

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

**ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE
LACTOBACILOS AUTÓCTONOS POTENCIALMENTE
PROBIÓTICOS FRENTE A BACTERIAS CAUSANTES DE ETA
EN MANZANAS MÍNIMAMENTE PROCESADAS**

Por

María Sara SALSI

Directora de Tesis: Andrea Marcela PIAGENTINI

Co-Directora de Tesis: María Florencia ZACARÍAS

Miembros del Jurado: Dra. Patricia BURNS

Dra. Andrea QUIBERONI

Dra. Silvia del Carmen RODRÍGUEZ

INSTITUTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Para quien lo necesite

Agradecimientos

Siempre puede haber alguien injustamente excluido, para evitarlo ...

*Gracias a Dios,
y a todos,
por brindarme esta oportunidad de aprender y crecer.*

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xiv
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1. <i>FRUTAS MÍNIMAMENTE PROCESADAS</i>	17
1.1.1 Consumo y propiedades nutricionales.....	17
1.1.2 Procesamiento Mínimo.....	18
1.1.3 Cambios en la fruta derivados del procesamiento	20
1.1.4 Aspectos microbiológicos ligados a la producción de frutas mínimamente procesadas	22
1.1.4.1 Microbiota	22
1.1.4.2 Enfermedades transmitidas por alimentos.....	24
1.1.4.3 Vías de contaminación	25
1.1.4.4 Frutas mínimamente procesadas y patógenos alimentarios.....	26
1.1.4.4 Tecnologías alternativas de conservación	29
1.2 <i>BIOCONSERVACIÓN</i>	30
1.2.1 Cultivos protectores en fruta mínimamente procesada.....	31
1.2.2 Cultivos probióticos como cultivos protectores	32
2. OBJETIVOS	36
2.1 <i>OBJETIVO GENERAL</i>	36
2.2 <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	36
3. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1 <i>CEPAS: CONSERVACIÓN Y MEDIOS DE CULTIVO</i>	38
3.2 <i>PRUEBAS DE ANTAGONISMO BACTERIANO</i>	39
3.2.1 Ensayo inicial	39
3.2.2 Ensayo con sobrenadantes libres de células (SLC)	40

3.2.3 Análisis estadístico	42
3.3 <i>ESTUDIO DE LAS CINÉTICAS DE INTERACCIÓN DE LAS BACTERIAS INDICADORAS FRENTE A LOS LACTOBACILOS EN COCULTIVO</i>	42
3.3.1 Ensayos preliminares	43
3.3.2 Preparación de cocultivos y cultivos controles. Ensayo de almacenamiento a diferentes temperaturas	44
3.3.3 Modelado y obtención de los parámetros cinéticos	44
3.4 <i>DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES OPERATIVAS PARA LA INCORPORACIÓN DE LOS LACTOBACILOS EN MANZANAS FRESCAS CORTADAS</i>	46
3.4.1 Determinación de la concentración inicial de lactobacilos	46
3.4.1.1 Ejecución del diseño experimental	48
3.4.2 Determinación del tiempo de inmersión y relación volumen de solución/peso de la fruta	49
3.4.2.1 Ejecución del diseño experimental	51
3.4.3 Análisis estadístico	52
3.5 <i>ESTUDIO DEL EFECTO DE L. plantarum 998 APLICADO EN MANZANAS FRESCAS CORTADAS SOBRE LA MICROBIOTA NATIVA DE LA FRUTA Y FRENTE A UNA CONTAMINACIÓN CON Salmonella Newport ITA S12</i>	53
3.5.1. Diseño Experimental	53
3.5.2 Análisis microbiológicos	56
3.5.3 Análisis Estadístico.	57
3.6 <i>ESTUDIO DEL EFECTO DE L. plantarum 998 APLICADO EN MANZANAS FRESCAS CORTADAS SOBRE SUS ATRIBUTOS DE CALIDAD</i>	58
3.6.1 Determinación de pH y sólidos solubles	58
3.6.2 Determinación de Propiedades Mecánicas	59
3.6.3 Determinación del color	60
3.6.4 Determinación de fenoles totales, capacidad antioxidante y contenido de vitamina C	61
3.6.5 Análisis estadístico	63

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
4.1 <i>PRUEBAS DE ANTAGONISMO BACTERIANO</i>	65
4.2 <i>ESTUDIO DE LAS CINÉTICAS DE INTERACCIÓN DE LAS BACTERIAS</i> <i>INDICADORAS FRENTE A LOS LACTOBACILOS EN COCULTIVO</i>	70
4.2.1 Ensayos preliminares	70
4.2.2 Modelado y obtención de los parámetros cinéticos	71
4.2.3 Interacciones durante el almacenamiento a 5°C	72
4.2.4 Interacciones durante el almacenamiento a 10 °C	81
4.2.5 Interacciones durante el almacenamiento a 15°C	92
4.2.6 Análisis conjunto de las pruebas de antagonismo y cinéticas de inhibición de las las bacterias indicadoras frente a los lactobacilos	101
4.3 <i>DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES OPERATIVAS PARA LA</i> <i>INCORPORACIÓN DE LOS LACTOBACILOS EN MANZANAS</i> <i>FRESCAS CORTADAS</i>	103
4.3.1 Determinación de la concentración inicial de lactobacilos	103
4.3.2 Determinación del tiempo de inmersión, relación volumen solución / peso fruta	114
4.4 <i>ATRIBUTOS DE CALIDAD DE MANZANAS FRESCAS CORTADAS</i>	116
4.4.1 Determinación de pH y sólidos solubles	117
4.4.2 Determinación de Propiedades Mecánicas	120
4.4.3 Determinación del color	121
4.4.4 Determinación de fenoles totales, capacidad antioxidante y vitamina C	126
4.5 <i>INTERACCIÓN ENTRE <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 998 Y LA</i> <i>MICROBIOTA NATIVA DE MANZANAS FRESCAS CORTADAS</i>	132
4.5.1 Microorganismos Aerobios Mesófilos Totales	132
4.5.2 Microorganismos Psicrotrofos	134
4.5.3 Mohos y levaduras	136
4.5.4 Bacterias Ácido Lácticas	137
4.6 <i>INTERACCIÓN ENTRE <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 998 Y</i> <i><i>Salmonella</i> Newport ITA S12 EN MANZANAS FRESCAS CORTADAS</i>	139

4.6.1 Estudio de la evolución de <i>Salmonella</i> Newport ITA S12, en manzanas frescas cortadas, almacenadas a 5° C y a 15° C	139
4.6.2 Estudio de la evolución de <i>L. plantarum</i> 998, en manzanas frescas cortadas inoculadas con <i>S. Newport</i> ITA S12, almacenadas a 5° C y a 15° C.	148
4.6.3 Correlación del comportamiento de <i>L. plantarum</i> 998 y <i>S. Newport</i> ITA S12 <i>in vitro</i> y en manzanas frescas cortadas, almacenadas a 5 y a 15° C.....	150
5. CONCLUSIONES	156
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	159

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 3.1** Cultivos controles y cocultivos almacenados a 5, 10 y 15°C durante 10 días.
- Tabla 3.2** Diseño experimental de Box-Behnken *in vitro* para determinar la concentración inicial de lactobacilos en solución para su inclusión en manzanas frescas cortadas.
- Tabla 3.3** Diseño experimental de Box-Behnken para determinar la concentración inicial de inóculo (C_{in}) y de solución antioxidante.
- Tabla 3.4** Diseño experimental de Box-Behnken para la determinación del tiempo de inmersión, relación volumen solución/ peso fruta.
- Tabla 3.5** Estudio del efecto combinado tiempo de inmersión – relación volumen solución/peso fruta (R). Diseño experimental de Box-Behnken.
- Tabla 3.6** Resumen de muestras de cubos de manzanas almacenadas a 5°C y a 15°C con sus respectivos tratamientos.
- Tabla 3.7** Análisis microbiológicos según el grupo de muestra analizado a 5°C y a 15°C.
- Tabla 4.1** Actividad antagonista de *L. plantarum* 998 y *L. rhamnosus* 64 frente a las cepas indicadoras utilizando el método de la doble capa de agar.
- Tabla 4.2** Actividad antagonista de los SLC sin neutralizar de *L. plantarum* 998 y *L. rhamnosus* 64 frente a bacterias indicadoras utilizando el método de difusión en agar (diámetro de los pozos: 6 mm).
- Tabla 4.3** Recuentos de bacterias indicadoras en sus medios selectivos agarizados para la comparación de crecimiento en Caldo Triptona Soya (TS) y Caldo Man Rogosa Sharpe (MRS).
- Tabla 4.4.** Parámetros cinéticos estimados del modelo de Baranyi y Roberts para el ajuste de la evolución de los recuentos de los cultivos control y cocultivos conservados a 5°C durante 10 días.
- Tabla 4.5.** Parámetros cinéticos estimados del modelo de Baranyi y Roberts para el ajuste de la evolución de los recuentos de los cultivos control y cocultivos conservados a 10°C durante 10 días.
- Tabla 4.6** Parámetros cinéticos estimados del modelo de Baranyi y Roberts para el ajuste de la evolución de los recuentos de los cultivos control y cocultivos conservados a 15° C durante 10 días.
- Tabla 4.7** Recuentos de *L. plantarum* 998 (N_0 , N_{30} y N_{60}) y su variación relativa ($\log N_{30}/N_0$, $\log N_{60}/N_0$) para los diferentes tiempos de contacto (0, 30 y 60 min) con las distintas combinaciones de soluciones de ácido cítrico (C_{AC}) y de ácido ascórbico (C_{AA}).
- Tabla 4.8** Análisis de varianza de los modelos obtenidos para la variación relativa de la concentración de *L. plantarum* 998 en función de C_{AA} , C_{AC} y C_{in} , para cada tiempo de exposición
- Tabla 4.9** Recuentos de *L. rhamnosus* 64 (N_0 , N_{30} y N_{60}) y su variación relativa ($\log N_{30}/N_0$, $\log N_{60}/N_0$) para los diferentes tiempos de contacto (0, 30 y 60 min) con las distintas combinaciones de soluciones de ácido cítrico (C_{AC}) y de ácido ascórbico (C_{AA}).
- Tabla 4.10** Análisis de varianza de los modelos obtenidos para la variación relativa de la concentración de *L. rhamnosus* 64 en función de C_{AA} , C_{AC} y C_{in} , para cada tiempo de exposición.
- Tabla 4.11** pH, sólidos solubles y concentración *L. plantarum* 998 obtenidos para manzanas frescas cortadas cada tiempo de inmersión (t_{imm}) y relación volumen de solución / peso de fruta (R).
- Tabla 4.12** Análisis de varianza de los modelos obtenidos para pH, sólidos solubles y concentración de *L. plantarum* 998 en manzanas frescas cortadas función tiempo del inmersión (t_{imm}) y la relación (R).
- Tabla 4.13** pH, sólidos solubles (SS), firmeza (F), concentración de fenoles totales (CFT), concentración de vitamina C (Vit C) y capacidad antioxidante (CAO) de manzanas frescas cortadas durante su almacenamiento a 5°C.

Tabla 4.14 pH, sólidos solubles (SS), firmeza (F), concentración de fenoles totales (CFT), concentración de vitamina C (Vit. C) y capacidad antioxidante (CAO) de manzanas frescas cortadas durante su almacenamiento a 15°C.

Tabla 4.15 Parámetros de color a^* y h_{ab} de las muestras de manzanas frescas cortadas durante el almacenamiento a 5°C

Tabla 4.16 Parámetros de color a^* y h_{ab} de las muestras de manzanas cortadas durante el almacenamiento a 15°C

Tabla 4.17 Recuentos de *S. Newport* ITA S12 en las distintas muestras de manzanas frescas cortadas almacenadas a 5 y a 15°C.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Esquema general del procesado mínimo de fruta. Adaptado de Artés y Allende (2014).
- Figura 1.2.** Esquema simplificado de los cambios fisiológicos, químicos y microbiológicos ocurridos en la fruta mínimamente procesada.
- Figura 1.3.** Distribución de los brotes de enfermedades microbianas relacionadas con los alimentos RTE considerados en la literatura revisada, desde 1980 hasta 2016, en relación con grupos específicos de alimentos, para los que se identificó claramente el año de ocurrencia.
- Figura 1.4** Diagrama esquemático de la estructura de un tejido vegetal contaminado con microorganismos. (A) imagen de microscopía electrónica de barrido de la superficie de una manzana gala; (B) estomas contaminados con *E. coli* O157:H7; (C) agregado de *E. coli* O157:H7 internalizado en un estoma de manzana (Yoon y Lee, 2018).
- Figura 3.1** Esquema del método de la doble capa de agar.
- Figura 3.2** Esquema del método por difusión en agar.
- Figura 3.3** Representación de los modelos a) completo; b) no lag; c) no asintótico; d) lineal.
- Figura 3.3** Esquema de la ejecución del diseño experimental para la determinación de las variables operativas tiempo de inmersión y relación volumen solución/peso fruta.
- Figura 3.4** Esquema de los distintos flujos de procesamiento de las manzanas frescas cortadas. Flechas **verdes**: muestras MP. Flechas **naranjas**: muestras C. Flechas **azules**: muestras LP.
- Figura 3.5** pHmetro y refractómetro.
- Figura 3.6** Texturómetro TA.XT Plus Stable Microsystems con probeta de punción.
- Figura 3.7** Representación gráfica de los espacios de color CIE Lab y CIE LC_{ab}h_{ab}.
- Figura 4.1** Prueba de antagonismo microbiano (doble capa) de (A) *L. plantarum* 998 (LP) y de (B) *L. rhamnosus* 64 (LR) frente a (1) *E. coli* ATCC 25922, (2) *L. monocytogenes* ATCC 15313 y (3) *Salmonella* Newport ITA S12.
- Figura 4.2** Prueba de difusión en pozos de los sobrenadantes libres de células con pH neutralizado (N) y sin neutralizar (A) de las cepas de *L. plantarum* 998 (Lr), *L. rhamnosus* 64 (Lp) y *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (LGG – no interviene en este estudio) frente a *E. coli* ATCC 25922 y a *Salmonella* Newport ITA S12.
- Figura 4.3** Estriado de las cepas indicadoras, de *L. rhamnosus* 64 (LR) y de *L. plantarum* 998 (LR) en los medios selectivos de recuento. (A) *E. coli* ATCC 25922, Agar EMB; (B) *L. monocytogenes* ATCC 15313, Agar Oxford Modificado y (C) *S. Newport*, Agar XLD.
- Figura 4.4** Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *E. coli* ATCC 25922 en cultivo control (EC) y en cocultivo con *L. plantarum* 998 (EC – LP) y de *L. plantarum* 998 en cultivo control (LP) y en cocultivo (LP – EC) a 5° C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.
- Figura 4.5** Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *E. coli* ATCC 25922 en cultivo puro (EC) y en cocultivo con *L. rhamnosus* 64 (EC – LR) y de *L. rhamnosus* 64 en cultivo puro (LR) y en cocultivo (LR – EC) a 5° C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

Figura 4.6 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *S. Newport* ITA S12 en cultivo control (SN) y en cocultivo con *L. plantarum* 998 (SN – LP) y de *L. plantarum* 998 en cultivo control (LP) y en cocultivo (LP – SN) a 5° C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

Figura 4.7 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *S. Newport* ITA S12 en cultivo puro (SN) y en cocultivo con *L. rhamnosus* 64 (SN – LR) y de *L. rhamnosus* 64 en cultivo puro (LR) y en cocultivo (LR – SN) a 5° C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

Figura 4.8 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *L. monocytogenes* ATCC 15313 en cultivo control (LM) y en cocultivo con *L. plantarum* 998 (LM – LP) y de *L. plantarum* 998 en cultivo control (LP) y en cocultivo (LP – LM) a 5° C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

Figura 4.9 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *L. monocytogenes* ATCC 15313 en cultivo puro (LM) y en cocultivo con *L. rhamnosus* 64 (LM – LR) y de *L. rhamnosus* 64 en cultivo puro (LR) y en cocultivo (LR – LM) a 5° C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

Figura 4.10 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *E. coli* ATCC 25922 en cultivo control (EC) y en cocultivo con *L. plantarum* 998 (EC – LP) y de *L. plantarum* 998 en cultivo control (LP) y en cocultivo (LP – EC) a 10° C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

Figura 4.11 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *E. coli* ATCC 25922 en cultivo puro (EC) y en cocultivo con *L. rhamnosus* 64 (EC – LR) y de *L. rhamnosus* 64 en cultivo puro (LR) y en cocultivo (LR – EC) a 10°C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

Figura 4.12 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *S. Newport* ITA S12 en cultivo control (SN) y en cocultivo con *L. plantarum* 998 (SN – LP) y de *L. plantarum* 998 en cultivo control (LP) y en cocultivo (LP – SN) a 10°C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

Figura 4.13 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *S. Newport* ITA S12 en cultivo puro (SN) y en cocultivo con *L. rhamnosus* 64 (SN – LR) y de *L. rhamnosus* 64 en cultivo puro (LR) y en cocultivo (LR – SN) a 10°C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

Figura 4.14 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *L. monocytogenes* ATCC 15313 en cultivo control (LM) y en cocultivo con *L. plantarum* 998 (LM – LP) y de *L. plantarum* 998 en cultivo control (LP) y en cocultivo (LP – LM) a 10°C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

Figura 4.15 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *L. monocytogenes* ATCC 15313 en cultivo puro (LM) y en cocultivo con *L. rhamnosus* 64 (LM – LR) y de *L. rhamnosus* 64 en cultivo puro (LR) y en cocultivo (LR – LM) a 10°C. Curva de pH del

cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

Figura 4.16 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *E. coli* ATCC 25922 en cultivo control (EC) y en cocultivo con *L. plantarum* 998 (EC – LP) y de *L. plantarum* 998 en cultivo control (LP) y en cocultivo (LP – EC) a 15° C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

Figura 4.17 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *E. coli* ATCC 25922 en cultivo puro (EC) y en cocultivo con *L. rhamnosus* 64 (EC – LR) y de *L. rhamnosus* 64 en cultivo puro (LR) y en cocultivo (LR – EC) a 15°C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

Figura 4.18 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *S. Newport* ITA S12 en cultivo control (SN) y en cocultivo con *L. plantarum* 998 (SN – LP) y de *L. plantarum* 998 en cultivo control (LP) y en cocultivo (LP – SN) a 15°C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

Figura 4.19 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *S. Newport* ITA S12 en cultivo puro (SN) y en cocultivo con *L. rhamnosus* 64 (SN – LR) y de *L. rhamnosus* 64 en cultivo puro (LR) y en cocultivo (LR – SN) a 15°C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

Figura 4.20 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *L. monocytogenes* ATCC 15313 en cultivo control (LM) y en cocultivo con *L. plantarum* 998 (LM – LP) y de *L. plantarum* 998 en cultivo control (LP) y en cocultivo (LP – LM) a 15°C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

Figura 4.21 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *L. monocytogenes* ATCC 15313 en cultivo puro (LM) y en cocultivo con *L. rhamnosus* 64 (LM – LR) y de *L. rhamnosus* 64 en cultivo puro (LR) y en cocultivo (LR – LM) a 15°C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

Figura 4.22 Gráfica de superficie de respuesta estimada para (a) 30 min de contacto y (b) 60 min de contacto, de la variación de la concentración de *L. plantarum* 998 en función de C_{AC} y C_{in} manteniendo $C_{AA}=0,5\%$ p/v ($\Delta = \log N / N_0$).

Figura 4.23 Gráfica de Efectos Principales (C_{AA} , C_{AC} y C_{in}) para la variación de la concentración de *L. plantarum* 998 para (a) 30 min de contacto y (b) 60 min de contacto. ($\Delta = \log N / N_0$)

Figura 4.24 Diagrama de Pareto estandarizado para la variación de la concentración de *L. plantarum* 998 para (a) 30 min de contacto y (b) 60 min de contacto ($\Delta = \log N / N_0$).

Figura 4.25 Gráfica de superficie de respuesta estimada para (a) 30 min de contacto y (b) 60 min de contacto, de la variación de la concentración de *L. rhamnosus* 64 en función de C_{AC} y C_{in} manteniendo $C_{AA}=0,5\%$ p/v. ($\Delta = \log N / N_0$).

Figura 4.26 Gráfica de Efectos Principales (C_{AA} , C_{AC} y C_{in}) para la variación de la concentración de *L. rhamnosus* 64 para (a) 30 min de contacto y (b) 60 min de contacto. ($\Delta = \log N / N_0$)

Figura 4.27 Diagrama de Pareto estandarizado para la variación de la concentración de *L. rhamnosus* 64 para (a) 30 min de contacto y (b) 60 min de contacto. ($\Delta = \log N / N_0$).

Figura 4.28 pH (promedio \pm SD) de muestras de manzanas MP, C y LP al día cero y luego de 7 días de almacenamiento a 5°C y 15°C.

Figura 4.29 Sólidos solubles (promedio \pm SD) de muestras de manzanas MP, C y LP al día cero y luego de 7 días de almacenamiento a 5°C y 15°C.

Figura 4.30 Firmeza (promedio \pm SD) de muestras de manzanas MP, C y LP al día cero y luego de 7 días de almacenamiento a 5°C y 15°C.

Fig. 4.31 Cambios en el color de cubos de manzanas almacenados 7 días a 5°C. (A) Sin tratamiento, muestras MP; (B) tratados sólo con solución antioxidante, muestras C; (C) tratados con solución antioxidante donde se incorporó *L. plantarum* 998, muestras LP.

Fig. 4.32 Cambios en el color de cubos de manzanas almacenados 7 días a 15°C. (A) Sin tratamiento, muestras MP; (B) tratados sólo con solución antioxidante, muestras C; (C) tratados con solución antioxidante donde se incorporó *L. plantarum* 998, muestras LP.

Figura 4.33 Concentración de fenoles totales (CFT), de muestras de manzanas MP, C y LP al día cero y luego de 7 días de almacenamiento a 5°C y 15°C.

Figura 4.34 Capacidad antioxidante de muestras de manzanas frescas cortadas MP, C y LP al día cero y luego de 7 días de almacenamiento a 5°C y 15°C.

Figura 4.35 Contenido de Vitamina C de muestras de manzanas MP, C y LP al día cero y luego de 7 días de almacenamiento a 5°C y 15°C.

Figura 4.36 Recuentos de **Microorganismos Aerobios Mesófilos Totales**, a los días 0 y 7 de almacenamiento a 5 y a 15 °C, para las muestras MP, C y LP de manzanas frescas cortadas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Figura 4.37 Recuentos de **Microorganismos Psicrótrofos**, a los días 0 y 7 de almacenamiento a 5 y a 15 °C, para las muestras de manzanas MP, C y LP. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Figura 4.38 Recuentos de **Mohos y Levaduras**, a los días 0 y 7 de conservación a 5 y a 15 °C, para las muestras de manzanas MP, C y LP. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Figura 4.39 Valores de recuento de **Bacterias Ácido Lácticas** a los días 0 y 7 de su conservación a 5 y a 15° C para las muestras MP, C y LP de manzanas frescas cortadas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 4.40. Valores de recuento de *S. Newport* ITA S12 en los distintos grupos de muestras de manzanas frescas cortadas conservadas a 5 y a 15°C. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para los distintos días en cada muestra.

Figura 4.41 Variación de los recuentos de *S. Newport* ITA S12 para cada día de muestreo con respecto al día cero, en los distintas muestras de manzanas frescas cortadas conservadas a 5° C

Figura 4.42 Variación de los recuentos de *S. Newport* ITA S12 para cada día de muestreo con respecto al día cero, en los distintos grupos de muestras de manzanas frescas cortadas conservadas a 15° C.

Figura 4.43 Valores de recuento de *L. plantarum* 998 en muestras de manzanas frescas cortadas, inoculadas con *S. Newport* ITA S12 (muestras LP+SN) almacenadas a 5 y a 15° C. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 4.44 Valores de recuento de *L. plantarum* 998 en muestras de manzanas frescas cortadas con (LP+SN) y sin inoculación (LP) con *S. Newport* ITA S12 durante su conservación a 5° C y a 15° C. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 4.45. Variación de los recuentos de *S. Newport* ITA S12, entre los días 0 y 7 de conservación a 5 y a 15°C, *in vitro* y en muestras de manzanas frescas cortadas

Figura 4.46 Variación de los recuentos de *L. plantarum* 998, entre los días 0 y 7 de conservación a 5°C, *in vitro* y en muestras de manzanas frescas cortadas

Figura 4.47 Variación de los recuentos de *L. plantarum* 998 y de *S. Newport* ITA S12 para cada día de muestreo con respecto al día cero; en muestras de manzanas frescas cortadas sin ningún tratamiento (MP+SN), con tratamiento antioxidante (C+SN) y con la incorporación de *L. plantarum* 998 (LP+SN), almacenadas a 5°C.

Figura 4.48 Variación de los recuentos de *L. plantarum* 998 y de *S. Newport* ITA S12 para cada día de muestreo con respecto al día cero; en muestras de manzanas frescas cortadas sin ningún tratamiento (MP+SN), con tratamiento antioxidante (C+SN) y con la incorporación de *L. plantarum* 998 (LP+SN), almacenadas a 15°C.

