjo una ligera acidificación del medio a 7 días de incubación, la cual fue similar al jugo control. En presencia de Ca_2Cl se observó la mayor disminución de pH (de 4,5 a 4,1) (Tabla 3.6). Este resultado es de gran importancia por varias razones: - (i), las tres cepas inoculadas aun cuando no crecieron fueron capaces de mantenerse viables en elevada concentración hasta el final del almacenamiento, sin afectar a las cualidades organolépticas (aspecto, pH, color), (ii) la elevada sobrevivencia de las cepas inoculadas favorecería su adecuado uso como vehículo de probióticos, en ese sentido algunas propiedades, además de la actividad antimicrobiana, se demostraron en el capítulo dos, (iii) las cepas inoculadas especialmente N8 y EFf29, aun cuando no crecieron ni acidificaron significativamente el jugo demostraron una eficiente actividad antagonista relativa al control, especialmente sobre bacterias potencialmente patógenas, logrando su completa inactivación, además de acelerar la de levaduras. Por lo tanto, queda claramente demostrado su importancia en el control de la microbiota de jugos refrigerados, (iv) la inoculación individual fue suficiente para inactivar la población bacteriana contaminante así como acelerar la inactivación de levaduras, aunque en este último caso la mezcla fue más efectiva.

Similares resultados fueron demostrados por Perez y Saguir (2012) en relación con la capacidad de *L. plantarum* N4 para sobrevivir en jugo de naranja almacenado a temperatura de refrigeración durante 4 semanas, sin alterar sus propiedades organolépticas. Más aun, estos autores proponen que el jugo de naranja podría ser usado para transportar BAL probióticas. Sin embargo, dichos autores no demostraron la actividad antimicrobiana de la cepa N4 en el medio natural. Por otro lado, Sajur y col. (2007), en coincidencia con nuestros resultados demostraron que la cepa *Ln. mesenteroides* ssp *mesenteroides* Tsc inoculada en puré de tomate almacenado a 30 °C inhibió completamente el crecimiento de la microbiota bacteriana, incluida la láctica, y un

CAPÍTULO 3

retardo en el de las levaduras, aunque en este último caso no se produjo su inactivación a diferencia de lo observado en nuestro estudio. Además, dichos autores no investigaron el comportamiento de la cepa Tsc a baja temperatura.

CAPÍTULO 3

Tabla 3.3 Recuentos microbianos en JMN control e inoculado con las cepas *L. plantarum* N8, EFj18, EFf29 incubado a 30 °C durante 14 días.

Recuento microbiano (log ufc/mL) en los siguientes medios durante diferentes tiempos (días)																
Lote	MRS				YPG-C				SSA				MC			
	0	2	7	14	0	2	7	14	0	2	7	14	0	2	7	14
Control	ND	5,83 ^A	6,00 ^A	5,80 ^A	ND	6,11 ^A	6,57 ^A	6,50 ^A	ND	6,18 ^A	5,04 ^{A,B}	4,50 ^A	3,30 ^A	4,93 ^A	5,59 ^A	4,10 ^A
<i>L. plantarum</i> N8	7,24 ^A	8,14 ^B	8,00 ^B	6,50 ^B	ND	5,67 ^B	3,30 ^B	ND	ND	4,65 ^B	ND	ND	3,35 ^{A,B}	4,00 ^B	ND	ND
<i>L. plantarum</i> EFj18	7,33 ^A	8,72 ^C	7,00 ^C	5,90 ^A	ND	4,23 ^C	4,07 ^C	2,70 ^B	ND	4,91 ^{B,D}	ND	ND	3,43 ^{A,B,C}	4,95 ^A	ND	ND
<i>L. plantarum</i> EFf29	7,36 ^A	8,82 ^C	8,00 ^B	6,90 ^C	ND	5,47 ^B	3,33 ^B	ND	ND	3,66 ^C	ND	ND	3,60 ^{B,C}	3,68 ^C	ND	ND
Combinación	7,19 ^A	8,73 ^C	7,39 ^D	6,00 ^A	ND	5,22 ^{B,D}	ND	ND	ND	3,39 ^C	D	ND	3,51 ^{A,B,C}	3,41 ^D	ND	ND
CaCl ₂	ND	7,50 ^D	6,84 ^C	6,15 ^{A,B}	ND	5,17 ^D	6,76 ^A	5,80 ^C	ND	5,07 ^{B,D}	5,62 ^B	4,80 ^A	3,37 ^{A,B}	5,03 ^A	ND	ND

ND: No detectado

Los valores corresponden a las medias de tres experimentos. Valores con diferentes letras como superíndice dentro de cada columna son significativamente diferentes de acuerdo al test Tukey (p<0,05)

Tabla 3.4 Recuento microbiano en JNM control e inoculado con las cepas de *L. plantarum* N8, EFj18 y EFf29 incubado a 4 °C durante 14 días

Recuento microbiano (log ufc/mL) en los siguientes medios a diferentes tiempo (días)																
Lote	MRS				YPG-C				SSA				MC			
	0	2	7	14	0	2	7	14	0	2	7	14	0	2	7	14
Control	ND	3,5 ^A	4,77 ^A	4,50 ^A	ND	5,0 ^A	4,89 ^A	ND	ND	5,25 ^A	4,85 ^A	3,8 ^A	3,28 ^A	3,40 ^A	2,93 ^A	1,40 ^A
<i>L. plantarum</i> N8	7,42 ^A	6,71 ^B	7,06 ^B	6,80 ^B	ND	4,10 ^B	3,50 ^B	ND	ND	2,36 ^B	ND	ND	3,33 ^{A,B}	2,04 ^B	1,60 ^B	ND
<i>L. plantarum</i> EFj18	7,38 ^A	7,1 ^C	7,3 ^C	6,90 ^B	ND	5,10 ^A	4,69 ^C	ND	ND	2,00 ^C	2,14 ^B	ND	3,65 ^C	2,90 ^C	2,00 ^C	ND
<i>L. plantarum</i> EFf29	7,45 ^A	7,13 ^C	6,98 ^D	6,40 ^C	ND	2,50 ^C	2,00 ^D	ND	ND	2,99 ^D	3,10 ^C	ND	3,58 ^C	3,01 ^C	2,32 ^D	ND
Combinación	7,29 ^{A,B}	7,30 ^C	7,03 ^B	6,90 ^B	ND	2,00 ^D	ND	ND	ND	2,04 ^C	2,17 ^{B,C}	ND	3,48 ^{B,C}	3,6 ^D	1,3 ^E	ND
CaCl ₂	ND	ND	ND	ND	ND	4,20 ^B	3,79 ^E	3,5 ^D	ND	1,78 ^E	2,30 ^C	1,18 ^B	3,38 ^{A,B}	2,5 ^E	1,25 ^E	ND

ND: No detectado

Los valores corresponden a los promedios de tres experimentos

Valores con diferentes letras como superíndice dentro de cada columna son significativamente diferentes de acuerdo al test Tukey (p<0,05)

Tabla 3.5 Variación de pH en JNM inoculado con cepas de *L. plantarum* incubados a 30 °C durante 14 días

Cepa	pH			
	0	2	7	14
Control	4,55 ± 0,24	4,23 ± 0,22	4,23 ± 0,33	4,00 ± 0,33
<i>L. plantarum</i> N8	4,54 ± 0,23	3,77 ± 0,20	3,62 ± 0,25	3,60 ± 0,15
<i>L. plantarum</i> EFj18	4,51 ± 0,33	3,44 ± 0,33	3,47 ± 0,25	3,44 ± 0,24
<i>L. plantarum</i> EFF29	4,53 ± 0,23	3,65 ± 0,22	3,67 ± 0,33	3,59 ± 0,33
Combinación	4,52 ± 0,19	3,60 ± 0,35	3,62 ± 0,21	3,58 ± 0,22
CaCl ₂	4,54 ± 0,33	3,80 ± 0,21	3,71 ± 0,24	3,56 ± 0,13

Los valores corresponden a los promedios de tres experimentos.

Tabla 3.6 Variación de pH en JNM inoculado con cepas de *L. plantarum* incubados a 4 °C durante 14 días

Cepa	pH			
	0	2	7	14
Control	4,55 ± 0,36	4,46 ± 0,32	4,31 ± 0,13	4,30 ± 0,22
<i>L. plantarum</i> N8	4,53 ± 0,27	4,49 ± 0,22	4,42 ± 0,25	4,43 ± 0,23
<i>L. plantarum</i> EFj18	4,52 ± 0,16	4,49 ± 0,13	4,41 ± 0,34	4,40 ± 0,24
<i>L. plantarum</i> EFF29	4,56 ± 0,17	4,55 ± 0,14	4,40 ± 0,35	4,42 ± 0,15
Combinación	4,54 ± 0,26	4,52 ± 0,24	4,34 ± 0,34	4,36 ± 0,24
CaCl ₂	4,55 ± 0,25	4,36 ± 0,13	4,18 ± 0,22	4,12 ± 0,25

Los valores corresponden a los promedios de tres experimentos.

3.4.2.3 Metabolismo de Azúcares y ácidos orgánicos en JMN fermentado a 30 °C

Se investigó los cambios químicos que tuvieron lugar durante la fermentación de JMN incubado a 4 y 30 °C (Tabla 3.7).

A 30 °C la utilización de azúcares (glucosa y fructosa) y ácidos orgánicos comenzó inmediatamente se inició el crecimiento microbiano, detectándose los mayores consumos de glucosa a 2 días de incubación correspondientes a 7,15; 8,43 y entre 12,87 y 14,47% o 3,02; 4,31 y entre 6,70 y 19,53% de la concentración inicial de glucosa o fructosa en JMN sin inocular (control),

JMN tratado con CaCl_2 e inoculados con las cepas seleccionadas. Con respecto al ácido málico, se detectó un contenido inicial de 10,44 mmol/L, el cual fue prácticamente consumido a los 2 días en los JMN inoculados, mientras que en JMN control y tratado con CaCl_2 sólo se consumió un 13,60 y 12,93% de su valor inicial respectivamente, sin observarse diferencias significativas a los 7 días de almacenamiento. De igual manera, el ácido cítrico fue totalmente consumido a 2 días en JMN inoculados pero no en el control o tratado con CaCl_2 , cuyos consumos máximos a 2 días fueron de 52,90 y 38,54% de su concentración inicial respectivamente. Así, las significativas diferencias encontradas en los perfiles de consumo de azúcares y ácidos orgánicos entre el control, JMN tratado con el agente químico (similar al control) y los jugos inoculados con las BAL se relacionó con la inhibición del crecimiento de la microbiota autóctona en los medios inoculados.

La utilización de los carbohidratos estuvo acompañada por un incremento principalmente de ácido láctico en los jugos inoculados en oposición al jugo control o tratado con el agente químico. En menor proporción se detectaron ácidos acético, succínico y de etanol, siendo éstos últimos principalmente encontrados en jugos sin inocular. La relación molar de láctico producido por glucosa + fructosa consumidos (mmol/mmol) fue menor a 1,0 y cercana o mayor que 2,0 en jugos sin inocular e inoculados, respectivamente (Tabla 3.8). Así, el rápido descenso del pH en los jugos inoculados estuvo relacionado con la rápida y significativa producción de los ácidos orgánicos, especialmente láctico. Por el contrario, la relación molar entre ácido acético o etanol por azúcares consumidos fue mayor en medio control que en los jugos inoculados, aun cuando en esta última condición ambos compuestos fueron detectados (Tabla 3.8). En esta condición la relación molar de alrededor 1 mmol/mmol entre citrato y ácido acético, indico que el ácido orgánico provino de catabolismo de citrato, completamente consumido.

Los resultados obtenidos indicaron que la microbiota autóctona utilizó glucosa y fructosa, aunque el primer azúcar en mayor proporción y, produjo ácido láctico acético y etanol, aunque el último en baja proporción en oposición a lo determinado en jugos inoculados con las cepas N8, EFj18 o EFf29. En base a estos resultados se pudo deducir que la microbiota bacteriana nativa del JNM, inhibida por las cepas inoculadas, estuvo principalmente constituida por microorganismos

heterofermentativos a diferencia de lo encontrado en EF. Coincidentemente con nuestros resultados, Sajur y col. (2007) y Pérez (2012), reportaron que las cepas inoculadas de *Ln. mesenteroides* Tsc y *L. plantarum* N4 utilizaron preferentemente glucosa en lugar de fructosa para su crecimiento. Por otro lado, Ellendersen y col. (2012) mostraron que el contenido de ácido málico en jugo de manzana Gala fermentado con *L. casei* disminuyó en un 87%, mientras que el contenido de ácido láctico aumentó en un 31%. Así dependiendo del metabolismo bacteriano, las cepas de las BAL pueden ejercer distintos efectos en relación con los metabolitos producidos durante la fermentación, los cuales finalmente impactan en el sabor del jugo fermentado (Ekinci y Gurel, 2008). Chen y col. (2018) detectaron que las concentraciones de ácido málico en todas las muestras disminuyeron apreciablemente durante la fermentación y esta tendencia fue más pronunciada en presencia de *L. acidophilus*; el ácido málico, principal ácido orgánico en jugo de manzana genera un sabor fuerte y agudo (Toit y col., 2011; Ye y col., 2015), dichos autores también detectaron ácido láctico con valores ligeramente menores al final de la fermentación (alrededor de 55,50 mmol/L) q lo encontrado en el presente estudio. El ácido láctico se produce vía de Embden-Meyerhof a partir del ácido pirúvico (Zhang y col., 2008), pero también a través de la fermentación maloláctica. Por lo tanto en los jugos inoculados derivaría del metabolismo de glucosa y ácido málico, este último completamente consumido.

Tabla 3.7 Utilización de azúcares, ácidos orgánicos y metabolitos producidos en JMN control y tratado almacenados a 30 °C

Tiempo	Tratamientos	Sustratos (mmol/L)				Productos (mmol/L)			
		Glucosa	Fructosa	Ácido málico	Ácido cítrico	Ácido acético	Ácido láctico	Ácido Succínico	Etanol
0 días	Control	223,83±11,12	282,88±14,56	10,44±0,54	43,87±0,22	0,16±0,001	0,22±0,01	0,25±0,01	0,06±0,001
2 días	Control	207,77±11,15	274,33±13,45	9,02±0,45	20,66±0,12	33,01±1,89	8,88±0,43	10,41±0,61	78,14±3,54
	<i>L.plantarum</i> N8	195,01±9,67	263,94±12,95	0,52±0,03	2,49±0,12	20,12±2,23	154,86±8,54	12,27±0,65	45,97±4,31
	<i>L.plantarum</i> EFf29	192,02±8,65	227,61±11,32	0,59±0,03	2,96±0,13	18,79±2,12	149,08±8,12	9,23±0,48	39,14±4,56
	<i>L.plantarum</i> EFj18	191,88±9,56	254,94±12,55	0,45±0,02	6,87±0,35	19,96±2,56	143,31±7,16	13,97±0,74	39,14±5,75
	Combinación	191,44±8,75	252,61±12,76	0,45±0,02	2,91±0,14	21,45±3,12	153,41±7,36	13,37±0,68	44,97±4,39
	CaCl ₂	204,94±12,15	270,66±11,98	9,09±0,48	16,91±0,86	27,14±1,67	7,32±0,38	11,43±0,55	73,80±4,13
7 días	Control	198,77±9,86	245,22±14,02	8,12±0,42	16,60±0,85	34,13±1,98	12,07±0,67	11,26±0,48	80,31±5,12
	<i>L.plantarum</i> N8	184,01±9,82	259,66±13,45	0,22±0,01	1,66±0,08	21,78±3,56	171,18±8,87	14,22±0,78	48,14±4,87
	<i>L.plantarum</i> EFf29	185,11±8,76	224,88±11,23	0,29±0,01	2,23±0,12	23,45±3,76	167,96±7,45	9,56±0,63	40,31±5,42
	<i>L.plantarum</i> EFj18	189,38±8,99	248,01±12,34	0,22±0,02	4,84±0,23	19,95±3,65	176,84±9,23	16,76±0,89	50,31±4,89
	Combinación	184,61±10,24	238,61±11,67	0,22±0,01	1,14±0,06	19,45±3,21	168,07±8,12	14,56±0,71	40,31±5,75
	CaCl ₂	195,11±9,67	259,55±12,98	6,38±0,04	2,23±0,14	43,13±2,12	10,87±0,54	12,95±0,60	78,14±5,62

Los valores representan los promedios de dos experimentos ± DE.

Tabla 3.8 Relación molar entre metabolitos formados y sustratos consumidos en JMN control y tratado almacenado a 30 °C

Sustratos	Tratamiento					
	Control	<i>L. plantarum</i> N8	<i>L. plantarum</i> EFf29	<i>L. plantarum</i> EFj18	Combinación	CaCl ₂
Glucosa ^a	16,05±0,87	28,83±1,36	31,83±1,76	31,94±1,65	32,38±1,79	18,88±0,98
Fructosa ^a	8,55±0,45	18,94±0,98	55,27±3,12	27,94±1,45	30,27±1,67	12,22±0,66
Ácido cítrico ^a	23,24±1,23	41,41±2,34	40,95±2,15	37,03±1,87	40,97±2,18	27,00±1,26
Y _{Láctico} ^b	0,30±0,01	3,03±0,15	1,60±0,07	2,22±0,11	2,28±1,12	0,24±0,02
Y _{Láctico} ^c	0,29±0,02	2,92±0,13	1,57±0,06	2,16±0,13	2,22±1,16	0,23±0,01
Y _{Láctico} ^d	0,32±0,02	3,50±0,17	3,40±0,19	3,60±0,17	3,50±0,18	0,31±0,02
Y _{acético} ^b	2,56±0,15	0,43±0,03	0,21±0,01	0,34±0,02	0,35±0,02	1,53±0,85
Y _{acético} ^b	0,47±0,03	0,23±0,02	0,21±0,02	0,33±0,02	0,33±0,02	0,49±0,03
Y _{acético} ^d	1,42±0,06	1,05±0,05	1,14±0,06	1,13±0,06	1,18±0,06	1,15±0,06
Y _{Etanol} ^e	3,17±0,02	0,95±0,07	0,44±0,04	0,65±0,07	0,71±0,06	2,37±0,12

^a: sustratos consumidos a 2 días (mmol/L)

^b: Y Ácido láctico o acético producidos por glucosa y fructosa consumida: [total ácido láctico o acético formado (mmol/L)] / [total de azúcares consumidos (mmol/L)]

^c: Y Ácido láctico o acético producidos por glucosa, fructosa y ácido cítrico consumidos: [total ácido láctico o acético formado (mmol/L)] / [total de azúcares consumido (mmol/L) + total de ácido cítrico consumido (mmol/L)]

^d: Y Ácido láctico o acético formado por ácido cítrico consumido: [total ácido lactico o acético formado (mmol/L)] / [total de ácido cítrico consumido (mmol/L)]

^e: Y Etanol producido por glucosa y fructosa consumida: [total etanol formado (mmol/L)] / [total de D-glucosa consumida(mmol/L) + total de fructosa consumido (mmol/L)]

3.4.2.4 Metabolismo de Azúcares y ácidos orgánicos en JMN fermentado a 4 °C

Los cambios químicos producidos en JMN almacenado a 4 °C se muestran en la Tabla 3.9. Los máximos consumos de glucosa y fructosa ocurrieron a 7 días de almacenamiento y fueron significativamente menores a lo detectado en JMN almacenado a 30 °C (entre 2 y 6%), lo que se relacionó con el menor crecimiento, especialmente en medios inoculados. A su vez, los ácidos málico y cítrico, no fueron completamente consumidos en ninguna condición, variando entre 24,4% y 48,4%. El hecho de que las cepas de *L. plantarum* inoculadas hayan consumido parcialmente los ácidos orgánicos a 7 días se relacionó con la ausencia de crecimiento, indicando que los mismos podrían ser utilizados como fuente de energía para el mantenimiento de las células de acuerdo a lo descrito por Vaningelgem y col. (2006). En cuanto a los metabolitos producidos, se detectó ácido láctico, acético y succínico a 7 días, coincidiendo con los máximos consumos, sin embargo en menor concentración que lo determinado a 30 °C. Los balances de fermentación del ácido láctico fueron inferiores a lo determinados a temperatura abusiva, resultando inferiores a 2 mmol/mmol en la mayoría de los casos lo que estaría indicando un cambio en el metabolismo de *L. planatrum* en la condición de refrigeración, aún cuando los balances resultaron superiores que en jugos no inoculados (Tabla 3.10).

Tabla 3.9 Utilización de azúcares, ácidos orgánicos y metabolitos producidos en JMN control y tratado almacenados a 4 °C

Tiempo	Tratamientos	Sustratos (mmol/L)				Productos (mmol/L)			
		Glucosa	Fructosa	Ácido málico	Ácido cítrico	Ácido acético	Ácido láctico	Ácido Succínico	Etanol
0 días	Control	223,80±11,45	282,79±13,45	10,41±0,06	43,81±2,34	0,15±0,01	0,11±0,01	2,20±0,09	0,06±0,002
2 días	Control	220,16±10,12	280,44±15,56	9,70±0,06	38,07±2,15	3,89±0,21	5,27±0,23	5,78±0,24	19,53±1,15
	<i>L.plantarum</i> N8	218,5±10,25	279,05±13,69	9,22±0,04	33,54±1,79	2,54±0,15	7,10±0,34	13,19±0,65	19,43±1,06
	<i>L.plantarum</i> EFf29	217,66±12,56	278,88±14,45	9,20±0,05	32,15±1,65	2,06±0,11	7,13±0,40	14,66±0,81	18,21±0,98
	<i>L.plantarum</i> EFj18	219,72±11,20	278,83±14,99	9,16±0,06	34,45±1,98	2,40±0,12	7,65±0,41	14,02±0,65	17,36±0,87
	Combinación	218,55±10,78	277,66±13,45	9,25±0,04	34,12±2,13	2,83±0,13	7,15±0,34	12,44±0,59	21,70±0,97
	CaCl ₂	220,55±13,56	282,06±15,60	9,63±0,05	37,32±2,56	3,25±0,19	2,44±0,13	5,21±0,25	17,10±0,87
7 días	Control	216,01±13,79	277,11±16,60	8,29±0,04	26,12±1,24	15,15±0,77	14,32±0,76	13,21±0,78	48,14±2,56
	<i>L.plantarum</i> N8	217,66±11,23	271,11±17,23	7,87±0,03	21,23±1,15	19,52±0,12	28,69±1,32	33,79±1,56	42,56±2,35
	<i>L.plantarum</i> EFf29	211,33±11,89	270,22±13,20	7,76±0,03	19,34±0,13	20,65±0,13	27,69±1,45	32,09±1,48	41,25±3,10
	<i>L.plantarum</i> EFj18	210,16±9,45	272,88±14,45	7,06±0,04	20,23±1,23	21,58±0,11	28,50±1,65	29,63±1,39	38,77±2,89
	Combinación	212,16±9,70	272,44±13,56	8,05±0,05	21,50±1,26	21,55±0,15	27,54±1,35	25,82±1,35	39,50±2,13
	CaCl ₂	217,38±10,33	273,38±14,34	8,05±0,05	28,66±1,58	14,12±0,87	16,44±0,85	13,80±0,77	34,68±1,98

Los valores representan los promedios de dos experimentos ± DE.