RESUMEN

Los brotes de Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA) asociados al consumo de frutas y hortalizas frescas cortadas o mínimamente procesadas se han incrementado considerablemente en los últimos años. La bioconservación de alimentos, basada en el uso de la microbiota natural o controlada y/o de sus compuestos antimicrobianos, constituye una excelente alternativa ecológica para prolongar la vida útil de estos alimentos, contribuyendo a asegurar su inocuidad. En este estudio se evaluó el efecto antagonista de dos lactobacilos autóctonos con potencial actividad probiótica, *Lactiplantibacillus plantarum* 998 y *Lacticaseibacillus rhamnosus* 64, sobre el crecimiento de tres cepas de bacterias indicadoras relacionadas a la inocuidad de alimentos (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 y *Salmonella* Newport ITA S12) *in vitro* y en manzanas mínimamente procesadas. En primera instancia, se utilizaron pruebas de antagonismo en doble capa y de difusión en agar. Luego, la interacción entre los lactobacilos y las bacterias indicadoras fue estudiada en cultivos mixtos (cocultivos), almacenados a 5, 10 y 15°C. Las evoluciones de cada bacteria en monocultivo control y en cocultivo fueron modeladas, permitiendo determinar y comparar sus parámetros cinéticos. Posteriormente, se seleccionó uno de los lactobacilos en estudio para llevar a cabo ensayos de enriquecimiento de manzanas frescas cortadas mediante impregnación a presión atmosférica. Luego de definirse las variables operativas mediante diseños experimentales adecuados, se procedió a los ensayos en manzanas frescas cortadas en cubos, las cuales fueron tratadas con solución antioxidante y con dicha solución adicionada de *L. plantarum* 998. En ambos tratamientos, parte de los cubos se inocularon con *Salmonella* Newport ITA S12 y todas las muestras se conservaron 7 días a 5 y 15°C. Las pruebas iniciales *in vitro* indicaron que los dos lactobacilos inhibieron el crecimiento de las tres bacterias indicadoras y que dicho efecto se basó principalmente en la producción de compuestos

ácidos. *L. plantarum* 998 fue el lactobacilo más eficaz para inhibir el crecimiento e inactivar a las tres bacterias indicadoras en cocultivo. *S. Newport* ITA S12 fue la más sensible a su efecto y *L. monocytogenes* ATCC 15313 la menos afectada. *L. plantarum* 998 pudo sobrevivir en las manzanas frescas cortadas durante 7 días a 5 y a 15°C con mínima variación de sus niveles, manteniendo y/o mejorando, la capacidad antioxidante y los atributos sensoriales característicos de la fruta. También, ejerció un efecto de control sobre la microbiota nativa de las manzanas (microorganismos aerobios mesófilos totales, microorganismos psicrótrofos y mohos y levaduras). Al final del período de almacenamiento a 5°C, la población de *S. Newport* ITA S12 se redujo en las muestras de manzanas impregnadas con *L. plantarum* 998 en la misma magnitud que en las muestras tratadas sólo con la solución antioxidante. Sin embargo a 15°C, mientras que los niveles de *S. Newport* ITA S12 no sobrepasaron su carga original en las manzanas enriquecidas con el lactobacilo, los niveles de la bacteria indicadora aumentaron en los demás grupos. Estos resultados promueven la incorporación de *L. plantarum* 998 en alimentos frescos como una opción saludable a sumarse a las barreras existentes en el procesamiento, para moderar el crecimiento de la microbiota no deseable y para mantener la inocuidad del alimento, especialmente ante abusos de temperatura.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. FRUTAS MÍNIMAMENTE PROCESADAS

1.1.1 Consumo y propiedades nutricionales

En una dieta humana equilibrada, las frutas frescas son componentes básicos. Los beneficios nutricionales asociados a su consumo, avalados por una extensa evidencia científica, demuestran que junto a las hortalizas constituyen el mayor aporte alimentario de macronutrientes como fibra y carbohidratos, y micronutrientes como la Vitamina C, vitaminas del grupo B (tiamina, riboflavina, B6, niacina, folato), A, E y minerales . Además, presentan en su composición fitoquímicos no nutritivos como los compuestos fenólicos, flavonoides y péptidos bioactivos, con múltiples propiedades beneficiosas para la salud humana que aún siguen en estudio (CDC, 2011; Septiembre – Malaterre y col., 2018; Castro Acosta, 2019). Se ha comprobado la intervención de estos fitoquímicos en la reducción del riesgo de algunas enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo, tales como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, infarto cerebral, diabetes, obesidad y algunos tipos de cáncer (Bouayed y col., 2011; Wang y col., 2014; Alegre Vilas y col., 2020).

La manzana (*Malus domestica*) es una de las frutas más completas desde el punto de vista nutricional. Se destaca el aporte de vitaminas del grupo B (B1, B2 y B6), vitamina C y minerales (fósforo, potasio y calcio). Además, su contenido de ácido málico y de ácido tartárico facilita la digestión de alimentos con un alto contenido en grasas (Kumar y col., 2018). Su consumo está recomendado no sólo por su contenido de nutrientes sino también por el de flavonoles y polifenoles (Guo y col., 2016; Krisch y Vucseta, 2017) ya que la manzana posee la segunda mayor actividad antioxidante entre las frutas más consumidas, después del el arándano rojo (Boyer y Liu, 2004). Más

recientemente, Ichwan y col. (2021) demostraron que tanto la quercetina como el ácido 3,5 dihidroxibenzoico (fitoquímicos presentes en la manzana) tienen propiedades proneurogénicas. Es decir que pueden estimular la producción de nuevas neuronas, lo cual podría tener importantes implicancias para el proceso de aprendizaje y la memoria.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) recomiendan una ingesta mínima diaria de 400 g de productos vegetales frescos para la prevención de enfermedades crónicas y varias deficiencias de micronutrientes (FAO, 2018). Aún así, el consumo de frutas en nuestro país descendió un 45% entre 1997 y 2018, al igual que el de verduras (10%) y se encuentra por debajo de la recomendación de FAO, especialmente en los sectores sociales más vulnerables. Entre 2012 y 2013 correspondió a 227g/día (Adrogué y Orlicki, 2018). El top 5 de las frutas más consumidas en la Argentina corresponde a la naranja, la banana, la manzana, la mandarina y la pera que componen el 67% del total de frutas (268.916 toneladas) ingresadas al Mercado Central de Buenos Aires en la primera mitad del año 2021 (Zapata y Rovirosa, 2021). A nivel mundial, la búsqueda de una vida más saludable y el amplio acceso a todo tipo de información fueron factores clave para que el consumidor promedio haya incrementado su consumo de frutas y hortalizas. Es así que la producción mundial de fruta fresca aumentó en un 54%, pasando de 576,65 a 887,03 millones de toneladas métricas entre 2000 y 2020 (Statista, 2022).

1.1.2 *Procesamiento Mínimo*

Una importante herramienta para facilitar la incorporación de frutas y hortalizas en la dieta del consumidor lo constituyen las tecnologías de procesamiento mínimo (Rodríguez Arzuaga y col., 2016). El desarrollo de estas tecnologías responde a la creciente demanda de los consumidores por obtener alimentos vegetales inocuos, convenientes, frescos y listos para consumir (Artés y Allende,

2014). En los últimos veinte años, el consumo de estos productos ha crecido en forma sostenida, siendo este aumento mayor en países desarrollados y en vías de desarrollo. Estados Unidos es el país con mayor consumo (30%), seguido del Reino Unido (15%) y Francia (6%) (Inocente – Quiroz y col., 2021).

Los vegetales mínimamente procesados se definen como frutas y hortalizas frescas, limpias, cortadas, envasadas, listas para su consumo, con una fecha de caducidad en torno a los 5 a 7 días, conservadas entre 1 y 4°C, de manera de garantizar su inocuidad y su calidad nutricional y sensorial (Alegre Vilas y col., 2020). Su procesamiento incluye varias operaciones unitarias que van desde la recepción de la materia prima, pasando por el cortado, lavado - desinfección hasta el envasado y distribución como se detalla en la Fig. 1.1 (Sheng y Zhu, 2021). Varias de estas etapas pueden ofrecer oportunidades de contaminación cruzada, en las que un pequeño lote de producto contaminado con microorganismos patógenos puede ser responsable de la contaminación de un lote grande (Ramos y col., 2013). Si bien todas ellas son importantes para la obtención de un producto de calidad, el lavado - desinfección es una operación clave, ya que es la única capaz de reducir la carga microbiana total de los vegetales, así como de reducir el riesgo de contaminación cruzada con microorganismos patógenos (Artés y Allende, 2014). La efectividad de esta operación se complementa con el estricto mantenimiento de la cadena de frío hasta el consumo, para mantener la inocuidad microbiológica de estos productos (Oliveira y col., 2015).

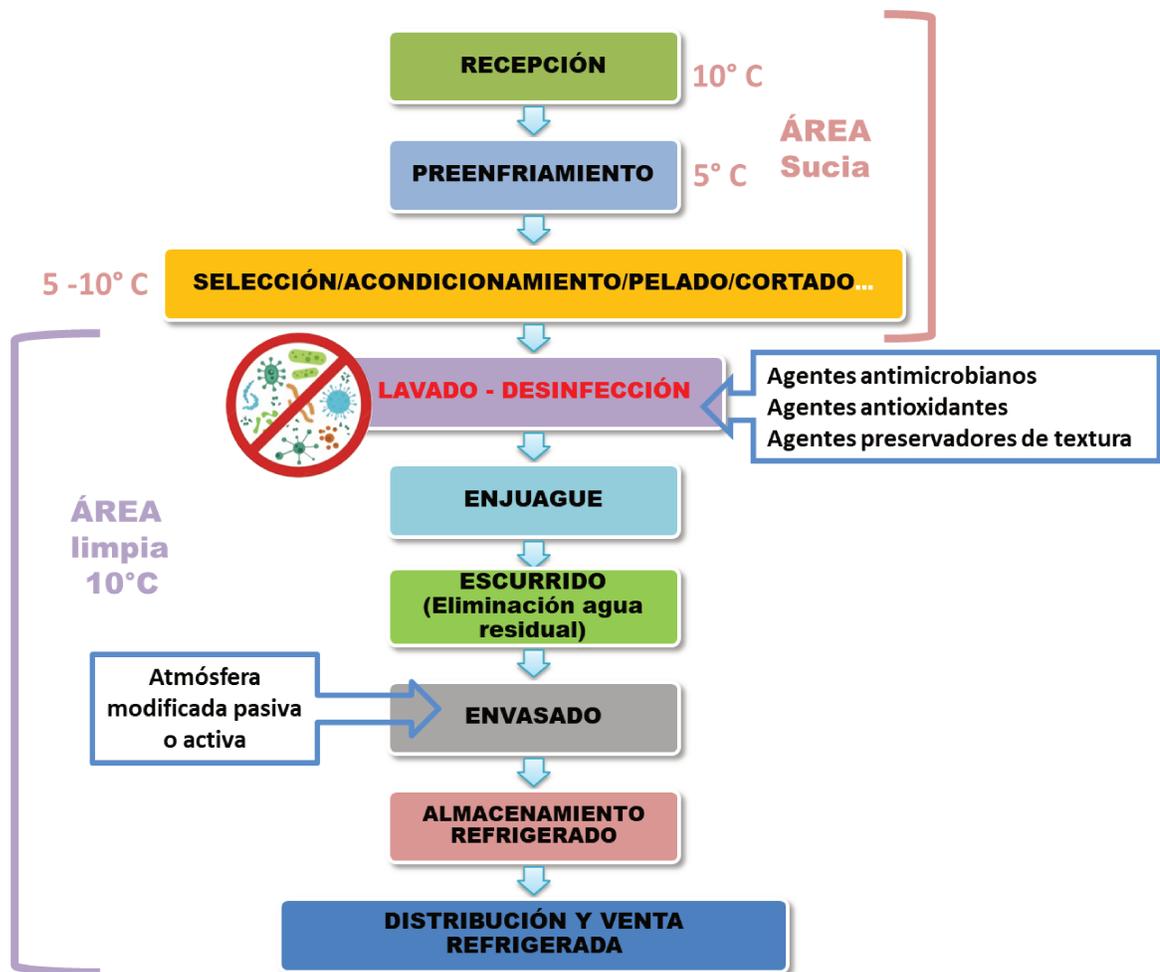


Figura 1.1. Esquema general del procesado mínimo de fruta. Adaptado de Artés y Allende (2014)

1.1.3 Cambios en la fruta derivados del procesamiento

El procesado mínimo de la fruta implica una importante alteración de su estructura con la consiguiente liberación de enzimas que interactúan con los sustratos asociados al tejido de la fruta (Fig. 1.2). Esto provoca el aumento de la producción de etileno, así como la estimulación del proceso respiratorio y del metabolismo fenólico. La fenilalanina amoníaco liasa, activada por la producción de etileno (inductor de la senescencia de la fruta), cataliza la formación de compuestos fenólicos (Fufa D., 2021). Estos compuestos, a su vez, sirven como sustratos para la enzima

polifenoloxidasas que, en presencia de oxígeno, da origen a quinonas que se polimerizan dando lugar a pigmentos pardos o rojizos (pardeamiento enzimático) especialmente en frutas y hortalizas de pulpa clara como papas, manzanas y peras (Carriel y col., 2014). El aumento de la tasa de respiración provoca pérdida de agua y reducción de los niveles de carbohidratos, vitaminas y ácidos orgánicos, con un impacto negativo en el sabor y el aroma. La pérdida de agua también se ve favorecida por la degradación de la membrana y de la pared celular dando lugar a la pérdida de turgencia. Al mismo tiempo, el crecimiento microbiano en la superficie de corte también aumenta a medida que los azúcares están disponibles, lo que acelera la posibilidad de deterioro microbiano. (Gil y Allende, 2012; De Corato, 2019; Fufa D., 2021). La contrapartida a estos mecanismos de deterioro radica en que el corte de la fruta fresca constituye un factor de stress abiótico que induce la rápida síntesis y acumulación de compuestos fenólicos en poco tiempo, lo cual puede mejorar el valor funcional de estos productos precortados (Cisneros Zeballos y Velazquez, 2020; Hu y col. 2022).

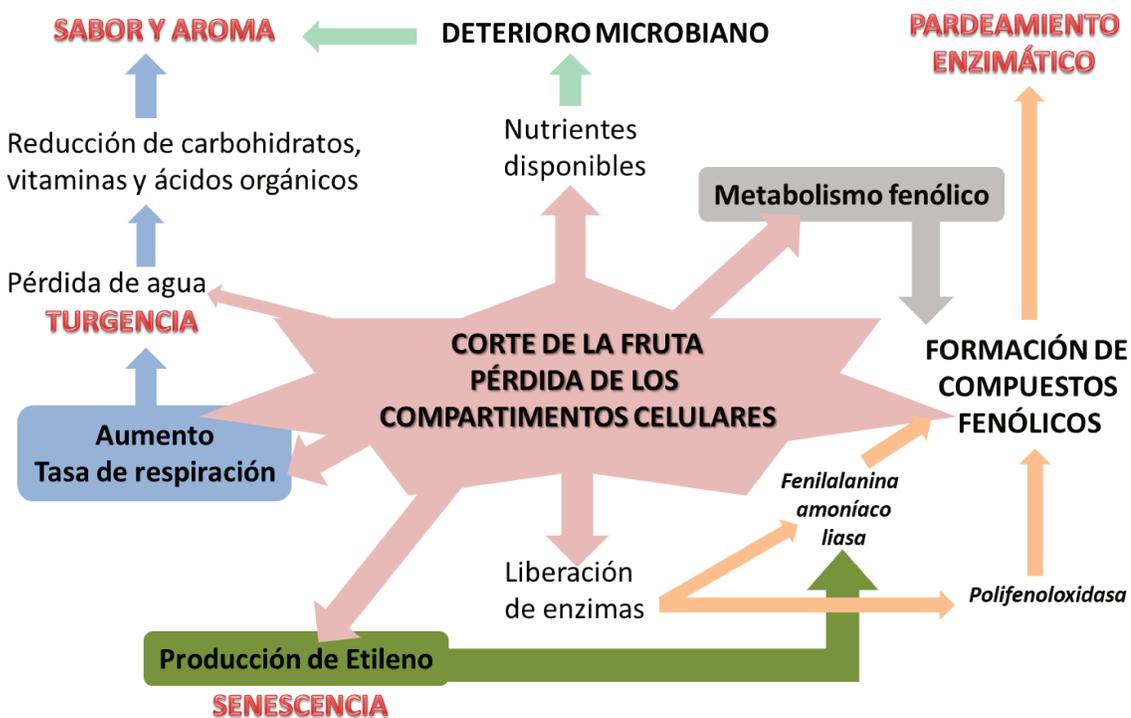


Figura 1.2. Esquema simplificado de los cambios fisiológicos, químicos y microbiológicos ocurridos en la fruta mínimamente procesada

1.1.4 Aspectos microbiológicos ligados a la producción de frutas mínimamente procesadas

1.1.4.1 Microbiota

La microbiota de las frutas y verduras frescas es diversa, no patógena y se considera normal que esté presente en los productos mínimamente procesados (en concentraciones permitidas por las regulaciones vigentes) al momento del consumo (Qadri y col., 2015). El tipo y el número de microorganismos difieren según la variedad del vegetal, las prácticas agronómicas, la zona geográfica de producción y las condiciones climáticas antes de la cosecha (Artés y Allende, 2014); así como también depende de las condiciones de cosecha, el transporte y el posterior procesamiento y manipulación de los productos (Olaimat y Holley, 2012). Las hortalizas presentan una microbiota con predominio de bacterias Gram negativas, mientras que la microbiota asociada a las frutas crudas

incluye sobre todo bacterias pectinolíticas, bacterias lácticas, levaduras y mohos. Dicha diferencia se debe principalmente al pH característico de ambos grupos de vegetales; entre 5 y 7 para las hortalizas y entre 2 a 4,5 para las frutas (ICMSF, 1998). *Pseudomonas* spp., *Erwinia herbicola*, *Flavobacterium* spp., *Xanthomonas* spp. y *Enterobacter agglomerans* están presentes tanto en frutas como hortalizas al inicio del almacenamiento refrigerado pero, en el caso de las hortalizas, *Pseudomonas* spp. tendrá predominio en la microbiota y será responsable de la alteración si la atmósfera de envasado lo permite (De Azeredo y col., 2011). En frutas, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus* spp. entre las bacterias lácticas y *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Saccharomyces* y *Candida* entre los géneros de levaduras, corresponden a los microorganismos más frecuentemente aislados (Siroli y col. 2016). El deterioro de la fruta mínimamente procesada se produce principalmente por la proliferación de su propia microbiota natural tolerante al ácido y osmófila. Las levaduras suelen ser responsables principalmente del sabor fermentado y de la producción de dióxido de carbono mientras que las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) pueden producir un sabor desagradable a suero de leche. Los mohos contribuyen al deterioro por su crecimiento superficial (Tournas y col., 2006).

Como la mayoría de las frutas, las manzanas presentan tres características que definen su tipo de microbiota: bajo pH, alto contenido de carbohidratos y elevada actividad acuosa. El pH puede variar entre 2,9 a 5 y en el caso de la variedad 'Granny Smith' entre 3,3 y 3,5 (Rodríguez Arzuaga y col. 2013, Altisent y col. 2014, Comisso y col. 2021). Esto permite el desarrollo de bacterias acidófilas de los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* y algunos pertenecientes al grupo de las BAL como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Aún así, la microbiota predominante nativa, principal responsable del deterioro microbiológico, está representada por levaduras débilmente fermentativas cuyas especies varían según la región geográfica y por algunos mohos de los géneros *Aspergillus*, *Monilia*, *Mucor* y *Penicillium* (Doores, 1983).

1.1.4.2 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)

Entre los peligros relacionados a la producción de frutas y hortalizas se encuentran los residuos de plaguicidas, los metales pesados y la contaminación microbiana patógena (Mostafidi y col., 2020). El hecho de que estos alimentos se consuman crudos y la ausencia de tratamientos térmicos de inocuidad durante su elaboración y almacenamiento, hacen que puedan albergar y ser vehículos de transmisión y/o multiplicación de microorganismos patógenos (Machado-Moreira y col., 2019). Desde 2009 hasta 2018 en Estados Unidos, un total de 266 brotes de origen alimentario con etiología confirmada se asociaron a frutas y verduras, dando lugar a 10.101 enfermedades, 1.930 hospitalizaciones y 87 muertes (CDC, 2018). De estos brotes, el 99,6% se debieron a etiologías biológicas, de las cuales el 70,6% fueron causadas por bacterias, el 25,5% y el 3,9% por virus y parásitos, respectivamente. Las etiologías bacterianas más implicadas, tanto en Estados Unidos como en la Unión Europea fueron *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, parásitos humanos: *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora* spp y virus: Hepatitis A y principalmente Norovirus (Callejón y col., 2015; EFSA y ECDC, 2019; Balali y col., 2020; Dyda y col., 2020). Según Sheng y Zhu (2021), *Salmonella* ha estado implicada en brotes o retiradas asociadas a frutas y verduras (pepinos, melones y sandías cortados, duraznos, papaya, verduras de hojas verdes) mientras que las *E. coli* productoras de toxina Shiga se relacionaron principalmente con las verduras de hoja verde (lechuga romana, iceberg) y los brotes. Aunque *L. monocytogenes* tiene una baja incidencia en los brotes recientes de productos frutihortícolas, se llevaron a cabo numerosas retiradas debido a su posible contaminación. La variedad de frutas y verduras retiradas también ha aumentado a lo largo de los años. Un gráfico de Machado – Moreira y col. (2019) (Fig 1.3), ilustra el crecimiento de los brotes de ETA relacionados a los vegetales mínimamente procesados, prácticamente desde el inicio del uso de esta tecnología, a principios de los años 80.

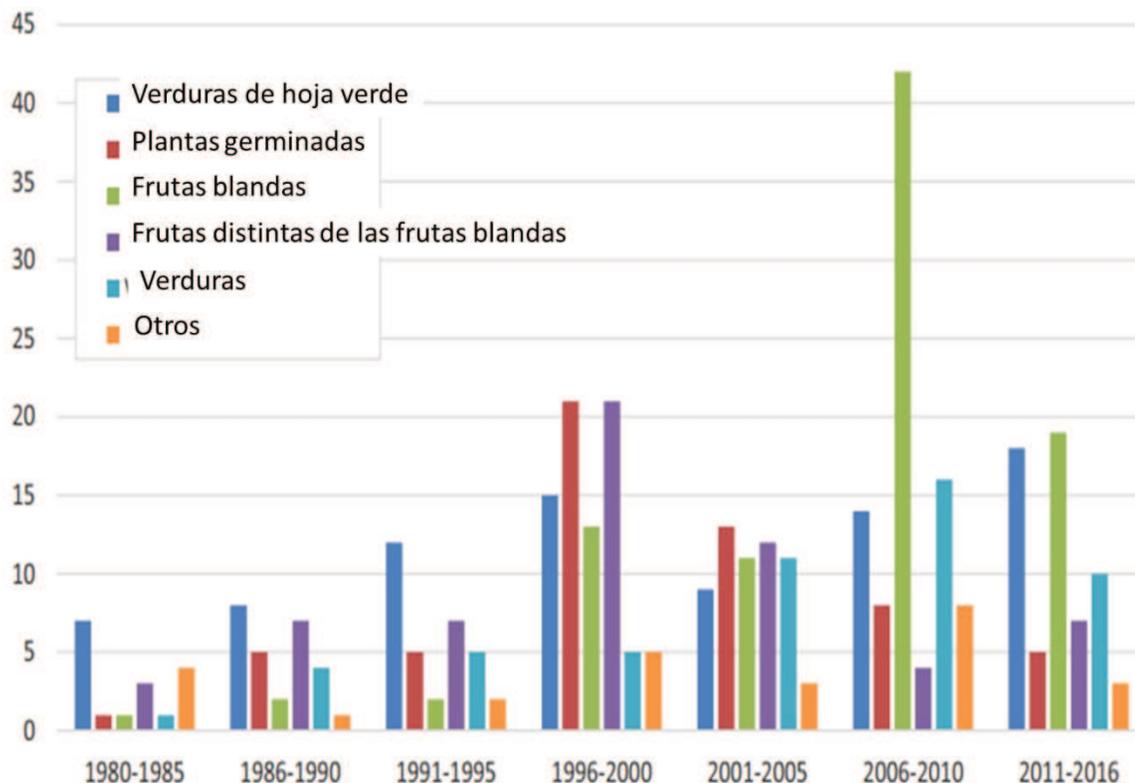


Figura 1.3. Distribución de los brotes de enfermedades microbianas relacionadas con los alimentos RTE considerados en la literatura revisada, desde 1980 hasta 2016, en relación con grupos específicos de alimentos, para los que se identificó claramente el año de ocurrencia. **Nota.** Las **verduras de hoja verde** se refieren a lechuga, albahaca, perejil, espinacas, el cilantro y berro. Las plantas germinadas incluyen alfalfa, fenogreco, semillas de hinojo, judías, semillas de anís, brotes de judías, brotes de trébol y otros brotes. **Las frutas blandas** comprenden arándanos congelados y frescos, fresas, frambuesas y otras bayas, y arilos de granada. **Las verduras** comprenden tomates, cebollas, apio, pepinos, zanahorias, rábanos, guisantes y pimientos. **Las frutas que no son frutas blandos** incluyen melón, cantalupo, sandía, zumo de naranja, zumo de manzana, zumo de cítricos, las ensaladas de frutas y el plátano piña, mamey y frutas de hueso. **La categoría otros** comprende las especias, los cereales secos, los piñones, las almendras y las avellanas. Los datos presentados no incluyen 211 brotes de norovirus que se produjeron en Estados Unidos en el periodo comprendido entre 1998 y 2005, vinculados al consumo de verduras de hoja verde, ya que no se disponía de información sobre el año en que se produjo cada brote individual.

1.1.4.3 Vías de contaminación

Los vegetales se cultivan en entornos abiertos y son propensos a la contaminación con microorganismos patógenos de diversas fuentes, como el agua de uso agrícola, el suelo, el abono, la intrusión de animales (ganado o animales silvestres), la maquinaria empleada y la manipulación humana. También puede introducirse contaminación durante el procesado mínimo e inclusive recontaminarse el producto aún después de ser sometido al proceso de lavado-desinfección (Murray

y col., 2017; Alegbeleye y col., 2018; Machado-Moreira y col., 2019). Para mitigar el riesgo de enfermedades transmitidas por los alimentos es importante que se adopten buenas prácticas en todas las etapas de la producción, dando prioridad a los procedimientos basados en los principios del Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) que incluyen como prerrequisitos a las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), las Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) y los Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES) (Maldonado y col., 2018). Las BPA recomiendan las mejores prácticas en áreas como la calidad del agua de riego, la gestión del estiércol y abonos, la gestión de la fauna silvestre, la salud e higiene de los trabajadores y la manipulación posterior a la cosecha. En Argentina, la Resolución 5/2018 (21/11/2018) de las Secretarías de Gobierno de Agroindustria y Salud incluyó en el Código Alimentario Argentino (CAA) la obligatoriedad de las BPA en la producción primaria (cultivo-cosecha) de frutas, a partir del 2 de enero de 2020 y de hortalizas desde el 4 de enero de 2021. Si bien es posible reducir los riesgos mediante la implementación de estos sistemas de gestión de la inocuidad, debido a la naturaleza de la cadena de cultivo de productos frescos, está generalmente acordado y demostrado que no es posible conseguir un riesgo cero (Iwu y Okho, 2019). En consecuencia, el principal objetivo del procesamiento mínimo de frutas y hortalizas se centra en garantizar la inocuidad alimentaria y mantener la calidad del producto mediante la reducción y/o inactivación de los microorganismos patógenos y el control de los microorganismos de deterioro (Mendoza y col., 2022).

1.1.4.4 Frutas mínimamente procesadas y patógenos alimentarios

Teniendo en cuenta los parámetros que favorecen el crecimiento bacteriano, las manzanas mínimamente procesadas no constituirían una matriz adecuada para los patógenos alimentarios, debido principalmente a su bajo pH y al uso de temperaturas de refrigeración para su conservación.

Sheng y col (2017) demostraron que *L. monocytogenes* pudo sobrevivir en la superficie de manzanas ‘Granny Smith’ durante 2 semanas a diferentes temperaturas (1, 4 y 10°C) y distintas concentraciones de inóculo. Se comprobó que cepas de *E. coli* O157: H7 fueron capaces de sobrevivir en sidra de manzana durante 21 días a pesar de la presencia de conservantes y de la acidez de la sidra (Miller y Kaspar, 1994). Se determinó también que algunos serotipos de *Salmonella enterica* como algunas cepas del serotipo Newport, pudieron resistir condiciones aún más ácidas que el mínimo pH de crecimiento de *Salmonella* spp. (3,8) mencionado por ICMSF (1996). A esto se suma la capacidad de varias cepas de *Salmonella* para crecer a temperaturas de refrigeración, hecho que se viene reportando desde hace muchos años (D’aooust J. Y., 1993; Jiménez y col., 2015).

Varios estudios han expuesto que tanto *Salmonella* spp. como *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* pueden adherirse a la superficie e internalizarse dentro del tejido de una gran variedad de vegetales frescos. La extensión de la adherencia e internalización dependen de muchos factores que incluyen la ruta de contaminación, la naturaleza de la epidermis, el pH del tejido, la fase de crecimiento del vegetal, así como los factores extrínsecos impuestos por el ambiente (Zhou y col., 2018; Sun y col., 2019). Esta capacidad potencial de los microorganismos patógenos se agrava aún más si se considera su capacidad para formar biopelículas. Las biopelículas o biofilms (comunidades de microorganismos adheridos a una superficie) pueden interrumpir el contacto interactivo entre los microorganismos y los desinfectantes, lo cual disminuiría la eficacia de los procesos de lavado - desinfección llevados a cabo durante el procesamiento y daría como resultado un aumento de su supervivencia en los productos frescos (Yoon y Lee, 2018) (Fig. 1.4). Baragopal y col (2017) determinaron que el 22,8% de las *E. coli* y el 22,2% de las *Salmonella* sp. de un grupo de cepas aisladas de frutas y verduras frescas eran formadores potenciales de biopelículas. También demostraron que varias de las cepas eran productoras de moléculas de señalización de quórum y de

cantidades significativas de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), ambas sustancias relacionadas estrechamente a la formación de biopelículas.

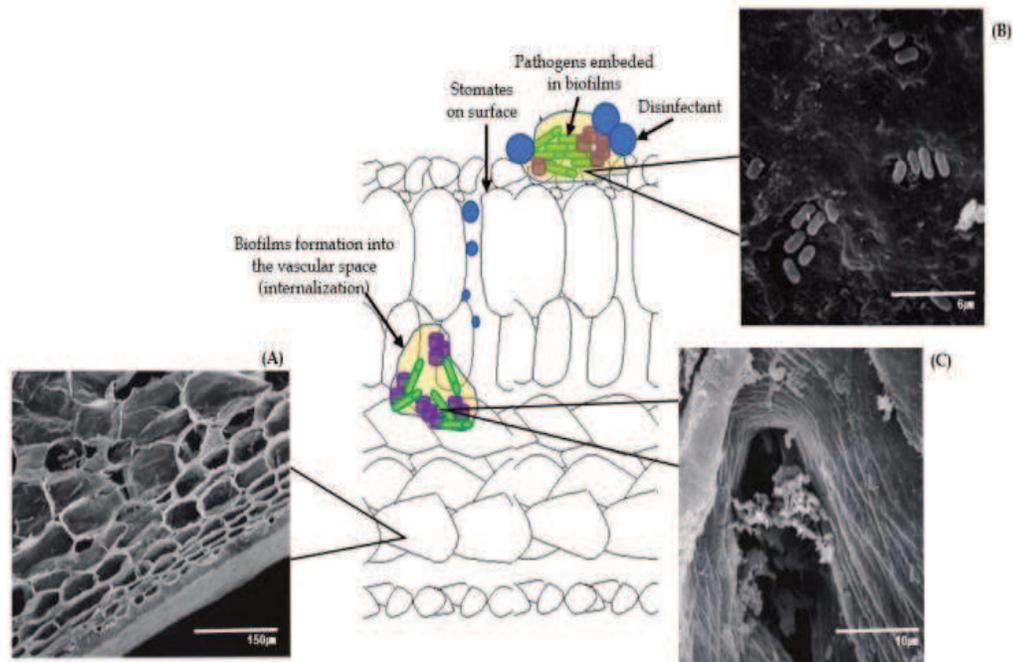


Figura 1.4 Diagrama esquemático de la estructura de un tejido vegetal contaminado con microorganismos. (A) imagen de microscopía electrónica de barrido de la superficie de una manzana gala; (B) estomas contaminados con *E. coli* O157:H7; (C) agregado de *E. coli* O157:H7 internalizado en un estoma de manzana (Yoon y Lee, 2018).

El otro aspecto a tener en cuenta con respecto a la formación de biofilms por parte de las bacterias patógenas es el de las superficies de contacto con los alimentos. Durante el procesamiento de los vegetales mínimamente procesados, sin un adecuado protocolo de limpieza y desinfección, aumenta el riesgo de contaminación cruzada y el posterior crecimiento bacteriano que puede conducir a la formación de biopelículas altamente resistentes (Mritunjay y Kumar, 2015). Es importante señalar que una vez que los microorganismos se adhieren a la superficie y comienza a desarrollarse la biopelícula, cuanto más tiempo transcurre, esta se vuelve más difícil de eliminar (Limoli y col., 2015).

1.1.4.5 Tecnologías alternativas de conservación

El creciente poder de adaptación de algunas bacterias patógenas aumenta el riesgo microbiológico en la fruta mínimamente procesada. Si bien existen y se investigan numerosos tratamientos o procesamientos para prolongar la vida útil y asegurar la inocuidad de estos productos (Mendoza y col., 2022), el uso del hipoclorito de sodio sigue siendo el método de desinfección que más frecuentemente se utiliza en la industria del procesamiento mínimo. Su relativa eficacia (en concentraciones apropiadas), su bajo costo comparativo y su aplicación en operaciones de cualquier tamaño hacen que así sea (Suslow, 1997). No obstante, el hipoclorito de sodio es inactivado rápidamente por la materia orgánica y aún más importante, puede originar subproductos insalubres en el agua procesada (cloraminas, cloroformo, ácidos haloacéticos, trihalometanos) los cuales ocasionan efectos cancerígenos o mutagénicos, así como toxicidad para hígado y riñones (Nieuwenhuijsen y col., 2000). Esto ha llevado a que en algunos países europeos (Alemania, Holanda, Dinamarca, Suiza y Bélgica) se haya restringido o prohibido su uso en la industria alimentaria.

Por esta razón, hace varios años se ha iniciado la búsqueda de alternativas ecológicas que dieran respuesta a esta problemática y a las demandas de los consumidores cada vez más orientados a adquirir productos en los que se apliquen métodos “ecoamigables” para su obtención y conservación como son las tecnologías de bioconservación (Meireles y col., 2016; Murray y col., 2017).

1.2 BIOCONSERVACIÓN

La bioconservación se basa en el uso de la microbiota natural o controlada y/o de sus compuestos antimicrobianos (bacteriocinas) para contribuir a la inocuidad microbiológica y extender la vida útil de los alimentos, especialmente de productos frescos, mediante la inactivación de microorganismos patógenos y el control del deterioro de origen microbiano (Gálvez y col 2012; Singh, 2018). Las principales técnicas de bioconservación de alimentos, incluyen la aplicación de bacteriocinas, bacteriófagos, y de cultivos protectores que se componen principalmente de bacterias ácido lácticas (Noha y col., 2021).

-Las *bacteriocinas* son péptidos antimicrobianos producidos por algunas especies de bacterias Gram-positivas, incluidas las BAL. Actúan sobre la membrana citoplasmática, inhibiendo la síntesis de la pared celular, disminuyendo la actividad de la RNasa y la DNasa, y alterando la permeabilidad de la membrana de la célula objetivo. Su actividad se limita normalmente a las bacterias Gram-positivas, incluida *L. monocytogenes* y tienen una eficacia limitada contra las bacterias Gram-negativas (Martin – Visscher y col., 2011). En melón y manzana frescos cortados, la aplicación de nisina redujo significativamente poblaciones de *L. monocytogenes* en comparación con muestras no tratadas tras su almacenamiento durante siete días a 10°C (Leverentz, y col., 2003).

-Los *bacteriófagos* son virus que invaden células bacterianas específicas, alteran su metabolismo y las lisan sin comprometer la viabilidad de la microbiota presente. Están presentes en grandes cantidades en agua, alimentos y tracto digestivo humano y animal. Se utilizan sólo los que tengan ciclos líticos ya que eliminan rápidamente a su hospedador y aumentan su progenie rápidamente. Se ha demostrado su efectividad frente a *S. typhimurium* y *S. enteritidis* en lechuga (Spricigo y col., 2013) pero no así en manzanas frescas cortadas frente a *Salmonella* sp., ya que la matriz ácida redujo su acción (Leverentz y col., 2001).

-Los *cultivos protectores*, agentes principales de la bioconservación, consisten en preparaciones de microorganismos vivos que se agregan a los alimentos. Su utilización presenta dos vías: la inoculación de la matriz alimentaria con estos microorganismos y la consiguiente producción *in situ* de moléculas inhibidoras y/o un efecto competitivo contra patógenos y microorganismos de alteración (Dokka y col., 2018; Ben Said y col. 2019). El ejemplo clásico de *cultivos protectores* lo constituyen las BAL aunque también existen algunos otros géneros bacterianos, provenientes de la microbiota natural de alimentos frescos. Un gran número de BAL han sido categorizadas según la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) como GRAS (*Generally Regarded As Safe*) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) las ha incluido en la lista de QPS (*Qualified Presumption of Safety*) (Ben Said y col., 2019). A su vez, también son los microorganismos más ampliamente utilizados como probióticos y sería lógico suponer que los mecanismos de antagonismo llevados a cabo por las BAL probióticas a nivel de intestino humano o animal, podrían también tener lugar en el alimento durante su conservación. Algunas de las vías posibles (Arena y col., 2016; Hossain y col, 2017) para este fin serían las siguientes:

- Bloqueo de los sitios de unión de los patógenos a la matriz alimentaria.
- Utilización más veloz de los carbohidratos disponibles.
- Producción de sustancias antimicrobianas, fundamentalmente de ácido láctico.

1.2.1 Cultivos protectores en fruta mínimamente procesada

Ya sea para desempeñarse como cultivos protectores *in situ* o para ejercer actividad probiótica en un alimento, los cultivos microbianos deben ser capaces de mantenerse viables durante todo el tiempo de conservación del producto. Las frutas frescas se consideran buenas matrices para los microorganismos debido a su óptimo contenido de nutrientes y a que la microarquitectura de la

superficie de las frutas los protegería del ambiente ácido del estómago (Ranadheera y col., 2010; Soccol y col., 2010). En el caso de la fruta mínimamente procesada, las operaciones de pelado y corte pueden permitir un mejor ingreso al interior del tejido vegetal y acceso al contenido de nutrientes por parte de los microorganismos que se deseen incluir en el alimento pero también por parte de los microorganismos patógenos que podrían estar presentes en la fruta debido, principalmente, a procedimientos incorrectos en la aplicación de Buenas Prácticas de Manufactura o Agrarias (Castro y col., 2016; Balali y col 2020).

Entre los obstáculos a sortear por los cultivos protectores y/o probióticos que se pretendan incluir en la fruta mínimamente procesada se encuentran: las bajas temperaturas empleadas durante todo el procesamiento y conservación, los compuestos antioxidantes necesarios para evitar el pardeamiento enzimático, el eventual uso de atmósferas modificadas y las condiciones de bajo pH de la materia prima. Principalmente por estos dos últimos factores se emplean cepas BAL, ya que en su mayoría son anaerobias facultativas y resisten muy bien condiciones acídicas (Gaggia y col., 2011). Las BAL utilizadas como cultivos protectores para la bioconservación de alimentos frescos deberían mostrar un crecimiento nulo o solo moderado a bajas temperaturas, sin afectar las propiedades sensoriales del alimento. Al aumentar la temperatura, deberían comenzar a crecer rápidamente, acidificar el producto y en consecuencia inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y controlar la microbiota alterante (Dokka y col, 2018).

1.2.2 Cultivos probióticos como cultivos protectores

Varios trabajos relatan la inclusión de probióticos en frutas mínimamente procesadas, la mayoría cepas comerciales como *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (Alegre y col., 2011; Iglesias y col., 2017; Yan y col., 2019). Sin embargo, no son tan numerosos los estudios que hayan abordado el potencial de los microorganismos probióticos como herramientas de biocontrol.

Existen varias cepas comerciales cuyo potencial probiótico ha sido comprobado y son utilizadas ampliamente por la industria alimentaria. Aún así, desde hace unos años se ha alentado desde la ciencia la exploración de probióticos de origen local o nativos, destacando la conveniencia de que las cepas de probióticos provengan del medio ambiente de donde serán parte una vez ingeridas. (Sybesma y col., 2015; Armachius y Yousheng, 2019). Varios proyectos han estudiado el microbioma humano de distintas poblaciones, como el proyecto estadounidense “MetaHIT” (Metagenomics of the Human Intestinal Tract), el proyecto europeo “Human Microbiome Project” y el “Asian Microbiome Project” (Arumugan y col., 2011; Koren y col., 2013; Nakayama y col., 2015). En todos ellos se destaca, además de las similitudes, las diferencias en la composición de la microbiota intestinal de personas de diferentes edades, regiones y hábitos alimenticios. Y esto a su vez, tendría incidencia en los diferentes requisitos nutricionales y de salud para diferentes regiones geográficas. En tal caso, las cepas autóctonas podrían presentar ventajas sobre otros probióticos actualmente disponibles en términos de estabilidad, viabilidad y, en última instancia, funcionalidad después del consumo (Sybesma y col., 2015).

Las cepas de *Lactobacillus* que fueron utilizadas en esta investigación poseen la particularidad de ser cepas autóctonas. *Lactiplantibacillus plantarum* 998 proviene de la microbiota de quesos de producción local (Zago y col., 2011) y *Lacticaseibacillus rhamnosus* 64 fue aislado de heces de recién nacidos locales (Gregoret y col., 2013). Sus propiedades funcionales y tecnológicas han sido estudiadas tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, y se las considera como potencialmente probióticas (Zago y col., 2011; Gregoret y col., 2013; Ferrando y col., 2016; Lavari y col. 2017). A la vez, la cepa de *Salmonella enterica* serovar Newport ITA S12 empleada en este estudio, fue aislada del ambiente aviar local. En ensayo de laboratorio pudo crecer a pH 3,7 con independencia de la concentración del inóculo (Jiménez y col. 2015). siendo que el mínimo pH de crecimiento de *Salmonella* spp. mencionado por ICMSF (1996) es de 3,8. Este hecho, sumado a los brotes

originados por la presencia de este serotipo de *Salmonella* en vegetales y frutas mínimamente procesadas (Crim y col, 2018; Dyda y col, 2020) motivó su elección para este estudio junto a las cepas ATCC de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*.

El uso de lactobacilos autóctonos potencialmente probióticos en esta tesis, permitió explorar un nuevo aspecto de su funcionalidad que va en concordancia con la búsqueda de alternativas para mejorar la calidad microbiológica de frutas y hortalizas mínimamente procesadas. Asimismo, el uso de una cepa nativa de *Salmonella* con sus particulares características, permitió una mayor aproximación al potencial riesgo microbiológico de las manzanas mínimamente procesadas y una mejor evaluación de la actividad antagonista de los lactobacilos autóctonos. Finalmente, dado que la oferta de cultivos protectores aprobados y comercializados no es tan amplia debido a los costos de su producción, y a que la mayoría son destinados a la industria láctea, cárnica o pesquera (Ben Said y col, 2019), los resultados de esta tesis podrían significar un avance hacia el desarrollo de un cultivo bioprotector para uso vegetal.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo principal*

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar a dos lactobacilos con potencial actividad probiótica para ser utilizados en estrategias de biocontrol, mediante su incorporación a manzanas mínimamente procesadas.

2.2 *Objetivos específicos*

Evaluar el efecto antagonista *in vitro* de *Lactiplantibacillus plantarum* 998 y de *Lacticaseibacillus rhamnosus* 64 sobre tres cepas de bacterias indicadoras, de interés en inocuidad alimentaria: *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Salmonella* Newport ITA S12 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Modelar las cinéticas de interacción entre las cepas de bacterias indicadoras y ambos lactobacilos en cocultivo o cultivos mixtos, estableciendo los parámetros cinéticos correspondientes, durante el almacenamiento a diferentes temperaturas.

Estudiar el efecto de la aplicación del lactobacilo con mayor actividad antagonista *in vitro* sobre la calidad de manzanas frescas de cortadas, almacenadas a diferentes temperaturas.

Estudiar el efecto de la aplicación del lactobacilo con mayor actividad antagonista *in vitro* sobre la microbiota de manzanas frescas cortadas, almacenadas a diferentes temperaturas

Estudiar la interacción del lactobacilo con mayor actividad antagonista *in vitro* frente a *Salmonella* Newport ITA S12 en manzanas frescas cortadas, almacenadas a diferentes temperaturas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CEPAS: CONSERVACIÓN Y MEDIOS DE CULTIVO

Lactiplantibacillus plantarum 998 y *Lacticaseibacillus rhamnosus* 64 pertenecen a la colección de cultivos del Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, FIQ – UNL, CONICET). De ahora en más y con fines prácticos, en el manuscrito se utilizará el término “lactobacilos” cuando sea necesario nombrar a estas cepas en conjunto, si bien pertenecen a géneros bacterianos diferentes (*Lactiplantibacillus* y *Lacticaseibacillus*) de acuerdo a su reciente reclasificación (Zheng y col. 2020). Las cepas indicadoras *Salmonella entérica* serovar Newport ITA S12, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 pertenecen a la colección de cultivos del Área de Microbiología de Alimentos del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA - FIQ - UNL).

Las cepas se mantuvieron a -80°C en los medios de cultivo utilizados para su crecimiento, adicionados con glicerol al 15 % v/v: los lactobacilos se mantuvieron a -80 °C en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS, Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) y las cepas indicadoras en caldo Tripteína Soya (TS, Laboratorios Britania S.A., CABA, Argentina) con extracto de levadura al 6 %. Previo a su utilización, las cepas indicadoras se reactivaron (37°C, 24 h) en caldo TS con extracto de levadura al 6 %. En el caso de los lactobacilos, la reactivación se realizó mediante dos repiques sucesivos (2 % v/v) en caldo MRS (37°C, 18 h). La determinación de las concentraciones de lactobacilos y bacterias indicadoras se llevó a cabo mediante recuentos en placa utilizando los medios específicos para cada bacteria: Agar con Eosina Azul de Metileno (Laboratorios Britania S.A., CABA, Argentina) para *E. coli* ATCC 25922 (37°C, 24 h), Agar Oxford Modificado (Laboratorios Britania S.A., CABA, Argentina) para *L. monocytogenes* (37°C, 24 h) y Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) para *Salmonella* Newport ITA S12

(37°C, 24 h). Los recuentos de *L. plantarum* 998 y *L. rhamnosus* 64 se llevaron a cabo en Agar MRS y su incubación fue de 48 hs a 37°C.

3.2 PRUEBAS DE ANTAGONISMO BACTERIANO

Se analizó la acción antibacteriana de *L. plantarum* 998 y *L. rhamnosus* 64 frente a cepas de bacterias patógenas, frecuentes productoras de ETA en frutas frescas mínimamente procesadas como *Salmonella* Newport y *Listeria monocytogenes*. También se analizó frente a *E. coli* genérico ATCC 25922, como bacteria índice de contaminación fecal. Esta última cepa ha sido utilizada desde hace varios años como subrogante de bacterias patógenas entéricas, en especial de *Escherichia coli* O157:H7 (Eblen y col., 2005), en estudios en planta procesadora de alimentos.

En primera instancia, la acción antagonista sobre las bacterias indicadoras se estudió mediante el método de la doble capa de agar. Posteriormente se obtuvieron los sobrenadantes libres de células de los lactobacilos, los cuales fueron enfrentados a cada una de las bacterias indicadoras susceptibles a su acción en el ensayo anterior.

3.2.1 Ensayo inicial

Para determinar la acción inhibitoria de las cepas de los lactobacilos frente a las cepas indicadoras, se empleó el método de la doble capa de agar (Nardi y col., 1999). Para ello, se inoculó una muestra de 5 µl de un cultivo *overnight* de una de las cepas de lactobacilos en la superficie de agar MRS y se incubó durante 24 h a 37°C en aerobiosis. Posteriormente, las células de la colonia formada se inactivaron mediante exposición a cloroformo durante 30 min y el residuo se dejó evaporar. La inactivación celular se confirmó cultivando una colonia en caldo MRS. Luego cada placa se cubrió con 3,5 ml de agar blando TS (0,75% p/v) inoculado con la cepa indicadora (ca. final

6 log UFC/ml) y se incubó durante 24 h a 37°C en aerobiosis. La actividad antagonista se evidenció como la presencia de una zona de inhibición de crecimiento de la cepa indicadora alrededor de la colonia del lactobacilo (Fig. 3.1). Para cada dupla lactobacilo – cepa indicadora se determinó el halo de inhibición restando al diámetro (en mm) de la zona de inhibición, el diámetro de la colonia de lactobacilo. El ensayo se realizó mínimo por cuadruplicado en cada caso.

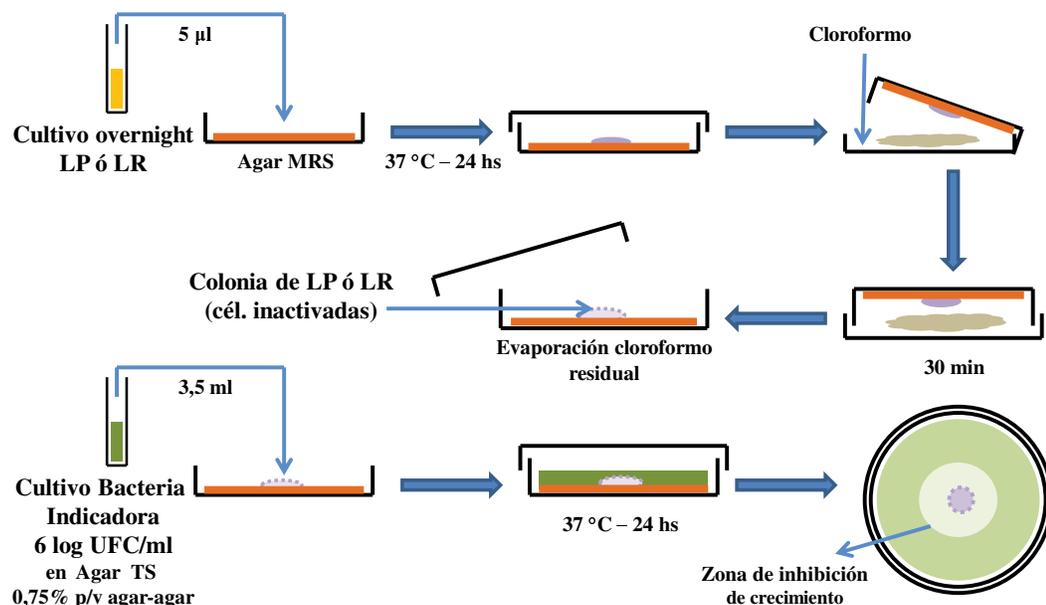


Figura 3.1. Esquema del método de la doble capa de agar

3.2.2 Ensayo con sobrenadantes libres de células (SLC)

Este ensayo se realizó para evaluar si la acción antagonista determinada en la prueba anterior se debe a la producción de compuestos ácidos por parte de los lactobacilos. Se utilizó la prueba de susceptibilidad microbiana por difusión en agar (Vinderola y col. 2008).

Los SLC se obtuvieron por centrifugación de cultivos *overnight* de los lactobacilos (6000 rpm, 5°C, 10 min). El volumen de SLC de cada lactobacilo se dividió en dos alícuotas, una fue tratada con una solución de NaOH 1 N para neutralizar el pH (SLC-N) y la otra no recibió tratamiento (SLC-A). Por otro lado, 15 ml de agar TS, fundido y atemperado a 45 °C se mezcló con 150 µL de un cultivo *overnight* de una de las cepas indicadoras y se vertió en una placa de Petri estéril. Una vez solidificado el agar, se realizaron pocillos de 6 mm de diámetro en donde se colocaron los SLC (SLC-N y SLC-A, 50 µl) de *L. plantarum* 998 (LP), *L. rhamnosus* 64 (LR) o caldo MRS (control negativo, 50 µl). Este procedimiento (Fig. 3.2) se llevó a cabo mínimo por triplicado para las tres cepas indicadoras. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h y se registraron los diámetros (mm) de los halos de inhibición del crecimiento en torno a los pocillos.