Tabla 3.10 Relación molar entre metabolitos formados y sustratos consumidos en JMN control y tratado almacenado a 4 °C

Sustratos	Tratamiento					
	Control	<i>L. plantarum</i> N8	<i>L. plantarum</i> EFf29	<i>L. plantarum</i> EFj18	Combinación	CaCl ₂
Glucosa ^a	7,79±0,34	6,14±0,25	12,47±0,66	13,64±0,72	11,64±0,5	6,42±0,3
Fructosa ^a	5,68±0,26	11,69±0,56	12,57±0,72	9,91±0,45	10,35±0,6	9,41±0,45
Ácido cítrico ^a	17,69±0,78	22,48±1,14	24,47±1,23	23,58±1,25	22,31±1,23	15,15±0,69
Y _{D-Láctico} ^b	0,89±0,04	1,46±0,07	0,99±0,05	1,06±0,55	1,14±0,06	0,88±0,05
Y _{D-Láctico} ^c	0,39±0,01	0,66±0,04	0,50±0,04	0,53±0,03	0,57±0,02	0,45±0,02
Y _{D-Láctico} ^d	0,68±0,03	1,15±0,05	1,02±0,04	1,06±0,05	1,12±0,07	0,92±0,06
Y _{A. acético} ^b	1,11±0,04	1,08±0,05	0,82±0,03	0,91±0,04	0,97±0,05	0,88±0,04
Y _{A. acético} ^c	0,48±0,02	0,48±0,03	0,41±0,03	0,45±0,02	0,48±0,02	0,45±0,03
Y _{A. acético} ^d	0,85±0,05	0,86±0,05	0,84±0,05	0,91±0,05	0,96±0,06	0,92±0,06
Y _{Etanol} ^e	3,56±0,18	2,38±0,13	1,64±0,08	1,64±0,09	1,79±0,08	2,18±0,13

^a: 7 días (mmol/L)

^b: Y Ácido láctico o ácido acético por glucosa y fructosa consumida: [total ácido D-láctico o ácido acético formado (mmol/ L)] / [total de D-glucosa consumida(mmol/l) + total de fructosa consumido (mmol/L)]

^c: Y Ácido láctico o ácido acético por glucosa, fructosa y ácido cítrico consumidos: [total ácido D-láctico o ácido acético formado (mmol/ L)] / [total de D-glucosa consumida (mmol/l) + total de fructosa consumido (mmol/L) + total de ácido cítrico consumido (mmol/L)]

^d: Y Ácido láctico o Ácido acético por ácido cítrico consumido: [total ácido D-lactico o Ácido acético formado (mmol/ L)] / [total de ácido cítrico consumido (mmol/l)]

^e: Y Etanol por glucosa y fructosa consumida: [total etanol formado (mmol/ L)] / [total de D-glucosa consumida(mmol/l) + total de fructosa consumido (mmol/L)]

3.4.2.5 Determinación de compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales (CPT) se muestra en la Tabla 3.11. El JMN presentó una concentración inicial promedio de 318 mg/L GAE, la cual incrementó 5,0 y 17,7%, a 2 días de incubación a 4 y 30 °C respectivamente. A 7 días, CPT del JMN control incubado a 4 °C se mantuvo prácticamente constante, mientras que se observó una disminución a 30 °C. En JMN inoculado con BAL, el contenido de CPT, en general no mostró diferencias significativas a 2 y 7 días de incubación a 4 y 30 °C, aun cuando en presencia de *L. plantarum* EFf29 al igual que en el inóculo combinado incrementó 27,6%, indicando que, en general las BAL tuvieron un efecto positivo sobre la composición fenólica del JMN. Este resultado se relacionó con los estudios de cinética de crecimiento, en los cuales las cepas seleccionadas fueron capaces de crecer eficientemente en presencia de una MCF (capítulo 2). Similares resultados fueron informados por Krapasob y col. (2017) en ensayos de fermentación con BAL en jugo de manzana a 30 °C. Diversos autores han demostrado que fermentaciones llevadas a cabo por BAL seleccionadas pueden mejorar el contenido de CPT de jugos fermentados (Gan y col., 2016; Kachouri y col., 2015; Kaltsa y col., 2015), lo cual podría atribuirse a la habilidad de BAL de producir enzimas hidrolíticas que degradan fitoquímicos complejos en formas simples (Gan y col., 2016; Kaltsa y col., 2015; Kwaw y col., 2017). Por otro lado, Kwaw y col. (2017) elaboraron jugos de mora fermentado con BAL y reportaron valores notablemente más elevados los cuales estuvieron comprendidos entre 600 y 800 mg/L GAE. Giacaman y col. (2014) informaron que estas diferencias se deben principalmente a la naturaleza de la fruta y al procesamiento del jugo. En resumen, los resultados indicaron que a 7 días de almacenamiento, la concentración de CFT en JMN fermentados no es significativamente diferente a la del JMN control o al JMN tratado con CaCl₂, aun cuando se produjo un ligero incremento almacenado a 30 °C, indicando que las BAL no modifican negativamente la composición fenólica propia de los JMN naturales, lo cual resulta de interés en función de su potencial aplicación biotecnológica.

Tabla 3.11 Concentración de compuestos fenólicos totales (CPT) en JMN control y fermentado con cepas de *L. plantarum* seleccionadas y almacenados a 4 y 30 °C durante 7 días.

Tiempo	Muestra	Compuestos fenólicos totales (mg/GAE L)	
		JMN 4 °C	JMN 30 °C
0 días	-	317,98 ± 15,23	318,23 ± 13,45
2 días	Control	333,94 ± 16,12	374,41 ± 18,34
	<i>L. plantarum</i> N8	330,01 ± 16,23	332,63 ± 14,87
	<i>L.plantarum</i> EFF29	296,91 ± 13,45	405,84 ± 22,98
	<i>L.planarum</i> EFj18	331,32 ± 14,34	393,70 ± 18,23
	Combinación	291,20 ± 14,45	404,65 ± 20,12
	CaCl ₂	227,05 ± 14,65	378,94 ± 17,34
7 días	Control	323,22 ± 15,56	214,77 ± 14,78
	<i>L. plantarum</i> N8	330,13 ± 17,54	316,32 ± 13,43
	<i>L. plantarum.</i> EFF29	284,77 ± 16,67	395,01 ± 15,06
	<i>L.plantarum.</i> EFj18	321,32 ± 18,23	381,08 ± 14,09
	Combinación	320,72 ± 17,34	371,44 ± 14,98
	CaCl ₂	286,91 ± 15,56	312,03 ± 15,69

Los valores representan las medias de dos experimentos ± DE

3.4.2.6 Determinación de actividad antioxidante

3.4.2.6.1 Actividad reductora del hierro férrico/poder antioxidante FRAP

Se evaluó la actividad reductora del hierro de JMN clarificado por centrifugación control y fermentado con las cepas de *L. plantarum* seleccionadas. En la Figura 3.3 se observa una actividad reductora de 156 μmol FESO₄/L a inicio de la fermentación, valor que incrementó a los 2 días un 15,8; 24,1; 14,7 y 31,0% en JMN incubado a 30 °C e inoculado con *L. plantarum* N8, EFF29, EFj18 y con el inóculo combinado respectivamente. A los 7 días dichos valores en general, no mostraron diferencias significativas respecto a los 2 días, excepto en presencia de *L. plantarum* EFj18 cuya disminución fue significativa. En JMN incubado a 4 °C no se registraron diferencias significativas respecto al control y el tiempo 0. Coincidentemente a lo observado para las cepas con mayor actividad, Hashemi y col. (2017) encontraron que la fermentación

láctica de jugo de limón mejoró significativamente la actividad antioxidante. Por otro lado, Mousavi y col. (2013), demostraron que durante la fermentación de un jugo de granada, la concentración de compuestos fenólicos disminuyó, mientras que la actividad antioxidante aumentó. Dueñas y col. (2005) informaron que la fermentación de harinas de frijol por *L. plantarum* también incrementó la actividad antioxidante, contrariamente, Rua y col. (2018) investigaron la actividad reductora de jugo de melón fermentado con BAL y almacenado a 4 °C durante 4 días; los autores encontraron que la misma disminuyó aunque no de manera significativas con respecto al valor inicial. En nuestro estudio, se confirmaría que la fermentación láctica estaría teniendo un efecto positivo al no disminuir o incluso mejorar suavemente la actividad antioxidante del JMN. Por el contrario, en presencia de CaCl₂ se observó una disminución de la propiedad en estudio.

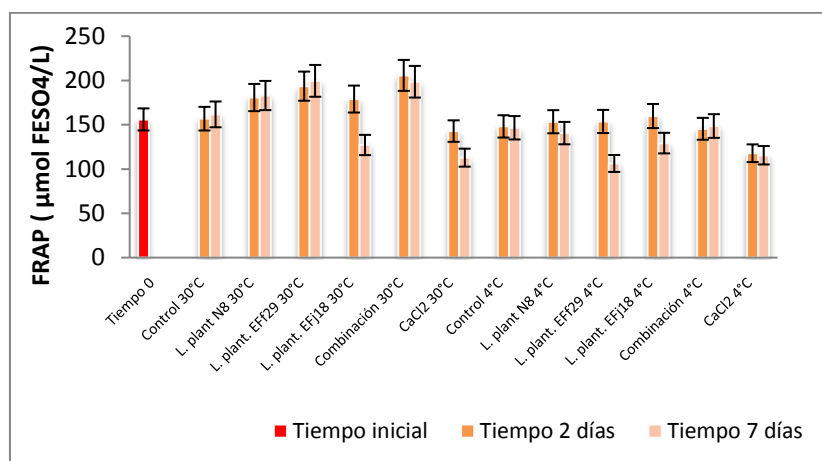


Figura 3.3. Actividad reductora del hierro en JMN fermentado con cepas de *L. plantarum* seleccionadas almacenados a 4 y 30 °C durante 7 días.

3.4.2.6.2 Captura del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)

Los resultados de DPPH mostraron una actividad antioxidante de 12,06 % del JMN en el tiempo inicial. A 30 °C en JMN control ésta disminuyó 62% a los 2 días y, luego se mantuvo constante hasta los 7 días. Por el contrario cuando el JMN fue tratado con BAL, la actividad antioxidante aumentó significativamente a los 2 días presentando incrementos de 56, 84, 60% en presencia de *L. plantarum* N8, EFf29 y EFf18 respectivamente, mientras que en presencia de

CaCl₂ se produjo una reducción de 35% y a los 7 días de iniciada la fermentación prácticamente no hubo diferencias significativas en todos los tratamientos respecto a 2 días. Por el contrario, JMN fermentado e incubado 4 °C no mostró incrementos en sus actividades antioxidantes, lo que se relacionó con la falta de crecimiento. De este modo los resultados indicaron que la fermentación láctica tuvo un efecto positivo en la actividad DPPH en JMN incubados a 30 °C lo cual estaría positivamente relacionado con el contenido y composición de CPT (Figura 3.4). Kwaw y col. (2017) en jugos de mora fermentados con BAL detectaron valores superiores a los nuestros, comprendidos entre 65,31 y 73,64%. Además, en este caso y junto a lo encontrado en los JMN fermentados e incubados a 30 °C, después de la fermentación; en este sentido, Dani y col. (2007) concluyeron que valores de polifenoles elevados generalmente determinan una elevada actividad antioxidante aunque dicho fenómeno podría depender de la maduración de la fruta y de las prácticas de cultivo (Burin y col., 2010). El aumento en la actividad depuradora DPPH estipula que la fermentación láctica podría aumentar la disponibilidad de compuestos con propiedades donadoras de protones, ya que durante la actividad depuradora del radical DPPH, el electrón anómalo del átomo de nitrógeno se reduce al aceptar el átomo de hidrógeno de los antioxidantes a la hidracina correspondiente (Kedare y Singh, 2011). Randazzo y col. (2016), encontraron en bebida tipo kéfir de manzana y jugo de kiwi fermentado con BAL comerciales de agua de kéfir valores más elevados de actividad antioxidante siendo al inicio de 37,6% y 94,7% respectivamente, mientras que el valor más bajo fue de 15,1% y correspondió a una bebida tipo kéfir de uva fermentada con los mismos microorganismos y reportaron que al final del proceso de fermentación dicha actividad disminuyó entre 3,34 y 19,08% dependiendo del tipo de bebida fermentada.

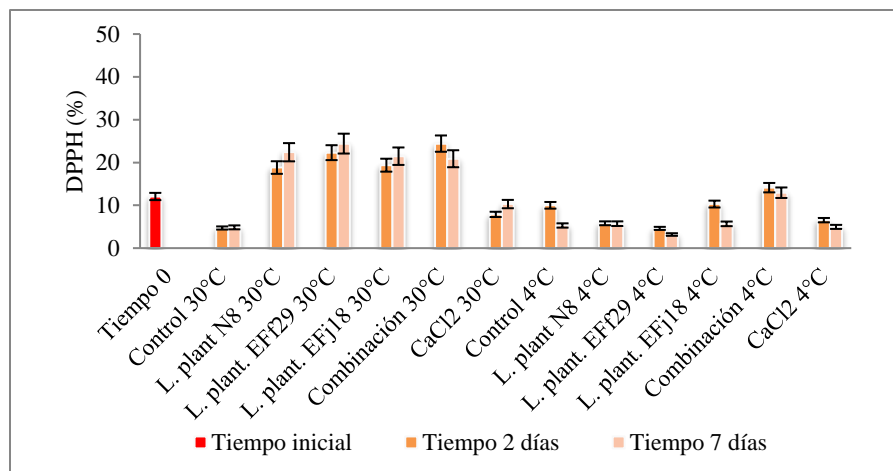


Figura 3.4. Porcentaje de depuración del radical libre DPPH en JMN fermentado con cepas de *L. plantarum* seleccionadas e incubados a 4 y 30 °C durante 7 días (L. plant: *L. plantarum*).

34.2.7 Determinación de vitamina C

El ácido ascórbico (AA) es uno de los compuestos bioactivos más importantes presente en la mayoría de las frutas y la fermentación láctica podría aumentar ciertos beneficios en la salud del consumidor modificando el contenido del mismo (Shrestha y col., 2013). Por lo cual se evaluó el contenido de vitamina C o ácido ascórbico (AA) en JMN inoculado con cepas de *L. plantarum* seleccionadas e incubados a 4 y 30 °C. En la Figura 3.5 se puede observar que al inicio de la fermentación el contenido de AA fue de 2.475 mg AA/L, valor que aumentó a los 2 días en todos los tratamientos a 30 °C, aunque cuando JMN fue inoculada con *L. plantarum* EFf29, EFj18 y la combinación se registraron los aumentos más significativos siendo del 15,15; 11,11 y 14,34% respectivamente. Krapasob y col. (2017) encontraron valores similares en jugo de manzana fermentado por BAL y almacenados a 30 °C y coincidentemente informaron que la fermentación tuvo un efecto positivo en el contenido de AA al inicio de la fermentación, hecho que al final del proceso de fermentación fue revertido de manera poco significativa. A los 7 días de incubación el contenido de AA disminuyó en todos los casos, en general, sin mostrar variaciones significativas. El incremento de AA durante la etapa inicial podría deberse al hecho de que AA estaría siendo adicionalmente sintetizado por microorganismos (Adetuyi y col., 2014) Zheng y col. (2014) también informaron un aumento en el contenido de AA de jugo de litchi

(fruta originaria del sur de china) cuando se fermentó durante 18 h por *L. casei*. En el presente estudio, por el contrario, cuando JMN se almacenó a 4 °C los valores no mostraron diferencias significativas respecto al tiempo inicial en todos los tratamientos. Por otro lado la disminución de AA durante la última etapa de fermentación podría deberse a la degradación del oxígeno residual por medio de la ácido ascórbico oxidasas de manera que cuando el oxígeno se agota totalmente se debe cambiar de una fase microaeróbica a una anaeróbica (Valente y col.,2011)

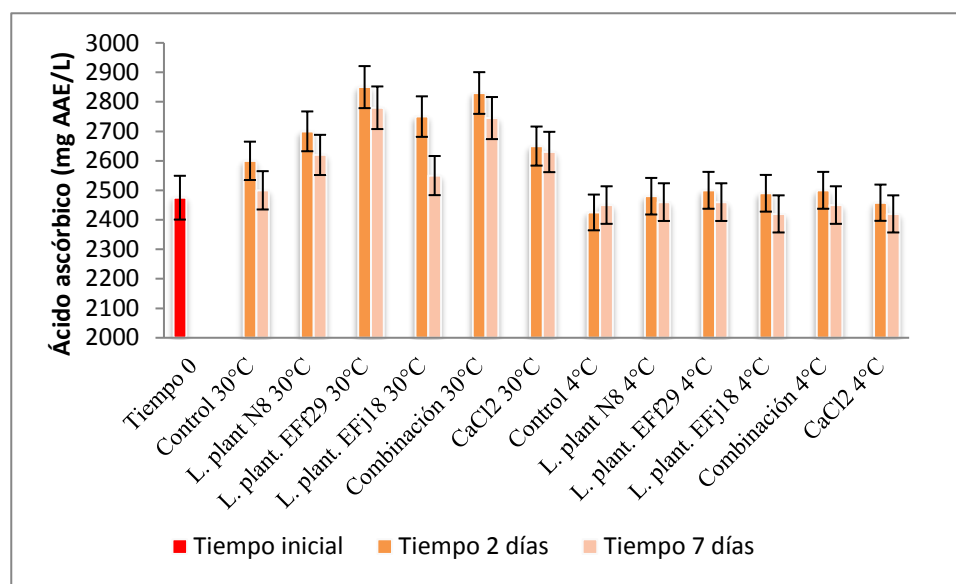


Figura 3.5 Contenido de vitamina C en JMN fermentados con cepas de *L. plantarum* seleccionadas e incubados a 4 y 30 °C durante 7 días. (L. plant: *L. plantarum*).

3.4.2.8 Análisis sensorial cualitativo de JMN.

Al final del almacenamiento de 14 días, todos los JMN fermentados con las cepas individuales, combinadas y en presencia de CaCl₂ y a ambas temperaturas (4 y 30 °C) se sometieron a un análisis sensorial cualitativo (Figura 3.6). Los JMN fermentados con cepas individuales y almacenados a 4°C obtuvieron un puntaje significativamente más elevado para todos los atributos sensoriales analizados en comparación con el control, el aroma y el color fueron los principales atributos que se diferenciaron entre JMN control y el inoculado. En general, la cepa que obtuvo mayor puntaje fue *L. plantarum* EFf29, mientras que por el contrario, la combinación de las tres cepas obtuvieron bajos puntajes. En JMN almacenado a 30°C el tratamiento que obtuvo mayor

puntaje en los atributos fue el tratado con CaCl_2 , y el JMN inoculado con BAL que mostró los valores más altos fue *L. plantarum* EFf29, coincidentemente con el JMN almacenado a 4°C . En el presente estudio el sabor dulce no fue tan bien percibido como otros atributos, aunque las cepas *L. plantarum* EFf29 y N8 mostraron valores significativamente mayores al control, esto podría deberse a la conversión del ácido málico en ácido láctico más débil (Toit y col., 2011), por lo que ciertas cepas de *Lactobacillus plantarum* podrían haber reforzado la sensación dulce en boca. En general la fermentación mejoró algunos atributos sensoriales de JMN, en este sentido, Di Cagno y col. (2011) confirmaron al fermentar batidos con BAL. Espirito-Santo y col. (2015) evaluaron las propiedades sensoriales de jugo de manzana fermentado con diferentes BAL y encontraron que teniendo en cuenta la puntuación media en la escala hedónica para el total de aceptabilidad, el jugo de manzana fermentado por *L. plantarum* 299 recibió la peor aceptación y los fermentados por *L. acidophilus* L10 y por *L. casei* L26 fueron los mejores aceptados, lo cual estaría indicando que los efectos sobre las propiedades sensoriales son especie/cepa dependientes. Por otro lado, Maldonado y col. (2017), investigaron la fermentación láctica de cuatro frutas, para obtener nuevas bebida a lo cual la evaluación sensorial de las mismas arrojaron resultados similares a los nuestros, obteniendo puntuaciones más elevadas aquellas bebidas fermentadas en comparación con la no fermentadas.

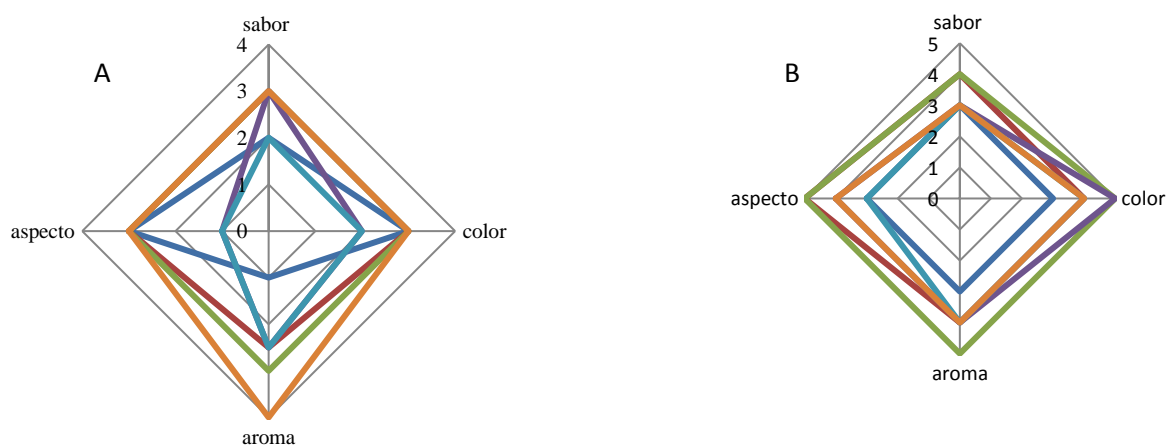


Figura 3.6 Análisis sensorial de los JMN A) almacenado a 30°C y B) almacenado a 4°C y fermentados por las siguientes BAL: — (control negativo), — (*L. plantarum* N8), — (*L. plantarum* EFf29), — (*L. plantarum* EFj18), — (mezcla de las 3 cepas) y — (CaCl_2).

3.4.3 Matrices alimenticias cortadas en trozos, listas para consumo

3.4.3.1 Frutillas trozadas

3.4.3.1.1 Análisis microbiológicos

La Tabla 3.12 muestra la evolución de los recuentos obtenidos durante el almacenamiento de la matriz alimenticia control y tratada bajo diferentes condiciones a temperatura abusiva (30 °C). En la muestra control, los recuentos de BAL y levaduras autóctonas en medios MRS e YPG-C (carga inicial de 5,4 y 2,1 U log) incrementaron alrededor de 2 y 3 U log mientras que en SSA y Mac Conkey (carga inicial de 1,60 y 2,67 U log) incrementaron 4,6 y 3,5 U log a 2 días respectivamente. En medio YPG-C los recuentos de levaduras continuaron creciendo hasta 7 días, aunque, en todos los medios ensayados no se detectaron recuentos viables a 14 días de incubación. En muestras inoculadas con las BAL, los recuentos iniciales en medio MRS en el orden de 10^6 ufc/g incrementaron alrededor de 2 U log y estuvieron constituidos por las cepas inoculadas (bacilos Gram positivos, catalasa negativos). Interesantemente, en medios YPG, SSA y Mac Conkey a dos días de incubación no se detectaron células viables, es decir las cepas inoculadas inhibieron completamente el crecimiento de la microbiota autóctona, produciendo además su completa inactivación. Solamente en Mac Conkey agar este efecto ocurrió más lentamente en presencia de *L. plantarum* EFj18 dado que la inactivación completa fue detectada recién a 7 días, aunque a 2 días no se detectó crecimiento microbiano. De este modo las cepas N8 y EFF29 fueron más efectivas que EFj18 para inactivar completamente la carga microbiana inicial detectada en medio Mac Conkey. En presencia de CaCl_2 el efecto inhibitorio fue notablemente menor al detectado en presencia de BAL, ya que en los medios YPG, SSA y Mac Conkey se observaron niveles altos de células viables incluso hasta los 7 días, en forma similar a lo determinado para la muestra control (Tabla 3.12). Cabe destacar que en esta matriz no se evaluó el efecto del inoculo combinado dado que en JMN éste, en general no fue significativamente más efectivo que lo determinado para los inoculos individuales.

En frutilla control almacenada a 4 °C, las BAL y levaduras autóctonas crecieron alcanzando, en medios MRS y YPG-C agar, recuentos máximos (6,6 y 6,9 U log) a 2 y 7 días

respectivamente, luego permanecieron constantes hasta el final del almacenamiento. En medios SSA y Mac Conkey agar los recuentos iniciales incrementaron 5,4 y 4,1 U log a dos días respectivamente, luego se mantuvieron constantes hasta los 7 días, sin ser detectados a 14 días de almacenamiento. En muestras inoculadas, las BAL determinadas en medio MRS agar incrementaron solamente alrededor de 0,3/0,4 U log, manteniendo sus recuentos constantes, similarmente a lo observado en JMN control, sin embargo, ejercieron un efecto inhibitorio. De este modo, en medio YPG-C se logró una inactivación total a los 2 días, mientras que en medio SSA y Mac Conkey este efecto ocurrió recién a los 7 días. Se destacó *L. plantarum* Effic29 que inhibió el crecimiento microbiano en ambas condiciones produciendo una reducción de una unidad log de la carga inicial en medio agar Mac Conkey. A 7 días, en presencia de las BAL inoculadas no se detectaron células viables en ningún medio ensayado, excepto agar MRS. De este modo las BAL inhibieron el crecimiento de la microbiota autóctona produciendo su completa inactivación, siendo la cepa Effic29 la más efectiva. En general, la inactivación sobre Enterobacterias potencialmente patógenas ocurrió más lentamente que lo observado a 30 °C, donde las BAL crecieron eficientemente. La presencia de CaCl₂ no modificó significativamente la evolución de la microbiota natural, la cual se comportó de forma similar al control (Tabla 3.13).

De esta manera, los resultados obtenidos, por primera vez en este tipo de matriz con BAL locales seleccionadas inoculadas nos permitieron concluir que, entre los agentes ensayados, solamente el uso de las BAL seleccionadas fue efectivo para inhibir e inactivar completamente las poblaciones microbianas contaminantes de frutillas trozadas durante el almacenamiento a temperatura abusiva y de refrigeración. En este último punto cabe destacar que la refrigeración no impidió el crecimiento e incluso la sobrevida de levaduras y bacterias potencialmente patógenas, lo que representa un gran riesgo para la salud del consumidor y, resalta la importancia de las investigaciones realizadas y potencial aplicación de las cepas inoculadas, especialmente Effic29 como agente de biocontrol de frutillas MP.

Tabla 3.12 Recuento microbiano en diferentes medios de muestras de frutilla trozadas e inoculadas con cepas de *L. plantarum* e incubadas a 30 °C durante 21 días.

Recuento microbiano (log ufc/g) en los siguientes medios durante 21 días																				
CEPA	MRS					YPG-C					SSA					Mac Conkey				
	0	2	7	14	21	0	2	7	14	21	0	2	7	14	21	0	2	7	14	21
Control	5,44 ^A	7,4 ^A	7,29 ^A	nd	nd	2,10 ^A	5,10 ^A	8,87 ^A	nd	nd	1,60 ^A	6,17 ^A	5,60 ^A	nd	d	2,67 ^A	6,20 ^A	5,50 ^A	nd	nd
<i>L. plantarum</i> N8	6,78 ^B	8,37 ^B	7,75 ^B	nd	nd	2,09 ^A	ND	ND	nd	nd	1,63 ^A	ND	ND	nd	nd	2,66 ^A	ND	ND	nd	nd
<i>L. plantarum</i> EFf18	6,85 ^B	8,27 ^B	7,6 ^{A,B}	nd	nd	2,10 ^A	4,71 ^B	2,17 ^B	nd	nd	1,59 ^A	ND	ND	nd	nd	2,7 ^A	2,60 ^B	ND	nd	nd
<i>L. plantarum</i> EFf29	6,81 ^B	8,11 ^B	7,90 ^{B,C}	nd	nd	2,11 ^A	ND	ND	nd		1,63 ^A	ND	ND	nd	nd	2,68 ^A	ND	ND	nd	nd
CaCl ₂	5,35 ^A	7,1 ^A	6,20 ^D	nd	nd	2,12 ^A	6,16 ^C	5,70 ^C	nd	nd	1,60 ^A	6,10 ^A	5,29 ^B	nd	nd	2,70 ^A	6,17 ^A	4,60 ^B	nd	nd

ND: No Detectado

nd: No determinado por muestra completamente deteriorada

Los valores corresponden a los promedios de tres experimentos

Valores con diferentes letras como superíndice dentro de cada columna son significativamente diferentes de acuerdo al test Tukey (p<0,05)

Tabla 3.13 Recuento microbiano en diferentes medios de muestras de frutilla trozadas e inoculadas con cepas de *L. plantarum* e incubadas a 4 °C durante 21 días.

Recuento microbiano (log ufc/g) en los siguientes medios durante 21 días																				
CEPA	MRS					YPG-C					SSA					Mac Conkey				
	0	2	7	14	21	0	2	7	14	21	0	2	7	14	21	0	2	7	14	21
Control	5,36 ^A	6,60 ^A	6,40 ^A	5,15 ^A	4,80 ^A	2,10 ^A	4,2 ^A	6,9 ^A	5,42 ^A	5,1 ^A	1,61 ^A	5,40 ^A	4,90 ^A	ND	ND	2,67 ^A	4,10 ^A	2,69 ^A	ND	ND
<i>L. plantarum</i> N8	6,78 ^B	7,35 ^B	7,45 ^B	6,9 ^B	6,75 ^B	2,09 ^A	ND	ND	ND	ND	1,73 ^A	3,43 ^B	ND	ND	ND	2,66 ^A	4,31 ^B	ND	ND	ND
<i>L. plantarum</i> EFf18	6,85 ^B	7,00 ^C	6,85 ^C	6,88 ^A	6,77 ^B	2,10 ^A	ND	ND	ND	ND	1,40 ^B	3,10 ^C	ND	ND	ND	2,7 ^A	4,58 ^C	ND	ND	ND
<i>L. plantarum</i> EFf29	6,81 ^B	7,26 ^B	7,49 ^B	6,90 ^A	6,90 ^B	2,11 ^A	ND	ND	ND	ND	1,61 ^A	1,60 ^D	ND	ND	ND	2,68 ^A	1,69 ^D	ND	ND	ND
CaCl ₂	5,43 ^A	6,07 ^D	5,19 ^D	4,19 ^C	3,98 ^C	2,12 ^A	2,17 ^B	3,5 ^B	4,44 ^B	3,6 ^B	1,61 ^A	3,90 ^E	3,4 ^B	ND	ND	2,7 ^A	4,10 ^A	3,50 ^B	ND	ND

ND: No Detectado

Los valores corresponden a los promedios de tres experimentos

Valores con diferentes letras como superíndice dentro de cada columna son significativamente diferentes de acuerdo al test Tukey (p<0,05)

La Figura 3.7 A se observan muestras de frutillas frescas recién cortadas en trozos antes de inocular (tiempo cero) de buen aspecto, color y textura, y tratadas bajo diferentes condiciones a 21 días de incubación a 4 °C. Se destaca la presencia de un moho blanco (tratadas con CaCl₂, Figura 3. 7 B) y hongos filamentosos de color gris cubriendo completamente la muestra control (Figura 3. 7 C). En las Figuras 3.7 D, E, F se muestran frutillas MP e inoculadas con BAL. Las mismas conservaron un aspecto aceptable, sin la presencia de hongos filamentosos en su superficie, la muestra inoculada con la cepa EFf29 muestra el mejor aspecto lo que se relacionó con su mayor efectividad antimicrobiana.

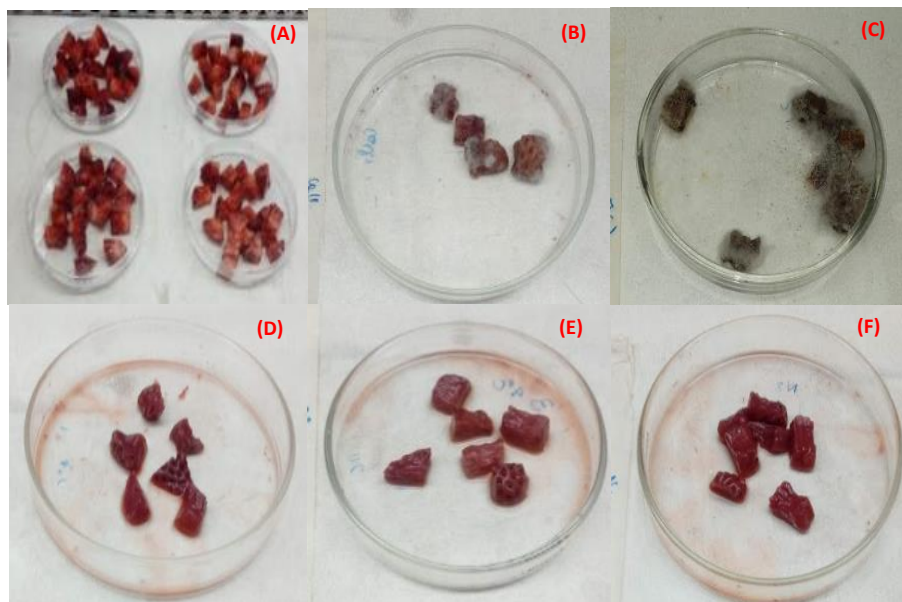


Figura 3.7 Fotografías de muestras de frutillas cortadas en trozos, sin inocular a tiempo cero (A) y a 21 días de incubación a 4 °C: tratada con 1,5% CaCl₂ (B) sin inocular (C), e inoculadas con *L. plantarum* EFj18 (D), *L. plantarum* EFf29 (E), *L. plantarum* N8 (F).

3.4.3.1.2 Microscopía electrónica de frutillas cortadas en trozos

Se observó mediante microscopía electrónica las frutillas cortadas en trozos en diferentes condiciones de ensayo en muestras frescas sin inocular y a 21 días de almacenadas a 4 °C.

En la figura 3.8 se observa la microestructura de la frutilla fresca madura sin inocular. La Figura A corresponde a un corte transversal del fruto donde se aprecian las células epidérmicas y parenquimáticas internas del tálamo comestible, organizadas de forma isodiamétrica. La Figura B muestra las células epidérmicas superficiales turgentes, de forma poliédricas, de paredes celulares

bien definidas en la que se diferencian células especializadas como pelos o tricomas. En la Figura C, se aprecia la presencia del verdadero fruto llamado aquenio dispuesto regularmente en la superficie del talamo carnososo y cónico.

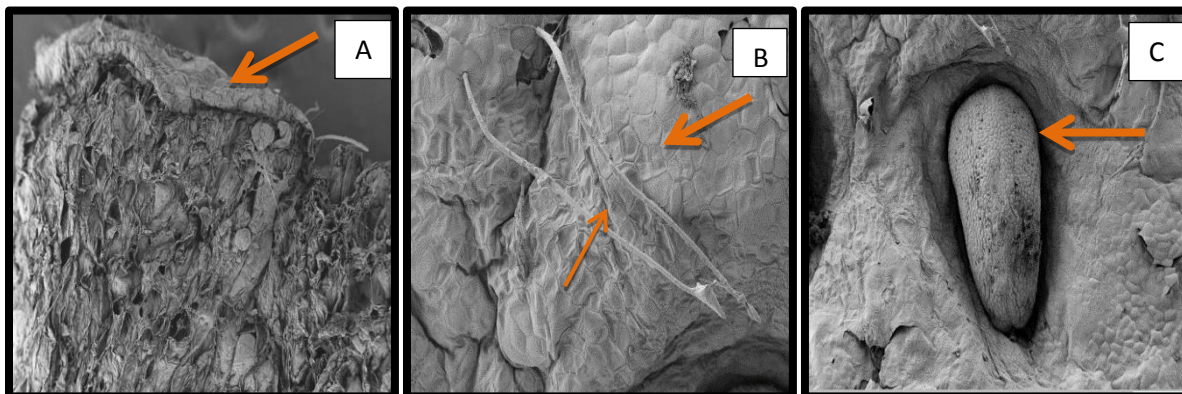


Figura 3.8 Microfotografías electrónicas de muestra fresca de frutillas cortadas en trozos sin inocular a tiempo cero. Corte transversal de la epidermis y subepidermis (A), Células epidérmicas, tricomas y presencia del aquenio (B y C).

La Figura 3.9 corresponde a la muestra de frutilla cortada en trozos sin inocular (control) e incubada a 4 °C a los 21 días de almacenamiento. En la Figura 3.9 A se aprecia como el tejido epidérmico superficial del fruto presenta una estructura celular desorganizada con pérdida de la morfología y tamaño. Además, coincidentemente con los recuentos microbianos descritos anteriormente, se observa presencia de células levaduriformes y bacterias en contraste con la Figura 3.8 A correspondiente al fruto fresco maduro por lo que existe una clara diferencia entre la muestra fresca recién cortada y luego del desarrollo de microorganismos de deterioro como levaduras que permanecieron viables hasta los 21 días de almacenamiento, según lo descrito anteriormente. En las Figuras 3.9 B y C se observan levaduras de forma y tamaño variados pertenecientes a la microbiota autóctona y/o contaminante de la fruta. Así mismo, muchas de estas células muestran diferentes estadios de reproducción asexual mediante brotación o gemación y en alguna de ellas se observan cicatrices consecuentes del proceso de división. En las Figuras 3.9 D y E se aprecia la superficie del aquenio cubierto totalmente por hifas de hongos fitopatógenos totalmente diseminados. En la Figura 3.9 F se observa la presencia de bacterias en plena división celular por fisión binaria. Las Figuras G y H muestran claramente abundantes hifas de hongos contaminantes

con sus respectivos conidios, coincidentemente con las fotografías tomadas en donde se observa la muestra completamente cubierta con un hongo grisáceo de aspecto belloso, muy probablemente *Botrytis cinerea* (*B.cinerea*). Esto podría deberse a que las fresas después de la cosecha perecen rápidamente y los frutos son altamente susceptible a la infección por este hongo filamentosos (Ugolini y col., 2014); este moho gris fitopatógeno representa una de las principales enfermedades de las fresas (*Fragaria* × *ananassa*) que se producen en el campo y post-cosecha (Droby y Lichter, 2007). La Figura H muestra en mayor escala los conidióforos y un gran cúmulo conidios, indicando el elevado grado de contaminación de la muestra. En esta muestra, es interesante destacar que a los 21 días de incubación los microorganismos de deterioro (hongos y levaduras principalmente) no mostraron su integridad celular alterada ni deteriorada, permaneciendo viables después de 3 semanas, lo cual es coincidente con los recuentos en medio YPG-C.

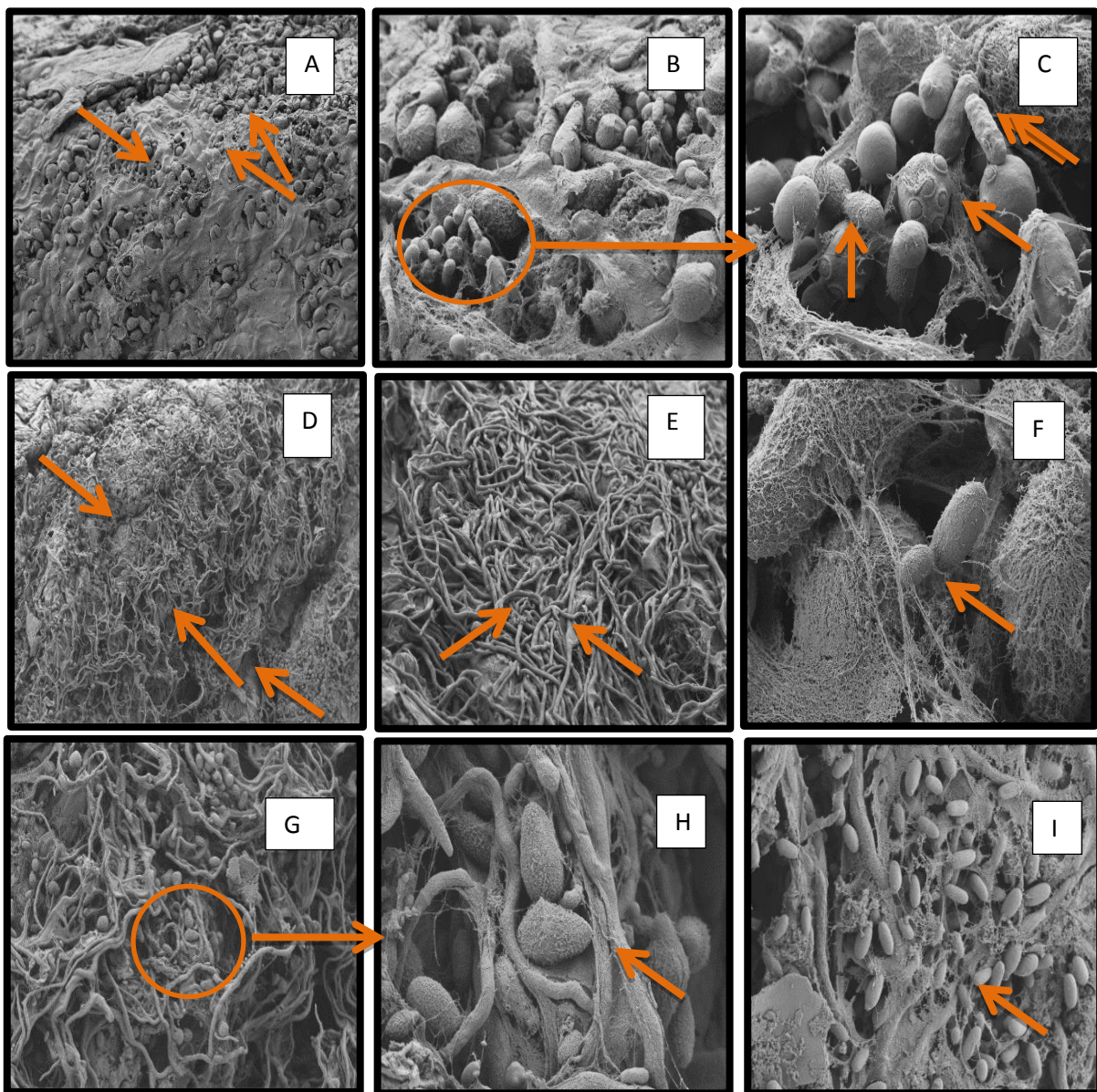


Figura 3.9 Microfotografías electrónicas correspondiente a muestras de frutillas sin inocular e incubada a 4 °C durante 21 días. Superficie de frutilla con presencia de células levaduriformes y bacterias (A), Levaduras en brotación y bacteria en división (B y C), Aquenio contaminado con hifas y conidios de hongos (D), Micelio de hongos contaminantes con conidios y levaduras adheridas (F y G), Conidios adheridos a hifas (H).

La Figura 3.10 corresponde a muestras de frutilla tratadas con CaCl_2 e incubadas a 4 °C a 21 días de almacenamiento, en las cuales se observa el desarrollo de microorganismos de deterioro principalmente levaduras y hongos filamentosos en coincidencia con lo determinado en los recuentos celulares, así como cúmulos de cristales cloruro de calcio. Este hecho explicaría la ausencia de efecto por parte del agente químico al permanecer insoluble en la matriz alimenticia.

En la Figura 3.10 A se puede observar la superficie del aquenio cubierto por hifas de hongos contaminantes. La Figura 3.10 B muestra la presencia de conidióforos y abundantes conidios del moho contaminante. Las Figuras 3.10 C, D y E se observan células levaduriformes con diferentes morfología y tamaño, algunas de ellas con pequeños brotes y dividiéndose y cúmulos de bacterias, confirmando que el tratamiento con CaCl_2 no fue efectivo para controlar la microbiota contaminante de la fruta y por lo tanto no es un método adecuado en las condiciones de ensayo para la conservación de alimentos. La resistencia de hongos filamentosos a diversos tratamientos debe recibir una atención considerable lo que sugiere la necesidad de emplear alternativas a estos métodos, particularmente en la agricultura orgánica donde no se permiten los tratamientos con fungicidas sintéticos (Fernández-Ortuno y col., 2013) , En este sentido los resultados obtenidos son de gran interés. En la Figura 3.10 F se observa depósito de cristales de cloruro de calcio.

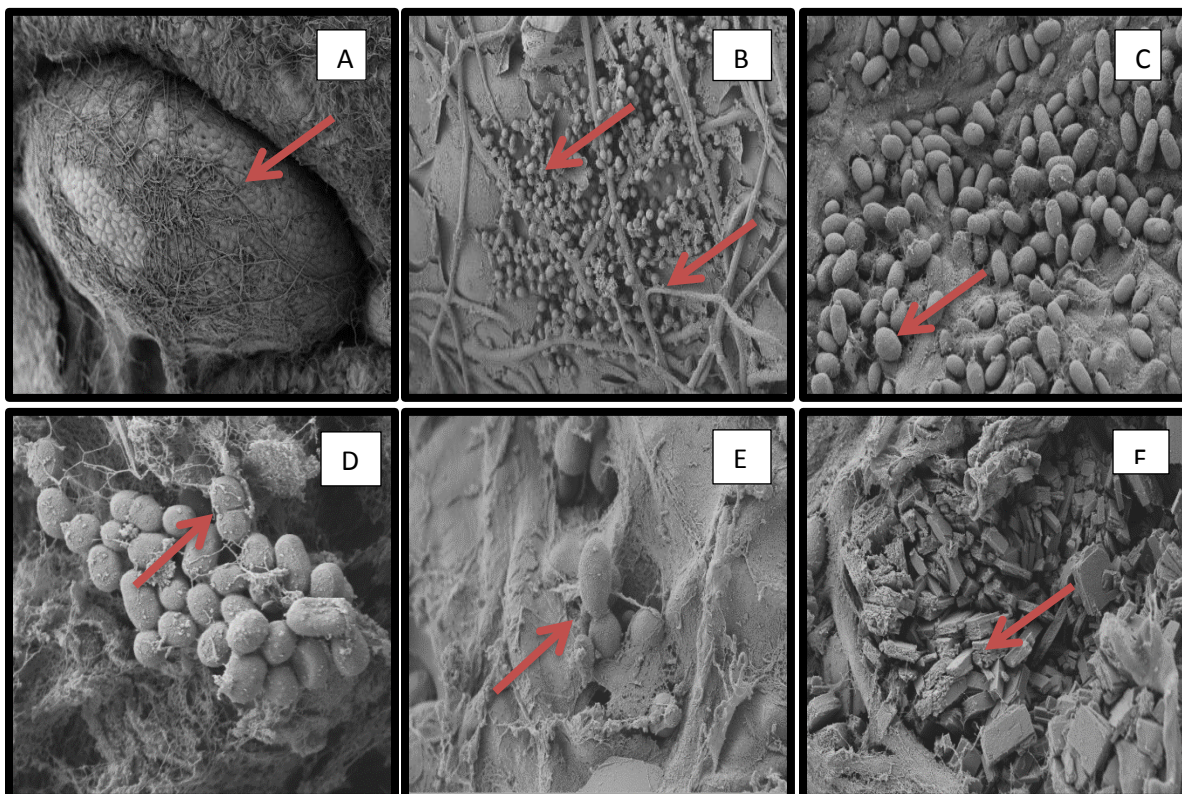


Figura 3.10 Microfotografías electrónicas correspondiente a muestra de frutilla tratada con CaCl_2 e incubada a $4\text{ }^\circ\text{C}$ durante 21 días. Superficie del Aquenio cubierto con abundantes hifas (A), Conidióforos, conidios (B), abundantes levaduras sobre la superficie del tálamo (C), Presencia de bacilos y levaduras en proceso de división sobre superficie del tálamo (D y E), Cristales de Cloruro de calcio (F)

La Figura 3.11 corresponde a muestra de frutillas inoculadas con BAL. En las Figuras 3.11 A y B se puede observar la presencia de la cepa inoculada *L. plantarum* EFf29 sobre las células epidérmicas del aquenio de las frutillas (quizás debido a la estructura celular rugosa del mismo), ausencia de flora contaminante autóctona y/o de deterioro, y con una estructura morfoanatómica muy similar a la muestra fresca (tiempo cero). La Figura 3.11 C muestra la microfotografía de células bacterianas con forma bacilar dispuestas de a pares o en cadenas cortas pertenecientes a la cepa *L. plantarum* EFf29. La Figura 3.11 D muestra las células poligonales de la superficie del tálamo de la frutilla cortada en trozos e inoculado con *L. plantarum* N8, las cuales conservan la morfología, tamaño y estructura celular comparada a la muestra fresca, en oposición a la muestra control de 21 días de almacenamiento, sin inocular, confirmando la efectividad antimicrobiana de la cepa EFf29 para reducir y/o eliminar microorganismos de deterioro y conservar la ultraestructura de los tejidos, lo que se relacionó con la buena apariencia de las mismas. Las Figuras E y F corresponde a un cúmulo de bacilos de la muestra inoculada con la cepa de *L. plantarum* N8, algunos de ellos en pleno proceso de división celular, estas microfotografías resultan interesantes ya que pone de manifiesto la capacidad no sólo de adherencia sino de mantenerse viables incluso a los 21 días de almacenamiento. La Figura G muestra en un corte transversal del fruto, los tejidos internos del tálamo totalmente conservados en tamaño, forma y estructura celular, sin signos de deterioro comparable con la Figura 3.8 A de la muestra en fresco a tiempo cero. Las Figuras H e I corresponden a microfotografías de conidios y conidióforos que perdieron la integridad celular (desintegradas o en vía de desintegración) por efecto de la BAL inoculada, en este caso *L. plantarum* EFf29 las cuales se pueden observar completamente adheridas a la estructura de la hifa. En este aspecto, Lavermicocca y col. (2000) describieron que el ácido 3-feniláctico (PLA) producido por algunas BAL está relacionado con la inhibición de la germinación conidial y la posterior desintegración de hifas de *Penicillium expansum*, *Penicillium. roqueforti*, *Aspergillus flavus*, *A.niger*, *Moniliasitophila*, y *Fusarium graminearum*, entre otros.