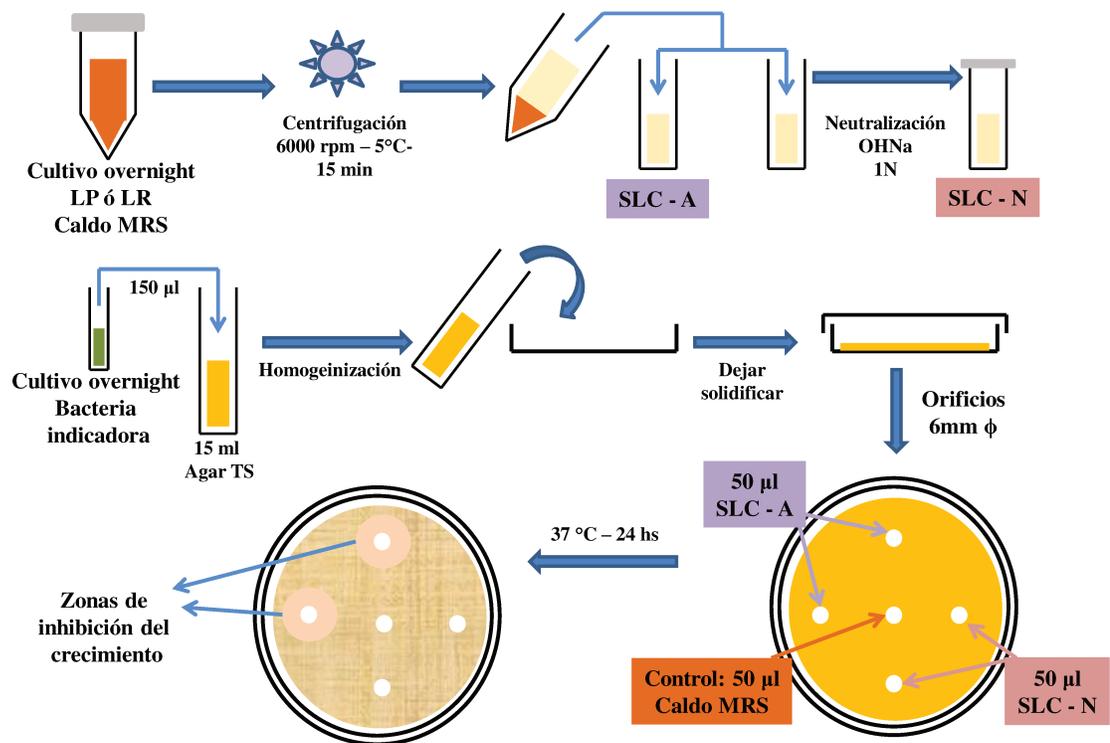


Figura 3.2. Esquema del método por difusión en agar

3.2.3 Análisis estadístico

El análisis de varianza (ANOVA) permitió la interpretación de los resultados a través del programa estadístico GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos). Se realizó un Anova Multifactorial y Test de rangos múltiples de Tukey, con un nivel de confianza del 95% para detectar diferencias significativas entre promedios.

3.3 ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE INTERACCIÓN DE LAS BACTERIAS INDICADORAS FRENTE A LOS LACTOBACILOS EN COCULTIVOS

La cinética de inhibición de las bacterias indicadoras frente a los lactobacilos fue determinada mediante el estudio de la evolución de *cultivos mixtos o cocultivos*. Cada lactobacilo, junto con cada una de las cepas indicadoras que en los ensayos anteriores evidenció inhibición en su presencia, se inocularon en un mismo medio de cultivo. Los cocultivos (lactobacilo + bacteria indicadora) y los correspondientes monocultivos controles, se conservaron durante 10 días a diferentes temperaturas de acuerdo a las condiciones de conservación de las frutas frescas cortadas: una temperatura normal de refrigeración (5°C) y dos temperaturas de abuso (10 y 15°C). A intervalos periódicos, se realizaron los recuentos en placa de cada cultivo control y cocultivo, utilizándose los medios de cultivo y condiciones de incubación especificados en el punto 3.1. En la Tabla 1 se indican los cultivos y cocultivos estudiados, almacenados a 5, 10 y 15°C durante 10 días.

Tabla 3.1. Cultivos controles y cocultivos almacenados a 5, 10 y 15°C durante 10 días

CULTIVOS	<i>E. coli</i> ATCC 25922 (EC)	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 (LM)	<i>S. Newport</i> ITA S12 (SN)	<i>L. plantarum</i> 998 (LP)	<i>L. rhamnosus</i> 64 (LR)
CONTROL	EC	LM	SN	LP	LR
COCULTIVO <i>L. plantarum</i> 998	EC + LP	LM + LP	SN + LP		
COCULTIVO <i>L. rhamnosus</i> 64	EC + LR	LM + LP	SN + LR		

3.3.1 Ensayos preliminares

Se realizaron los ensayos preliminares para seleccionar el caldo de cultivo adecuado para el desarrollo de los cocultivos y cultivos controles y evaluar la selectividad de los medios agarizados a utilizarse en los recuentos de cada una de las cepas. Se reactivaron todas las cepas y cada una de ellas fue inoculada individualmente (1 % v/v) tanto en caldo TS como en caldo MRS. Se realizaron recuentos luego de 24 horas de incubación a 37°C para verificar si las cepas indicadoras crecían de la misma forma en caldo MRS (específico para lactobacilos), como en un caldo de uso común para su desarrollo como el TS. En el caso de las cepas indicadoras, los recuentos se llevaron a cabo en Agar TS y en sus medios de cultivos específicos, detallados en el inciso 3.1. Por otro lado, cada una de las cepas indicadoras, fueron estriadas en placas de MRS y ambos lactobacilos fueron estriados en todos los medios específicos de aislamiento de las cepas indicadoras, para descartar la posible interferencia entre colonias desarrolladas de distinto origen (cepa indicadora o lactobacilo) sobre un mismo medio de cultivo al momento del recuento de ambas poblaciones en los cocultivos.

3.3.2 Preparación de cocultivos y cultivos controles. Ensayo de almacenamiento a diferentes temperaturas

Las cepas se reactivaron y se inocularon de a pares (cepa indicadora + lactobacilo) en caldo MRS de manera de lograr una concentración final aproximada de 5 log UFC/ml para la cepa indicadora (EC, LM o SN) y de 7 log UFC/ml para el lactobacilo (LP o LR). En paralelo, se prepararon cultivos controles de cada una de las cepas indicadoras y de cada uno de los lactobacilos en las mismas concentraciones que en los cocultivos. Posteriormente, todos los cultivos se almacenaron 10 días a 5, 10 y 15°C. Se realizaron recuentos en placa (por duplicado) en forma periódica y se realizó la medición de pH de cada una de las muestras (pHmetro digital Ludwig pH - 016, China).

3.3.3 Modelado cinético y obtención de los parámetros cinéticos

Los recuentos de los lactobacilos (LP y LR) y de cada una de las bacterias indicadoras (EC, LM y SN), se expresaron como logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro (log UFC/ml) y se utilizaron para realizar las curvas experimentales de cada bacteria; tanto en cocultivo como en cultivo control para cada temperatura estudiada (5, 10 y 15 °C). Las curvas se ajustaron a un modelo primario, propuesto por Baranyi y Roberts (1994) mediante la aplicación del programa DMFit versión 3.5 (Baranyi y Tamlin, 2004; ComBase; <https://www.combase.cc/index.php/en/2-uncategorised/22-recursos>).

Dicho modelo se expresa a través de la Ecuación 1:

$$y(t) = y_0 + \mu_{max} F(t) - \ln\left(1 + \frac{e^{\mu_{max}t} - 1}{e^{y_{max} - y_0}}\right) \quad (1)$$

Donde, $F(t) = t + \frac{1}{v} \ln(e^{-vt} + e^{-h_0} - e^{-vt-h_0})$; $y(t)$ es el log UFC/ml a cada tiempo $t(d)$; y_0 es la concentración inicial de microorganismos (log UFC/ml); $\mu_{\text{máx}}$ es la máxima velocidad de crecimiento (log UFC ml⁻¹d⁻¹); v se asume igual a $\mu_{\text{máx}}$; h_0 es igual a $(\mu_{\text{máx}} \times \lambda)$; y λ es la duración de la fase lag o de latencia en días.

La ecuación 1 permitió modelar la evolución en el tiempo de los recuentos de lactobacilos y de bacterias indicadoras, a temperatura constante (5, 10 o 15°C). El software DMFit estimó los siguientes parámetros:

- **Valor inicial (y_0):** concentración inicial de microorganismos (log UFC/ml).
- **Fase lag (λ):** duración de la fase *lag* o de latencia (d).
- $\mu_{\text{máx}}$: máxima velocidad de crecimiento (log UFC ml⁻¹d⁻¹).
- **Valor final (y_f):** concentración final de microorganismos (log UFC/ml).

Si se pueden estimar todos los parámetros, el modelo se denomina **completo** (Figura 3.3a). Cuando $\lambda=0$, el modelo es **no lag** (Figura 3.3b). Si no se logra determinar y_f en el tiempo de ensayo, el modelo se llama **no asintótico** (Figura 3.3c). El modelo es **lineal** cuando $\lambda=0$, y a la vez no se alcanza un valor de y_f (Figura 3.3d).

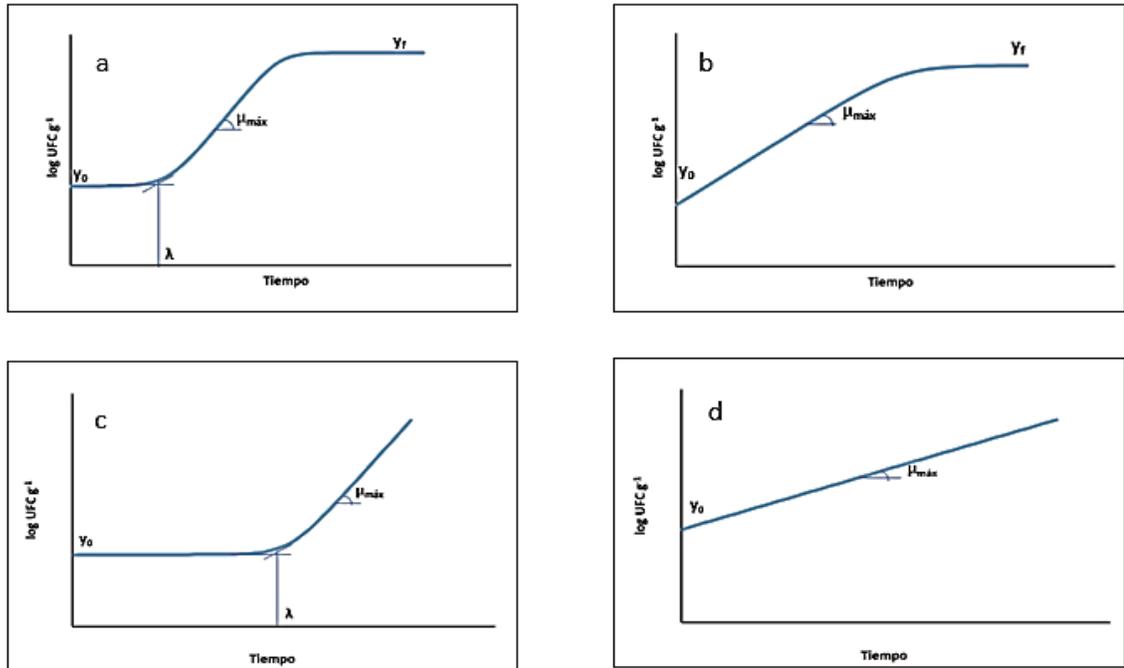


Figura 3.3. Representación de los modelos a) completo; b) no lag; c) no asintótico; d) lineal.

La capacidad de los modelos para predecir con precisión el crecimiento de poblaciones microbianas se evaluó mediante el error estándar del modelo (SE) y el coeficiente de determinación (R^2). El valor R^2 es la proporción de variabilidad en los datos experimentales explicada por el modelo.

3.4 DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES OPERATIVAS PARA LA INCORPORACIÓN DE LOS LACTOBACILOS EN MANZANAS FRESCAS CORTADAS

3.4.1 Determinación de la concentración inicial de lactobacilos

Para encontrar las concentraciones apropiadas de ácido cítrico (AC) y de ácido ascórbico (AA) que permitan la mayor supervivencia del lactobacilo en estudio y que a la vez eviten el

pardeamiento enzimático de las manzanas cortadas, se utilizó la metodología de superficie de respuesta aplicando un diseño de Box Behnken (Montgomery, 2004) con 3 factores en 3 niveles (15 experimentos con 2 réplicas en el punto central). Este diseño se desarrolló *in vitro* para dos tiempos de contacto: 30 y 60 min. Las concentraciones de ambos ácidos utilizadas en el diseño se basaron en trabajos previos realizados con manzanas cortadas (Rodríguez Arzuaga y Piagentini, 2018).

Tabla 3.2. Diseño experimental de Box-Behnken *in vitro* para determinar la concentración inicial de lactobacilos en solución para su inclusión en manzanas frescas cortadas.

Variables Independientes		Niveles
Concentración de ácido ascórbico	C_{AA} (% p/v)	0,0
		0,5
		1,0
Concentración de ácido cítrico	C_{AC} (% p/v)	0,0
		0,5
		1,0
Concentración del inóculo de lactobacilo	C_{in} (log UFC/ml)	7
		8
		9

Se propone una función matemática para la respuesta en función de las tres variables independientes de proceso estudiadas.

$$Y_k = f(C_{AA}, C_{AC}, C_{in})$$

Donde:

- $Y_k = C_f$ (log UFC/ml) de lactobacilos al final del tiempo de contacto con la solución antioxidante.
- C_{AA} = concentración de ácido ascórbico (% p/v)
- C_{AC} = concentración de ácido cítrico (% p/v)

- C_{in} = concentración inicial o inóculo de LP o LR (log UFC/ml)

Se propuso una ecuación polinomial de segundo orden para modelar la respuesta (Ecuación 2)

(Montgomery, 2004):

$$Y_k = \beta_{k_0} + \sum_{i=1}^3 \beta_{k_i} X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{k_{ii}} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{k_{ij}} X_i X_j \quad (2)$$

Donde Y_k es la respuesta C_f (log UFC/ml) concentración de lactobacilos al final del tiempo de contacto con la solución antioxidante; β_k son los coeficientes del modelo; y X_i son las variables independientes ($X_1 = C_{AA}$, $X_2 = C_{AC}$ y $X_3 = C_{in}$). Una vez desarrollados los modelos matemáticos para cada lactobacilo (LP y LR) y tiempo de contacto (30 y 60 min), se determinaron las concentraciones óptimas de cada uno de los ácidos y del inóculo inicial, que permitieran la mayor concentración de lactobacilos sobrevivientes (C_f) a los distintos tiempos de contacto estudiados.

3.4.1.1 Ejecución del diseño experimental

Los lactobacilos se reactivaron, se centrifugaron (6000 rpm, 5°C, 10 min) y se resuspendieron según el diseño experimental (Tabla 3.3). Para cada punto experimental, el inóculo correspondiente (7, 8 o 9 log UFC/ml) se puso en contacto con la solución de AA y AC especificada por el diseño. Una vez transcurrido el tiempo de contacto en estudio (30 o 60 min), se llevó a cabo el recuento en placa en Agar MRS (37 °C, 48 h) de cada lactobacilo.

Tabla 3.3. Diseño experimental de Box-Behnken para determinar la concentración inicial de inóculo (C_{in}) y de solución antioxidante.

Corrida experimental	C_{AA} (% p/v)	C_{AC} (% p/v)	C_{in} (log UFC/ml)
1	0,5	0	9
2	0	0	8
3	0,5	0,5	8
4	0,5	0,5	8
5	0	0,5	7
6	1	1	8
7	0,5	0,5	8
8	0,5	1	7
9	0	0,5	9
10	0,5	1	9
11	1	0,5	7
12	1	0,5	9
13	0,5	0	7
14	1	0	8
15	0	1	8

3.4.2 Determinación del tiempo de inmersión y la relación volumen solución/peso de la fruta

El tiempo de inmersión de la fruta fresca cortada en la solución antioxidante que contiene los lactobacilos, y la relación volumen de solución/peso de la fruta fueron definidos mediante el empleo de un diseño experimental de Box-Behnken de 2 variables en 3 niveles cada una (Tabla 3.4). Los niveles de las variables fueron establecidos de acuerdo a resultados de ensayos previos.

Tabla 3.4. Diseño experimental de Box-Behnken para la determinación del tiempo de inmersión, relación volumen solución/ peso fruta.

Variables Independientes		Niveles
Tiempo de inmersión	t_{inm} (min)	2
		6
		10
Relación vol. de solución/ peso fruta	R (L /kg)	3
		6,5
		10

Al igual que en el inciso 3.4.1.1, se propone una ecuación polinomial de segundo orden (Ecuación 3) para modelar las respuestas en función de las dos variables independientes de proceso (Montgomery, 2004) y es la siguiente:

$$Y_k = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^2 \beta_{ki}X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{kii}X_i^2 + \beta_{kij}X_iX_j \quad (3)$$

Donde:

- Y_k = Respuesta
- X_1 = Tiempo de inmersión, t_{inm} (min)
- X_2 = Relación volumen solución/peso de la fruta, R (L/kg)
- β_k = son los coeficientes del modelo para cada respuesta

Las respuestas evaluadas (Y_k) sobre manzanas frescas cortadas tratadas con la solución antioxidante (AA 1% p/v-AC 1 % p/v) para diferentes tiempos de inmersión y diferentes relaciones volumen solución/peso de la fruta fueron las siguientes:

- pH
- Concentración del lactobacilo en manzanas frescas cortadas (log UFC/ml)
- Sólidos solubles (grados Brix)

Se utilizó la metodología de Optimización de Respuestas Múltiples (Derringer y Suich, 1980), que permite la optimización simultánea de las respuestas estudiadas. De esta manera se determinó el tiempo de inmersión y la relación volumen solución/peso de la fruta óptimos que lograron la mayor concentración de lactobacilos en la manzana y a la vez, valores de pH y sólidos solubles compatibles con el producto.

3.4.2.1 Ejecución del diseño experimental

El ensayo se llevó a cabo con manzanas ‘Granny Smith’, adquiridas en un comercio local. Las manzanas se mantuvieron en cámara refrigerada a 1,5°C hasta el momento de su procesamiento en el que fueron lavadas, peladas, descorazonadas y cortadas en cubos de 1,5 cm de lado. El lactobacilo que presentó mayor estabilidad en los ensayos experimentales de la etapa 3.4.1 se reactivó, se centrifugó (6000 rpm, 5°C, 15 min) y sus células se suspendieron en el volumen necesario de solución AC+AA (concentración de la solución y del inóculo determinadas en 3.4.1), para cumplir la relación volumen/peso especificada por el diseño para las distintas corridas experimentales (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Estudio del efecto combinado tiempo de inmersión – relación volumen solución/peso fruta (R). Diseño experimental de Box-Behnken.

Corrida experimental	t_{imm} (min)	R (L/kg)
1	6	6,5
2	2	10
3	6	3
4	10	6,5
5	10	3
6	2	3
7	10	10
8	2	6,5
9	6	6,5
10	6	6,5
11	6	10

Los cubos se retiraron a los tiempos establecidos por el diseño, se escurrieron y se llevó a cabo el recuento de lactobacilos y la medición de pH y de sólidos solubles. Un esquema del procedimiento completo se muestra en la Figura 3.3.

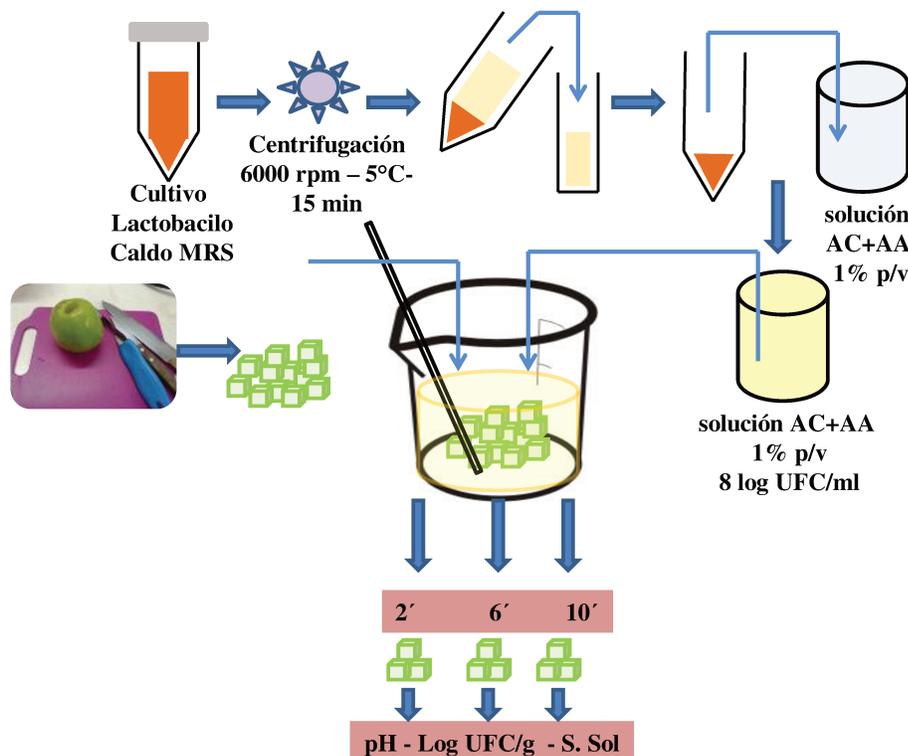


Figura 3.3. Esquema de la ejecución del diseño experimental para la determinación de las variables operativas tiempo de inmersión y relación volumen solución/peso fruta.

3.4.3 Análisis estadístico

El análisis de varianza (ANOVA) permitió la interpretación de los resultados a través del programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV 15.02.06 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, EE.UU.). Este programa permitió ajustar las ecuaciones polinomiales de 2° orden a los datos experimentales, graficar las superficies predichas a partir de los modelos y realizar la

optimización en los rangos experimentales ensayados. También se utilizó para comprobar la idoneidad de los modelos propuestos.

3.5. ESTUDIO DEL EFECTO DE *L. plantarum* 998 APLICADO EN MANZANAS FRESCAS CORTADAS SOBRE LA MICROBIOTA NATIVA DE LA FRUTA Y FRENTE A UNA CONTAMINACIÓN CON *S. Newport* ITA S12

En base a los resultados obtenidos de los ensayos descritos en los incisos 3.2 y 3.3, se decidió trabajar con *L. plantarum* 998 y evaluar su efecto sobre la microbiota nativa de la fruta. Además, se seleccionó *S. Newport* ITA S12 para estudiar la interacción *in situ* entre ambos y el potencial del lactobacilo como agente bioprotector ante una eventual contaminación.

3.5.1. Diseño experimental

Manzanas ‘Granny Smith’, procedentes de un comercio local, fueron procesadas como se detalló anteriormente (punto 3.4.2.1). Los cubos de manzanas conformaron 3 grandes grupos como se detalla en Tabla 3.6: materia prima (MP), cubos tratados con solución antioxidante (C); y cubos tratados con solución antioxidante a la que se le incorporó el *L. plantarum* 998 (LP). A su vez cada uno de estos grupos se subdividieron en inoculados y sin inocular con *S. Newport* ITA S12 (SN). El volumen requerido de solución de AA/AC 1% p/v fue preparado en el momento de su uso de acuerdo a la relación volumen/peso de fruta determinado en el punto 3.3.2. Tanto los tratamientos como las inoculaciones se llevaron a cabo en una cabina de seguridad biológica clase II (marca Biobase, China).

Tabla 3.6. Resumen de muestras de cubos de manzanas almacenadas a 5°C y a 15°C con sus respectivos tratamientos.

MUESTRAS	Sol. AA/AC (1% p/v)	LP (log UFC/ml)	SN (log UFC/g)
MP	-	-	-
MP + SN	-	-	6
C	x	-	-
C + SN	x	-	6
LP	x	8	-
LP + SN	x	8	6

MP: materia prima, **MP +SN:** mat. prima + *S. Newport* ITA S12, **C:** control, **C + SN:** control + *S. Newport*, **LP:** *L. plantarum* 998, **LP+ SN:** *L. plantarum* 998+ *S. Newport* ITA S12

Los cubos recién cortados que no recibieron tratamiento con la solución antioxidante (Fig. 3.4), correspondientes a las **muestras MP**, se dividieron en dos subgrupos: MP y MP+SN. Mientras que las muestras MP se almacenaron directamente a 5 y 15°C, las muestras MP+SN se inocularon con 30 µl/cubo de una suspensión de *S. Newport* de concentración 8 log UFC/ml (para lograr una concentración final de 6 log UFC/g en cada cubo aproximadamente) y se dejaron reposar 10 min. Esta suspensión se obtuvo por centrifugación (6000 rpm, 5°C, 10 min) de un cultivo *overnight* de la cepa de *S. Newport* a 37°C y posterior resuspensión en igual volumen de tampón fosfato salino (PBS). Después del tiempo de reposo, se envasaron y almacenaron a 5 y a 15°C (Fig. 3.4).

Para obtener las **muestras C**, los cubos se colocaron en una cestilla de acero inoxidable que se sumergió en una solución de AA/AC 1% p/v en una relación de 1:10 durante 10 min. Posteriormente, los cubos fueron escurridos sobre una rejilla de acero inoxidable durante 5 min y se dividieron en dos subgrupos: C y C+SN (inoculación con *S. Newport* al igual que Mp+SN) (Fig. 3.4).

En el caso de las **muestras LP**, se incorporó *L. plantarum* 998 a la solución antioxidante de manera de obtener una concentración final en solución de 8 log UFC/ml, de acuerdo a lo determinado en la etapa 3.3. Brevemente, cultivos *overnight* de *L. plantarum* 998 se centrifugaron (6000 rpm, 5 °C, 10 min), los sobrenadantes fueron descartados y los pellets se resuspendieron en solución AC/AA 1% p/v de modo de obtenerse la concentración final deseada. Una vez homogeneizada la solución con el *L. plantarum* 998, se procedió a la inmersión y escurrido de los cubos, de igual manera que con el grupo control C. Los cubos escurridos se subdividieron en LP y LP+SN (inoculados con *S. Newport*) (Fig. 3.4).

Las muestras de todos los grupos se envasaron en bandejas de tereftalato de polietileno (PET) con tapa, previamente desinfectadas. Características del envase: PET de 0,42 mm de espesor, 270 cm³ de capacidad, con un área superficial de 0,036 m² y velocidades de transmisión: 29-59 [cm³/m².día.atm] para O₂ (a 23°C y 0% RH) y 12-18 [g/m².día] para vapor de agua (a 38°C y 90% RH). En las muestras sin inoculación con SN se realizaron análisis microbiológicos y de atributos de calidad a tiempo cero y luego de 7 días de almacenamiento a 5°C y a 15°C, mientras que las muestras inoculadas con SN se analizaron microbiológicamente a distintos tiempos, como se describe a continuación.