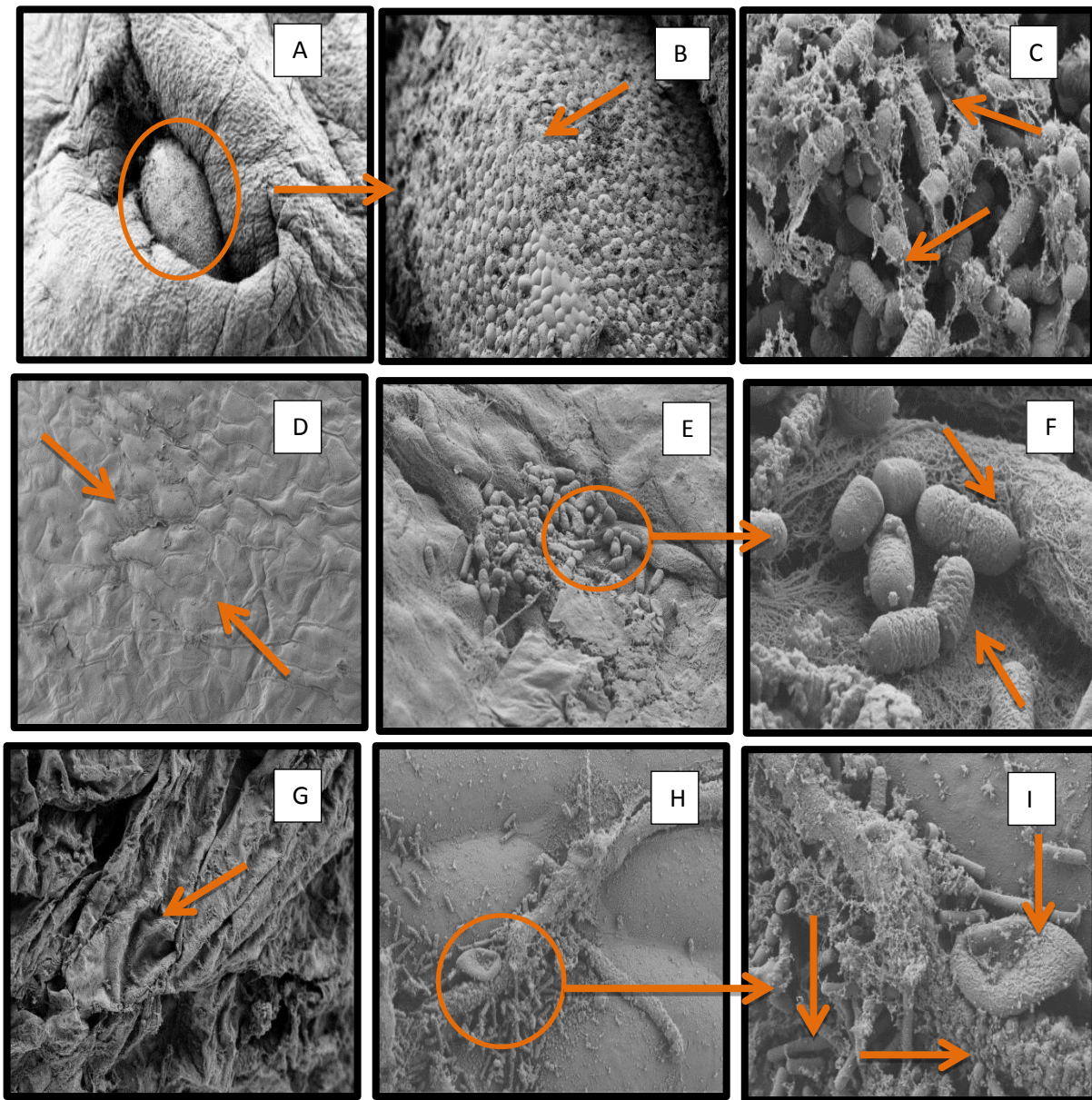


Figura 3.11 Microfotografías electrónicas de muestras de frutillas inoculadas con BAL y almacenadas a 4 °C durante 21 días. Frutilla inoculada con *L. plantarum* EFf29, mayor concentración de *L. plantarum* EFf29 sobre células epidérmicas del aquenio (A, B), Presencia de *L. plantarum* EFf29 sobre la superficie del aquenio (C), Células poligonales de la superficie del tálamo (D), Células con morfología bacilar correspondiente a *L. plantarum* N8 sobre las células superficiales del tálamo (E, F), Estructura de tejidos internos del tálamo totalmente conservados en un corte transversal del fruto (G), conidios y conidióforos que perdieron su integridad celular en presencia de *L. plantarum* EFf29 (H, I).

3.4.3.1.3 Determinación de °Brix y Firmeza en frutilla cortada fermentada

Los resultados de firmeza y sólidos solubles totales (SST) medidos como °Brix en frutilla cortada en trozos fermentada y almacenada a 4 °C durante 21 días se muestran en la Tabla 3.14. Al inicio de la fermentación, la firmeza tuvo un valor de 7,5 ° Brix de SST y de 108 g (promedio de las 3 determinaciones por punción) y, a los 7 días de incubación, se observó una disminución del 100% en el valor de la firmeza en la frutilla control, mientras que en las muestras inoculadas la disminución, en general, fue del 36% comparada con el valor inicial. Respecto a SST en las muestras de frutilla control e inoculadas se detectó una disminución de 48 y 12,85%, respectivamente; es decir en la frutilla inoculada no se modificaron de manera significativa los SST, lo que se relacionó con los resultados descriptos anteriormente. A los 14 días la muestra de frutillas inoculada con EFl29 fue la que presentó la menor reducción en el valor de la firmeza (73%), mientras que en el control, la reducción de la misma fue del 100%. Similares resultados fueron demostrados por Iglesias y col. (2018) quienes no detectaron cambios significativos en los valores de SST al final de un proceso de almacenamiento de 9 días a 5 °C en muestras de peras frescas cortadas y tratadas con *L. rhamnosus* GGAsí como con Abadias y col. (2014) quienes estudiaron el efecto de una cepa biopreservante de *Pseudomonas graminis* CPA-7 en melón fresco cortado y almacenado a 5 y 10° C. En este sentido, de hecho, la maduración de la fruta se caracteriza por el ablandamiento tisular asociado con la degradación enzimática de los compuestos de la pared celular como sustancias químicas y fibras como celulosa, hemicelulosa y lignina (Oms-Oliu y col., 2007). Cabe destacar que en cada fruta los cambios que tienen lugar en la pared celular constituyen un fenómeno particular, debido a que cada fruto posee diferencias en la composición de los polímeros que la integran. Por ende, una batería enzimática específica inciden en la dinámica de ablandamiento de cada fruto, lo que constituye un problema para la adecuada conservación de su calidad (Carrasco-Orellana y col., 2018). Esto podría ser el motivo principal de la mayor pérdida de firmeza en la frutilla, en comparación con otras frutas. En nuestro estudio, las cepas inoculadas ayudaron a mantener la

firmeza de los tejidos (al menos hasta los 7 días), posiblemente al inhibir actividades enzimáticas involucradas en el proceso como consecuencia de la rápida acidificación del medio.

Tabla 3.14 Parámetros de calidad de JMN fermentado con cepas de BAL seleccionadas e incubado a 4 °C durante 21 días.

Tiempo	Cepa	Parámetros de Calidad	
		Firmeza (gr)	° Brix
0	<i>L. plantarum</i> N8	105±4,8	7,5±0,40
	<i>L. plantarum</i> EFf29	110±5,2	7,6±0,38
	<i>L. plantarum</i> EFj18	108±5,9	7,6±0,34
	Control	110±5,6	7,6±0,33
7 días	<i>L. plantarum</i> N8	70±4,2	6,5±0,35
	<i>L. plantarum</i> EFf29	70±3,8	6,8±0,36
	<i>L. plantarum</i> EFj18	68±3,7	6,7±0,4
	Control	0	4±0,2
14 días	<i>L. plantarum</i> N8	0	4,5±0,18
	<i>L. plantarum</i> EFf29	25±1,1	5±0,24
	<i>L. plantarum</i> EFj18	0	4,0±0,18
	Control	0	4±0,2
21 días	<i>L. plantarum</i> N8	0	4,4±0,23
	<i>L. plantarum</i> EFf29	12±1,2	4,7±0,21
	<i>L. plantarum</i> EFj18	0	3,8±0,22
	Control	0	0

Los valores representan los promedios de dos experimentos ± desviación estándar

3.4.3.2 Manzanas cortadas en trozos

3.4.3.2.1 Recuentos microbianos en manzanas

La Tabla 3.15 muestra la evolución de los recuentos microbianos obtenidos durante el almacenamiento de manzanas cortadas control y almacenada a temperatura abusiva (30 °C). En la muestra control, los recuentos de BAL y levaduras autóctonas en medios MRS y YPG-C (carga inicial de 5,85 U log y no detectada) incrementaron hasta valores máximos de 8,39 y 7,39 U log a los 7 días respectivamente, luego se mantuvieron constantes hasta 21 mientras que, en SSA y Mac Conkey agar los máximos recuentos se registraron a los 2 días con incrementos de alrededor 3

unidades logarítmicas, sin detectarse células viables a 7 y 14 días respectivamente. En esta condición, la presencia de BAL inoculadas inhibió el crecimiento microbiano similarmente como se observó en frutillas trozadas, no detectándose células viables en ningún tiempo y condición ensayada, excepto en medio Mac Conkey inoculado con *L. plantarum* EFj18 cuya inactivación completa ocurrió recién a los 14 días, de manera que las cepas más efectivas fueron *L. plantarum* N8 y EFF29, lo que estuvo de acuerdo con lo observado en frutillas. Al igual que en frutilla en esta matriz no se evaluó el efecto del inoculo combinado dado que en JMN éste, en general no fue significativamente más efectivo que lo determinado para los inoculos individuales. El agregado de CaCl₂, en general no tuvo efectos antagónicos significativos sobre la microbiota autóctona determinada en medios YPG-C y Mac Conkey, aunque sí fue más notorio en medio SSA produciendo inactivación total a 7 días (Tabla 3.15). Así, las BAL inoculadas inhibieron la microbiota autóctona bacteriana y levaduriforme contaminante de manzanas trozadas, listas para consumo, almacenadas a 30 °C, mientras que ellas crecieron alrededor de 2 unidades logarítmicas en concordancia con lo observado en frutillas trozadas.

En manzana cortada en trozos almacenada a 4 °C los máximos recuentos en MRS e YPG-C correspondientes a 6,99 y 5,80 log ufc/g se detectaron a 2 días, mientras que en medios SSA y Mac Conkey agar no se detectaron células viables y el recuento inicial de 3,92 log ufc/g permaneció, sin crecer, viable hasta los 14 días inclusive respectivamente. En presencia de BAL inoculadas, las cuales no crecieron pero sí permanecieron viables durante todo el período de almacenamiento, se observó, en general, una completa inactivación de la carga microbiana a 2 días en medios YPG-C y SSA mientras que en medio Mac Conkey este efecto tuvo lugar a los 14 días. El agregado de CaCl₂, en general no tuvo efectos antagónicos significativos en los medios YPG-C y Mac Conkey hasta los 21 días (Tabla 3.16).

Tabla 3.15 Recuento microbiano en diferentes medios de muestras de frutilla trozadas e inoculadas con cepas de *L. plantarum* e incubadas a 4 °C durante 21 días

Recuento microbiano (log ufc/g) en los siguientes medios a diferentes tiempo (días)																				
Lote	MRS					YPG-C					SSA					MC				
	0	2	7	14	21	0	2	7	14	21	0	2	7	14	21	0	2	7	14	21
Control	5,85 ^A	7,5 ^A	8,39 ^{A,D}	8,40 ^A	7,80 ^A	ND	5,90 ^A	7,90 ^A	6,80 ^A	5,17 ^A	ND	2,80 ^A	ND	ND	ND	3,80 ^A	6,90 ^A	4,39 ^A	2,40 ^A	ND
<i>L. plantarum</i> N8	6,77 ^B	8,40 ^{B,C}	7,43 ^B	7,00 ^B	6,12 ^B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,90 ^A	ND	ND	ND	ND
<i>L. plantarum</i> EFF18	6,61 ^B	8,10 ^B	8,00 ^{C,D}	7,50 ^C	6,13 ^B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,90 ^A	6,90 ^A	3,17 ^B	ND	ND
<i>L. plantarum</i> EFF29	6,71 ^B	8,50 ^C	8,2 ^{A,D}	7,80 ^C	6,20 ^B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,85 ^A	ND	ND	ND	ND
CaCl ₂	5,90 ^A	6,46 ^D	7,30 ^B	7,20 ^{B,C}	6,20 ^B	ND	5,8 ^A	4,90 ^B	3,90 ^B	ND	ND	2,30 ^B	ND	ND	ND	3,93 ^A	3,46 ^B	3,23 ^B	3,10 ^B	ND

ND: No Detectado

Los valores corresponden a los promedios de tres experimentos

Valores con diferentes letras como superíndice dentro de cada columna son significativamente diferentes de acuerdo al test Tukey (P < 0,05)

Tabla 3.16 Recuento microbiano en diferentes medios de muestras de frutilla trozadas e inoculadas con cepas de *L. plantarum* e incubadas a 4 °C durante 21 días

Recuento microbiano (log ufc/ml) en los siguientes medios a diferentes tiempo (días)																				
Lote	MRS					YPG-C					SSA					MC				
	0	2	7	14	21	0	2	7	14	21	0	2	7	14	21	0	2	7	14	21
Control	5,85A	6,99 ^A	6,90 ^A	6,85 ^A	6,60 ^A	ND	5,80 ^A	5,17 ^A	3,10 ^A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,92 ^A	2,99 ^A	2,90 ^A	2,50 ^A	ND
<i>L. plantarum</i> N8	6,80B	6,85 ^{A,C}	6,80 ^A	6,82 ^A	6,50 ^{A,B}	ND	5,70 ^A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,90 ^A	3,17 ^B	3,94 ^B	1,10 ^B	ND
<i>L. plantarum</i> EFf18	6,62C	6,58 ^B	6,57 ^B	6,53 ^B	6,25 ^B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,80 ^A	4,17 ^C	3,90 ^B	ND	ND
<i>L. plantarum</i> Ff29	6,68C	6,70 ^{B,C}	6,80 ^A	6,79 ^A	6,35 ^{B,A}	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,86 ^A	3,90 ^D	2,50 ^C	ND	ND
CaCl ₂	5,88A	5,86 ^D	5,85 ^C	5,26 ^C	5,11 ^C	ND	6,30 ^B	4,90 ^B	2,40 ^B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,87 ^A	4,47 ^E	4,25 ^D	3,91 ^C	ND

ND: No Detectado

Los valores corresponden a los promedios de tres experimentos

Valores con diferentes letras como superíndice dentro de cada columna son significativamente diferentes de acuerdo al test Tukey (p<0,05)

Capítulo 3

De este modo, las BAL inoculadas, fueron capaces de inactivar rápidamente la microbiota levaduriforme y acelerar la tasa de muerte de bacterias potencialmente patógenas determinadas en medio Mac Conkey, sin embargo no evitaron el amarronamiento de las muestras a diferencia de lo observado en presencia de cloruro de calcio (Figura 3.12). Sin embargo, en esta condición se observó que su textura fue alterada por deshidratación (Figura 3.12 B) al igual que en la manzana sin inocular luego de 21 días (Figura C), aunque en este caso también se aprecia la presencia de un hongo filamentoso de color negro, muy probablemente perteneciente a *Aspergillus* sp. Las Figuras 3.12 D, E y F corresponde a las manzana cortadas en trozos e inoculadas con BAL luego de 21 días de almacenadas a 30 °C, las cuales no conservaron su color respecto a la muestra sin inocular a tiempo cero, produciéndose empardecimiento de la fruta como se comentó anteriormente pero mantuvieron la firmeza y textura de los tejidos de modo adecuado excepto la muestra inoculada con la cepa N8. En ningún caso se observó signos visibles de contaminación microbiana en concordancia con el análisis microbiológico realizado.

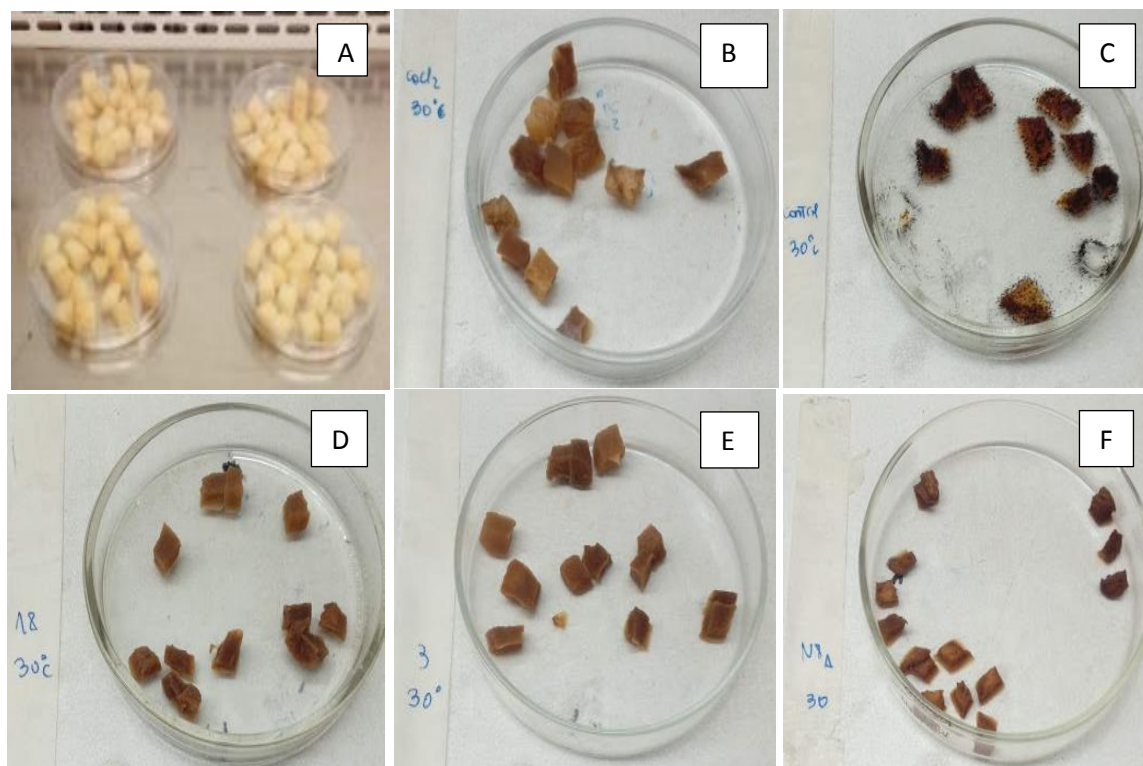


Figura 3.12 Fotografías de muestras de manzanas cortadas en trozos, sin inocular a tiempo cero (A) y a 21 días de incubación a 4 °C: tratada con 1,5% CaCl₂ (B) sin inocular (C), e inoculadas con *L. plantarum* EFj18 (D), *L. plantarum* EFf29 (E), *L. plantarum* N8 (F).

3.4.3.2.2 Microscopía electrónica de manzanas cortadas en trozos

Se observó, al igual que para las frutillas trozadas, mediante microscopía electrónica muestras de manzanas cortadas en trozos en diferentes condiciones de ensayo (Figuras 3.13). Las microfotografías obtenidas de las muestras de manzanas frescas, recién cortadas en trozos pequeños, en corte transversal, muestra una porción de la parte comestible del fruto (hipanto) constituido por una capa de células epidérmicas superficiales cutinizadas con abundantes ceras, sin estomas y, varias capas de células colenquimáticas subepidérmicas, fuertemente cohesionadas, sin espacios intercelulares (Figura 3.13 A). Los tejidos más internos del hipanto muestran células y espacios intercelulares en un arreglo en forma de red. En las Figuras 3.13 B y C se puede apreciar células poliédricas redondeadas, bien turgentes, con paredes celulares consistentes. Los espacios intercelulares se presentan de varias formas y tamaños, siendo irregulares, algunos de ellos alargados.

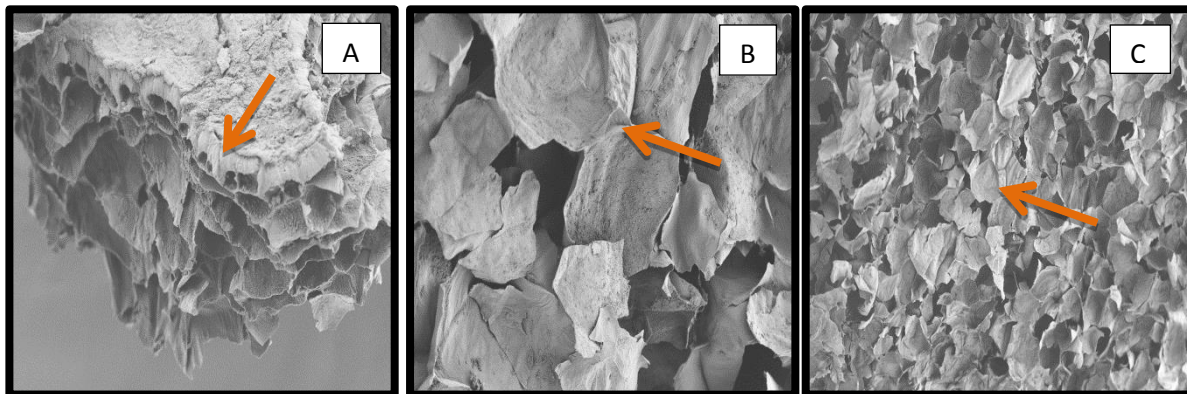


Figura 3.13. Microfotografías electrónicas correspondiente a muestras de manzana frescas cortadas en trozos sin inocular a tiempo cero. Corte transversal de epidermis y subepidermis (A), Células del tejido interno del hipanto (B y C):

En la Figura 3.14 A se aprecia desorganización de la estructura y contenido celular de los tejidos internos del tálamo de la manzana sin inocular después de 21 días de almacenamiento, con pérdida de morfología, tamaño y de la disposición en forma de red celular, lo que se relacionó con la pérdida de textura y, firmeza de la muestra (Figura 3.14 A). Así mismo, se apreció una disminución del número y tamaño de los espacios intercelulares, posiblemente debido a la deshidratación considerable de los tejidos por el crecimiento de microorganismos contaminantes

demostrado en el análisis microbiológico. La actividad de agua (a_w) es uno de los factores ambientales claves que influyen tanto en la tasa de deterioro de frutas por los hongos como en la producción de micotoxinas (Magan y Aldred, 2007). En la Figura 3.14 B se observan abundantes hifas de hongo filamentoso, lo que concuerda con el aspecto registrado en las fotografías donde se aprecia la superficie cubierta con un moho veloso de color negro negro. Se ha reportado especies de *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus japonicus/aculeatus* como responsables frecuentes de pudriciones a campo y post cosecha en manzanas, peras, duraznos, cítricos, uvas, higos, berries, tomates, melones, etc.) (Perrone y col., 2007). En la Figura 3.14 C se puede observar células con morfología bacilar

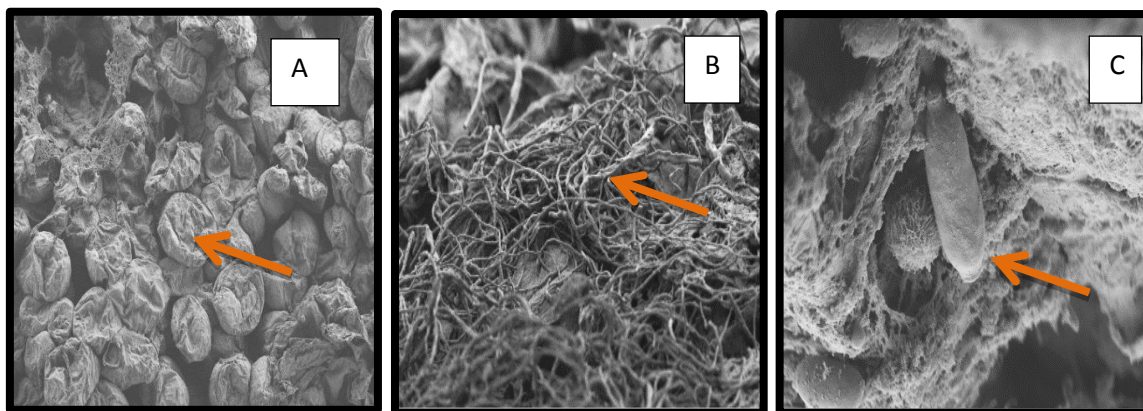


Figura 3.14. Microfotografía electrónica de manzana cortadas en trozos sin inocular (control) luego de 21 días de almacenamiento. Tejidos internos del hipanto (A), conjunto de hifas sobre células epidérmicas superficiales B), células con morfología bacilar (C)

La Figura 3.15 corresponde a muestras de manzana cortadas e inoculadas con la cepa *L. plantarum* EFF29 a 30 °C durante 21 días de almacenamiento. La Figura 3.15 A muestra un corte transversal del tejido interno del hipanto, donde se conservan la morfología, tamaño y estructura celular comparados con la microestructura de la fruta fresca, se observa claramente la disposición en forma de red de las células, sin embargo, se aprecia un ligero engrosamiento de las paredes celulares y menor número de espacios intercelulares. A pesar de ello, la microestructura no se modificó significativamente, lo que se relaciona con la adecuada textura y apariencia de las muestras inoculadas comparables a la fruta fresca, recién cortada excepto por el pardeamiento de las

mismas. Desde el punto de vista microbiológico en las muestras inoculadas, solamente se aprecia la presencia de cúmulos de bacilos con morfología celular típica de las cepas inoculadas, lo que estuvo de acuerdo con sus efectos antagónicos sobre la microbiota bacteriana, levduriforme y fúngica demostrada en los resultados obtenidos. La figura 3.15 B corresponde a la muestra inoculada con la cepa *L. plantarum* EFf29. Se observa que las células bacilares presentan afinidad para localizarse en las zonas de la laminilla media bien definida y de alta densidad en contacto con las paredes celulares y en las zonas de contacto triangular de tres o más células. En la Figura 3.15 C, se observan células con morfología bacilar en cadenas cortas pertenecientes a la cepa inoculada de *L. plantarum* EFf29 sobre la superficie catonizada de células epidérmicas de las muestras de manzana.

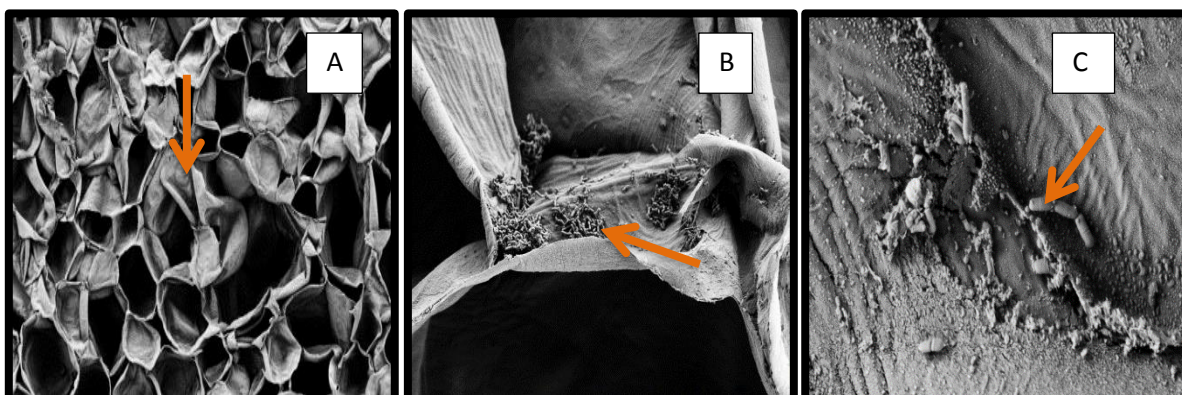


Figura 3.15. Microfotografía electrónica correspondiente a manzana inoculada con *L. plantarum* EFf29 después de 21 días de almacenamiento a 30 °C. Tejidos internos del hipanto conservados (A), presencia de *L. plantarum* EFf29 en la zona de laminilla media en contacto con ambas células (B), Bacilos en cadenas cortas pertenecientes a la cepa *L. plantarum* EFf29 sobre la superficie de trozos de manzana.

Los resultados obtenidos en manzanas trozadas, como en frutillas trozadas, listas para consumo, inoculadas, resultan muy novedosos y con elevado potencial de aplicación biotecnológica, ya que muestra el potencial efecto biopreservante de BAL seleccionadas contra bacterias, levaduras y hongos alterantes y potencialmente patógenos contaminantes de las matrices en estudio. En este sentido, la microscopía electrónica confirmó los resultados obtenidos, además de demostrar claramente el efecto antifúngico de las cepas inoculas no estudiado particularmente en este trabajo de Tesis pero que se proyecta investigar dado el enorme interés que presenta. Se ha reportado que los hongos filamentosos y las levaduras son la

principal causa de deterioro de frutas provocando pérdidas devastadoras de cultivos, de frutas postcosecha y frescas en todo el mundo, Abbaszadeh y col. (2017) en este sentido investigaron la capacidad de BAL para inhibir el crecimiento de diversos hongos, incluyendo *A. niger* y encontraron elevada actividad antifúngica coincidentemente con nuestros resultados. Chen y col., 2008 y Lavermicocca y col., 2000 demostraron que *Lactobacillus alimentarius*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Ln citreum* y *L. plantarum* produjeron diversos tipos de ácidos durante su crecimiento que fueron capaces de inhibir algunas especies de hongos. Coincidentemente con nuestros resultados, Ryu y col. (2014) detectaron actividad antifúngica de *L. plantarum* HD1 y la misma fue significativamente mayor en comparación con otros conservantes de alimentos aprobados en elevadas concentraciones. En el presente estudio, cabe resaltar que las cepas seleccionadas e inoculadas en las matrices alimentarias ensayadas, incluido JMN resultaron muy efectivas en cuanto a su actividad antimicrobiana, e incluso notablemente mayor que la del agente químico ensayado en las frutas MP, que en general se comportó de manera similar al control, sin tratar.

La efectividad antimicrobiana de las cepas de *L. plantarum* seleccionadas en las matrices vegetales fue en general mayor para las cepas EFf29 y N8, las cuales, además de sus propiedades cinéticas, acidificantes y elevado potencial láctico como fue demostrado en el Capítulo 2 y luego en el JMN, se destacan por producir sustancias con propiedades antimicrobianas activas contra bacterias patógenas de naturaleza proteica y peróxido de hidrógeno respectivamente de acuerdo a lo descrito en el Capítulo 1. En este sentido nos proponemos profundizar las investigaciones dado el gran potencial que demostraron estas bacterias como agentes de biocontrol, que además le aporten valor agregado al producto final, manteniendo sus cualidades sensoriales. BAL con compuestos antifúngicos de origen proteico, así como compuestos de bajo peso molecular como reuterina, ácidos carboxílicos y sus derivados, ácidos grasos y sus derivados, dipéptidos cíclicos, entre otros han sido reportados (Wang y col., 2012; Li y col., 2012). Bouroni y col. (2012) ha descrito el efecto inhibitorio de ácidos láctico y acético, producido por *Lactobacillus* sp. contra microorganismos patógenos y de

deterioro en matrices alimentarias. Estos ácidos orgánicos débiles son capaces de difundir a través de la membrana citoplasmática de células y provocar la acidificación del citoplasma, inhibiendo la glucólisis, debido a la sensibilidad de sus enzimas a bajo pH (Stoyanova y col., 2012). De este modo, las formas protonadas y disociadas de dichos ácidos en el interior de las células, causan alteraciones en las funciones metabólicas, como en la síntesis de proteínas e inhibición de la síntesis de ATP (Melo y col., 2017). Por otro lado, es interesante resaltar que las BAL inoculadas fueron capaces de inactivar la microbiota contaminante de las frutas MP aún a temperatura de refrigeración, condición en la que no desarrollaron, aunque si mantuvieron una elevada sobrevivencia. Así, este resultado está de acuerdo con la producción de otras sustancias de naturaleza diferente, además de competencia por sustrato y acidez, implicadas en el control de la microbiota contaminante de jugo y frutas MP.

2.5 CONCLUSIONES PARCIALES

➤ Se evaluó el comportamiento de tres cepas seleccionadas *L. plantarum* N8, EFj18 y EFF29 por sus propiedades antimicrobianas, de crecimiento, metabólicas y tecnológicas "in situ", empleando tres matrices alimentarias:

- Jugo mixto fresco de manzana y naranja, cuya composición, 2 partes de manzana, 1 parte de naranja fue ensayada y seleccionada por sus atributos sensoriales (olor, aspecto y sabor) por un panel de catadores no entrenados (JMN, 2:1).
- Frutas cortadas en trozos (MP), listas para consumo que formaron parte de las muestras de ensaladas de frutas empleadas en los ensayos de aislamiento de BAL. Específicamente, manzanas MP la cual fue seleccionada por la gran aceptación por parte del consumidor y frutilla, la cual además de su amplio consumo es un cultivo de gran importancia en la provincia.

- **Los ensayos en JMN, 2:1 a 30 y 4 °C demostraron:**
- A 30 °C, se manifestó un significativo incremento de la población autóctona constituida por BAL, levaduras y bacterias potencialmente patógenas en 48 h de incubación, las cuales permanecieron viables hasta 14 días.
 - En esta condición, la inoculación de las cepas seleccionadas inhibió el crecimiento de la microbiota bacteriana y levaduriforme autóctona, produciendo su completa inactivación en 7 días, excepto para la población levaduriforme, lo cual fue acompañada por una rápida acidificación del medio.
 - Los cambios producidos en los perfiles de utilización de azúcares y ácidos orgánicos y metabolitos producidos confirmaron el efecto inhibitorio sobre la microbiota láctica autóctona. Las BAL inoculadas consumieron mayores cantidades de azúcares, completamente los ácidos orgánicos y produjeron elevados niveles de ácido láctico en relación con su metabolismo homofermentativo de glucosa, mientras que la microbiota láctica autóctona predominante sería heterofermentativa obligada.
 - La actividad antagónica de las BAL inoculadas también fue observada a 4 °C. A esta temperatura la microbiota autóctona levaduriforme y de cepas potencialmente patógenas fue capaz de crecer y sobrevivir a elevadas densidades en JMN sin inocular, lo que representa un riesgo para la salud. Por lo tanto el efecto antimicrobiano de las cepas inoculadas indica la necesidad de aplicar en forma combinada ambos parámetros para asegura la calidad sanitaria de jugos naturales conservados a temperatura de refrigeración.
 - A 4°C no se produjeron cambios significativos en el pH y la disminución de los sustratos residuales fue menor que a 30 °C, lo que se relacionó con la ausencia de crecimiento microbiano y sobrevida de las BAL inoculadas. Sin embargo las cepas inoculadas, especialmente N8 y EFf29 manifestaron un marcado efecto inhibitorio lo que se relacionaría con sus capacidades para producir otra sustancia, además de ácidos orgánicos, tales como peróxido de hidrógeno y de naturaleza proteica.

- En general los compuestos fenólicos totales, las actividades antioxidantes y el contenido de vitamina C mostraron un ligero incremento en dos días en los jugos fermentados a 30 °C, indicando que las BAL tuvieron un efecto positivo, aunque no fue muy marcado. A 4°C no se observaron diferencias significativas respecto al control.
- El análisis sensorial demostró que los jugos fermentados con cepas individuales y almacenados a 4 °C obtuvieron puntajes significativamente más elevados para los atributos analizados, comparado con el control. El jugo mejor aceptado fué el inoculado con *L. plantarum* EFF29, la cual, a su vez, presentó la mayor efectividad antimicrobiana. A 30 °C, los JMN con mejor aceptabilidad fueron los inoculados con *L. plantarum* EFF29 y la combinación de las tres cepas de BAL.
- El inóculo combinado de las tres cepas en JMN mostró una tendencia similar a los jugos inoculados individualmente, especialmente en presencia de EFF29 y N8.
- El cloruro de calcio en general se comportó en forma similar al control.

➤ **En frutas MP, listas para consumo:**

- En frutillas MP, se detectó crecimiento microbiano en los medios de prueba similarmente como en JMN a 30 °C, lo que confirma la necesidad de aplicar un método de conservación.
- La inoculación de las frutillas MP con *L. plantarum* N8, EFF29 o EFj18 inhibió el crecimiento de la población autóctona levaduriforme y bacteriana produciendo su completa inactivación a dos días de incubación, excepto EFj18 que lo hizo más lentamente sobre la población levaduriforme (7 días).
- A 4 °C, también se observó un marcado efecto antagónico sobre la microbiota levaduriforme y de cepas potencialmente patógenas, capaces de crecer y/o sobrevivir en la matriz sin tratar, especialmente en presencia de *L. plantarum* N8 y EFF29. La microscopía electrónica confirmó el efecto inhibitorio sobre bacterias y levaduras así como la actividad antifúngica de las cepas seleccionadas.

- Las matrices inoculadas conservaron una apariencia y textura adecuada, similar a las frutas frescas recién procesadas a diferencia del control sin tratar.
- El CaCl_2 , fue menos efectivo que las cepas inoculadas, comportándose en la matriz de manera similar al control.
- En manzanas MP, se observaron resultados similares a los de frutillas MP. De este modo la inoculación con las tres BAL impidió el crecimiento de la microbiota natural, manteniendo la textura y ultraestructura de los tejidos como lo confirmó la microscopía electrónica.
- Además mediante la microscopía electrónica se observó un marcado efecto antifúngico en las matrices ensayadas.
- De este modo, los resultados novedosos y con gran potencial de aplicación demostraron la capacidad de las cepas seleccionadas, especialmente *L. plantarum* N8 y EFf29 para controlar la microbiota autóctona, manteniendo e incluso mejorando ciertos atributos nutricionales y organolépticos tanto a temperatura abusiva y de refrigeración.
- Cabe destacar que en manzana MP, aun cuando la fruta se conservó microbiológicamente, así como la ultraestructura de sus tejidos, la inoculación con las BAL no pudo evitar el pardeamiento enzimático o químico de la fruta a diferencia del CaCl_2 . En frutillas se obtuvieron excelentes resultados en cuanto a su apariencia, textura y control microbiológico y por lo tanto proponemos continuar las investigaciones en dicha matriz alimenticia de gran importancia regional.



*CONCLUSIONES
FINALES*



CONCLUSIONES FINALES

➤ **Aislamiento e identificación de la microbiota de hortalizas y frutas MP, listas para consumo:**

- La carga microbiana de ensalada de frutas (EF) fue superior a la de ensalada de hortalizas (EH), independientemente del origen de la muestra. En EF las BAL fueron predominantes, mientras que en EH las levaduras, aún cuando se aislaron BAL en proporción alrededor de 1 ciclo log menor.
- En ambas matrices alimentarias, se obtuvieron recuentos positivos en medios sólidos PCA y Mac Conkey de microorganismos potencialmente alterantes y patógenos. Este resultado resalta la importancia de caracterizar BAL autóctonas de frutas y hortalizas frescas o MP para su potencial aplicación como agentes de biocontrol de dichos alimentos.
- La caracterización fenotípica de 81 aislados de EF y EH de elaboración local demostró, por primera vez, la presencia de cuatro géneros comunes de BAL con aptitud para crecer eficientemente en medios ácido; siendo *Lactobacillus* y *Leuconostoc* predominantes en cada una de ellas, respectivamente.

➤ **Actividad antimicrobiana de los aislados caracterizados en esta Tesis Doctoral y de las cepas de frutas y hortalizas frescas no procesadas frente a cepas indicadoras (*S. Typhimurium*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes* y dos cepas de *E. coli*), cuyas especies han sido asociadas a intoxicaciones alimentarias:**

- Casi la mitad de las BAL evaluadas presentaron actividad antagónica fuerte al menos frente a tres de las cinco bacterias indicadoras ensayadas, lo que representó un total de 48 cepas.
- En orden decreciente las BAL de hortalizas, frutas o EF y finalmente de EH presentaron mayor grado de efectividad antimicrobiana.

- Las actividades antimicrobianas estuvieron relacionadas principalmente a acidez y, en menor medida a producción de peróxido de hidrógeno (cepas *L. plantarum* N4, N8 y JNB25 aisladas de naranjas), o de una sustancia de naturaleza proteica inhibida por tripsina (*L. plantarum* EFf29 y EFj47 aisladas de EF, *L. plantarum* SB2, SB5 y JP11 aisladas de berenjenas y pimientos respectivamente). Sin embargo, en algunas bacterias la naturaleza antimicrobiana no pudo ser completamente establecida.
- Se destaca la producción de peróxido de hidrógeno por las tres aisladas de naranja, indicando que ésta es una propiedad bastante común en bacterias provenientes del citado nicho ecológico.
- En base a los resultados obtenidos se realizó una segunda selección de cepas (19), 11 de frutas o EF y 8 de hortalizas o EH para evaluar el modo de acción antimicrobiano en SLC.
- El modo de acción de las 19 cepas seleccionadas por sus propiedades antagónicas fue, en general bactericida en forma total o parcial, siendo este efecto más pronunciado en las 11 cepas de frutas/EF, lo que les da un valor adicional para su potencial aplicación como agentes de biocontrol en matrices alimenticias. Por lo tanto, este grupo de 11 bacterias se seleccionó para continuar con las investigaciones propuestas,

➤ **Crecimiento bacteriano en diferentes condiciones de cultivo, capacidad acidificante y actividades metabólicas de cepas seleccionadas:**

- En medios de laboratorio y natural, MRS y jugo multifruta pasteurizado y clarificado de origen comercial (JMC), en general, las bacterias seleccionadas crecieron adecuadamente y mostraron buena capacidad acidificante, la cual fue mayor en medio de laboratorio, pH 6,5. Sin embargo, se produjeron diferencias significativas dependiendo de la cepa, presentando las cepas de *L. plantarum* y especialmente EFf29, N8, JNB25, EFJ18, EFj47 y EFj24, las mejores respuestas en término de velocidades de crecimiento y, capacidad acidificante..
- En medio MRS, todas las cepas ensayadas formaron ácido láctico a partir de glucosa, sin

embargo, *Ln* ssp. EFf6 presentó el menor rendimiento, además, de formación de ácido acético y etanol lo que se relacionó con su metabolismo heterofementativo obligado. Contrariamente las cepas de *L. plantarum* principalmente produjeron ácido láctico con rendimientos superiores a 1,0 mmol:mmol, especialmente las cepas destacadas anteriormente lo que se relacionó con sus notables efectos antimicrobianos.

- Estudios de inactivación de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* en JMC inoculados con las seis cepas de *L. plantarum*, N8, JNB25, EFJ18, EFj24, EFj47 y EFf29 a 30 C confirmaron su acción antimicrobiana en una matriz alimenticia, especialmente cuando ésta fue neutralizada, condición en que las BAL inoculadas, inhibieron tanto sus crecimientos así como incrementaron su tasa de inactivación, sin detectarse células de *S. Typhimurium* en 48 horas de incubación.

- De este modo, los resultados obtenidos "in vitro" se correlacionaron con los observados en el medio natural.

- La presencia de una mezcla de compuestos fenólicos puros, naturalmente presentes en vegetales, no afectó e incluso mejoró el crecimiento bacteriano, sugiriendo que los mismos fueron utilizados por las BAL en estudio, especialmente la cepa EFj47. Esta propiedad podría favorecer la formación de nuevos metabolitos con propiedades funcionales mejoradas. Por otro lado, dichos compuestos podrían ser usados como fuente adicional de carbono y energía.

- En base a los resultados obtenidos se seleccionaron las cepas *L. plantarum* N4, N8, JNB25, EFj18, EFj24, EFj47 para continuar las investigaciones.

- Las cepas de EF aisladas en esta Tesis Doctoral se identificaron a nivel molecular, mediante PCR específica de especie y la secuenciación de ADNr 16S. Los resultados confirmaron la identificación fenotípica. Se evaluaron, entonces sus propiedades tecnológicas y nutricionales.

➤ **Propiedades tecnológicas y nutricionales de cepas seleccionadas de *L. plantarum*:**

- En general no presentaron resistencia a los antibióticos ensayados, excepto amoxicilina,

CONCLUSIONES FINALES

siendo N8 la más susceptible a amoxicilina. Esto es beneficioso para su uso en alimentos.

- No mostraron capacidad para producir las aminas biógenas putrescina, tiramina, cadaverina e histamina en medio mínimo decarboxilasa a partir de sus respectivos aminoácidos precursores, las cuales pueden ser tóxicas para el consumidor.
- Catabolizaron arginina, lo que alcalinizó el medio, posiblemente a través del sistema ADI. Esta propiedad les ofrecería una ventaja competitiva a las células para crecer en medios ácidos debido a la producción de amonio y energía adicional en forma de ATP.
- En general, presentaron elevados porcentajes de hidrofobicidad, excepto *L. plantarum* N8, lo que influiría en su capacidad de adhesión.
- Las cepas ensayadas fueron capaces de inhibir moderadamente la formación de biofilm de *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*, lo que favorecería su actividad antimicrobiana frente a patógenos.
- Sin embargo, presentaron capacidad moderada o débil para formar biofilm, siendo esta propiedad destacada en orden decreciente en *L. plantarum* EFj18, EFj24 o EFf29 y EFj47, N8 o JNB25 en las condiciones de ensayo.
- Todas las cepas desarrollaron eficientemente en el medio químicamente definido para *L. planarum*, LPMS. En general, presentaron bajo requerimientos en vitaminas. Solamente pantotenato de calcio y niacina fueron esenciales para EFj24, EFj47 y JNB25, siendo EFj24 las más exigente. Contrariamente las cepas *L. plantarum* N8, EFj18 y EFf29 no presentaron auxotrofia, siendo las vitaminas (NE) y en menor número (S) para su crecimiento. Esta propiedad favorecería su uso en las matrices alimenticias, al otorgarle una ventaja competitiva frente a microorganismos más exigentes nutricionalmente. Además, se relacionaría con una mayor capacidad biosintética, lo que podría influir positivamente en la composición nutricional del alimento biopreservado.
- El análisis mediante el programa Permutmatrix, dividió a las cepas en dos grupos: (A) que mostraron, en general, las mejores propiedades ensayadas, y dentro de éste el subgrupo C, el

cual resultó ser el más interesante, constituido por *L. plantarum* N8, EFj18, EFj47 y EFf29.

- Se aisló y caracterizó fenotípica y genotípicamente *Enterobacter cloacae*, considerado un patógeno oportunista, de EF de elaboración local para ampliar los estudios de actividad antimicrobiana. Los ensayos, mediante el método de difusión en agar, permitieron corroborar el potencial de las cepas N8, EFf29 y EFj18 para inhibir microorganismos patógenos aislados del mismo nicho ecológico, o muy relacionado, al de las BAL en estudio.

- Las cepas *L. plantarum* N8, EFj18 y EFf29 resultaron las más cepas atractivas para ser usadas como cultivos iniciadores para la preservación de frutas y productos derivados listos para consumo. Por lo tanto, fueron seleccionadas para ensayos en matrices alimenticias.

➤ **Comportamiento de *L. plantarum* N8, EFj18 y EFf29 "in situ" empleando las siguientes matrices alimentarias:**

1- Jugo mixto fresco de manzana y naranja, 2:1 seleccionado por sus atributara sensoriales (olor, aspecto y sabor) en esta Tesis Doctoral (JMN, 2:1).

2- Frutas cortadas en trozos (MP), listas para consumo, que formaron parte de las muestras de EF empleadas en los ensayos de aislamiento de BAL.

Específicamente, manzanas MP la cual fue seleccionada por su gran popularidad y aceptabilidad y frutilla que, además, de su amplio consumo es un cultivo de gran importancia en la provincia.