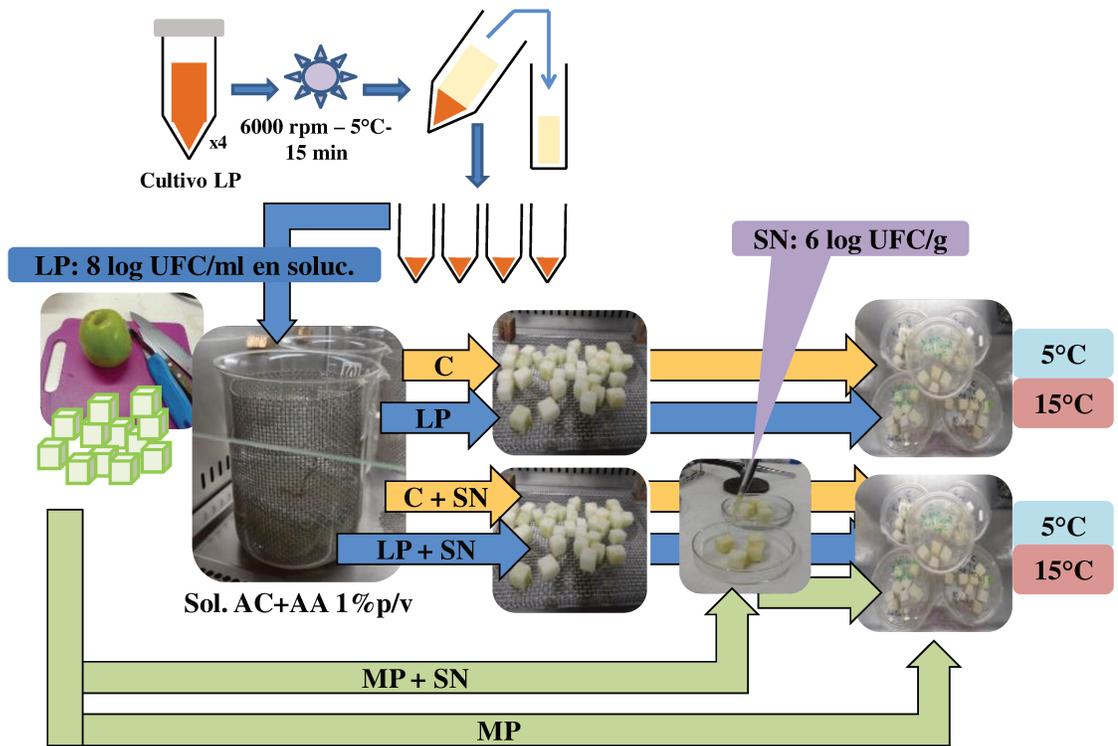


Figura 3.4. Esquema de los distintos flujos de procesamiento de las manzanas frescas cortadas. Flechas **verdes**: muestras MP. Flechas **naranjas**: muestras C. Flechas **azules**: muestras LP.

3.5.2 Análisis microbiológicos

La influencia de la solución antioxidante y de la presencia de *L. plantarum* 998 sobre la microbiota de las manzanas se evaluó mediante recuentos de grupos microbianos indicadores al día 0 y al día 7 de almacenamiento a 5 y 15°C (muestras MP, C y LP). Se realizaron recuentos de mohos y levaduras (M y L) en Agar Extracto de Levadura – Glucosa - Cloranfenicol (YGC - 25°C - 3 a 7 días) y de microorganismos aerobios mesófilos totales (AMT) y psicrótrofos (Psic.) en Agar para Recuento en Placa (PCA, 30°C - 48hs y 7°C - 10 d, respectivamente) tal como se observa en la Tabla 3.7. Para monitorear la evolución del lactobacilo y de la bacteria indicadora *S. Newport* a 5 y a 15°C (muestras MP+SN, C+SN y LP+SN) se realizaron recuentos en agar MRS y agar XLD,

respectivamente, como se describió en el punto 3.1. Los análisis se llevaron a cabo a los 0, 2, 4 y 7 días de conservación tanto a 5°C como a 15°C (Tabla 3.7).

Tabla 3.7 Análisis microbiológicos según el grupo de muestra analizado a 5°C y a 15°C

Muestras	T°C	Día 0	Día 2	Día 4	Día 7
MP	5	Tot. / Psic			Tot. / Psic
MP	15	M y L / MRS XLD			M y L / MRS XLD
C	5	Tot. / Psic			Tot. / Psic
C	15	M y L / MRS XLD			M y L / MRS XLD
LP	5	Tot. / Psic			Tot. / Psic
LP	15	M y L / MRS XLD			M y L / MRS XLD
MP + SN	5	MRS	MRS	MRS	MRS
MP + SN	15	XLD	XLD	XLD	XLD
C + SN	5	MRS	MRS	MRS	MRS
C + SN	15	XLD	XLD	XLD	XLD
LP + SN	5	MRS	MRS	MRS	MRS
LP + SN	5	XLD	XLD	XLD	XLD

3.5.3 Análisis Estadístico

El programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV 15.02.06 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, EE.UU.) se utilizó para determinar el efecto del tipo de muestra, del tiempo y la temperatura de almacenamiento sobre los recuentos microbiológicos a través del análisis de varianza (ANOVA). Luego, se determinaron diferencias significativas entre las medias a través del test de rango múltiple de Tukey

3.6 ESTUDIO DEL EFECTO DE *L. plantarum* 998 APLICADO EN MANZANAS FRESCAS CORTADAS SOBRE SUS ATRIBUTOS DE CALIDAD

Una de las principales condiciones que deben cumplir los agentes de biopreservación, es no afectar las características sensoriales y nutricionales del alimento en donde se aplica. Por ello, junto a las determinaciones microbiológicas, se llevó a cabo la evaluación de los principales atributos de calidad de las muestras de manzanas de los grupos MP, LP y C al día cero y al día 7 de almacenamiento a 5°C y 15°C. Los atributos analizados fueron: pH, sólidos solubles, propiedades mecánicas, parámetros instrumentales de color, contenido de fenoles totales, contenido de vitamina C, y capacidad antioxidante.

3.6.1 Determinación de pH y sólidos solubles

La medición de pH se realizó utilizando un pHmetro compacto Twin pH Horiba B-213 y el contenido de sólidos solubles se analizó con un refractómetro portátil digital PAL-ALFA (Atago, Tokio, Japón), expresándose los resultados en °Brix (Fig. 3.5). Ambas mediciones se realizaron por triplicado para cada muestra.



Figura 3.5 pHmetro y refractómetro

3.6.2 Determinación de Propiedades Mecánicas

Las propiedades mecánicas de los cubos de manzanas se evaluaron mediante ensayos de penetración. Se utilizó un equipo analizador de textura TA.XT Plus Stable Micro Systems (Godalming, Surrey, Reino Unido) equipado con una celda de carga de 50 N y con una punta cilíndrica de acero inoxidable de 4 mm de diámetro (Fig. 3.6).

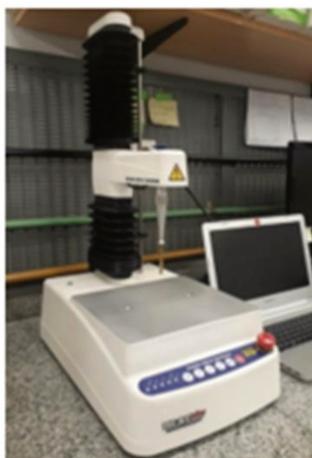


Figura 3.6 Texturómetro TA.XT Plus Stable Microsystems con probeta de punción.

Se evaluaron 10-15 cubos por cada muestra y en cada determinación, la punta se desplazó desde la superficie de cada cubo de manzana hasta una distancia de penetración de 8 mm, a una velocidad de 1 mm/s, registrándose la fuerza de penetración durante el desplazamiento de la punta y obteniéndose así, la curva Fuerza vs Desplazamiento. A partir de cada curva de penetración, se determinó la Fuerza máxima (F). La Fuerza máxima es el valor de la fuerza necesaria para producir la fractura de la superficie de la fruta que corresponde al punto máximo de la curva. Esta fuerza corresponde al punto de ruptura de la pulpa (límite de elasticidad) y representa la firmeza.

3.6.3 Determinación del color

La evaluación instrumental del color se realizó utilizando un espectrofotómetro Minolta CM 508-d (Konica Minolta Inc., Ramsey, NJ, EEUU) en las siguientes condiciones: iluminante D65, ángulo del observador 10°, componente especular excluido (SCE), evaluándose los parámetros CIELab y sus índices derivados: ángulo de tono (h_{ab}) y croma (C_{ab}^*). La luminosidad varía de $L^*=100$: blanco; a $L^*=0$: negro; el parámetro a^* indica el grado de componente rojo o verde ($a^*>0$: rojo; $a^*<0$: verde) y b^* determina el grado de componente amarillo o azul ($b^*>0$: amarillo $b^*<0$: azul) (Fig. 3.7). Por su parte C_{ab}^* (croma) y h_{ab} (ángulo de tono) son definidos a partir de a^* y b^* donde $C_{ab}^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0.5}$ y $h_{ab} = \arctg (b^*/a^*)$ (0° : rojo; 90° : amarillo; 180° : verde; 270° : azul) (Piagentini y Pirovani, 2017). El procedimiento se realizó sobre la superficie de dos lados opuestos de 10 cubos por cada muestra.

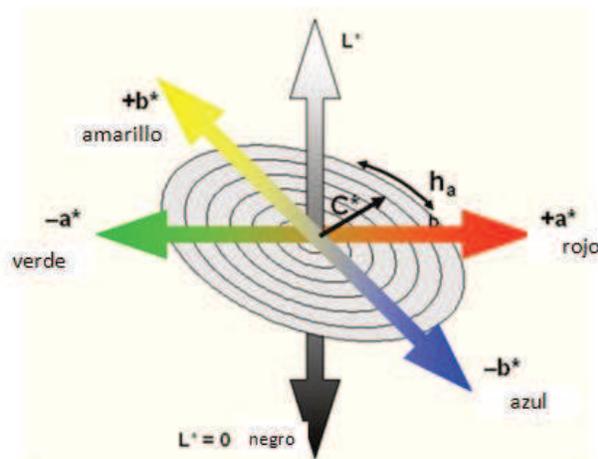


Figura 3.7 Representación gráfica de los espacios de color CIE Lab y CIE LCh_{ab} .

3.6.4 Determinación de fenoles totales, capacidad antioxidante y contenido de vitamina C

Proceso de Extracción

La extracción se realizó de acuerdo a Villamil-Galindo y col. (2020), modificada para las muestras estudiadas. Se pesaron 10 g de muestra molida y se adicionó 12,5 ml de solución extractante SE (metanol: agua en una relación de 80:20, y 0,5% de ácido acético), se agitó con *vortex* por aproximadamente 30 s, y luego se llevó al ultrasonido a por 15 min. Posteriormente, se centrifugó a 12000g a 4°C por 20 min (Heal Force modelo Nefuge 18R), se separó el sobrenadante y se reservó en un matraz de 25 ml. El residuo sólido se resuspendió con 12,5 ml de SE y se repitió el proceso anteriormente descrito. Finalmente, se completó el volumen de los extractos con SE hasta los 25 ml, se filtró con filtros de jeringas de 20µm y se almacenó a -20°C hasta la realización del análisis.

Determinación del contenido de Fenoles Totales (CFT)

La determinación del contenido de Fenoles Totales, se realizó a través del método de Folin-Ciocalteau (F-C) de acuerdo a Rodríguez-Arzuaga y col. (2016). En tubos Falcon de 15 ml de capacidad se colocó un volumen predeterminado (de 0,05 a 0,25 ml dependiendo de la concentración estimada de polifenoles en la muestra) de extracto de manzana, 0,25 ml de reactivo de F-C modificado, 0,5 ml de solución de Na₂CO₃ 10%, y el volumen de agua destilada necesario para completar un volumen total de 5 ml. Los tubos se agitaron en un vórtex V1 plus BOECO, se centrifugaron durante 15 min y se dejaron reaccionar durante otros 15 min. Posteriormente se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro Genesis 5 (Milton Roy, Ivyland, EE.UU). Dado que algunas de las muestras presentaban alto contenido de vitamina C y este método experimenta interferencias debido a la presencia de ácido ascórbico, entre otras sustancias, se realizó una corrección de las medidas por la interferencia de la vitamina C de acuerdo a Cortez y col. (2018).

Finalmente, los resultados se expresaron en miligramos de ácido gálico equivalente (ÁGE) por Kg de fruta.

Determinación de la capacidad antioxidante (CAO)

La capacidad antioxidante se determinó por el método del radical libre DPPH, el cual reduce el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH*) a la 2,2-difenil-1-picril hidrazina por la acción antioxidante de compuestos que contienen grupos -OH que decoloran dicho reactivo. La disminución de la absorbancia de una solución metanólica de DPPH* de 30 mg/l a 517 nm en presencia del extracto de cada muestra fue medida, después de 30 min de reacción, de acuerdo a Rodríguez-Arzuaga y Piagentini (2018). Se expresó como capacidad antioxidante equivalente al ácido ascórbico (AEAC, mg/Kg).

Determinación del contenido de vitamina C

El ácido L-ascórbico (AA), la principal forma biológicamente activa de la vitamina C, es oxidado reversiblemente a ácido L-dehidroascórbico (ADHA). Esta última forma también exhibe actividad biológica. Por lo tanto, la vitamina C, como el ácido ascórbico total (AAT) en las frutas, puede asumirse igual a la suma de los contenidos de AA y ADHA (Van de Velde y col., 2012).

La determinación de vitamina C se realizó de acuerdo a Cortéz y col. (2018). Se realizó la extracción de 6,25 g de muestra molida con 12,5 ml de solución extractante de ácido metafosfórico (30 g/l) y ácido acético (80 g/l), y se homogeneizaron durante 1 min con vórtex. Posteriormente, la mezcla se sonicó en baño con ultrasonido TESTLAB (15 min) y se centrifugó a 12000g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se usó para la determinación, de ácido ascórbico total haciendo reaccionar 2 mL de cada extracto con 0,5 mL de solución de DL-ditiotreitól (DTT: 5g/L, preparado en fosfato de potasio dibásico, K_2HPO_4 2,58M), durante 2 h en la oscuridad. Las muestras se

diluyeron con fase móvil de acuerdo a la concentración de vitamina C presente, se homogeneizaron y se filtraron con una membrana Millipore de 45µm, para inyectar en HPLC (Shimadzu LC-20AT, USA). La fase móvil consiste en una solución buffer 0,03 mol/l de acetato de sodio / ácido acético pH 5,8 (95%), metanol (5%). El equipo de cromatografía líquida posee un detector de arreglo de diodo SPD-M20A y está equipado con una columna de fase reversa Gemini 5µ C18/110A unida a un guarda-columna (Phenomenex Inc., CA. EE.UU.). Las muestras se inyectaron en forma manual y se trabajó bajo condiciones isocráticas y a temperatura ambiente. La velocidad de flujo fue de 1,15 ml/min y las mediciones se hicieron a 265 nm. Los resultados se expresaron en mg AA/ Kg Fruta.

3.6.5 Análisis estadístico

El programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV 15.02.06 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, EE.UU.) se utilizó para determinar el efecto del tipo de muestra, del tiempo y la temperatura de almacenamiento sobre los atributos de calidad determinados durante el ensayo de almacenamiento de manzanas frescas cortadas a través del análisis de varianza (ANOVA). Luego, se determinaron diferencias significativas entre las medias a través del test de rango múltiple de Tukey

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PRUEBAS DE ANTAGONISMO BACTERIANO

La capacidad antagonista de *Lactiplantibacillus plantarum* 998 (LP) y de *Lacticaseibacillus rhamnosus* 64 (LR) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 (EC), *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 (LM) y *Salmonella* Newport ITA S12 (SN) se evaluó mediante el método de la doble capa de agar y también, utilizando los sobrenadantes libres de células de ambos lactobacilos, a través de la prueba por difusión en agar.

Tanto LP como LR inhibieron el desarrollo de todas las cepas indicadoras en el ensayo de la doble capa de agar (Fig 4.1). Los diámetros de inhibición de crecimiento oscilaron entre 19,2 mm y 28 mm. No se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en la comparación de los dos lactobacilos frente a la misma cepa indicadora, ni en la inhibición de cada lactobacilo frente a las 3 cepas indicadoras (Tabla 4.1). De manera similar y con ligeras variaciones en los métodos, varios estudios (Dobrevá y col., 2020; Chen y col., 2022; Joshi 2022 entre otros) han demostrado que cepas de *L. plantarum* y de *L. rhamnosus* tuvieron actividad antagonista frente a distintas cepas de las bacterias indicadoras empleadas en este estudio, en grado variable, ya que esta propiedad depende tanto de la cepa del lactobacilo como de la cepa indicadora a la que se enfrente (Dinev y col., 2017; Samanje y Kilic, 2020).

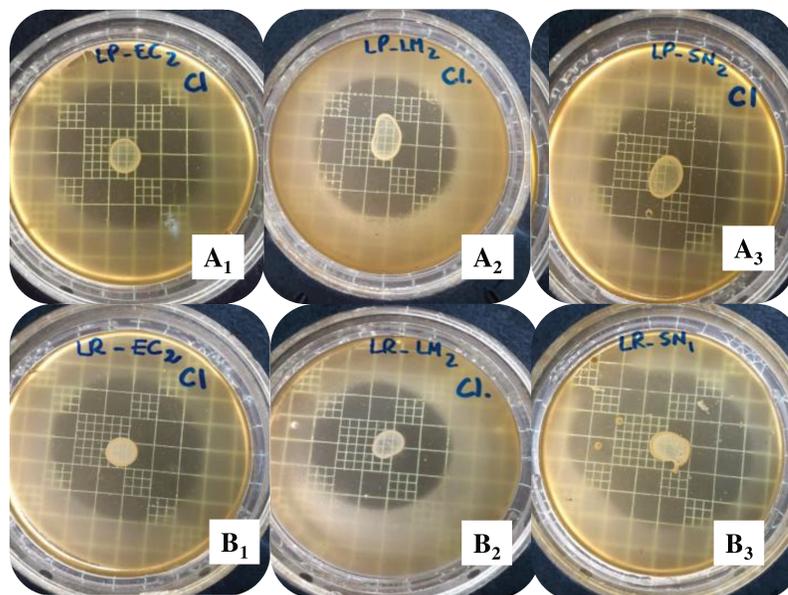


Figura 4.1. Prueba de antagonismo microbiano (doble capa) de (A) *L. plantarum* 998 (LP) y de (B) *L. rhamnosus* 64 (LR) frente a (1) *E. coli* ATCC 25922, (2) *L. monocytogenes* ATCC 15313 y (3) *Salmonella* Newport ITA S12.

Tabla 4.1. Actividad antagonista de *L. plantarum* 998 y *L. rhamnosus* 64 frente a las cepas indicadoras utilizando el método de la doble capa de agar.

Cepas indicadoras	Halo de Inhibición (mm) *	
	<i>L. plantarum</i> 998	<i>L. rhamnosus</i> 64
<i>E. coli</i> ATCC 25922	23,0 ± 2,9 aA	25,3 ± 3,1 aA
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	19,2 ± 5,8 aA	25,5 ± 2,2 aA
<i>Salmonella</i> Newport ITA S12	26,5 ± 2,7 aA	28,0 ± 0,8 aA

(*) Diámetros de inhibición (promedio ± SD en mm; n ≥ 4). Letras minúsculas y mayúsculas distintas indican diferencias significativas (p<0,05) entre cepas indicadoras y lactobacilos, respectivamente.

En la prueba por difusión en agar, sólo se observó actividad antagonista para los SLC no neutralizados (Fig. 4.2 y Tabla 4.2). Esto señalaría que dicha actividad se debería principalmente a la producción de compuestos ácidos por parte de los lactobacilos.

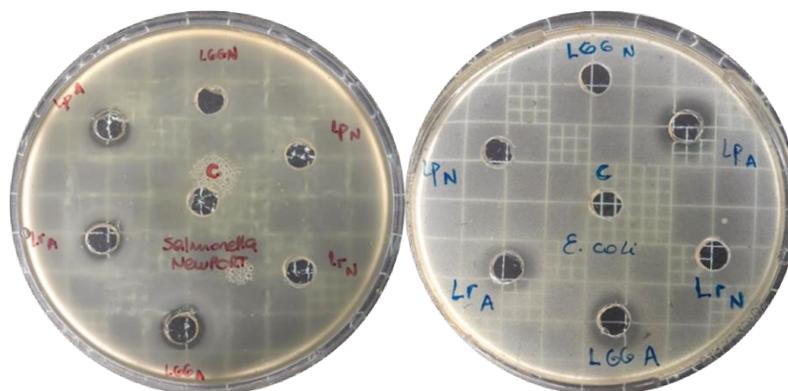


Figura 4.2 Prueba de difusión en pozos de los sobrenadantes libres de células con pH neutralizado (N) y sin neutralizar (A) de las cepas de *L. plantarum* 998 (Lr), *L. rhamnosus* 64 (Lp) y *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (LGG – no interviene en este estudio) frente a *E. coli* ATCC 25922 y a *Salmonella Newport* ITA S12.

Tabla 4.2 Actividad antagonista de los SLC sin neutralizar de *L. plantarum* 998 y *L. rhamnosus* 64 frente a bacterias indicadoras utilizando el método de difusión en agar (diámetro de los pozos: 6 mm).

Cepas indicadoras	Halo de Inhibición total (mm) *	
	<i>L. plantarum</i> 998	<i>L. rhamnosus</i> 64
<i>E. coli</i> ATCC 25922	9,9±0,9 aA	9,4±0,4 aA
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313**	16,3 ± 3,3	17,7 ± 0,5
<i>Salmonella</i> Newport ITA S12	10,5 ± 0,9 Aa	8,8 ± 0,1 aB

(*) Promedio de los diámetros de inhibición ($n \geq 3$, en mm) \pm Desviación Estándar. Letras minúsculas y mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cepas indicadoras y lactobacilos, respectivamente.

(**) No presentó inhibición total del crecimiento.

Zhang y col. (2020) así como otros autores (Arena y col. 2016, Arrijoja-Breton y col. 2020, Chen y col 2022) encontraron que un gran número de cepas de lactobacilos (entre ellos *L. plantarum* y *L. rhamnosus*), aisladas de distintas fuentes o procesos alimentarios, inhibieron el crecimiento de bacterias productoras de ETA en la pruebas doble capa o con los SLC sin modificar pero no observaron dicha inhibición cuando se utilizaron los SLC cuyos pH fueron neutralizados. Existen varios mecanismos que pueden explicar la actividad antimicrobiana de las BAL y de los lactobacilos en particular. Estos son la producción de bacteriocinas; la de ácidos orgánicos, la de otras sustancias inhibidoras como etanol, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno; y la competencia por los nutrientes (Ibrahim y col., 2021; Wang y col., 2021). La ausencia de un efecto antibacteriano causado por sustancias peptídicas no implica necesariamente que las cepas analizadas sean incapaces de producir bacteriocinas, sólo que las bacterias indicadoras ensayadas no son sensibles a ellas (Samanje y Kilic, 2020). Se ha establecido que las bacterias gramnegativas son intrínsecamente resistentes a las bacteriocinas producidas por las BAL debido a la presencia de la membrana externa, que constituye una barrera física para el paso y unión de bacteriocinas (Pehrson y col., 2015). En consecuencia, una desestabilización de la membrana externa podría permitir que las bacteriocinas ingresen a las células y eventualmente ejerzan su acción inhibitoria. Se ha comprobado que el ácido láctico actúa como un permeabilizador de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, aumentando así su susceptibilidad a los antimicrobianos (incluidas las bacteriocinas) (Alakomi y col., 2000).

Cuando en la prueba de difusión en agar se utilizaron SLC sin modificación de su pH, se observó inhibición total del crecimiento con ambos lactobacilos, tanto en el caso de EC como en el de SN. Asimismo, LM presentó sólo inhibición parcial (menor densidad del césped bacteriano). No existieron diferencias significativas en los diámetros de EC al comparar la acción antagonista de los dos lactobacilos pero sí las hubo en el caso de SN, siendo LP quien indujo mayor inhibición. A la

vez, LR y LP inhibieron parcialmente a LM de modo similar. En general podría decirse que existió concordancia entre los resultados del método de la doble capa y el de difusión en agar para EC y SN con los dos lactobacilos. En el caso de LM, en el método de difusión en agar no se observó un halo de inhibición total que sí se observó en el método de la doble capa. En los dos casos existe una exposición a los compuestos ácidos producidos por los lactobacilos pero en el caso del método de la doble capa, dichos compuestos podrían estar en mayor concentración en el entorno y en la colonia del lactobacilo en estudio, como para producir un halo de inhibición total de LM. Varios estudios demuestran la mayor sensibilidad de *L. monocytogenes* a la acción antagonista de las BAL con respecto a bacterias patógenas Gram negativas (Oldak y col. 2017, Valente y col. 2019, Sadeghi y col. 2022). Sin embargo otros estudios, como el de Martin y col. (2022), destaca que la actividad metabólica de algunas cepas de *L. monocytogenes* puede no verse afectada por los compuestos antimicrobianos producidos por las BAL (bacteriocinas, ácidos orgánicos, incluidos los ácidos láctico y acético) debido a su tolerancia al ácido y a la síntesis de enzimas proteolíticas. Podría pensarse en este caso una situación en donde LM no sería resistente a la acción antagonista de los lactobacilos pero sí requeriría una mayor concentración de compuestos ácidos antibacterianos en los SLC como para que su crecimiento se vea inhibido por completo en el método de difusión en agar.

4.2 ESTUDIO DE LAS CINÉTICAS DE INTERACCIÓN DE LAS BACTERIAS INDICADORAS FRENTE A LOS LACTOBACILOS EN COCULTIVO

Cultivos mixtos o cocultivos (lactobacilo + bacteria indicadora) fueron almacenados a una temperatura normal de refrigeración (5°C) y a dos temperaturas de abuso (10 y 15°C) durante 10 días al igual que los cultivos control o monocepa tanto de las bacterias indicadoras como de los lactobacilos. El ensayo se realizó con todas las bacterias indicadoras, ya que todas fueron inhibidas en su crecimiento por ambos lactobacilos de acuerdo a los resultados presentados en la sección 4.1.