1- JMN (2:1)

- A 30 °C, se detectó en diferentes medios de ensayo, el crecimiento y sobrevida de microorganismos autóctonos incluyendo BAL, levaduras y bacterias potencialmente patógenas durante los 14 días de ensayo.

- En esta condición, la inoculación de las cepas seleccionadas no solo inhibió el crecimiento de la microbiota bacteriana y levaduriforme autóctona, sino que, además, produjo su completa inactivación de la microbiota bacteriana y levaduriforme a 7 y 14 días respectivamente, excepto

EFj18 sobre las levaduras que las inactivo más lentamente (alrededor de 2 ciclos log en 14 días). La actividad antimicrobiana fue acompañada por rápida acidificación del medio, especialmente para EFl29 y N8.

- Los cambios producidos en los perfiles de utilización de azúcares y ácidos orgánicos y metabolitos producidos confirmaron el efecto inhibitorio por parte de las BAL
- La actividad antagónica de las BAL inoculadas se observó también a 4 °C. En esta condición, la microbiota autóctona levaduriforme y bacteriana, incluida cepas potencialmente patógenas fueron capaces de crecer y sobrevivir a elevadas densidades hasta 7 y 14 días respectivamente, lo que representa un riesgo para la salud. Por lo tanto, es evidente la necesidad de aplicar las BAL para asegurar la calidad sanitaria de jugos naturales conservados a temperatura de refrigeración.
- A 4 °C, en los jugos inoculados no se produjeron cambios significativos en el pH y los sustratos fueron ligeramente consumidos lo que se relaciono con la ausencia de crecimiento microbiano y sobrevivida de las BAL inoculadas. Esto sugiere que otra sustancia, además de la producción de ácidos y competencia por sustratos, estarían involucradas en la actividad antimicrobiana tales como peróxido de hidrógeno y tipo bacteriocina en las cepas N8 y EFl29, respectivamente.
- En general, los compuestos fenólicos totales, las actividades antioxidantes y el contenido de vitamina C mostraron un ligero incremento en dos días en los jugos fermentados a 30 °C, indicando que las BAL tuvieron un efecto positivo, aunque no fue muy marcado. A 4 °C no se observaron diferencias significativas respecto al control.
- El análisis sensorial demostró que los jugos fermentados con cepas individuales y almacenados a 4 °C obtuvieron puntajes significativamente más elevado, comparado con el control y los jugos incubados a 30 °C. El jugo inoculado con *L. plantarum* EFl29 fue el más aceptado.

- En jugos fermentados se mantuvieron menores pérdidas de firmeza y grados Brix a 7 días comparado con el control sin tratar.
- El inóculo combinado de las tres cepas, en general, mostró una tendencia similar a los jugos inoculados individualmente especialmente con las cepas EFF29 y N8.
- La adición de cloruro de calcio en general, no fue efectiva.

2- Frutas MP, listas para consumo:

- En frutillas MP, se detectó crecimiento microbiano, en los medios de pruebas, similarmente como en JMN a 30 °C, lo que confirma la necesidad de aplicar un método de conservación.
- La inoculación de las frutillas MP con *L. plantarum* N8, EFF29 o EFj18 inhibió totalmente el desarrollo de levaduras y bacterias, inactivándolas completamente a dos días- La EFj18 lo hizo más lentamente sobre la población levaduriforme (7 días de almacenamiento).
- A 4 °C, también se observó un marcado efecto antagonístico sobre la microbiota natural levaduriforme y bacteriana incluidas BAL y cepas potencialmente patógenas, las cuales fueron capaces de crecer y/o sobrevivir en la matriz sin inocular. El efecto fue más pronunciado para N8 y EFF29.
- La microscopia electrónica confirmó el efecto inhibitorio sobre bacterias y levaduras así como una notable actividad antifúngica de las cepas seleccionadas.
- Al final del almacenamiento, las matrices inoculadas conservaron una apariencia y textura adecuada, similar a las frutas frescas recién procesadas, a diferencia del control sin tratar que se encontraba totalmente deteriorado.
- El cloruro de calcio, como ocurrió en JMN, fue menos efectivo.
- En manzanas MP, se observaron resultados similares a los de frutillas trozadas. De este modo la inoculación con las tres BAL impidió el crecimiento de la microbiota natural, manteniendo la textura y ultraestructura de los tejidos como lo confirmó la microscopia electrónica. En esta condición también se observó un marcado efecto antifúngico, tanto a 4 como 30 °C.

- De este modo, los resultados obtenidos, novedosos y con gran potencial de aplicación demostraron la capacidad de las cepas seleccionadas, especialmente N8 y EFl29 para controlar las microbiota autóctona contaminante de jugos y frutas MP. Al mismo tiempo permitió mantener e incluso mejorar atributos nutricionales y organolépticos, tanto a temperatura abusiva y de refrigeración.
- En frutillas trozadas listas para consumo, se obtuvieron excelentes resultados en cuanto a su apariencia, textura y control microbiológico, especialmente a 4 °C, por lo tanto, nos proponemos continuar las investigaciones en dicha matriz alimenticia de gran importancia en la provincia de Tucumán.

Las investigaciones propuestas en esta Tesis Doctoral permitieron ampliar los conocimientos sobre la ecología bacteriana de vegetales MP, en particular ensaladas de frutas y de hortalizas de elaboración local, hasta ahora no descripta. Al mismo tiempo, profundizar los conocimientos a nivel bioquímico de BAL autóctonas en relación con sus propiedades antimicrobianas en ensayos “in vitro” e “in situ”, y la mejora de la seguridad de jugos y frutas MP, así como la selección de cepas para su potencial aplicación biotecnológica.

De los resultados obtenidos, se propone seleccionar tres cepas de *L. plantarum* cuyas propiedades antimicrobianas, tecnológicas y metabólicas fueron, por primera vez, probadas en tres matrices alimentarias derivadas de frutas, lo que garantiza su potencial aplicación tecnológica para la obtención de jugos y frutas MP de calidad y óptima seguridad.

En particular, se destacan las cepas *L. plantarum* EFl29 y N8 para ser aplicadas en la conservación de frutillas cortadas listas para consumo, de gran interés regional, lo que representa un aporte valioso tanto para el sector productivo como la salud del consumidor.



PROYECCIONES



PROYECCIONES

- Profundizar y ampliar estudio sobre los mecanismos de acción antimicrobiana de las cepas seleccionadas, especialmente EFf29 en relación con la caracterización y purificación de una sustancia tipo bacteriocina.

- Aislar e identificar los hongos filamentosos contaminantes de frutillas frescas y MP. Determinar los mecanismos de acción de las cepas seleccionadas, especialmente N8 y EFf29 involucrados en la actividad antimicrobiana-

- Profundizar los estudios sobre las potenciales propiedades probióticas de las cepas seleccionadas, especialmente EFf29 y N8 para su aplicación en frutillas MP y JMN como vehículos de microorganismos beneficiosos para la salud del consumidor.

- Realizar estudios a nivel análisis sensorial de las matrices frutales fermentadas con panel entrenado.

- Tipificar las cepas seleccionadas a fin de establecer marcadores específicos para ensayos de dinámico poblacional y su rápida detección en matrices alimenticias.



*PRODUCCIÓN
CIENTÍFICA*



PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Parte de los resultados de este trabajo de tesis doctoral dieron lugar a las siguientes publicaciones:

Publicaciones de trabajos completos en revistas con referato

2016. “Maturano C.; Rivero L.V.; Rodriguez Vaquero M.J, Saguir F.M. 2016. The effect of organic acids and sulfur dioxide on C4 compound production and β -glucosidase activity of *Oenococcus oeni* from wines under acidic conditions. International Journal of Wine Research”, 8:19–28

2014. “Rodriguez Vaquero M.J, Perato M., Rivero L.V., Saguir F.M. Isolation and Identification of Homolactic Bacteria from *Solanum melongena* L. with Antibacterial Activity that Improve Vegetable Fermentation. International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering”, 4: 384-393

Capítulos de libros

2018. Malic acid fermentation: influence and application in winemaking. Saguir, FM; Rivero, LV; Rodriguez Vaquero, MJ y Maturano, R C. Lugar: Nova Science Publishers, Inc. 400 Oser Avenue, Suite 1600. Hauppauge, NY 11788; p. 203 – 223

2016. Wine Microbiological Processes: Benefits of the Use of Starter Cultures Red Wine Consumption and Health. Rivero, L V; Vallejo, CV; Saguir, FM; Aredes Fernandez, P A y Rodriguez Vaquero, M J. Lugar: Nova Science Publishers, Inc. 400 Oser Avenue, Suite 1600. Hauppauge, NY 11788; p. 1 – 115.

Resúmenes presentados en congresos nacionales nacionales e internacionales

2018. Biopreservación de jugo de naranja con cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas de frutas de la región con propiedades antimicrobianas. Cicytac. Cordoba

2017. Efecto antagónico de bacterias ácido lácticas aisladas de frutas mínimamente procesadas contra *Salmonella* Typhimurim. SAMIGE. San Miguel de Tucumán.

2017. Efecto de compuestos fenólicos sobre el comportamiento de bacterias lácticas de vino y residuos vitivinícolas de la región NOA. Cafayate, Salta.

2017. Aislamiento y caracterización de bacterias lácticas con actividad antimicrobiana de productos mínimamente procesados contra patógenos. Jornada de Jóvenes Investigadores de la UNT, San Miguel de Tucumán.

2017. Mejora en la actividad antioxidante en jugo de fruta fermentado usando cepas de *Oenococcus oeni* seleccionadas. ASEV. Washington, USA.

2016. Estudio de la actividad antimicrobiana de bacterias lácticas aisladas de frutas y derivados mínimamente procesados sobre patógenos transmitidos por alimentos. COLMIC. Medellín, Colombia.

2015. Cambios en el perfil de compuestos de aroma y fenólicos totales al final de la fermentación maloláctica conducida por *Oenococcus oeni* MS46. Brasil

2015. Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas aisladas de diferentes vegetales. SAMIGE. Córdoba

2014. Efecto de compuestos fenólicos sobre los parámetros de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* aislados de frutas y hortalizas cultivadas en nuestra región. San Miguel de Tucumán, Argentina.



BIBLIOGRAFÍA



- Abadias, M., Alegre, I., Usall, J., Torres, R. y Viñas, I. (2011). Evaluation of alternative sanitizers to chlorine disinfection for reducing foodborne pathogens in fresh-cut apple. *Postharvest Biology and Technology*, 59, 289-297.
- Abadias, M., Altisent, R., Usall, J., Torres, R., Oliveira, M. y Viñas, I. (2014). Biopreservation of fresh-cut melon using the strain *Pseudomonas graminis* CPA-7. *Postharvest biology and technology*, 96, 69-77.
- Abadias, M., T.P. Canamas, A. Asensio, M. Anquera y I. Vinas. (2006). Microbiological quality of commercial "Golden delicious" apples throughout production and shelf life in Lleida. *Journal of Food Microbiology*, 108(3), 404-409.
- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solson, C., y Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1–2), 121–129.
- Abbaszadeh-Dahaji, P., Ghorbanpour, M., Omidvari, M., Omidvar, R. y Kariman, K. (2017). Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biological Control*, 117, 147-157.
- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P. y Chihib, N. E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of microbiology*, 196(7), 453-472.
- Abee, T., Krockel, L. y Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International journal of food microbiology*, 28(2), 169-185.
- Ackers, M.L., Mahon, B.E., Leahy, E., Goode, B., Damrow, T., Hayes, P.S. y Griffin, P.M. (1998). An outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *Journal of infectious diseases*, 177(6), 1588-1593.
- Adetuyi, F. O. y Ibrahim, T. A. (2014). Effect of fermentation time on the phenolic, flavonoid and vitamin C contents and antioxidant activities of okra (*Abelmoschus esculentus*) seeds. *Nigerian Food Journal*, 32(2), 128-137.
- Adnan, A.F.M. y Tan, I.K. (2007). Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology*, 98(7), 1380-1385.
- Aguirre, J.S., Rodríguez, M. R., y de Fernando, G.D.G. (2011). Effects of electron beam irradiation on the variability in survivor number and duration of lag phase of four food-borne organisms. *International journal of food microbiology*, 149(3), 236-246.
- Alakomi, H., Skytta, E., Saarela, M. y Mattila-Sandholm, T. (2000). Lactic acid permeabilizes Gram negatives bacteria by disturbing the outer membrane. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 2001-2005.
- Alazzam, B., Bonnassie-Rouxin, S., Dufour, V. y Ermel, G. (2011). MCLMAN, a new minimal medium for *Campylobacter jejuni* NCTC 11168. *Research in microbiology*, 162(2), 173-179.
- Alegre, I., Colás-Medà, P., Abadias, M., Usall, J., y Viñas, I. (2015). Effect of ripeness stage during processing on *Listeria monocytogenes* growth on fresh-cut 'Conference' pears. *Food microbiology*, 49, 116-122.
- Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Figge, M. J. y Abadias, M. (2013). Control of foodborne pathogens on fresh-cut fruit by a novel strain of *Pseudomonas graminis*. *Food microbiology*, 34(2), 390-399.

- Alexandre, E.M.C., Brandão, T.R.S. y Silva, C.L.M. (2011). Modelling microbial load reduction in foods due to ozone impact. *Procedia Food Science*, 1, 836–841.
- Alexandre, E.M.C., Brandão, T.R.S. y Silva, C.L.M. (2012). Assessment of the impact of hydrogen peroxide solutions on microbial loads and quality factors of red bell peppers, strawberries and watercress. *Food Control*, 27(2), 362–368.
- Allende, A., Tomás-Barberán, F. A., y Gil, M. I. (2006). Minimal processing for healthy traditional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17(9), 513-519.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. y Lipman, D., (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403–410
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389 – 3402.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. Y y Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. *Nucleic Acid Research*, 25, 3389-3402.
- Alvarez-Cisneros, Y. M., Fernández, F. J., Sainz-Espuñez, T. y Ponce-Alquicira, E. (2017). Assessment of virulence factors, antibiotic resistance and amino-decarboxylase activity in *Enterococcus faecium* MXVK 29 isolated from Mexican chorizo. *Letters in applied microbiology*, 64(2), 171-176.
- Álvarez-Ojeda, G., Gallegos-Robles, M.A., Morales-Loredo, A., Osuna-García, J.A., Martínez, I.O., Morales-Ramos, L.H. y Fratamico, P. (2009). PCR detection and microbiological isolation of *Salmonella* spp. from fresh beef and cantaloupes. *Journal of food science*, 74(1), 37-40.
- Alvarez-Parrilla, E., Ayala-Zavala, J. F., Del-Toro-Sánchez, L., y González-Aguilar, G. A. (2008). High relative humidity in-package of fresh-cut fruits and vegetables: advantage or disadvantage considering microbiological problems and antimicrobial delivering systems? *Journal of Food Science*, 73(4), 41-47.
- Alzamora, S.M., Lopez-Malo, A., Tapi, M.S. (2000). Overview. In: Alzamora, S.M., Tapia, M.S., Lopez-Malo, A. (Eds.), *Minimally Processed Fruits and Vegetables: Fundamental Aspects and Applications*. Aspen, Gaithersburg, pp. 1–9
- Ammor, M. S., Flórez, A. B., Van Hoek, A. H., Clara, G., Aarts, H. J., Margolles, A. y Mayo, B. (2008). Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 14(1-3), 6-15.
- Angmo, K., Kumari, A. y Bhalla, T.C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT-food Science and Technology*, 66, 428-435.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C, 2000.
- Arena, M. E., de Nadra, M. C. M. y Muñoz, R. (2002). The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium *Lactobacillus hilgardii* X1B: structural and functional study of the arcABC genes. *Gene*, 301(1-2), 61-66.

- Arena, M. P., Capozzi, V., Spano, G., & Fiocco, D. (2016). The potential of lactic acid bacteria to colonize biotic and abiotic surfaces and the investigation of their interactions and mechanisms. *Applied microbiology and biotechnology*, *101*(7), 2641-2657.
- Arena, M.E., Saguir, F.M. y Manca de Nadra, M.C. (1996). Inhibition of growth of *Lactobacillus plantarum* isolated from citrus fruits in the presence of organic acids. *MAN Microbiologie, aliments, nutrition*, *14*(3), 219-226.
- 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.
- Artes, F. y Allende, A. (2017). Minimal Processing of Fresh Fruits, Vegetables, and Juices. *Emerging Technologies for Food Processing*, 583-597.
- Artés, F., Gómez, P., Aguayo, E., Escalona, V., y Artés-Hernández, F. (2009). Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. *Postharvest Biology and Technology*, *51*(3), 287-296.
- Assouhoun-Djeni, N.M.C., Djeni, N.T., Messaoudi, S., Lhomme, E., Koussemon-Camara, M., Ouassa, T. y Doussat, X. (2016). Biodiversity, dynamics and antimicrobial activity of lactic acid bacteria involved in the fermentation of maize flour for doklu production in Côte d'Ivoire. *Food Control*, *62*, 397-404.
- Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen, S. & von Wright, A. (eds). *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects* 2nd Edition. New York: Marcel Dekker Inc., 1-72
- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. *Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker*, *139*, 1-66.
- Ayala-Zavala, J. F. y González-Aguilar, G. A. (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of food science*, *76*(1), 6-15.
- Bautista Gallego, J., Rodríguez Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido Fernández, A., Arroyo López, F.N., 2011. Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology*, *147*, 89 -96.
- Beuchat, L.R. (1996). Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of food protection*, *59*(2), 204-216.
- Beuchat, L.R. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and infection*, *4*(4), 413-423.
- Boeing, H., Bechthold, A., Bub, A., Ellinger, S., Haller, D., Kroke, A. (2012). Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *European Journal of Nutrition*, *51*, 637- 663.
- Borges, A., Saavedra, M.J. y Simões, M. (2012). The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling*, *28*(7), 755-767.
- Borges, S., Silva, J., y Teixeira, P. (2012). Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *101*(3), 677-682.

- Bouroni, O. C., El Bour, M., Calo-Mata, P., Mraouna, R., Abedellatif, B. y Barros-Velázquez, J. (2012). Phylogenetic analysis of antimicrobial lactic acid bacteria from farmed seabass *Dicentrarchus labrax*. *Canadian Journal of Microbiology*, 58, 463–474.
- Bover-Cid, S. y Holzapfel, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 53(1), 33-41.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal-Carou, M.C. (2001). Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 66(3), 185-189.
- Brackett, R.E. (1999). Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens on produce. *Postharvest Biological Technology*, 15, 305 – 311
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. y Berset, C. L. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bringel, F., Curk, M.C. y Hubert, J.C. (1996). Characterization of lactobacilli by Southern-type hybridization with a *Lactobacillus plantarum* pyrDFE probe. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(2), 588-594.
- Brizuela, N., Bravo-Ferrada, B. M., Hollmann, A., La Hens, D. V., Tymczyszyn, E. y Semorile, L. (2016). Growth and consumption of l-malic acid in wine-like medium by acclimated and non-acclimated cultures of Patagonian *Oenococcus oeni* strains. *Folia microbiologica*, 61(5), 365-373.
- Brizuela, N.S., Bravo-Ferrada, B.M., La Hens, D.V., Hollmann, A., Delfederico, L., Caballero, A. y Semorile, L. (2017). Comparative vinification assays with selected Patagonian strains of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum*. *LWT*, 77, 348-355.
- Burin, V. M., Falcão, L. D., Gonzaga, L. V., Fett, R., Rosier, J. P. y Bordignon-Luiz, M. T. (2010). Colour, phenolic content and antioxidant activity of grape juice. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(4), 1027–1032.
- Caggia, C., De Angelis, M., Pitino, I., Pino, A. y Randazzo, C. L. (2015). Probiotic features of *Lactobacillus* strains isolated from Ragusano and Pecorino Siciliano cheeses. *Food microbiology*, 50, 109-117.
- Callejas, T.A., Martínez-Hernández, G.B. y Artés, F. (2011). Neutral and acidic electrolyzed water as emergent sanitizers for fresh-cut mizuna baby leaves. *Postharvest Biology and Technology*, 59(3), 298-306
- Callejón, R.M., Rodríguez-Naranjo, M.I., Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., Garcia-Parrilla, M. C. y Troncoso, A.M. (2015). Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: trends and causes. *Foodborne pathogens and disease*, 12(1), 32-38.
- CAMPOS, F.M., PINHEIRO-SANT'ANA, H.M., STRINGHETA, P.C., CHAVES, J.B.P. (2003). Teores de betacaroteno em vegetais folhosos preparados em restaurantes comerciais de Viçosa-MG. *Braz. J. Food Technol.*, 6 (2), 163-169.
- Cano, A., Medina, A. y Bermejo, A. (2005). Bioactive compounds in different citrus varieties. Discrimination among cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(5), 377-381.
- Cano, M.P., Sánchez-Moreno, C., De Pascual-Teresa, S., De Ancos, B. (2005) Procesado mínimo y valor nutricional. En González-Aguilar GA, Gardea AA, Cuamea-Navarro F (Eds.) *Nuevas Tecnologías de*

- Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados. Logiprint Digital. Guadalajara, México. pp. 289-312
- Cappello, M.S., Zapparoli, G., Logrieco, A. y Bartowsky, E.J. (2017). Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour. *International journal of food microbiology*, 243, 16-27.
- Carrasco-Orellana, C., Stappung, Y., Mendez-Yañez, A., Allan, A. C., Espley, R. V., Plunkett, B. J. y Herrera, R. (2018). Characterization of a ripening-related transcription factor FcNAC1 from *Fragaria chiloensis* fruit. *Scientific reports*, 8(1), 10524.
- Champagne, C.P. (2009). Some technological challenges in the addition of probiotic bacteria to foods in Prebiotics and Probiotics Science and Technology. D. Charalampopoulos, and R. A. Rastall, ed. Springer, New York, NY, 761–804
- Champomier-Vergès, M.C., Maguin, E., Mistou, M.Y., Anglade, P. y Chich, J.F. (2002). Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *Journal of Chromatography B*, 771(1-2), 329-342.
- Chen, X., Zuo, W., Zhang, T., Xu, H., Wang, C. y Lu, M. (2018). Effect of fermentation time on nutritional components of red-fleshed apple cider. *Food and Bioproducts Processing*, 114, 276-285.
- Choi, S.Y. y Beuchat, L.R. (1994). Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocin of *Pediococcus acidilactici* M during fermentation of kimchi. *Food microbiology*, 11(4), 301-307.
- Chung, W.H, Bae, J.W., Rhee, S.K., Park, J.R., Nam, Y.D., Lee, I. y Park, Y.H. (2005). Development and evaluation of genome-probing microarrays for monitoring lactic acid bacteria. *Applied. Environment. Microbiology.*, 71(12), 8825-8835.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Fernández, M.F. y Hernández, P.E. (1998). Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiology*, 15(3), 289-298.
- Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A. y Bartkiene, E. (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control*, 31(2), 539-545.
- Coman, M.M., Verdenelli, M.C., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., Boyko, N. y Cresci, A. (2014). In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502® and SYN BIO® against pathogens. *Journal of applied microbiology*, 117(2), 518-527.
- Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Reviews*, 3(3), 269-280.
- Corbo, M.R., Del Nobile, M.A., y Sinigaglia, M. (2006). A novel approach for calculating shelf life of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 106(1), 69–73
- Cordano, A.M., y Jacquet, C. (2009). *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salads sold at supermarkets in Santiago, Chile: prevalence and strain characterization. *International Journal of Food Microbiology*, 132(2-3), 176-179.
- Curk, M.C., Hubert, J.C. y Bringel, F. (1996). *Lactobacillus paraplantarum* sp. nov., a new species related to *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(2), 595-598.
- Curutchet, A., Dellacassa, E., Ringuet, J. A., Chaves, A. R., y Viña, S.Z. (2014). Nutritional and sensory quality during refrigerated storage of fresh-cut mints (*Mentha piperita* and *M. spicata*). *Food Chemistry*, 143, 231-238.

- da Costa, W.K.A., de Souza, G.T., Brandão, L.R., de Lima, R.C., Garcia, E.F., dos Santos Lima, M. y Magnani, M. (2018). Exploiting antagonistic activity of fruit-derived *Lactobacillus* to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. *Food Research International*, 108, 172-182.
- Da Silva Pinto, M., Genovese, M. I., De Souza Schmidt Gonçalves, A. E. y Lajolo, F. M. (2008). Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. *Food Science and Technology International*, 14(3), 207-214.
- Daeschel, M.A. (1993). Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. In *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, 63-91.
- Dani, C., Oliboni, L. S., Agostini, F., Funchal, C., Serafini, L., Henriques, J. A. y Salvador, M. (2007). Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage. *Toxicology in Vitro*, 24(1), 148-153.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C. y Masella, R. (2007). Polyphenols dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 43, 348-361.
- Das, J. K., Mishra, D., Ray, P., Tripathy, P., Beuria, T. K., Singh, N. y Suar, M. (2013). In vitro evaluation of anti-infective activity of a *Lactobacillus plantarum* strain against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Gut pathogens*, 5(1), 11.
- Das, P., Khowala, S., & Biswas, S. (2016). In vitro probiotic characterization of *Lactobacillus casei* isolated from marine samples. *LWT*, 73, 383-390
- De Man, J. C., Rogosa, M., and Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. 23, 130-135.
- De Vries M.C., Vaughan E.E., Kleerebezem M., De Vos W.M. (2006). *Lactobacillus plantarum* – survivor, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16, 1018-1028.
- del Campo, G., Berregi, I., Caracena, R. y Santos, J. I. (2006). Quantitative analysis of malic and citric acids in fruit juices using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 556(2), 462-468.
- del Valle, M. J., Laiño, J. E., de Giori, G. S. y LeBlanc, J. G. (2014). Riboflavin producing lactic acid bacteria as a biotechnological strategy to obtain bio-enriched soymilk. *Food Research International*, 62, 1015-1019.
- Demir, N., Bachçeci, K.S. y Acar, J. (2006). The effects of different initial *Lactobacillus plantarum* concentrations on some properties of fermented carrot juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30, 352-363.
- Di Cagno, R., Cardinali, G., Minervini, G., Antonielli, L., Rizzello, C.G., Ricciuti, P. y Gobbetti, M. (2010). Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. *Food Microbiology*, 27(3), 381-389.
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M. y Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33(1), 1-10.
- Di Cagno, R., Filannino, P. y Gobbetti, M. (2016). Novel fermented fruit and vegetable-based products. In *Novel Food Fermentation Technologies*, 279-291. Springer, Cham.

- Di Cagno, R., Filannino, P. y Gobbetti, M. (2017). Lactic acid fermentation drives the optimal volatile flavor-aroma profile of pomegranate juice. *International journal of food microbiology*, 248, 56-62.
- Di Cagno, R., Surico, R. F., Siragusa, S., De Angelis, M., Paradiso, A., Minervini, F. y Gobbetti, M. (2008). Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. *International journal of food microbiology*, 127(3), 220-228.
- Di Cagno, R., Surico, R.F., Minervini, G., Rizzello, C. G., Lovino, R., Servili, M. y Gobbetti, M. (2011). Exploitation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) puree added of stem infusion through fermentation by selected autochthonous lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 28(5), 900-909.
- Di Cagno, R., Surico, R.F., Paradiso, A., De Angelis, M., Salmon, J.C., Buchin, S. y Gobbetti, M. (2009). Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensory properties of tomato juices. *International journal of food microbiology*, 128(3), 473-483.
- Djuric, Z., Ellsworth, J. S., Weldon, A. L., Ren, J., Richardson, C. R., Resnicow, K. y Sen, A. (2011). A diet and exercise intervention during chemotherapy for breast cancer. *The open obesity journal*, 3, 87.
- Droby, S. y Lichter, A. (2007). Post-harvest Botrytis infection: etiology, development and management. In *Botrytis: Biology, pathology and control*, 349-367.
- Drosinos, E.H., Tassou, C., Kakiomenou, K. y Nychas, G.E. (2000). Microbiological, physico-chemical and organoleptic attributes of a country tomato salad and fate of *Salmonella enteritidis* during storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions at 4 C and 10 C. *Food Control*, 11(2), 131-135.
- Du Plessis, H. W., Dicks, L. M. T., Pretorius, I. S., Lambrechts, M. G. y Du Toit, M. (2004). Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines. *International Journal of food microbiology*, 91(1), 19-29.
- du Toit, M., Engelbrecht, L., Lerm, E. y Krieger-Weber, S. (2011) Lactobacillus: the next generation of malolactic fermentation starter cultures—an overview. *Food Bioprocess Technology*, 4, 876–906.
- Duar, R.M., Lin, X.B., Zheng, J., Martino, M.E., Grenier, T., Pérez-Muñoz, M.E. y Walter, J. (2017). Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS microbiology reviews*, 41(1), 27-48.
- Duarte, F. N. D., Rodrigues, J. B., Lima, M. C., Lima, M. S., Pacheco, M. T. B., Pintado, M. M. E. y Souza, E. L. (2017). Potential prebiotic properties of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) agro-industrial byproduct on *Lactobacillus* species. *Journal of Science and Food Agriculture*, 97, 3712–3719.
- Dueñas, M., Fernández, D., Hernández, T., Estrella, I. y Muñoz, R. (2005). Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(2), 297-304.
- Edwards, D. J. y Holt, K. E. (2013). Beginner's guide to comparative bacterial genome analysis using next-generation sequence data. *Microbial informatics and experimentation*, 3(1), 2.
- Ekinci, F. Y. y Gurel, M. (2008). Effect of using propionic acid bacteria as an adjunct culture in yogurt production. *Journal of dairy science*, 91(3), 892-899.
- Ellendersen de Souza Neves, L., Granato, D., Bigetti Guergoletto, K. y Wosiacki, G. (2012). Development and sensory profile of a probiotic beverage from apple fermented with *Lactobacillus casei*. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 475-485.

- Endo, A., y Salminen, S. (2013). Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(6), 444-448.
- Espirito-Santo, A. P., Carlin, F. y Renard, C. M. (2015). Apple, grape or orange juice: Which one offers the best substrate for lactobacilli growth?—A screening study on bacteria viability, superoxide dismutase activity, folates production and hedonic characteristics. *Food Research International*, 78, 352-360..
- Esteban-Torres, M., Reverón, I., Santamaría, L., Mancheño, J. M., de las Rivas, B. y Muñoz, R. (2013). The Lp_3561 and Lp_3562 enzymes support a functional divergence process in the lipase/esterase toolkit from *Lactobacillus plantarum*. *Frontiers in microbiology*, 7, 1118.
- Faour-Klingbeil, D., Todd, E. C., & Kuri, V. (2016). Microbiological quality of ready-to-eat fresh vegetables and their link to food safety environment and handling practices in restaurants. *LWT*, 74, 224-233.
- Fatma, C.H. y Benmechernene, Z. (2013). Isolation and identification of *Leuconostoc mesenteroides* producing bacteriocin isolated from Algerian raw camel milk. *African Journal of Microbiology Research*, 7(23), 2961-2969.
- Favaro, L., Basaglia, M., Casella, S., Hue, I., Dousset, X. y Franco, B.D.G. (2014). Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. *Food Microbiology*. 38, 228–239
- Favrin, S., To, M.S., Romanova, N. y Griffiths, M.W. (2002). Post daptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5258–5264.
- Fernández Ramírez, M. D., Smid, E. J., Abee, T., & Nierop Groot, M. N. (2015). Characterisation of biofilms formed by *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and food spoilage isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 207, 23–29.
- Fernández, A., Saguir, F. M. y Manca de Nadra, M. C. (2003). Effect of amino acids and peptides on growth of *Pediococcus pentosaceus* from wine. *Latin American applied research*, 33(3), 225-229.
- Fernández, P. A. A., Farías, M. E. y de Nadra, M. C. M. (2010). Interaction between *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii* isolated from wine. Modification of available nitrogen and biogenic amine production. *Biotechnology letters*, 32(8), 1095-1102.
- Fernández-Ortuño, D., Grabke, A. y Schnabel, G. (2013). Fenhexamid resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry fields in the Carolinas is associated with four target gene mutations. *Plant disease*, 97(2), 271-276.
- Figueiredo, I.C.R., Jaime, P.C. y Monteiro, C.A. (2008). Factors associated with fruit and vegetable intake among adults of the city of São Paulo, Southeastern Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 42(5), 777-785.
- Filannino, P., Bai, Di Cagno, R., Gobbetti, M. y Gänzle, M. G. (2015). Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food microbiology*, 46, 272-279.
- Filannino, P., Di Cagno, R., Trani, A., Cantatore, V., Gambacorta, G. y Gobbetti, M. (2017). Lactic acid fermentation enriches the profile of biogenic compounds and enhances the functional features of common purslane (*Portulaca oleracea* L.). *Journal of functional foods*, 39, 175-185.

- Filannino, P., Di Cagno, R., y Gobetti, M. (2018). Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth. *Current opinion in biotechnology*, 49, 64-72.
- Finnegan, E., y O'Beirne, D. (2015). Characterising and tracking deterioration patterns of fresh-cut fruit using principal component analysis–Part I. *Postharvest Biology and Technology*, 100, 73-80.
- Fletcher, J., Leach, J.E., Eversole, K., y Tauxe, R. (2013). Human pathogens on plants: designing a multidisciplinary strategy for research. *Phytopathology*, 103(4), 306-315.
- Foulquié, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1-24.
- Francis, G. A., Gallone, A., Nychas, G. J., Sofos, J. N., Colelli, G., Amodio, M. L. (2012). Factors affecting quality and safety of fresh-cut produce. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 52, 595 - 610.
- Froder, H., Martins, C.G., de Souza, K.L.O., Landgraf, M., Franco, B., y Destro, M. T. (2007). Minimally processed vegetable salads: Microbial quality evaluation. *Journal of Food Protection*, 70(5), 1277–1280.
- Galdeano, C.M., de Moreno de Leblanc, A., Dogi, C. y Perdígón, G. (2010). Lactic Acid Bacteria as Immunomodulators of the Gut-Associated Immune System. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, 125-140.
- Gan, R., Shah, N. P., Wang, M. F., Lui, W. y Corke, H. (2016). *Lactobacillus plantarum* WCFS1 fermentation differentially affects antioxidant capacity and polyphenol content in mung bean (*Vigna radiata*) and soya bean (*Glycine max*) milks. *Journal of Food processing and Preservation*, 41(1), 12944.
- García-Cayuela, T., Korany, A. M., Bustos, I., P. Gómez de Cadiñanos, L., Requena, T., Peláez, C. y MartínezCuesta, M. C. (2014). Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Research International*, 57(0), 44-50.
- García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A. J., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P. J. y Moreno-Arribas, M. V. (2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, 19(9), 835-841.
- Gerez, C.L., Torino, M.I., Rollán, G. y de Valdez, G.F. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food control*, 20(2), 144-148.
- Giacaman, R., Contzen, M., Yuri, J.A. y Muñoz-Sandoval, C. (2014). Anticaries effect of an antioxidant-rich apple concentrate on enamel in an experimental biofilm-demineralization model. *Journal of Applied Microbiology*, 117, 846-853.
- Gillman, M.W., Cupples, L.A., Gagnon, D., Posner, B.M., Ellison, R.C., Castelli, W.P. y Wolf, P.A. (1995). Protective effects of fruits and vegetables on stroke in men. *Journal of the American Medical Association* **273**, 1113–1117.
- Giraffa, G. (2004). Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS. Microbiol. Rev.*, 28, 251-260.
- Gómez, N.C., Ramiro, J.M., Quecan, B.X. y de Melo Franco, B.D. (2016). Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation. *Frontiers in microbiology*, 7, 863.

- Graça, A., Esteves, E., Nunes, C., Abadias, M. y Quintas, C. (2017). Microbiological quality and safety of minimally processed fruits in the marketplace of southern Portugal. *Food control*, 73, 775-783.
- Graça-Dias, M., Olmedilla-Alonso, B., y Hornero-Méndez, D. (2017). Tabla de contenido en carotenoides de alimentos iberoamericanos.
- Guglielmetti, S., De Noni, I., Caracciolo, F., Molinari, F., Parini, C. y Mora, D. (2008). Bacterial cinnamoyl esterase activity screening for the production of a novel functional food product. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 1284– 1288.
- Hannum, S.M. (2004). Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.*, 44(1), 1-17.
- Harrigan, W.F., y McCance, M.E. (1976). Laboratory methods in food and dairy microbiology. *Academic Press Inc.*(London) Ltd.
- Hashemi, S. M. B., Khaneghah, A. M., Barba, F. J., Nemat, Z., Shokofte, S. S. y Alizadeh, F. (2017). Fermented sweet lemon juice (*Citrus limetta*) using *Lactobacillus plantarum* LS5: Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities. *Journal of functional foods*, 38, 409-414.
- Hastings, J.W., Sai, M., Johnson, K., Roy, K.L., Vederas, J.C. y Stiles, M.E. (1991) Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc*. *Journal of Bacteriology*, 173, 7491-7500.
- Hays, G. L. y Riester, D. W. (1952). The control of off-odor spoilage in frozen concentrated orange juice. *Food Technology*, 6(10), 386-389.
- Heard, N.L., Allen, H. L., Estrada, K., Lettre, G., Berndt, S. I., Weedon, M. N., Rivadeneira, F. y Ferreira, T. (2010). Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature*, 467(7317), 832.
- Hemme, D. y Foucaud-Scheunemann, C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 14(6), 467-494.
- Hoffmann, S., Macculloch, B. y Batz, M. (2015). Economic burden of major foodborne illnesses acquired in the United States. EIB-140. *US Department of Agriculture, Economic Research Service*.
- Holdsworth, M, Landais, E., Bour, A., Gartner, A., McCullough, F. y Delpuech, F.. (2015). Socio-economic and behavioural determinants of fruit and vegetable intake in Moroccan women. *Public health nutrition*, 18(5), 809-816.
- Holzappel, W.H., Geisen, R., y Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International journal of food microbiology*, 24(3), 343-362.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., Rozes, N. (2012). Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiology*, 31, 1-8.
- Iglesias, M.B., Abadias, M., Anguera, M., y Viñas, I. (2018). Efficacy of *Pseudomonas graminis* CPA-7 against *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on fresh-cut pear and setting up of the conditions for its commercial application. *Food microbiology*, 70, 103-112.

- Iglesias, M.B., Echeverría, G., Viñas, I., López, M.L. y Abadias, M. (2018). Biopreservation of fresh-cut pear using *Lactobacillus rhamnosus* GG and effect on quality and volatile compounds. *LWT*, 87, 581-588.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821–1835.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. y Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 59(2), 171-200.
- Kachouri, F., Ksontini, H., Kraiem, M., Setti, K., Mechmeche, M. y Hamdi, M. (2015). Involvement of antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* on functional properties of olive phenolic compounds. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7924-7933.
- Kaltsa, A., Papaliaga, D., Papaioannou, E. y Kotzekidou, P. (2015). Characteristics of oleuropeinolytic strains of *Lactobacillus plantarum* group and influence on phenolic compounds in table olives elaborated under reduced salt conditions. *Food Microbiology*, 48, 58-62.
- Kedare, S.B. y Singh, R.P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48, 412–422.
- Keskinen, L.A., Burke, A. y Annous, B.A. (2009). Efficacy of chlorine, acidic electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce leaves. *International Journal of Food Microbiology*, 132(2–3), 134–140.
- Keskinen, L.A., Todd, E.C., y Ryser, E.T. (2008). Transfer of surface-dried *Listeria monocytogenes* from stainless steel knife blades to roast turkey breast. *Journal of Food Protection*, 71(1), 176-181.
- Khan, I. y Kang, S. C. (2016). Probiotic potential of nutritionally improved *Lactobacillus plantarum* DGK-17 isolated from Kimchi—A traditional Korean fermented food. *Food Control*, 60, 88-94.
- Kim, D.H., Kim, H.B., Chung, H.S., y Moon, K.D. (2014). Browning control of fresh-cut lettuce by phytoncide treatment. *Food chemistry*, 159, 188-192.
- Kirezieva, K., Luning, P. A., Jacxsens, L., Allende, A., Johannessen, G.S., Tondo, E.C. y van Boekel, M.A. (2015). Factors affecting the status of food safety management systems in the global fresh produce chain. *Food Control*, 52, 85-97.
- Kong, S. y Davidson, A.J. (1980). The role of the interactions between O₂, H₂O₂, OH. and *O₂ in the free radical damage to biological systems. *Journal of Biological Chemistry*, 204, 18-29.
- Koohmaraie, M., Brichta-Harhay, D.M., Arthur, T.M., Bosilevac, J.M., Kalchayanand, N., Shackelford, S.D. y Wheeler, T. L. (2011). Diversity of multidrug-resistant *Salmonella enterica* strains associated with cattle at harvest in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(5), 1783-1796.
- Kos, B., Suskovic, J., Vukovic, S., Simpraga, M., Frece, J. y Matosic, S. (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 981–987.
- Kos, B., Susković, J., Vuković, S., Simpraga, M., Frece, J. y Matosić, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94(6), 981-987.

- Kunji, E.R.S., Smid, E.J., Plapp, R., Poolman, B., y Konings, W.N. (1996). Di-tripeptides and oligopeptides are taken up via distinct transport mechanisms in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 175, 2052–2059
- Kwaw, E., Ma, Tchabo, W., Apaliya, M. T., Wu, M., Sackey, A. S. y Tahir, H. E. (2017). Effect of lactobacillus strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice. *Food chemistry*, 250, 148-154.
- Lahtinen S., Ouwehand A.C., Salminen S. y Wright A.V. (2012). Lactic Acid Bacteria Microbiological and functional aspects Fourth edition Taylor & Francis Group. Boca Raton London New York
- Lai, K.K., Lorca, G.L. y Gonzalez, C.F. (2009). Biochemical properties of two cinnamoyl esterases purified from a lactobacillus johnsonii strain isolated from stool samples of diabetes-resistant rats. *Applied Environmental Microbiology*, 75, 5018-5024.
- Lanciotti, R., Belletti, N., Patrignani, F., Gianotti, A., Gardini, F., y Guerzoni, M.E. (2003). Application of hexanal,(E)-2-hexenal, and hexyl acetate to improve the safety of fresh-sliced apples. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(10), 2958-2963.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A. y Gobbetti, M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied Environmental Microbiology*, 66(9), 4084-4090.
- Leroy, F., y De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15(2), 67-78.
- Leuschner, R. G., Heidel, M. y Hammes, W. P. (1998). Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 1–10.
- Lewis, C., Skovierova, H., Rowley, G., Rezuchova, B., Homerova, D., Roberts, M., y Kormanec, J. (2006). Identification of the σE regulon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, 152(5), 1347-1359.
- Li, H., Liu, L., Zhang, S., Cui, W. y Lv, J. (2012). Identification of antifungal compounds produced by *Lactobacillus casei* AST18. *Current microbiology*, 65(2), 156-161.
- Limón-Martínez, R.J., Olivas-Armendáriz, I., Sosa-Rodarte, E., Rodríguez-Rodríguez, C.I., Hernández-Paz, J. F., Acosta-Torres, L.S., y Martel-Estrada, S.A. (2018). Evaluation of in vitro bioactivity and in vitro biocompatibility of Polycaprolactone/Hyaluronic acid/Multiwalled Carbon Nanotubes/Extract from Mimosa Tenuiflora composites. *Bio-medical materials and engineering*, (Preprint), 1-13.
- Lin, A.W., Usera, M.A., Barrett, T.J., y Goldsby, R.A. (1996). Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(4), 870-876.
- Linares, D. M., Martín, M., Ladero, V., Alvarez, M. A. y Fernández, M. (2011). Biogenic amines in dairy products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(7), 691-703.
- Lindgren, S.E., y Dobrogosz, W.J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS microbiology reviews*, 7(1-2), 149-163.

- Liu S., Ye H., Zhi-jiang Z. (2011). Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International*, 3, 643–651.
- Liu, C. (2001). Study on preservatives in the aloe gel juice system. *Journal of Wuxi University of Light Industry (Chenses)*, 20(5), 480– 484.
- Liu, C. (2002). Study on the technics of stabilized aloe vera gel. Thesis submitted to Food Science and Technology School of Southern Yangtze University in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science (Chenses).
- Liu, F.N., Wen, K., Li, G.H., Yang, X.D., Kocher, J., Bui, T., Jones, D., Pelzer, K., Clark-Deener, S. y Yuan, L.J. (2014a). Dual functions of *Lactobacillus acidophilus* NCFM as protection against rotavirus diarrhea. *Journal of Pediatric and Gastroenterology Nutritional*, 58(2), 169–176
- Lokerse, R.F.A., Maslowska-Corker, K.A., Van de Wardt, L.C. y Wijtzes, T. (2016). Growth capacity of *Listeria monocytogenes* in ingredients of ready-to-eat salads. *Food control*, 60, 338-345.
- Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. In *Lactic acid bacteria: Genetics, metabolism and applications*, 317-331. Springer, Dordrecht.
- Lucas, P. y Lonvaud-Funel, A. (2002). Purification and partial gene sequence of the tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809. *FEMS microbiology letters*, 211(1), 85-89.
- Luo, W., Chen, M., Chen, A., Dong, W., Hou, X., y Pu, B. (2015). Isolation of lactic acid bacteria from pao cai, a Chinese traditional fermented vegetable, with inhibitory activity against *Salmonella* associated with fresh-cut apple, using a modelling study. *Journal of Applied Microbiology*, 118, 998-1006.
- Magan, N. y Aldred, D. (2007). Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International journal of food microbiology*, 119(1-2), 131-139.
- Maldonado, R. R., da Costa Araújo, L., da Silva Dariva, L. C., Rebac, K. N., de Souza Pinto, I. A., Prado, J. P. R. y Aguiar-Oliveira, E. (2017). Potential application of four types of tropical fruits in lactic fermentation. *LWT*, 86, 254-260.
- Matamoros, S., Leroi, F., Cardinal, M., Gigout, F., Kasbi Chadli, F. y Cornet, J. (2009a). Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. *Journal of Food Protection*, 72, 365-374.
- Mathur, S., and Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria -a review. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 281–295. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008
- Maturano, C. y Saguir, F.M. (2017). Influence of glycosides on behavior of *Oenococcus oeni* in wine conditions: growth, substrates and aroma compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(8), 151.
- Medina, J.J.P., Domínguez, L., Miranda, C. y López-Aranda, J.M. (2011). Comportamiento de distintas variedades de fresa en cultivo convencional y en cultivo sin suelo. *Campaña 2009-2010*, 343, 20-24.
- Medina, M.S., Tudela, J.A., Marín, A., Allende, A., Gil, M.I. (2012). Short postharvest storage under low relative humidity improves quality and shelf life of minimally processed baby spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 67, 1 -9.

- Meireles, A., Giaouris, E., y Simões, M. (2016). Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry. *Food Research International*, 82, 71-85.
- Melo, A. N. F., Souza, G. T., Schaffner, D., Moreira de Oliveira, T. C., Maciel, J. F., Souza, E. L. y Magnani, M. (2017). Changes in thermo-tolerance and survival under simulated gastrointestinal conditions of *Salmonella Enteritidis* PT4 in chicken breast meat after exposure to sequential stresses. *International Journal of Food Microbiology*, 251, 15–23.
- Miller, B.J., Franz, C.M., Cho, G.S. y du Toit, M. (2011) Expression of the malolactic enzyme gene (mle) from *Lactobacillus plantarum* under winemaking conditions. *Current Microbiology*, 62(6), 1682–1688.
- Montet, D., Loiseau, G., Kakhia-Rozis, N. (2006). Microbial technology of fermented vegetables. In: Ray, R.C., Ward, O.P. (Eds.), *Microbial Biotechnology in Horticulture*, 1, 309-343.
- Montville, T.J. y Matthews, K.R. (2008). *Food Microbiology: An Introduction*, 2nd (edn). United States of America: ASM Press, Washington DC; 428.
- Moracanin, S. V., Stefanovic, S., Radicevic, T., Borovic, B. y Djukic, D. (2015). Production of biogenic amines by lactic acid bacteria isolated from Uzicka sausages. *Procedia Food Science*, 5, 308-311.
- Mousavi, S. M., Gharibzahedi, S. M. T., Hamed, M., Rezaei, K. y Khodaiyan, F. (2011). Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of Persian walnut oil obtained by several extraction methods. *Industrial crops and products*, 45, 133-140.
- Mousavi, S. S., Moeini, H., Mohamad, R., Dinarvand, M., Ariff, A., Ling, F. H. y Raha, A. R. (2013). Effects of medium and culture conditions on folate production by *Streptococcus thermophilus* BAA-250. *Research in Biotechnology*, 4, 21–29.
- Mozaffarian, D., Bertoia, M. L., Mukamal, K. J., Cahill, L. E., Hou, T., Ludwig, D. S., y Rimm, E. B. (2016). Correction: Changes in intake of fruits and vegetables and weight change in United States men and women followed for up to 24 years: Analysis from three prospective cohort studies. *PLoS medicine*, 13(1), 996-1001.
- Muruzović, M. Ž., Mladenović, K. G. y Čomić, L. R. (2018). In vitro evaluation of resistance to environmental stress by planktonic and biofilm form of lactic acid bacteria isolated from traditionally made cheese from Serbia. *Food bioscience*, 23, 54-59.
- Nguyen, T., Campo, J.D. y Amiot, M.J. (2000). Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of food protection*, 63(10), 1359-1368.
- Nguyen-the, C., Carlin, F. (2000). Fresh and processed vegetables. In: Lund BM, Baird-Parker TC, Gould GW, editors. *The microbiological safety and quality of food*. Gaithersburg (MD): Aspen, 620-84.
- Oey, I., Lille, M., Van Loey, A., y Hendrickx, M. (2008). Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit and vegetable-based food products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 19(6), 320–328.
- Olaimat, A.N. y Holley, R.A. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food microbiology*, 32(1), 1-19.
- Olarte Mantilla, S.M., Collins, C., Iland, P.G., Kidman, C.M., Jordans, C., y Bastian, S.E.P. (2013). Comparison of sensory attributes of fresh and frozen wine grape berries using Berry Sensory Assessment. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19(3), 349-357.