4.2.1 Ensayos preliminares

Los ensayos preliminares tuvieron como objetivo seleccionar el medio de cultivo adecuado para el desarrollo de los cocultivos y cultivos controles así como evaluar la selectividad de los medios agarizados a utilizarse en los recuentos de cada una de las cepas indicadoras. Los resultados indicaron que no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los recuentos correspondientes a los dos caldos examinados (MRS y TS) para cada cepa indicadora (Tabla 4.3). Se optó entonces por trabajar con caldo MRS ya que soporta el crecimiento de los lactobacilos y de las cepas indicadoras. Además, como se visualiza en la Figura 4.3, cada agar selectivo usado para la determinación de las bacterias indicadoras inhibió el crecimiento de LP y LR. Esto permitió garantizar que al analizar los cocultivos se contarán, en cada agar selectivo, sólo las colonias de las cepas indicadoras y no las de los lactobacilos. Recíprocamente, también se comprobó que las bacterias indicadoras no formaron colonias visibles en agar MRS durante el período de incubación de los lactobacilos.

Tabla 4.3 Recuentos de bacterias indicadoras en sus medios selectivos agarizados para la comparación de crecimiento en Caldo Triptona Soya (TS) y Caldo Man Rogosa Sharpe (MRS).

Caldo de cultivo	Bacterias Indicadoras		
	<i>E. coli</i> ATCC 25922 Agar EMB (log UFC/ml)	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 Agar Oxford Modificado (log UFC/ml)	<i>S. Newport</i> ITA S12 Agar XLD (log UFC/ml)
Caldo MRS	8,9 ± 0,05 a	8,4 ± 0,1 a	8,6 ± 0,15 a
Caldo TS	8,7 ± 0,2 a	8,0 ± 0,1 a	8,6 ± 0,1 a

Letras distintas en la misma columna, indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre medios de cultivo

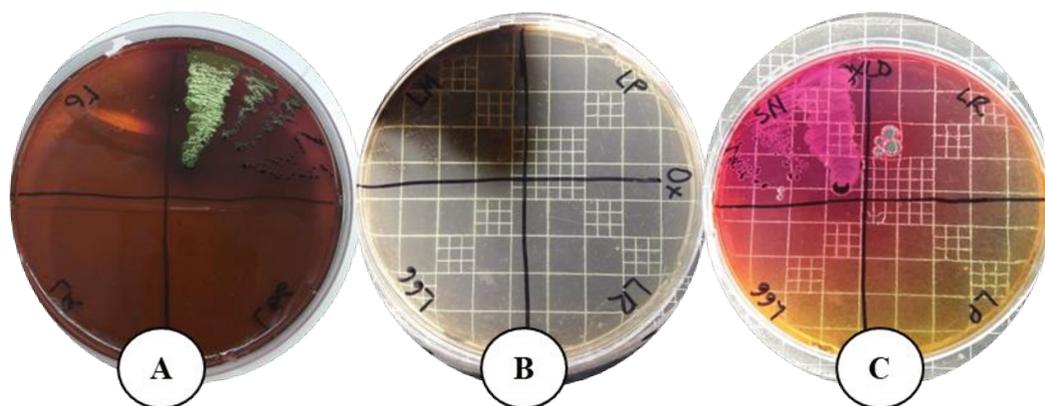


Figura 4.3. Estriado de las cepas indicadoras, de *L. rhamnosus* 64 (LR) y de *L. plantarum* 998 (LR) en los medios selectivos de recuento. (A) *E. coli* ATCC 25922, Agar EMB; (B) *L. monocytogenes* ATCC 15313, Agar Oxford Modificado y (C) *S. Newport*, Agar XLD.

4.2.2 Modelado y obtención de los parámetros cinéticos

El modelo de Baranyi y Roberts describió satisfactoriamente los conjuntos de datos experimentales de las curvas obtenidas correspondientes a cocultivos y cultivos controles. Los valores experimentales correspondientes al crecimiento o inactivación (según el caso) presentaron comportamiento sigmoide y los parámetros del modelo se estimaron mediante regresión no lineal utilizando el programa de ajuste de curvas DMfit (<https://www.combase.cc/index.php/en/>). La

bondad de ajuste se evaluó mediante el error estándar (SE), el análisis de los residuos y el coeficiente de determinación (R^2).

Los modelos obtenidos tuvieron un SE medio de 0,08 (mínimo 0,04 y máximo 0,18) a 5°C (Tabla 4.4), un SE medio de 0,15 (mínimo 0,03 y máximo 0,3) a 10°C (Tabla 4.5), y un SE medio de 0,20 (mínimo 0,11 y máximo 0,44) a 15 °C (Tabla 4.6). Los R^2 mostraron que hubo un mayor ajuste de las curvas experimentales obtenidas a 10 y 15° C donde los valores promedio fueron superiores a 0,9 mientras que a 5°C el valor promedio de los R^2 resultó de 0,72. Esto se correlaciona con el hecho de que a 5°C se observó escasa variación de los datos experimentales en función del tiempo para todas las cepas estudiadas, como se analiza más adelante. Los parámetros cinéticos estimados junto a su desviación estándar, tasa o velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}), tasa o velocidad máxima de inactivación ($-\mu_{max}$), fase de latencia (lag), logaritmo de la concentración inicial de microorganismos (log N_0) y logaritmo de la concentración final de microorganismos (log N_f) se presentan en las Tablas 4.4, 4.5 y 4.6 para 5°C, 10°C y 15°C, respectivamente. Las curvas de pH de cada cocultivo y cultivo control, si bien no fueron modeladas, pueden observarse en las mismas gráficas de los datos experimentales de recuento, para cada temperatura.

4.2.3 Interacciones durante el almacenamiento a 5°C

-E. coli ATCC 25922

En los cocultivos con LP y con LR, EC decreció lentamente desde el día 0 (modelo no lag) mientras que en su cultivo control decreció 6,7 veces más rápido después de una fase lag de casi 3 días, para finalmente alcanzar fase estacionaria alrededor del día 6, ajustándose así a un modelo *completo* (Tabla 4.4, Figuras 4.4 y 4.5). El descenso con respecto a la carga inicial (Tabla 4.4) fue superior para el control (1,4 log UFC/ml) que en cocultivo con LP (0,5 log UFC/ml) o con LR (0,8

log UFC/ml). Esto difiere de lo referido por Aguilar y Klotz (2010) para la cepa de *E. coli* ECO25 en cocultivos individuales con dos cepas de *L. plantarum* (LB279 y WS4174), en donde los parámetros cinéticos para el control y en cocultivo no presentaron diferencias. Sin embargo, el estudio de Aguilar y Klotz se realizó con inóculos iniciales de 2-3 log UFC/ml para ambas bacterias tanto en cocultivo como en cultivo control. Respecto al comportamiento de los lactobacilos en cocultivo con EC, LP mostró una fase lag prolongada de casi 8 días para luego decrecer lentamente hacia el final del almacenamiento, mientras que los datos experimentales de LR se ajustaron a un modelo *lineal* sin experimentar variaciones durante el todo el ensayo (Tabla 4.4, Figuras 4.4 y 4.5). Los controles respectivos presentaron comportamientos similares a los cocultivos correspondientes: LP no modificó prácticamente su carga inicial dando lugar a un modelo lineal y LR elevó levemente sus recuentos para dar lugar a un modelo no lag (Tabla 4.4). En cuanto a la evolución del pH, ni la curva del cultivo control de la bacteria indicadora, ni la de los cocultivos así como las de control de ambos lactobacilos tuvieron alguna variación que superara la unidad de pH (Fig. 4.4 y 4.5). Esto reflejó lo ocurrido con las curvas de recuento respectivas a consecuencia de la baja temperatura de almacenamiento que incidió ralentizando la actividad metabólica de estas cepas bacterianas mesófilas.

Tabla 4.4. Parámetros cinéticos estimados del modelo de Baranyi y Roberts para el ajuste de la evolución de los recuentos de los cultivos control y cocultivos conservados a 5°C durante 10 días.

Mo	T (°C)	Cultivo	Parámetros cinéticos del modelo						
			μ_{max} (log UFC. ml ⁻¹ . d ⁻¹)	lag (días)	log No (UFC/ml)	log Nf (UFC/ml)	R ²	SE Modelo	Modelo Baranyi-Roberts
EC	5	Control	-0.429 ± 0.176	2.963 ± 0.872	5.118 ± 0.111	3.744 ± 0.111	0.928	0.182	<i>completo</i>
		Cocultivo LP	-0.064 ± 0.012		5.255 ± 0.052	4.69 ± 0.107	0.874	0.078	<i>no lag</i>
		Cocultivo LR	-0.080 ± 0.011		5.121 ± 0.048	4.347 ± 0.16	0.932	0.072	<i>no lag</i>
LP	5	Control	-0.011 ± 0.004		8.136 ± 0.0255		0.572	0.034	<i>Lineal</i>
		Cocultivo EC	-0.086 ± 0.059	7.713 ± 1.438	7.451 ± 0.031	7.412 ± 0.047	0.444	0.067	<i>no asintótico</i>
		Cocultivo LM	-0.065 ± 0.021	0.716 ± 3.077	6.94 ± 0.107		0.822	0.109	<i>no asintótico</i>
		Cocultivo SN	-0.171 ± 0.068		7.430 ± 0.047	7.147 ± 0.027	0.865	0.047	<i>no lag</i>
LR	5	Control	0.065 ± 0.044		6.95 ± 0.060	7.143 ± 0.035	0.590	0.060	<i>no lag</i>
		Cocultivo EC	0.031 ± 0.011		6.805 ± 0.064		0.564	0.095	<i>Lineal</i>
		Cocultivo LM	-0.117 ± 0.042		6.826 ± 0.103	6.228 ± 0.065	0.820	0.111	<i>no lag</i>
		Cocultivo SN	0.046 ± 0.023	1.722 ± 3.917	7.294 ± 0.085		0.647	0.104	<i>no asintótico</i>
LM	5	Control	0.190 ± 0.024		3.886 ± 0.033	4.437 ± 0.018	0.970	0.036	<i>no lag</i>
		Cocultivo LP	-0.174 ± 0.112		4.006 ± 0.08	3.715 ± 0.034	0.589	0.080	<i>no lag</i>
		Cocultivo LR	-0.031 ± 0.009		3.932 ± 0.0267	3.698 ± 0.031	0.848	0.038	<i>no lag</i>
SN	5	Control	-0.066 ± 0.017		4.879 ± 0.031	4.548 ± 0.023	0.929	0.037	<i>no lag</i>
		Cocultivo LP	-0.068 ± 0.030		4.831 ± 0.055	4.537 ± 0.038	0.749	0.066	<i>no lag</i>
		Cocultivo LR	-0.169 ± 0.084		4.867 ± 0.079	4.524 ± 0.041	0.691	0.083	<i>no lag</i>

Mo: microorganismo, **μ_{max} :** tasa o velocidad máxima de crecimiento, - **μ_{max} :** tasa o velocidad máxima de inactivación, **lag:** fase de latencia, **log No:** log de la concentración inicial de microorganismos, **log Nf:** log de la concentración final de microorganismos, **R²:** coeficiente de determinación, **SE Modelo:** error estándar del ajuste del modelo.

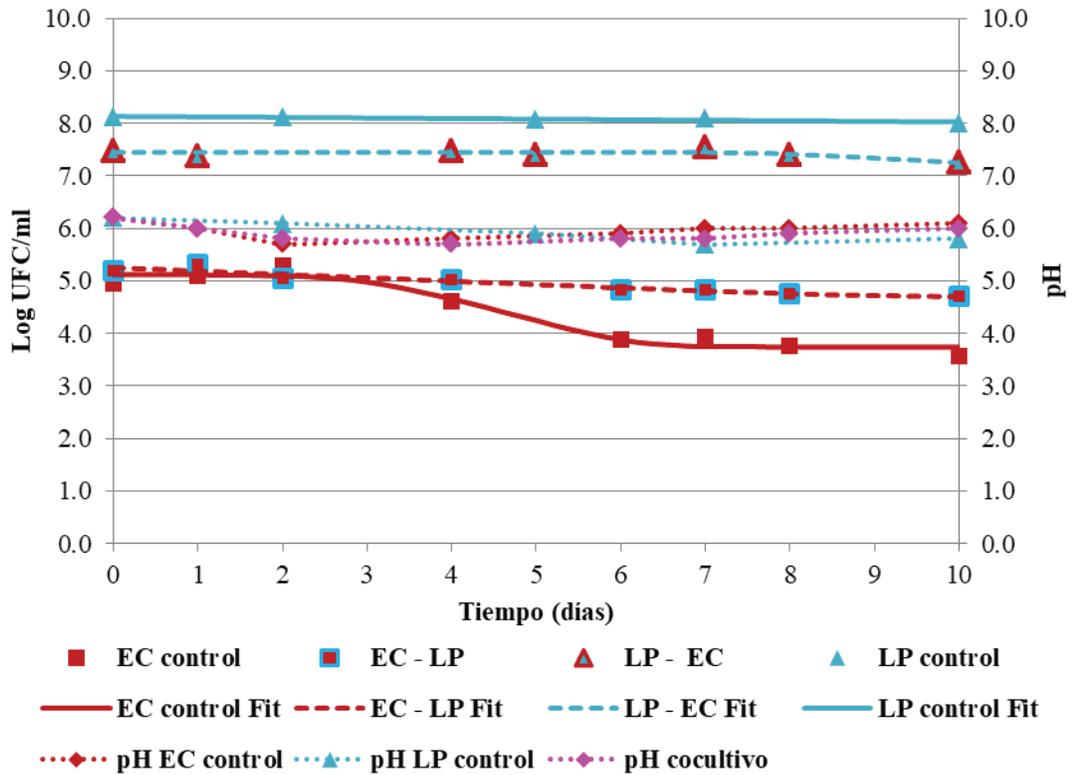


Figura 4.4 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *E. coli* ATCC 25922 en cultivo control (EC) y en cocultivo con *L. plantarum* 998 (EC – LP) y de *L. plantarum* 998 en cultivo control (LP) y en cocultivo (LP – EC) a 5° C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

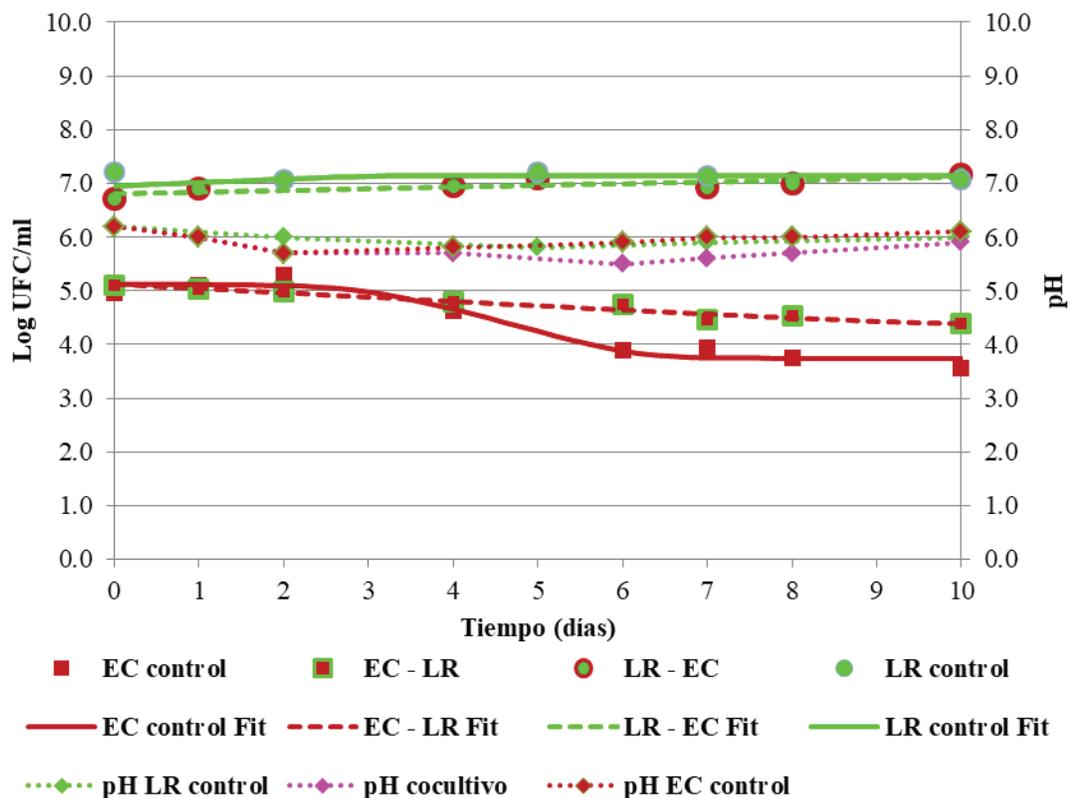


Figura 4.5 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *E. coli* ATCC 25922 en cultivo puro (EC) y en cocultivo con *L. rhamnosus* 64 (EC – LR) y de *L. rhamnosus* 64 en cultivo puro (LR) y en cocultivo (LR – EC) a 5° C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

-*Salmonella* Newport ITA S12

Las evoluciones de los recuentos de SN en cocultivo con LP y con LR no difirieron de la de su cultivo control (Figuras 4.6 y 4.7), con velocidades de inactivación prácticamente iguales (Tabla 4.4). Las tres curvas experimentales se ajustaron a modelos *no lag* que en definitiva reflejaron la escasa variación de los recuentos de SN en las tres condiciones de cultivo (Tabla 4.4). En concordancia con esto, una población de *Salmonella* Enteritidis se mantuvo estable durante una incubación de 5 días a 5°C sin presentar diferencias significativas entre el control y los cocultivos con dos BAL: *Leuconostoc* sp. LL R15 y *Pediococcus* sp. LL R106 (Ortiz y col. 2014). Los datos

experimentales en cocultivo con SN, mostraron que LR, tras una fase lag de casi 2 días desarrolló una tasa de crecimiento similar a su control. En el caso de LP, experimentó un descenso de sólo 0,3 log UFC/ml en comparación con el modelo lineal del control (Fig. 4.6 y 4.7, Tabla 4.4). Las curvas de pH de los cocultivos con SN, así como la de la bacteria indicadora mostraron poca variación en función del tiempo y como en el caso de EC, nunca superaron la unidad. No obstante a diferencia de lo ocurrido con EC, los pH finales en la experiencia con SN se situaron todos por debajo de 6.

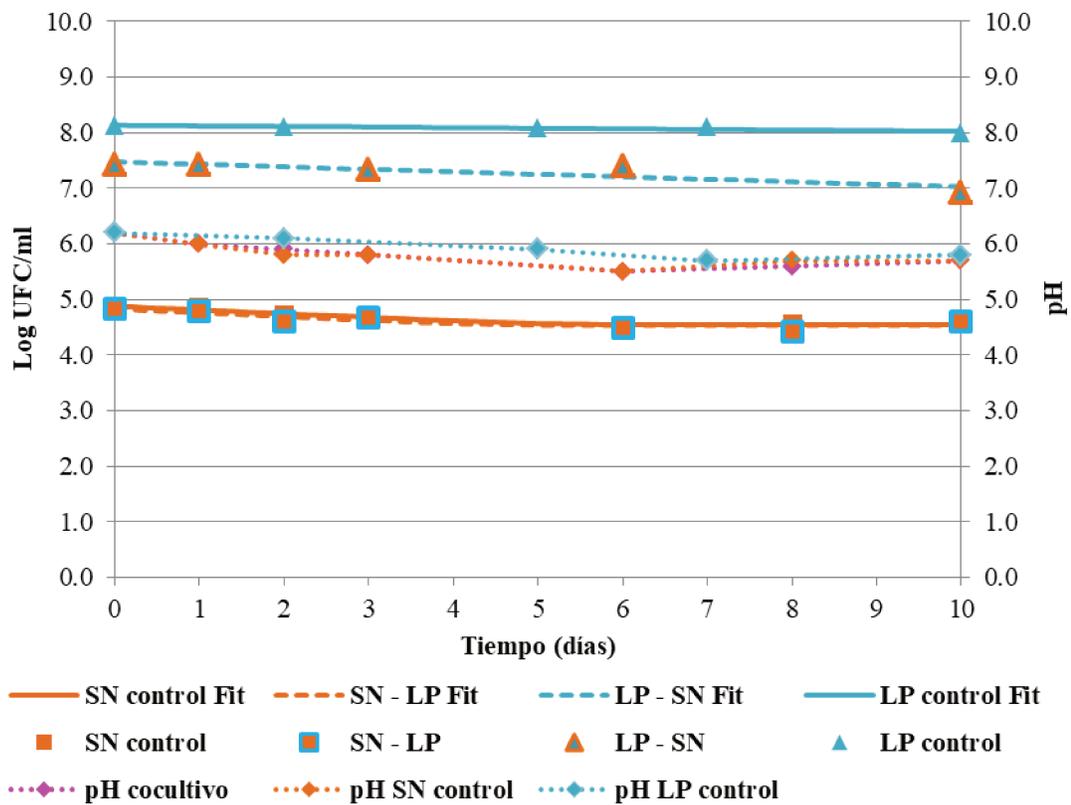


Figura 4.6 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *S. Newport* ITA S12 en cultivo control (SN) y en cocultivo con *L. plantarum* 998 (SN – LP) y de *L. plantarum* 998 en cultivo control (LP) y en cocultivo (LP – SN) a 5° C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

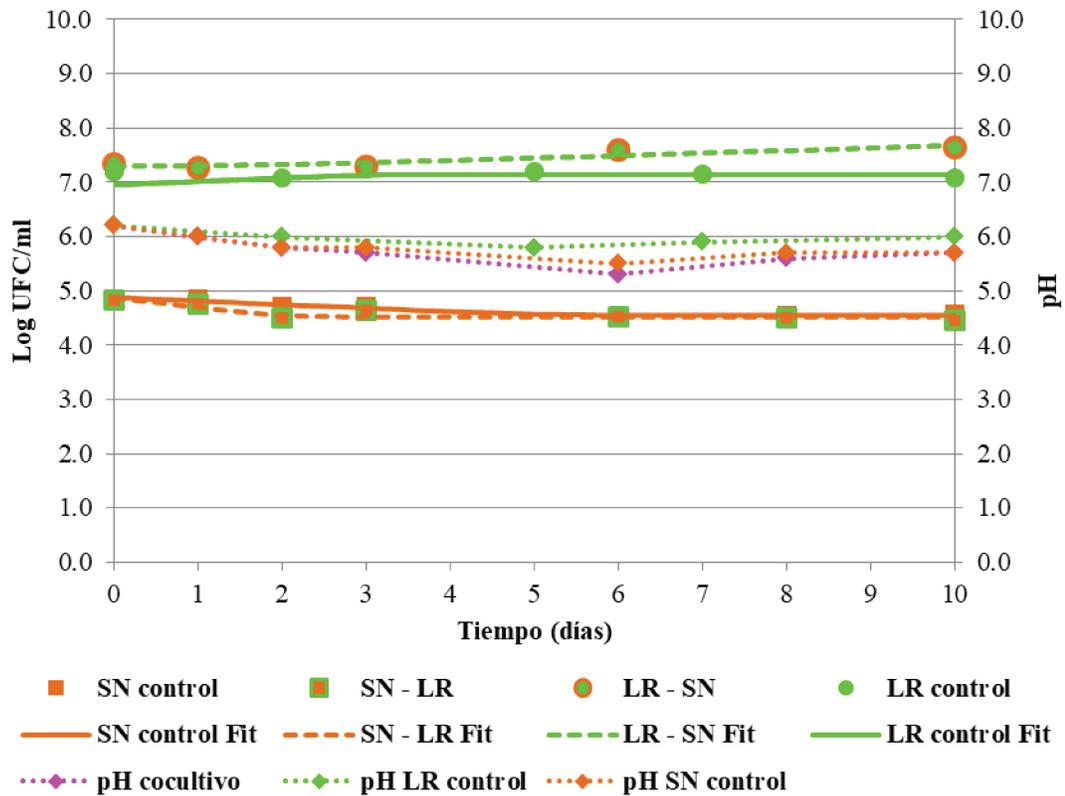


Figura 4.7 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *S. Newport* ITA S12 en cultivo puro (SN) y en cocultivo con *L. rhamnosus* 64 (SN – LR) y de *L. rhamnosus* 64 en cultivo puro (LR) y en cocultivo (LR – SN) a 5° C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

-*L. monocytogenes* ATCC 15313

Por su condición de psicrótrofa, a diferencia de las demás bacterias indicadoras, LM creció en el cultivo control desde el día cero hasta el día 4 y se mantuvo en fase estacionaria hasta el final del almacenamiento. En cocultivo con ambos lactobacilos fue inactivándose con una velocidad cinco veces mayor en presencia de LP que en cocultivo con LR (Figuras 4.8 y 4.9, Tabla 4.4). Un comportamiento similar fue observado por Correia Peres Costa y col. (2020) a 4°C para una cepa de *L. monocytogenes* que disminuyó su tasa de crecimiento (respecto a su control) enfrentada en cocultivo con *L. sakei* L115 (Ortiz y col. 2014). Bajo condiciones experimentales similares, *L. monocytogenes* LMO26 y *L. monocytogenes* ATCC 7644 crecieron moderadamente en sus cultivos

controles mientras que frente a *L. plantarum* WS4174 y *Leuconostoc* sp. LLR 15 (perteneciente a la familia de las BAL) mantuvieron su población inicial prácticamente sin cambios durante su almacenamiento a 5°C (Aguilar y Klotz 2010). LP en cocultivo con LM, decreció levemente con respecto a su cultivo control de modelo lineal. Por su parte, LR pasó de un lento crecimiento en cultivo control a una lenta disminución en sus conteos en presencia de LM (Figuras 4.8 y 4.9, Tabla 4.4). Los máximos descensos de pH de ambos cocultivos con LM fueron de igual magnitud (0,7), ocurriendo al día 10 con LP y al día 9 con LR. A su vez, este descenso fue igualado por el cultivo control de LM al día 10 y resultó superior a los experimentados por los cultivos controles de ambos lactobacilos (Figuras 4.8 y 4.9).

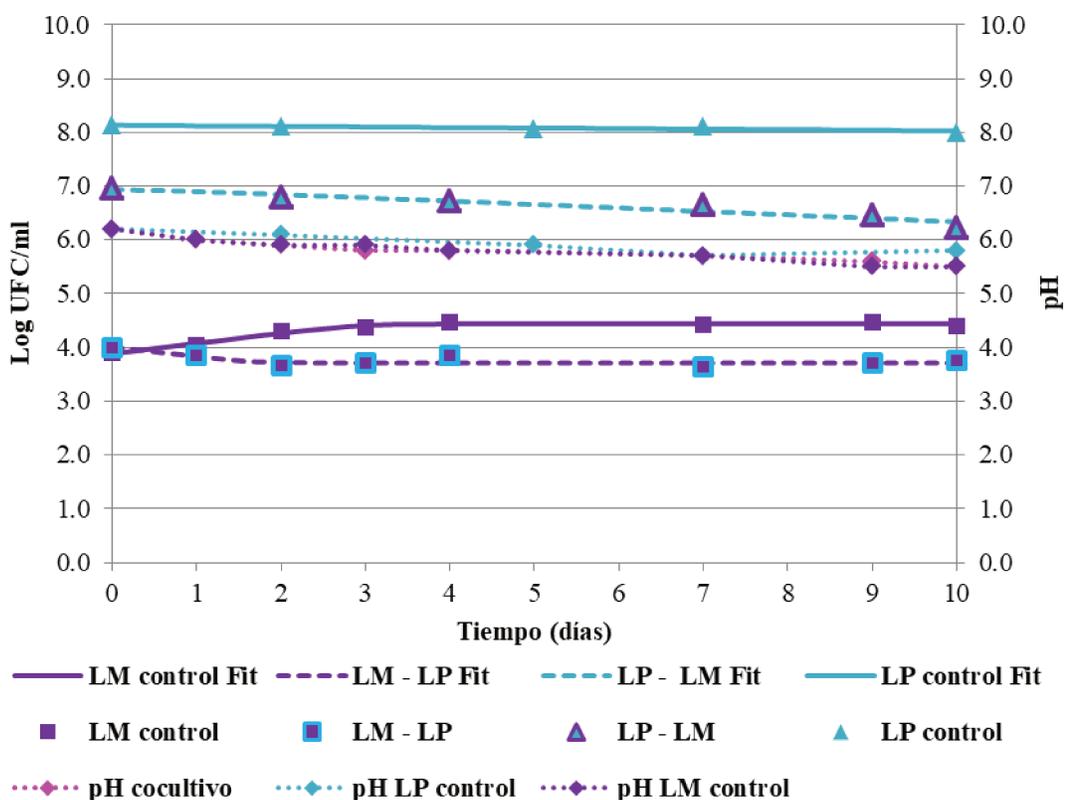


Figura 4.8 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *L. monocytogenes* ATCC 15313 en cultivo control (LM) y en cocultivo con *L. plantarum* 998 (LM – LP) y de *L. plantarum* 998 en cultivo control (LP) y en cocultivo (LP – LM) a 5° C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

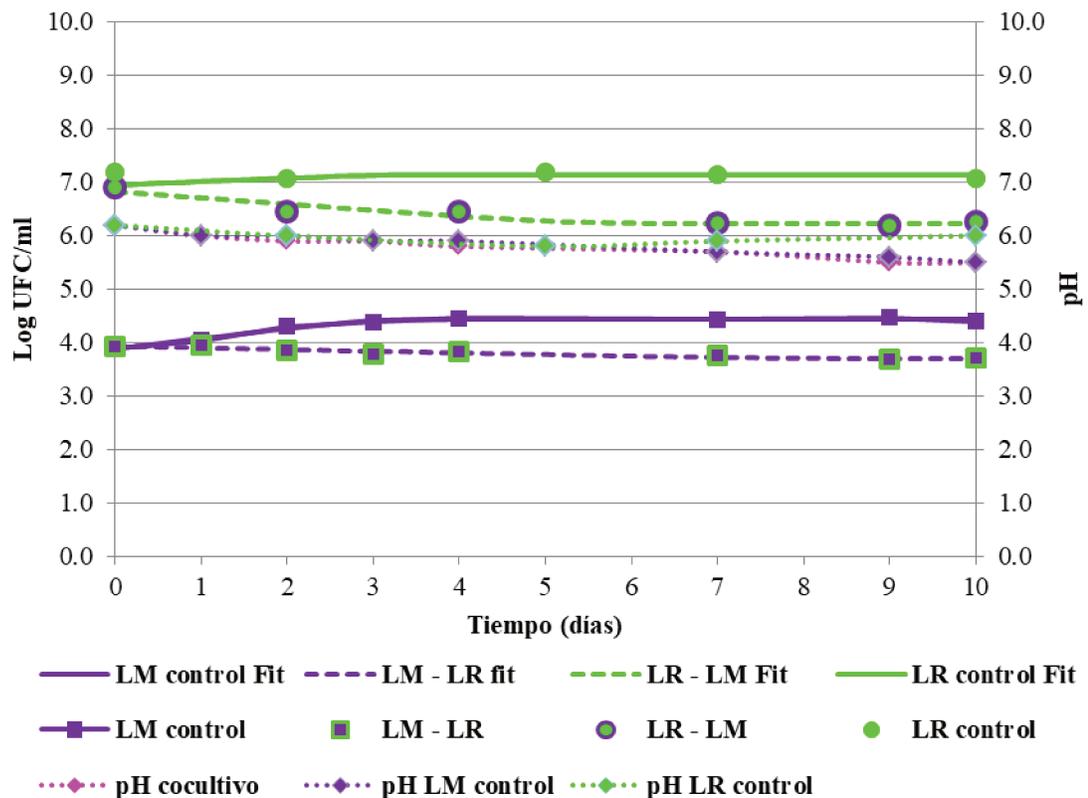


Figura 4.9 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *L. monocytogenes* ATCC 15313 en cultivo puro (LM) y en cocultivo con *L. rhamnosus* 64 (LM – LR) y de *L. rhamnosus* 64 en cultivo puro (LR) y en cocultivo (LR – LM) a 5° C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

Conclusiones parciales de las interacciones a 5°C

El factor determinante para la supervivencia de las distintas especies bacterianas, en su mayoría mesófilas, fue la temperatura de almacenamiento. En todos los cultivos controles y en los cocultivos, las cinéticas de inactivación o crecimiento promediaron velocidades de $0,1 \log \text{UFC ml}^{-1} \text{d}^{-1}$, salvo para el control de LM que resultó superior. Esta situación podría relacionarse a un mayor consumo de energía debido al trabajo adicional realizado en condiciones de estrés y a la síntesis de proteínas de choque de frío que disminuyen el rendimiento máximo de crecimiento (Horn y col.,

2007). Esta escasa variación en las distintas poblaciones bacterianas tuvo su correlato en las curvas de pH, las cuales tampoco experimentaron variaciones notables en función del tiempo.

La presencia de ambos lactobacilos en los cocultivos de EC y SN, no modificó la tendencia de los cultivos controles respectivos. En el caso de LM, se destacó el cambio de una cinética de crecimiento desarrollada en el cultivo control (por su condición de psicrótrofa) a una cinética de inactivación en cocultivo tanto con LR como con LP.

4.2.4 Interacciones durante el almacenamiento a 10°C

-E. coli ATCC 25922

Para EC en cultivo control, el aumento de la temperatura de almacenamiento significó el desplazamiento desde una cinética de decrecimiento a una de crecimiento que se ajustó a un modelo completo, con el desarrollo de todas sus fases (Tabla 4.5 y Fig. 4.10). En cocultivo con LP, EC se mantuvo en fase lag durante 5 días y luego fue decreciendo gradualmente hasta no detectarse en el último día de ensayo. Por su parte, el cultivo control de LP desarrolló una cinética de crecimiento con una fase lag de 3 días, en contraposición a la de inactivación desarrollada a 5°C. En presencia de EC, LP creció desde el inicio a una velocidad 8 veces mayor que su control (Fig. 4.10 y Tabla 4.5). Se observa también que LP en cocultivo con EC, entra en fase estacionaria en torno al día 3, y poco después, EC inicia su fase de inactivación. Frente a LR, EC mantuvo una fase lag de 7 días y posteriormente disminuyó sus conteos para terminar cerca del límite de detección (1,96 log UFC/ml) (Fig. 4.11 y Tabla 4.5). LR en cultivo control y en cocultivo con EC presentó tasas de crecimiento similares entre sí ($\mu = 0,156 \text{ log UFC ml}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y $\mu = 0,163 \text{ log UFC ml}^{-1} \text{ d}^{-1}$ respectivamente), e inferiores a la de LP en cocultivo con EC ($0,811 \text{ log UFC ml}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Esto podría explicar la mayor extensión de la fase de latencia de EC previa a su inactivación en cocultivo con LR (7 días) frente a

la desarrollada en cocultivo con LP (5 días) que culminó con la no detección de la bacteria indicadora (Fig. 4.10 y 4.11). Con respecto al pH, las curvas de los cocultivos alcanzaron valores más bajos (pH final EC-LP: 3,0 y pH final EC-LR: 3,3) que en el control de EC (pH final: 5,0) y que en los controles de ambos lactobacilos (pH final LP: 4,3 y pH final LR: 4,7) (Fig. 4.10 y 4.11). Esto significó descensos de pH de 3,2 unidades en el cocultivo con EC-LP en coincidencia con la no detección de EC y de 2,9 para el caso del cocultivo EC-LR donde EC se mantuvo viable hasta el final del período de conservación (Fig. 4.10 y 4.11).

Tabla 4.5. Parámetros cinéticos estimados del modelo de Baranyi y Roberts para el ajuste de la evolución de los recuentos de los cultivos control y cocultivos conservados a 10°C durante 10 días.

Mo	T (°C)	Cultivo	Parámetros cinéticos del modelo						
			μ_{\max} (log UFC. ml ⁻¹ . d ⁻¹)	lag (días)	log No (UFC/ml)	log Nf* (UFC/ml)	R ²	SE Modelo	Modelo Baranyi-Roberts
EC	10	Cultivo C	1.237 ± 0.068	0.48 ± 0.102	4.761 ± 0.064	7.966 ± 0.029	0.997	0.065	Completo
		Cocultivo LP	-1.019 ± 0.111	5.310 ± 0.237	5.022 ± 0.069	0.930 ± 0.206	0.988	0.155	Completo
		Cocultivo LR	-1.063 ± 0.093	7.218 ± 0.195	4.960 ± 0.052		0.978	0.140	No asintótico
LP	10	Cultivo C	0.114 ± 0.012	2.970 ± 0.636	8.133 ± 0.033		0.985	0.041	No asintótico
		Cocultivo EC	0.881 ± 0.222		6.590 ± 0.156	8.180 ± 0.070	0.939	0.156	No lag
		Cocultivo LM	0.546 ± 0.110	7.161 ± 0.588	7.07 ± 0.064		0.974	0.111	No asintótico
		Cocultivo SN	0.329 ± 0.097		6.815 ± 0.173	8.199 ± 0.125	0.894	0.204	No lag
LR	10	Cultivo C	0.157 ± 0.073		6.949 ± 0.102	7.483 ± 0.059	0.826	0.102	No lag
		Cocultivo EC	0.163 ± 0.027		6.779 ± 0.156		0.856	0.240	Lineal
		Cocultivo LM	0.310 ± 0.066	4.653 ± 1.023	6.844 ± 0.102		0.956	0.154	No asintótico
		Cocultivo SN	0.442 ± 0.083	0.615 ± 0.452	6.381 ± 0.090	7.734 ± 0.052	0.979	0.090	Completo
LM	10	Cultivo C	0.492 ± 0.069	3.159 ± 0.955	4.020 ± 0.184		0.960	0.283	No asintótico
		Cocultivo LP	0.296 ± 0.12	1.896 ± 0.829	3.864 ± 0.091	4.857 ± 0.068	0.935	0.117	Completo
		Cocultivo LR	0.518 ± 0.264	2.73 ± 0.544	3.804 ± 0.087	4.673 ± 0.115	0.865	0.147	Completo
SN	10	Cultivo C	0.809 ± 0.179	2.549 ± 0.493	4.673 ± 0.144	7.574 ± 0.132	0.972	0.218	Completo
		Cocultivo LP	-3.015 ± 0.161	4.040 ± 0.050	4.705 ± 0.03	1.000 ± 0.0346	0.999	0.060	Completo
		Cocultivo LR	-0.510 ± 0.056	3.629 ± 0.427	4.827 ± 0.082	1.722 ± 0.312	0.984	0.142	Completo

μ_{\max} : tasa o velocidad máxima de crecimiento, $-\mu_{\max}$: tasa o velocidad máxima de inactivación, **lag**: fase de latencia, **log No**: log de la concentración inicial de microorganismos, **log Nf**: log de la concentración final de microorganismos, **R²**: coeficiente de determinación, **SE Modelo**: error estándar del ajuste del modelo, **(*) log Nf (UFC/ml) = 1**, corresponde a no detección.

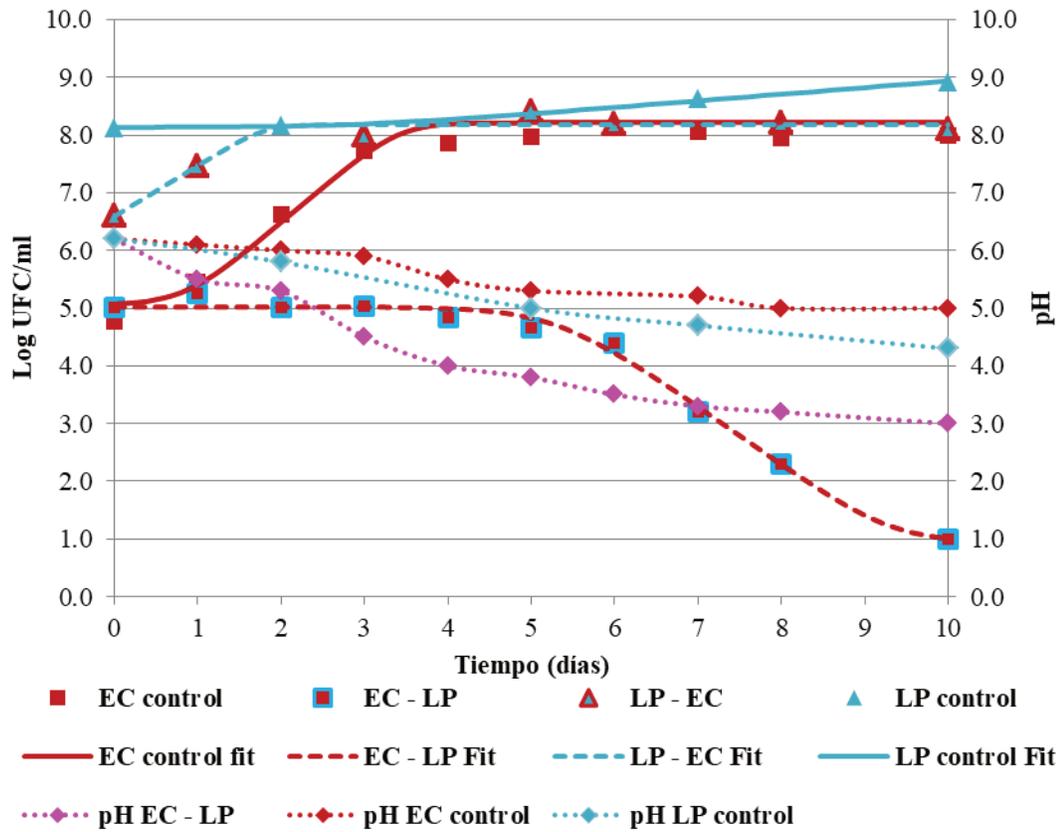


Figura 4.10 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *E. coli* ATCC 25922 en cultivo control (EC) y en cocultivo con *L. plantarum* 998 (EC – LP) y de *L. plantarum* 998 en cultivo control (LP) y en cocultivo (LP – EC) a 10° C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

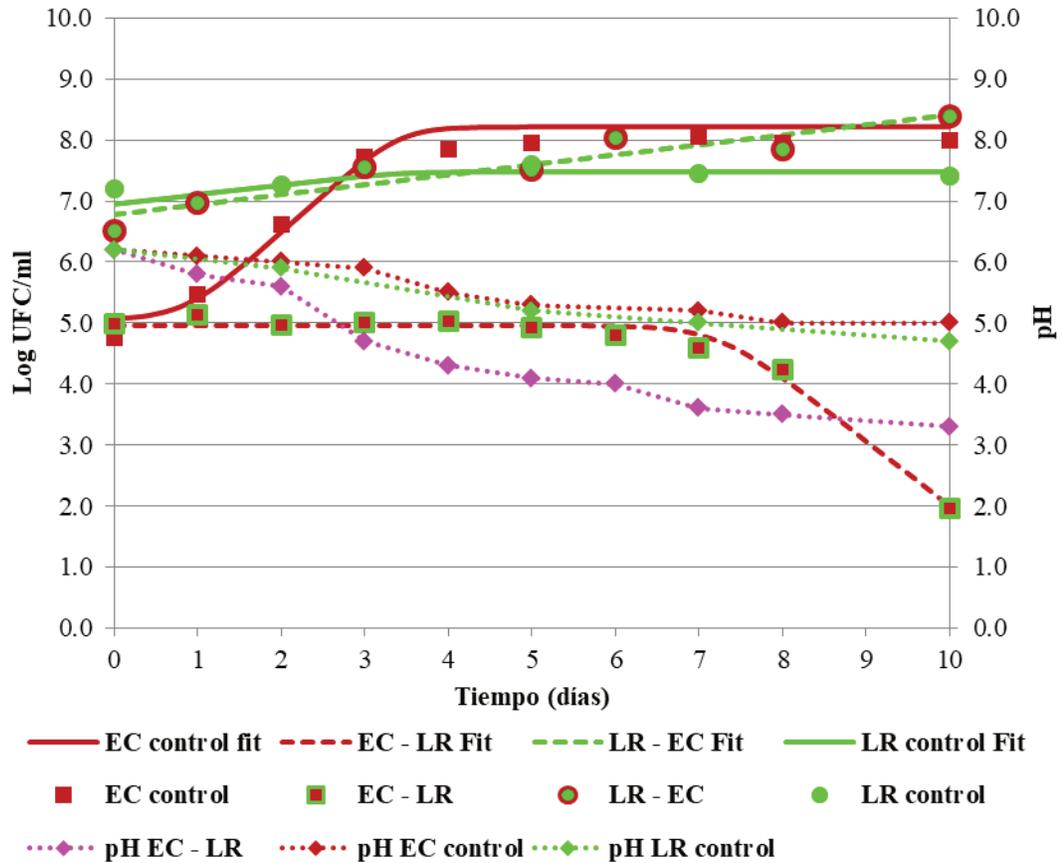


Figura 4.11 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *E. coli* ATCC 25922 en cultivo puro (EC) y en cocultivo con *L. rhamnosus* 64 (EC – LR) y de *L. rhamnosus* 64 en cultivo puro (LR) y en cocultivo (LR – EC) a 10°C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

-*Salmonella* Newport ITA S12

Los datos experimentales de SN en cultivo control se ajustaron a un modelo completo de crecimiento ($\mu_{max} = 0,809 \log \text{ UFC ml}^{-1} \text{ d}^{-1}$), a diferencia del lento decrecimiento experimentado a 5° C ($\mu_{max} = -0,066 \log \text{ UFC ml}^{-1} \text{ d}^{-1}$) (Tabla 4.5). SN en cocultivo con LP, experimentó una fase de latencia de 4 días para después disminuir sus recuentos aceleradamente ($-3,015 \log \text{ UFC ml}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) y finalmente dejar de detectarse al día 7. Entre el día 4 y el día 5, LP detuvo su crecimiento para entrar en fase estacionaria coincidiendo con el inicio de la inactivación de SN (Tabla 4.5 y Fig. 4.12). Con respecto a su control, LP en cocultivo triplicó la velocidad de crecimiento. SN en

cocultivo con LR, mostró un descenso más gradual que con LP ya que su tasa de inactivación resultó 6 veces menor (Tabla 4.5 y Fig.4.12 y 4.13). Hacia el final del almacenamiento, los recuentos de SN en cocultivo con LR promediaron muy cerca del límite de detección (1,88 log UFC/ml). Por su parte, el control de LR desarrolló un modelo *no lag* con una velocidad de crecimiento casi 3 veces menor que en cocultivo con SN, donde se ajustó a un modelo completo y en torno al día 3 entró en fase estacionaria hasta el final del almacenamiento (Tabla 4.5 y Fig. 4.13). También aquí, la fase estacionaria del lactobacilo (día 3) se produjo muy cercana al inicio de la inactivación de la bacteria indicadora (día 4). A diferencia de lo ocurrido a 5°C, las curvas experimentales de pH mostraron un descenso continuo, siendo las correspondientes a los dos cocultivos donde se registraron las mayores disminuciones hacia el final del almacenamiento; en coincidencia con la no detección de la bacteria indicadora (Δ SN-LP: 3,2 - día 8 – pH final 3,0) o con valores cercanos al límite de detección (Δ SN-LR: 3,2 - día 10 – pH final 3,0). Siguieron los descensos de los controles de cada lactobacilo (Δ LP: 1,9, Δ LR: 1,4) y con el menor descenso, el control de SN (Δ SN: 0,9) (Fig.4.12 y 4.13).

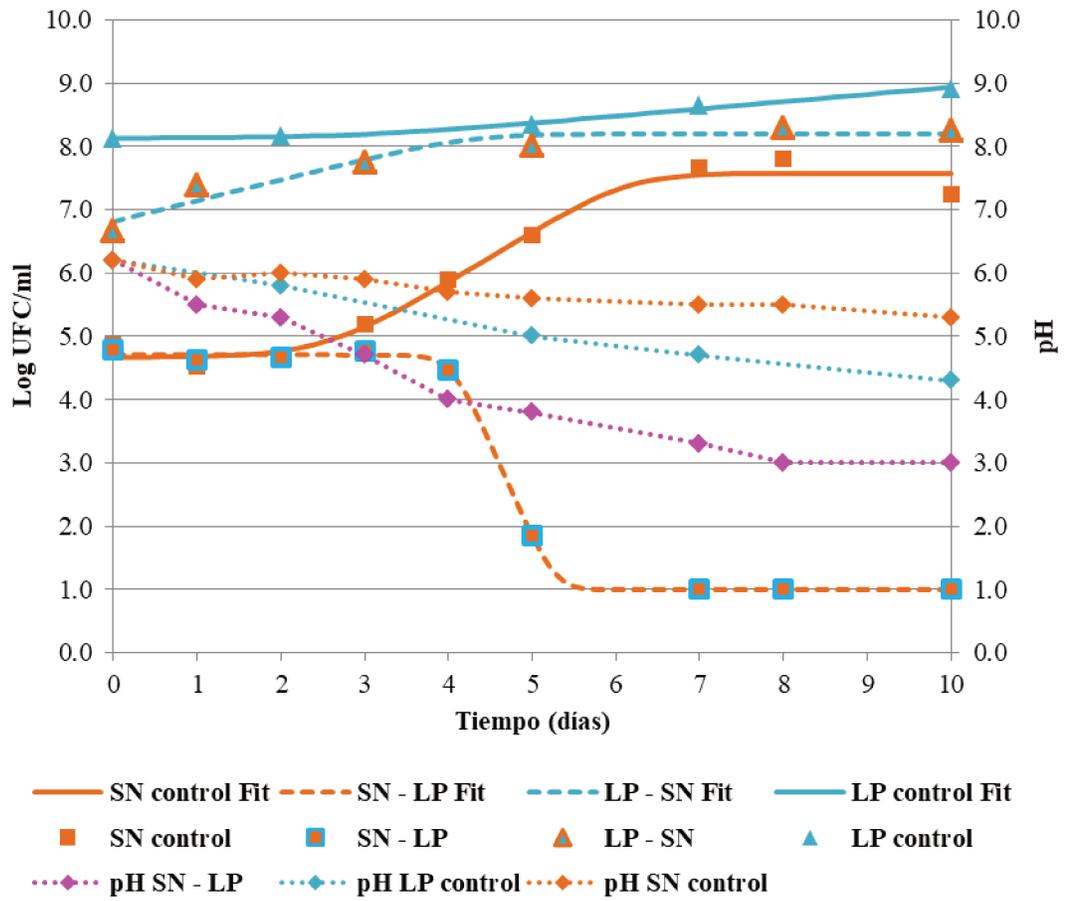


Figura 4.12 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *S. Newport* ITA S12 en cultivo control (SN) y en cocultivo con *L. plantarum* 998 (SN – LP) y de *L. plantarum* 998 en cultivo control (LP) y en cocultivo (LP – SN) a 10°C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

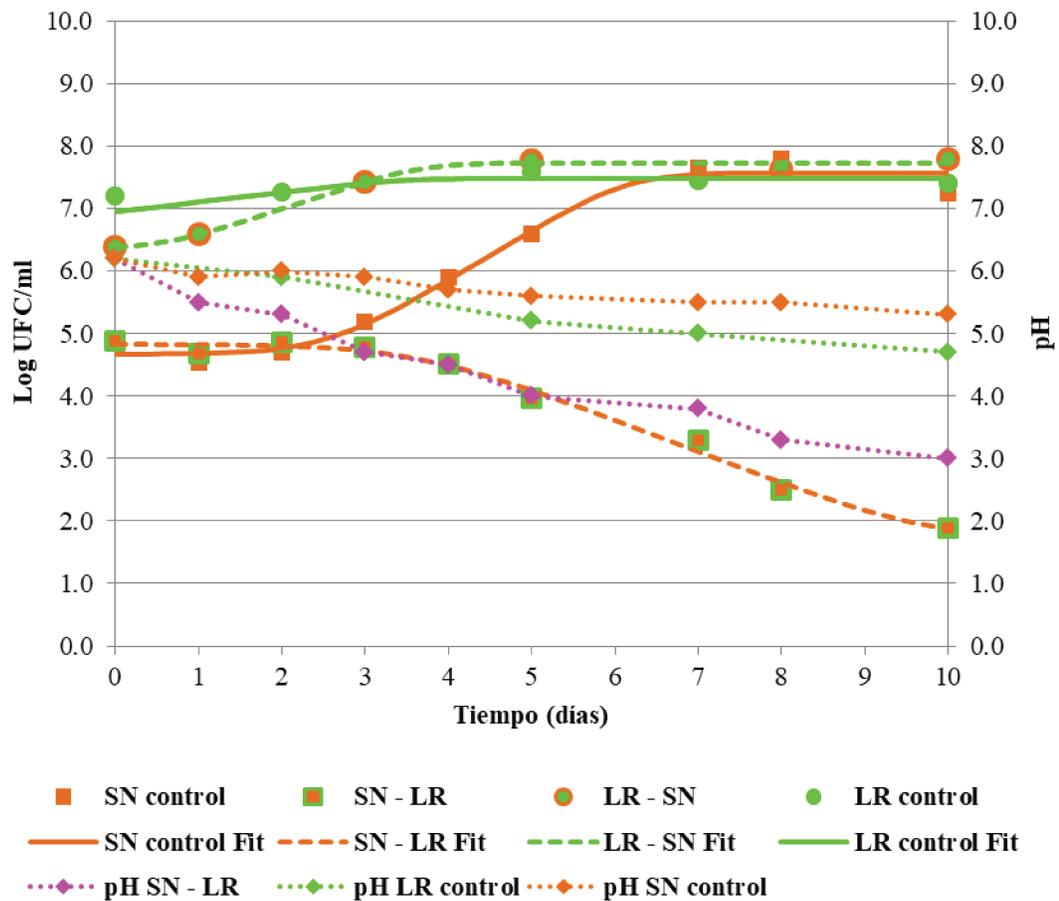


Figura 4.13 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *S. Newport* ITA S12 en cultivo puro (SN) y en cocultivo con *L. rhamnosus* 64 (SN – LR) y de *L. rhamnosus* 64 en cultivo puro (LR) y en cocultivo (LR – SN) a 10°C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

-L. monocytogenes ATCC 15313

Tanto en cultivo control como en sus dos cocultivos, LM se mantuvo latente entre 2 y 3 días para luego comenzar a crecer. El crecimiento de LM en el control ocurrió de manera ininterrumpida desde el inicio hasta el final del almacenamiento, por lo que se ajustó a un modelo *asintótico*, pudiendo haberse extendido esta fase o haber llegado a una fase estacionaria si el tiempo de almacenamiento hubiera sido mayor. En los cocultivos, LM desarrolló modelos *completos* pero sin marcadas diferencias entre los valores de recuento iniciales y finales, las cuales no pudieron superar

1 log UFC/ml tanto en cocultivo con LP (0,99 log UFC/ml) como con LR (0,87 log UFC/ml) (Tabla 4.5 y Fig. 4.14 y 4.15). En cocultivo con LM, LP creció a mayor velocidad que la de su control, pero con una fase de latencia más extensa (7 días). LR en cocultivo con LM tras una fase lag de 4 días, creció al doble de velocidad que su control, en el cual no desarrolló fase lag (Fig. 4.14 y 4.15). Por contraposición, en los cocultivos con EC y con SN ambos lactobacilos prácticamente no presentaron fases de latencia, creciendo desde el inicio (Tabla 4.5). Correia Peres Costa y col. (2020), en su trabajo basado en el antagonismo entre *L. sakei* L115 y *L. monocytogenes* observaron que si bien a 8 y a 11°C obtuvieron los máximos niveles de inhibición de *L. monocytogenes* (lo estudiaron a 4, 8, 11, 15 y 20°C), al mismo tiempo observaron la mayor influencia sobre los parámetros cinéticos del lactobacilo. Se observó la disminución de la velocidad de crecimiento de *L. sakei* L115 y se postuló como causa a la competencia por nutrientes dependiente de la temperatura. Esto podría justificar la extensión prolongada de las fases lag de LP y LR en cocultivo con LM obtenidas en esta tesis (en comparación con los cocultivos con EC y SN). En consecuencia, también existiría una menor producción de compuestos ácidos por parte de los lactobacilos que se reflejaría en los pH finales de los cocultivos, que se situaron alrededor de 4,0 mientras que en los casos de EC y SN estuvieron en 3,0 (correspondiendo a la no detección de la bacteria indicadora) (Fig 4.10 a 4.15).