- Oliveira, M., Abadias, M., Colas-Meda, P., Usall, J., y Viñas, I. (2015). Biopreservative methods to control the growth of foodborne pathogens on fresh-cut lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 214, 4-11.
- Oliveira, M., Abadias, M., Usall, J., Torres, R., Teixidó, N., y Viñas, I. (2015). Application of modified atmosphere packaging as a safety approach to fresh-cut fruits and vegetables—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 13-26.
- Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R. y Martín Belloso, O. (2008). Edible coatings with antibrowning agents to maintain sensory quality and antioxidant properties of fresh-cut pears. *Postharvest Biology Technology*, 50, 87–94.
- Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso, O. (2007). Effect of ripeness on the shelf-life of fresh-cut melon preserved by modified atmosphere packaging. *European Food Research and Technology*, 225(3-4), 301-311.
- Oms-Oliu, G., y Soliva-Fortuny, R. (2010). 15 Future Trends in Fresh-Cut Fruit and Vegetable Processing. *Advances in fresh-cut fruits and vegetables processing*, 377.
- O'Toole, G. y Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28, 449–461.
- Ouwehand, A.C. (1998). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen, S. and Von Wright A. (Ed.), *lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects*, 2 edition (edited by). Marcel nd Dekker Inc, New York, 139-159.
- Painter, J.A., Hoekstra, R.M., Ayers, T., Tauxe, R.V., Braden, C.R., Angulo, F.J. y Griffi, P.M. (2013). Attribution of Foodborne Illnesses, Hospitalizations, and Deaths to Food Commodities by Using Outbreak Data, United States, 1998–2008.
- Palgan, I., Caminiti, I. M., Muñoz, A., Noci, F., Whyte, P., Morgan, D. J., et al. (2011). Effectiveness of high intensity light pulses (HILP) treatments for the control of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice, orange juice and milk. *Food Microbiology*, 28(1), 14–20.
- Palmai, M., y Buchanan, R. L. (2002). The effect of *Lactococcus lactis* on the growth characteristics of *Listeria monocytogenes* in alfalfa sprout broth. *Acta alimentaria*, 31(4), 379-392.
- Palomino, J.M., Árbol, J.T., Benomar, N., Abriouel, H., Cañamero, M.M. y Gálvez, A. (2015). Application of *Lactobacillus plantarum* Lb9 as starter culture in caper berry fermentation. *LWT-Food Sci. Technol.* 60, 788–794.
- Palou, E. y López-Malo, A. (2000). Modeling the Growth/No-Growth Interface of *Zygosaccharomyces bailii* in Mango Puree. *Journal of Food Science*, 65(3), 516-520.
- Pan, L., Hu, X., & Wang, X. (2011). Assessment of antibiotic resistance of lactic acid bacteria in Chinese fermented foods. *Food Control*, 22(8), 1316-1321.
- Panda, S.H., Naskar, S.K., Sivakumar, P.S., y Ray, R.C. (2009). Lactic acid fermentation of anthocyanin-rich sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) into lacto-juice. *International journal of food science and technology*, 44(2), 288-296.

- Parish, M. y Higgins, D. (1988). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Samples of Citrus Molasses and Unpasteurized Orange Juice. *Journal of Food Science*, 53(2), 645-646.
- Parish, M.E., Beuchat, L.R., Suslow, T.V., Harris, L.J., Garrett, E.H. y Farber, J.N. (2003). Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 161-173.
- Pasha, I., Saeed, F., Sultan, M.T., Khan, M.R. y Rohi, M. (2014). Recent developments in minimal processing: a tool to retain nutritional quality of food. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(3), 340-351.
- Pennington, J. A., y Fisher, R. A. (2010). Food component profiles for fruit and vegetable subgroups. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(5), 411-418.
- Perez, M.B. y Saguir, F.M. (2012). Transfer and subsequent growth and metabolism of *Lactobacillus plantarum* in orange juice medium during storage at 4 and 30° C. *Letters in applied microbiology*, 54(5), 398-403.
- Perrone, G., Logrieco, A., Moretti, A. y Mulè, G. (2007). Biodiversity of complexes of mycotoxigenic fungal species associated with Fusarium ear rot of maize and Aspergillus rot of grape. *International journal of food microbiology*, 119(1-2), 11-16.
- Peršić, M., Petkovšek, M.M., Bubola, M., Jug, T., Pelengić, R. y Rusjan, D. (2017). Ampelography of 'Muškati momjanski', the Muscat accession cultivated on Istrian peninsula. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 67(1), 28-35.
- Piard, J.C., y Desmazeaud, M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Le lait*, 71(5), 525-541.
- Ponce, A.G., Moreira, M.R., Del Valle, C.E. y Roura, S.I. (2008). Preliminary characterization of bacteriocin-like substances from lactic acid bacteria isolated from organic leafy vegetables. *LWT-Food Science and Technology*, 41(3), 432-441.
- Pui, C.F., Wong, W.C., Chai, L.C., Nillian, E., Ghazali, F.M., Cheah, Y.K. y Radu, S. (2011). Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR. *Food Control*, 22(2), 337-342.
- Rahman, S.M.E., Jin, Y.G. y Oh, D.H. (2011). Combination treatment of alkaline electrolyzed water and citric acid with mild heat to ensure microbial safety, shelf-life and sensory quality of shredded carrots. *Food Microbiology*, 28(3), 484-491.
- Raimondi, S., Anighoro, A., Quartieri, A., Amaretti, A. y Tomas-Barber, A. (2015). Role of bifidobacteria in the hydrolysis of chlorogenic acid. *Microbiology Open*, 4, 41-52.
- Ramaswamy, V., Cresence, V.M., Rejitha, J.S., Lekshmi, M.U., Dharsana, K.S., Prasad, S.P. y Vijila, H.M. (2007). *Listeria*-review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, 40(1), 4.
- Ramos, B., Miller, F. A., Brandão, T. R., Teixeira, P., y Silva, C. L. (2013). Fresh fruits and vegetables—an overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 1-15.
- Randazzo, C.L., Pitino, I., Scifo, G.O. y Caggia, C. (2009). Biopreservation of minimally processed Iceberg lettuces using a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* wild strain. *Food Control*, 20(8), 756-763.

- Randazzo, W., Corona, O., Guarcello, R., Francesca, N., Germana, M. A., Erten, H. y Settanni, L. (2016). Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. *Food Microbiology*, 54, 40-51.
- Rao, K. P., Chennappa, G., Suraj, U., Nagaraja, H., Raj, A. C. y Sreenivasa, M. Y. (2015). Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from sorghum-based traditional fermented food. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 7(2), 146-156.
- Reguant, C. y Bordons, A. (2003). Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 95(2), 344-353.
- Reis, J.A., Paula, A.T., Casarotti, S.N. y Penna, A.L.B. (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Eng. Rev*, 4, 124-140.
- Ricciardi, A., Parente, E., Piraino, P., Paraggio, M. y Romano, P. (2005). Phenotypic characterization of lactic acid bacteria from sourdoughs for Altamura bread produced in Apulia (Southern Italy). *International journal of food microbiology*, 98(1), 63-72.
- Rico, D., Martin-Diana, A.B., Barat, J.M. y Barry-Ryan, C. (2007). Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 18(7), 373–386.
- Ripamonti, B., Agazzi, A., Bersani, C., De Dea, P., Pecorini, C., Pirani, S. y Tirloni, E. (2011). Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts. *Anaerobe*, 17(3), 97-105.
- Rivero, M.A., Padola, N.L., Etcheverría, A.I., y Parma, A.E. (2004). *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 64(4), 352-356.
- Rodríguez Vaquero, M.J., Aredes Fernandez, P.A., Manca de Nadra, M.C. y Strasser de Saad, A.M. (2010). Phenolic compound combinations on *Escherichia coli* viability in a meat system. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(10), 6048-6052.
- Rodríguez Vaquero, M.J., Fernández, P.A.A. y de Nadra, M.C.M. (2011). Effect of phenolic compound mixtures on the viability of *Listeria monocytogenes* in meat model. *Food Technology and Biotechnology*, 49(1), 83.
- Rodríguez, L. G. R., Aller, K., Bru, E., De Vuyst, L., Hébert, E. M. y Mozzi, F. (2017). Enhanced mannitol biosynthesis by the fruit origin strain *Fructobacillus tropaeoli* CRL 2034. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(15), 6165-6177.
- Rodríguez-Vaquero, M.J., Perato, S.M., Rivero, L.D. V. y Saguir, F.M. (2014). Isolation and identification of Homolactic bacteria from *Solanum melongena* L. with antibacterial activity that improve vegetable fermentation. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 4, 384-393.
- Ross, M. y Guzewich, J. (1999). Evaluation of risks related to microbiological contamination of ready-to-eat food by food preparation workers and the effectiveness of interventions to minimize those risks. *FDA White Paper, FDA, CFSAN*.
- Rúa, J., López-Rodríguez, I., Sanz, J., García-Fernández, M. C., del Valle, M. P. y García-Armesto, M. R. (2018). Improving functional properties of “Piel de Sapo” melon juice by addition of a Lippia citriodora natural extract and probiotic-type lactic acid bacteria. *LWT*, 96, 75-81.

- Ruiz Rodríguez, L., Vera Pingitore, E., Rollan, G., Cocconcelli, P.S., Fontana, C., Saavedra, L. y Hebert, E. M. (2016). Biodiversity and technological-functional potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented quinoa sourdoughs. *Journal of applied microbiology*, 120(5), 1289-1301.
- Ruiz Rodríguez, L., Vera Pingitore, E., Rollan, G., Cocconcelli, P. S., Fontana, C., Saavedra, L. y Hebert, E. M. (2016). Biodiversity and technological-functional potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented quinoa sourdoughs. *Journal of applied microbiology*, 120(5), 1289-1301.
- Ruiz-Cruz, S., Acedo-Félix, E., Díaz-Cinco, M., Islas-Osuna, M.A., y González-Aguilar, G.A. (2007). Efficacy of sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* populations on fresh-cut carrots. *Food Control*, 18(11), 1383-1390.
- Russo, P., Pena, N., de Chiara, M. L. V., Amodio, M. L., Colelli, G., y Spano, G. (2015). Probiotic lactic acid bacteria for the production of multifunctional fresh-cut cantaloupe. *Food Research International*, 77(4), 762-772.
- Ryu, E. H., Yang, E. J., Woo, E. R. y Chang, H. C. (2014) Purification and characterization 476 of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. *Food Microbiology*, 41, 19-26.
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J.M. y Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology* ,50(1), 1-16.
- Sagdic, O., Ozturk, I., y Tornuk, F. (2013). Inactivation of non-toxigenic and toxigenic *Escherichia coli* O157: H7 inoculated on minimally processed tomatoes and cucumbers: Utilization of hydrosols of Lamiaceae spices as natural food sanitizers. *Food Control*, 30(1), 7-14.
- Saguir, F. M., y de Nadra, M.C.M. (2007). Improvement of a chemically defined medium for the sustained growth of *Lactobacillus plantarum*: nutritional requirements. *Current microbiology*, 54(6), 414.
- Saguir, F.M, Rivero, L.V., Rodríguez Vaquero, M.J. y Maturano, C. (2018). Malic acid fermentation: influence and applications in winemaking. *A closer look at grapes wines and winemaking*, 203,222.
- Saguir, F.M. y de Nadra, M.C.M. (2007). Improvement of a chemically defined medium for the sustained growth of *Lactobacillus plantarum*: nutritional requirements. *Current microbiology*, 54(6), 414.
- Saguir, F.M. y Manca de Nadra, M.C. (2002). Effect of l-malic and citric acids metabolism on the essential amino acid requirements for *Oenococcus oeni* growth. *Journal of applied microbiology*, 93(2), 295-301.
- Saguir, F.M., Campos, I.E.L., Maturano, C., y de Nadra, M.C.M. (2009). Identification of dominant lactic acid bacteria isolated from grape juices. Assesment of its biochemical activitis relevant to flavor development in wine. *International Journal of Wine Research*, 1, 175-185.
- Saguir, F.M., Loto Campos, I.E. y Manca de Nadra, M.C. (2008). Utilization of amino acids and dipeptides by *Lactobacillus plantarum* from orange in nutritionally stressed conditions. *Journal of applied microbiology*, 104(6), 1597-1604.
- Sajur, S. A., Saguir, F.M. y de Nadra, M.M. (2007). Effect of dominant specie of lactic acid bacteria from tomato on natural microflora development in tomato purée. *Food Control*, 18(5), 594-600.
- Sánchez-Maldonado, A. F., Schieber, A. y Gänzle, M. G. (2011). Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of applied microbiology*, 111(5), 1176-1184.

- Sanchez-Vizuete, P, Bridier, A., Guilbaud, M., Piard, J.C., Naitali, M., y Briandet, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food microbiology*, 45, 167-178.
- Savino, M.J., Sánchez, L.A., Saguir, F.M. y de Nadra, M.C.M. (2012). Lactic acid bacteria isolated from apples are able to catabolise arginine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 1003-1012.
- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V. y Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free radical research*, 36(2), 177-187.
- Schwentesius, R. y Gómez, M. A. (2002) .Supermercats in Mexic: Impacts on Horticulture Systems. *Development Policy Reviuw*, 20 (4), 487-502.
- Selma, M. V., Allende, A., López-Gálvez, F., Conesa, M. A., y Gil, M. I. (2008). Disinfection potential of ozone, ultraviolet-C and their combination in wash water for the fresh-cut vegetable industry. *Food Microbiology*, 25(6), 809-814.
- Septembre-Malaterre, A., Remize, F., y Poucheret, P. (2018). Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Research International*, 104, 86-99.
- Serrazanetti D., Guerzoni M.E., Corsetti A. y Vogel R. (2009). Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. *Food Microbiology*, 26, 700-711.
- Sheehan, V.M., Ross, P. y Fitzgerald, G.F. (2007) Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 279–284.
- Siddiq, M., Sogi, D. S., y Dolan, K. D. (2013). Antioxidant properties, total phenolics, and quality of fresh-cut ‘Tommy Atkins’ mangoes as affected by different pre-treatments. *LWT-Food Science and Technology*, 53(1), 156-162
- Singleton, V. L. y Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D. I., Tabanelli, G., Montanari, C., Gardini, F. y Lanciotti, R. (2015). Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce. *Food microbiology*, 47, 74-84.
- Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D. I., Vannini, L., Salvetti, E., Torriani, S. y Lanciotti, R. (2016). Use of a nisin-producing *Lactococcus lactis* strain, combined with natural antimicrobials, to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples. *Food microbiology*, 54, 11-19.
- Soares, E , Moreira Barros, L., de Castro Bento, J.N., Áfio Caetano, J., Nogueira Moreira, R.A., Fernandes Pereira, F.G. y Marques Frota, N. (2012). Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 33(3).
- Splitstoesser, D.F. (1987). Fruits and fruit products. In: Beuchat LR (Ed) , *Food and Beverage Mycology*. Van Nostrand Reinhold, New York, 101 – 128

- Stackebrand, E. y Goebel, B.M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 44(4), 846-849.
- Stead, D. (1993). The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine-spoilage lactic acid bacteria. *Journal of applied bacteriology*, 75(2), 135-141.
- Stiles, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van leeuwenhoek*, 70(2-4), 331-345.
- Stiles, M.E., y Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*, 36(1), 1-29.
- Storari, M., Kulli, S., Wüthrich, D., Bruggmann, R., Berthoud, H. y Arias-Roth, E. (2016). Genomic approach to studying nutritional requirements of *Clostridium tyrobutyricum* and other Clostridia causing late blowing defects. *Food microbiology*, 59, 213-223.
- Stoyanova, L. G., Ustyugova, E. A. y Netrusov, A. I. (2012). Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: Their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48, 229-243.
- Su, L.J., y Arab, L. (2006). Salad and raw vegetable consumption and nutritional status in the adult US population: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of the American Dietetic Association*, 106(9), 1394-1404.
- SUKMARINI, L., MUSTOPA, A. Z., NORMAWATI, M. y MUZDALIFAH, I. (2014). Identification of Antibiotic-Resistance Genes from Lactic Acid Bacteria in Indonesian Fermented Foods. *HAYATI Journal of Biosciences*, 21(3), 144-150.
- Svensson, L., Sekwati-Monang, B., Lopez-Lutz, D., Schieber, A. y Gänzle, M.G. (2010). Phenolic acids and flavonoids in nonfermented and fermented red sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9214-9220.
- Tabasco, R., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M.V., Peláez, C. y Requena, T. (2011) Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: resistance and metabolism. *Food Microbiol*, 28, 1345- 1352.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W. (1976). Bacteriocins or Grampositive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40, 722-756.
- Tamang, J.P., Tamang, B., Schillinger, U., Franz, C.M., Gores, M. y Holzapfel, W.H. (2005). Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. *International journal of food microbiology*, 105(3), 347-356.
- Terrade, N. y de Orduña, R. M. (2009). Determination of the essential nutrient requirements of wine-related bacteria from the genera *Oenococcus* and *Lactobacillus*. *International journal of food microbiology*, 133(1-2), 8-13.
- Terraf, M. L., Juárez Tomás, M. S., Nader-Macías, M. E. F. y Silva, C. (2012). Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. *Journal of applied microbiology*, 113(6), 1517-1529.
- Teusink, B., van Enkevort, F. H. J., Francke, C., Wiersma, A., Wegkamp, A., Smid, E. J. y Siezen, R. J. (2005). In silico reconstruction of the metabolic pathways of *Lactobacillus plantarum*: comparing

- predictions of nutrient requirements with those from growth experiments. *Applied Environmental Microbiology*, 71, 7253–7262.
- Thirabunyanon, M. y Thongwittaya, N. (2012) Protection activity of a novel probiotic strain of *Bacillus subtilis* against *Salmonella enteritidis* infection. *Res. Vet. Sci*, 93, 74-81.
- Timmerman, H.M., Koning, C.J.M., Mulder, L., Rombouts, F.M. y Beynen, A.C. (2004). Monostrain, multistrain and multispecies probiotics a comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 219–233.
- Tiwari, U., y Cummins, E. (2013). Factors influencing levels of phytochemicals in selected fruit and vegetables during pre-and post-harvest food processing operations. *Food Research International*, 50(2), 497-506.
- Torriani, S., Felis, G.E. y Dellaglio, F. (2001) Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3450–3454.
- Trias, R., Bañeras, L., Badosa, E., y Montesinos, E. (2008). Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 50-60.
- Trias, R., Bañeras, L., Montesinos, E., y Badosa, E. (2008). Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International Microbiology*, 11(4), 231.
- Tsai, J. C., Huang, G. J., Chiu, T. H., Huang, S. S., Huang, S. C., Huang, T. H. y Lee, C. Y. (2011). Antioxidant activities of phenolic components from various plants of *Desmodium* species. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(4), 468-476.
- Ugolini, L., Martini, C., Lazzeri, L., D'Avino, L. y Mari, M. (2014). Control of postharvest grey mould (*Botrytis cinerea* Per.: Fr.) on strawberries by glucosinolate-derived allyl-isothiocyanate treatments. *Postharvest biology and technology*, 90, 34-39.
- Ukuku, D.O., Geveke, D.J., Chau, L. y Niemira, B.A. (2016). Microbial safety and overall quality of cantaloupe fresh-cut pieces prepared from whole fruit after wet steam treatment. *International journal of food microbiology*, 231, 86-92.
- Valente, A., Albuquerque, T. G., Sanches-Silva, A. y Costa, H. S. (2011). Ascorbic acid content in exotic fruits: A contribution to produce quality data for food composition databases. *Food Research International*, 44(7), 2237-2242.
- Valero, M., Selma, M.V., Salmeron, M.C. y Fernandez, P.S. (2006). Efficacy of pulsed electric fields for *Listeria monocytogenes* inactivation and control in horchata. *Journal of food safety*, 26(2), 137-149.
- Van De Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S.D. y Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 187-216.
- Vanangelgem, F., Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Lefebvre, K., Pot, B. y De Vuyst, L. (2006). Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and applied microbiology*, 29(6), 487-495.

- Vaquero, M.J.R. y De Nadra, M.C.M. (2008). Growth parameter and viability modifications of *Escherichia coli* by phenolic compounds and argentine wine extracts. *Applied biochemistry and biotechnology*, 151(2-3), 342-352.
- Vaquero, M.J.R., Alberto, M. R. y de Nadra, M.C.M. (2007). Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(5), 587-593.
- Vaquero, M.J.R., Alberto, M. R. y de Nadra, M.C.M. (2007). Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(5), 587-593.
- Vergès, C., Cornet, M. y Zagorec, M. (2002). *Lactobacillus sakei*: recent developments and future prospects *Research. Microbiology*, 153, 115-123.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., y Debevere, J. (2004). Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 96(2), 149-164.
- Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36(9-10), 895-904.
- Vinderola, C. G., Medici, M. y Perdigon, G. (2004). Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 96(2), 230-243.
- Vinderola, C. G., Mocchiutti, P. y Reinheimer, J. A. (2002). Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *Journal of Dairy science*, 85(4), 721-729.
- Viswanathan, P. y Kaur, R. (2001). Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruits and sprouts. *International journal of hygiene and environmental health*, 203(3), 205-213.
- Wang, H., Yan, Y., Wang, J., Zhang, H. y Qi, W. (2012). Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU0014. *PLoS ONE* 7, 29452.
- Warriner, K. (2005). Pathogens in vegetables. In W. Jongen (Ed.), Cambridge Woodhead Publishing limited and CRC Press. Improving the safety of fresh fruit and vegetables, 3-43.
- Yáñez, R., Gullon, B., Alonso, J. L. y Parajó, J. C. L. (2008). L-Lactic acid production from apple pomace by sequential hydrolysis and fermentation. *Bioresource technology*, 99(2), 308-319.
- Yanez, R., Marques, S., Girio, M.F. y Roseiro, J.C. (2008) The effect of acid stress on lactate production and growth kinetics in *Lactobacillus Rhamnosus* cultures. *Process Biochemistry*, 43, 356–361.
- Zanoni, P., Farrow, J.A., Phillips, B.A. y Collins, M.D. (1987). *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson, and Anderson) sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 339-341.
- Zhang, G.Y., Mills, D.A., Block, D.E. (2009). Development of chemically defined media supporting high-cell-density growth of lactococci, enterococci, and streptococci. *Applied Environmental Microbiology*, 75, 1080-1087.

- Zheng, X., Yu, Y., Xiao, G., Xu, Y., Wu, J., Tang, D. y Zhang, Y. (2014). Comparing product stability of probiotic beverages using litchi juice treated by high hydrostatic pressure and heat as substrates. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 23, 61-67.
- Zhou, J. S., Pillidge, C. J., Gopal, P. K. and Gill, H. S. (2012). Antibiotic Susceptibility Profiles of New Probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains. *International Journal of Food Microbiology* 98, 211- 217.
- Zhu, Q., Gooneratne, R., y Hussain, M. (2017). *Listeria monocytogenes* in fresh produce: Outbreaks, prevalence and contamination levels. *Foods*, 6(3), 21.



CONICET