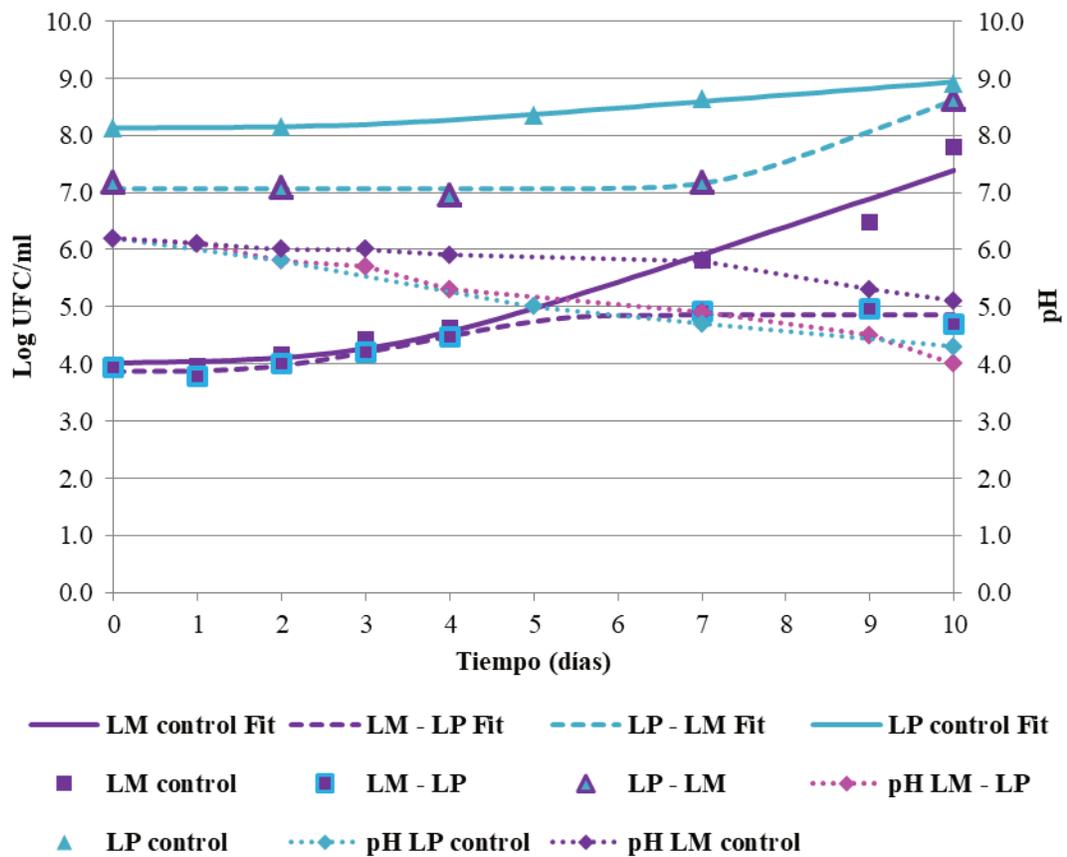


Figura 4.14 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *L. monocytogenes* ATCC 15313 en cultivo control (LM) y en cocultivo con *L. plantarum* 998 (LM – LP) y de *L. plantarum* 998 en cultivo control (LP) y en cocultivo (LP – LM) a 10°C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

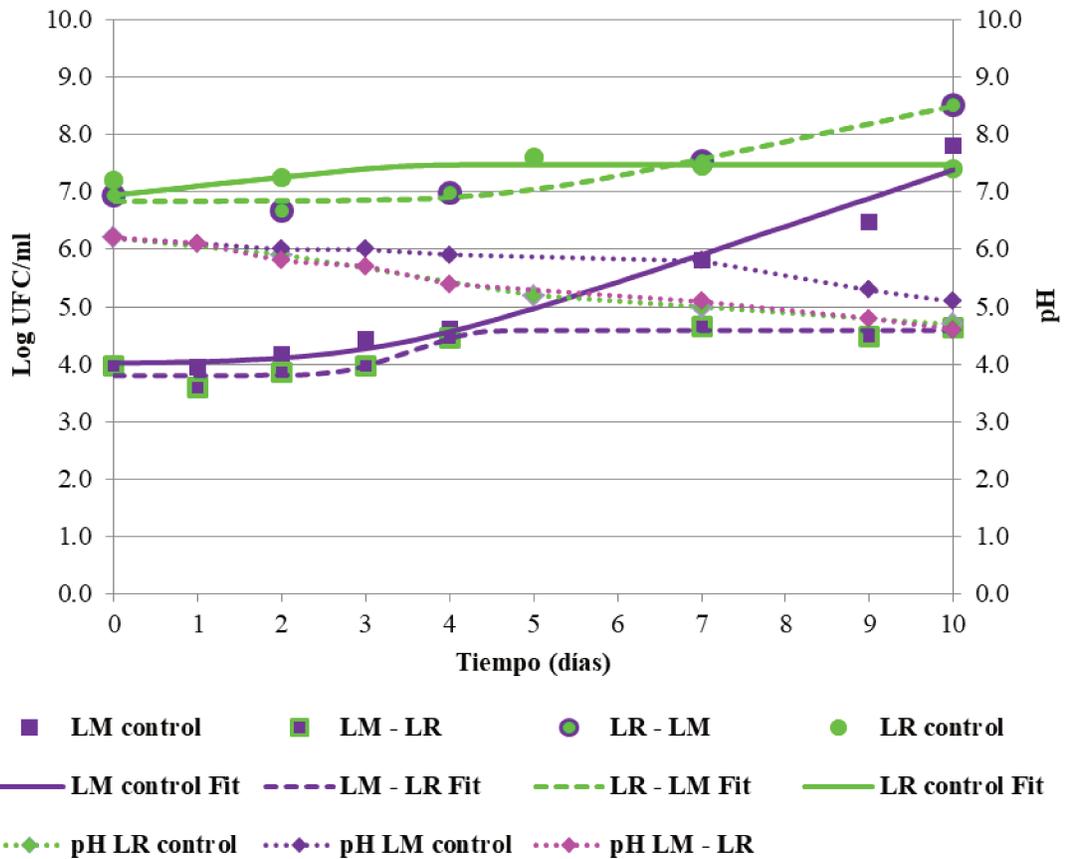


Figura 4.15 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *L. monocytogenes* ATCC 15313 en cultivo puro (LM) y en cocultivo con *L. rhamnosus* 64 (LM – LR) y de *L. rhamnosus* 64 en cultivo puro (LR) y en cocultivo (LR – LM) a 10°C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

Conclusiones parciales de las interacciones a 10°C

Todas las bacterias indicadoras presentaron cinéticas de crecimiento en sus cultivos control. EC alcanzó más velozmente la fase estacionaria, seguida de SN y finalmente LM, que no logró desarrollar esa fase al término del almacenamiento (Tabla 4.5).

En los cocultivos con LP, EC y SN mostraron cinéticas de inactivación que culminaron con la no detección de la bacteria (día 10 y día 7, respectivamente) mientras que en cocultivo con LR, se determinaron valores de recuento muy cercanos al límite de detección. Por su parte LM desarrolló escaso crecimiento en ambos cocultivos para entrar en fase estacionaria alrededor del día 5.

El pH experimentó mayores variaciones que a 5°C en todos los cultivos. Las curvas de pH de los controles de lactobacilos y bacterias indicadoras transcurrieron más próximas entre sí y con menores disminuciones respecto al pH inicial. Las curvas de pH de los cocultivos (EC y SN) presentaron los mayores descensos.

En los cocultivos con EC y SN, el final de la fase de crecimiento logarítmico e inicio de la fase estacionaria de los lactobacilos, coincidió con el principio de la inactivación de las bacterias indicadoras. En concordancia con esto, Shi y col. (2019) observaron que la inhibición del crecimiento de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 cocultivada con *Limosilactobacillus reuteri* S5, en condiciones similares a las de esta tesis, comenzó en la fase estacionaria temprana de este último. A su vez, Roldán y col. (2011) refirieron la misma observación durante la inactivación de *E. coli* O157:H7 en cocultivo con *L. casei* 206/1 a 37°C. Para explicar en cierta medida esta situación puede destacarse el trabajo de Kumar A. y col. (2018) en donde se enfrentaron en cocultivo *Lactococcus lactis* MTCC-440 y *Salmonella* Typhi a 30°C, en un medio de cultivo donde la glucosa fue la principal fuente de carbohidratos y principal responsable de la producción de ácido láctico (y de la generación de energía) por parte de *L. lactis*. A las 10 hs de cocultivo, pudo verificarse que *S* Typhi detuvo su crecimiento y al mismo tiempo se observó la fase final del crecimiento logarítmico del lactococo, la disminución exponencial de la concentración de glucosa, el aumento (también exponencial) de ácido láctico y la consecuente disminución del pH. Esto permitiría entender que en ese momento se alcanza la concentración crítica de ácido láctico que en el estudio de Kumar A. y col (2018) provocó el cese del crecimiento de *S* Typhi. Trasladado a esta tesis, en el final de la fase de crecimiento logarítmico e inicio de la fase estacionaria de LP y LR, se logra la concentración necesaria de compuestos ácidos (ácido láctico) para iniciar la inactivación de EC y SN.

Otro aspecto de interés consiste en el hecho de que las velocidades de crecimiento de LP y LR en cocultivo, resultaron superiores a las de sus respectivos controles (Tabla 4.5). Este impacto

positivo en la cinética de las BAL en cocultivo se ha reportado entre distintas cepas de BAL, con el objetivo de encontrar cultivos mixtos en los que se potenciaran las propiedades de cada bacteria (Canon y col., 2020). Sin embargo, hay escasa información de los cultivos controles de las BAL enfrentadas en cocultivos con bacterias patógenas productoras de ETA. Generalmente porque es de mayor interés la comparación con el cultivo control del patógeno que se desea inactivar o inhibir su crecimiento.

4.2.5 Interacciones durante el almacenamiento a 15°C

-E. coli ATCC 25922

El cultivo control de EC a 15°C creció a menor velocidad que a 10°C pero con una fase lag más breve (2,5 horas). En cocultivo con LP, EC se inactivó más rápido que a 10°C (33%), con 3 días menos de latencia, para dejar de detectarse al día 5. En presencia de LR, EC triplicó su tasa de inactivación a 10°C, redujo su fase lag a 4 días y ya no se detectó al día 6 (Tabla 4.6, Fig. 4.16 y 4.17). En cultivo control, LP creció desde el inicio (modelo *no lag*) 4 veces más rápido que a 10°C. En cocultivo con EC, sus conteos se ajustaron al mismo modelo pero con una tasa de crecimiento 3 veces mayor y superando la tasa de crecimiento a 10°C (Fig. 4.16 y Tabla 4.6). También en cocultivo, LP entró en fase estacionaria alrededor del día 2, en coincidencia con el inicio de la etapa de inactivación de la bacteria indicadora. Por otro lado, el control de LR aceleró 1,3 veces su crecimiento, con respecto al cultivo control almacenado a 10°C. En presencia de EC, LR triplicó la velocidad de su control y aceleró la tasa de crecimiento alcanzada por el cocultivo a 10°C (Fig. 4.17 y Tabla 4.6). En torno al día 4, de forma similar a LP, LR entró en fase estacionaria de su desarrollo coincidiendo con el inicio de la inactivación de EC (Tabla 4.6 y Fig. 4.16 y 4.17). Comparando las curvas de pH a 10 y 15°C, se observaron descensos más acelerados para las curvas de los cocultivos

(pH final: 3,0) y controles de lactobacilos (pH final LP: 3,8; pH final LR: 4,0) mientras que el control de EC presentó una menor variación con respecto al pH inicial (pH final: 4,8) (Fig. 4.16 y 4.17).

Tabla 4.6 Parámetros cinéticos estimados del modelo de Baranyi y Roberts para el ajuste de la evolución de los recuentos de los cultivos control y cocultivos conservados a 15° C durante 10 días.

Mo	T (°C)	Cultivo	Parámetros cinéticos del modelo						
			μ_{max} (log UFC. ml-1. d-1)	lag (días)	log No (UFC/ml)	log Nf* (UFC/ml)	R ²	SE Modelo	Modelo Baranyi-Roberts
EC	15	Cultivo C	0.899 ± 0.0754	0.154 ± 0.269	5.0101 ± 0.127	8.889 ± 0.0648	0.993	0.128	Completo
		Cocultivo LP	-1.527 ± 0.156	1.925 ± 0.212	5.424 ± 0.129	0.974 ± 0.0874	0.992	0.177	Completo
		Cocultivo LR	-3.351 ± 0.218	3.891 ± 0.060	5.32 ± 0.055	1 ± 0.055	0.997	0.111	Completo
LP	15	Cultivo C	0.459 ± 0.107		8.13 ± 0.145	9.4 ± 0.0839	0.933	0.145	No lag
		Cocultivo EC	1.357 ± 0.339		6.99 ± 0.234	9.018 ± 0.105	0.912	0.234	No lag
		Cocultivo LM	0.53 ± 0.124	0.307 ± 0.682	6.96 ± 0.146	9.194 ± 0.0842	0.976	0.146	Completo
		Cocultivo SN	0.761 ± 0.163		6.863 ± 0.115	8.573 ± 0.0678	0.978	0.115	no lag
LR	15	Cultivo C	0.215 ± 0.0389		7.302 ± 0.149	8.988 ± 0.195	0.938	0.177	no lag
		Cocultivo EC	0.611 ± 0.322		6.846 ± 0.228	8.606 ± 0.103	0.909	0.228	no lag
		Cocultivo LM	0.385 ± 0.0468		6.91 ± 0.114	8.89 ± 0.0724	0.978	0.124	no lag
		Cocultivo SN	1.324 ± 0.332		6.36 ± 0.231	8.563 ± 0.134	0.944	0.231	no lag
LM	15	Cultivo C	0.983 ± 0.144	1.019 ± 0.441	4.177 ± 0.196	9.066 ± 0.112	0.99	0.21	Completo
		Cocultivo LP	-2.441 ± 0.722	6.57 ± 0.313	5.096 ± 0.192	0.998 ± 0.307	0.95	0.43	Completo
		Cocultivo LR	-1.979 ± 0.69	7.034 ± 0.421	5.003 ± 0.197	1.092 ± 0.441	0.93	0.445	Completo
SN	15	Cultivo C	0.658 ± 0.069		5.127 ± 0.171	8.774 ± 0.127	0.976	0.222	Completo
		Cocultivo LP	-2.233 ± 0.314	2.322 ± 0.186	5.259 ± 0.126	1.003 ± 0.099	0.99	0.2	Completo
		Cocultivo LR	-2.15 ± 0.266	2.448 ± 0.156	5.074 ± 0.104	1.001 ± 0.085	0.992	0.17	Completo

μ_{max} : tasa o velocidad máxima de crecimiento, - μ_{max} : tasa o velocidad máxima de inactivación, **lag**: fase de latencia, **log No**: log de la concentración inicial de microorganismos, **log Nf**: log de la concentración final de microorganismos, **R²**: coeficiente de determinación, **SE Modelo**: error estándar del ajuste del modelo, **(*)log Nf (UFC/ml) = 1**, **corresponde a no detección**

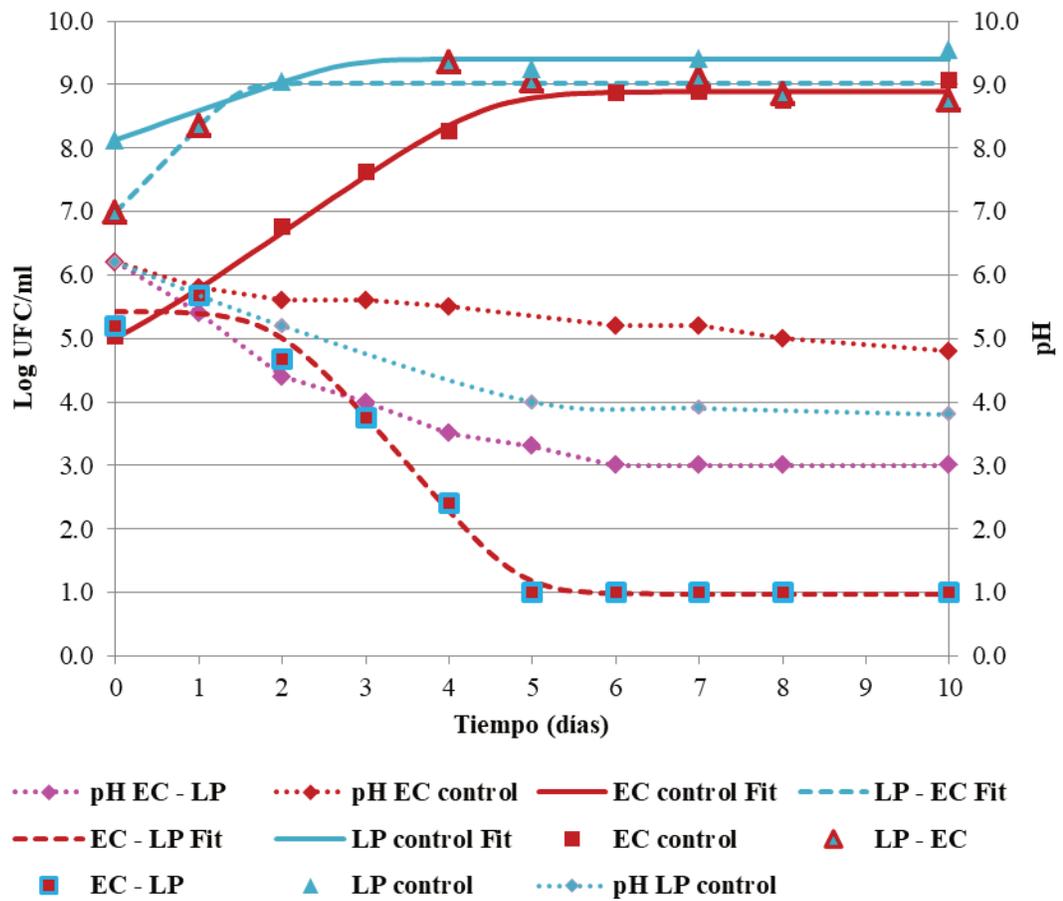


Figura 4.16 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *E. coli* ATCC 25922 en cultivo control (EC) y en cocultivo con *L. plantarum* 998 (EC – LP) y de *L. plantarum* 998 en cultivo control (LP) y en cocultivo (LP – EC) a 15° C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

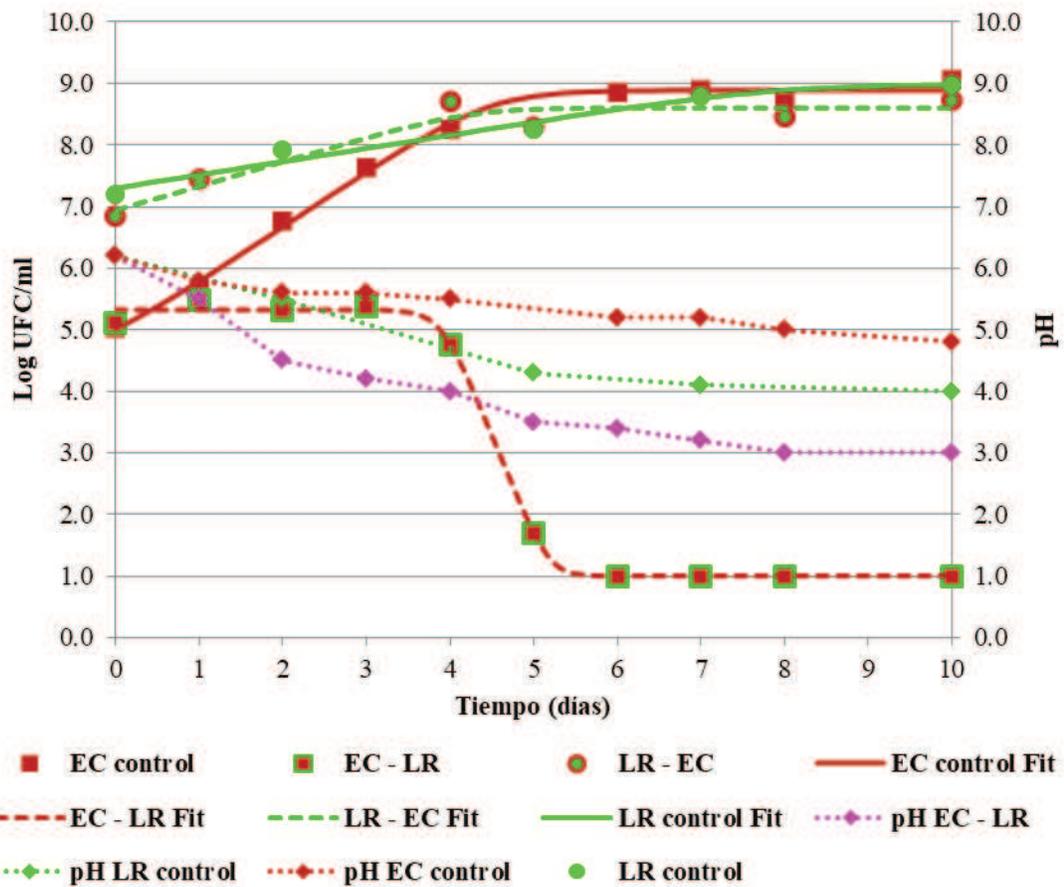


Figura 4.17 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *E. coli* ATCC 25922 en cultivo puro (EC) y en cocultivo con *L. rhamnosus* 64 (EC – LR) y de *L. rhamnosus* 64 en cultivo puro (LR) y en cocultivo (LR – EC) a 15°C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

-S. Newport ITA S12

A diferencia de lo registrado a 10°C, SN en cultivo control creció desde el inicio sin desarrollar fase de latencia hasta entrar en fase estacionaria en torno al día 6. En cocultivo con LP mostró una fase lag reducida a la mitad y mayor velocidad de inactivación que a 10°C (1,3 veces), con niveles casi no detectables al día 4 (1,3 log UFC/ml) mientras que al mismo día, a 10°C alcanzaba los 4,47 log UFC/ml. En presencia de LP, SN presentó fase de latencia y tasa de inactivación similares a las del cocultivo con LR, dejando de detectarse al mismo tiempo en los dos cocultivos (día 6) (Fig. 4.18 y 4.19, Tabla 4.6). Los recuentos de LP en cocultivo con SN fueron

incrementándose desde el inicio (modelo *no lag*) al igual que su control, pero a mayor velocidad y duplicando la alcanzada a 10°C. A su vez LR, en presencia de SN, también desarrolló un modelo *no lag* pero con mayor tasa de crecimiento (6,2 veces) que su control y acelerando la velocidad alcanzada a 10°C (Fig. 4.18 y 4.19, Tabla 4.6). También se observó que la entrada en fase estacionaria por parte de los lactobacilos en ambos cocultivos, coincidió con el inicio de la inactivación de SN. Con respecto al pH, pudo observarse un gradual y menor descenso en el control de la bacteria indicadora (pH final: 5,0) y un mayor y más acelerado descenso en los cocultivos (pH final: 3,0) y en ambos controles de lactobacilos (pH final LP: 3,8; pH final LR: 4,0) (Fig 4.18 y 4.19).

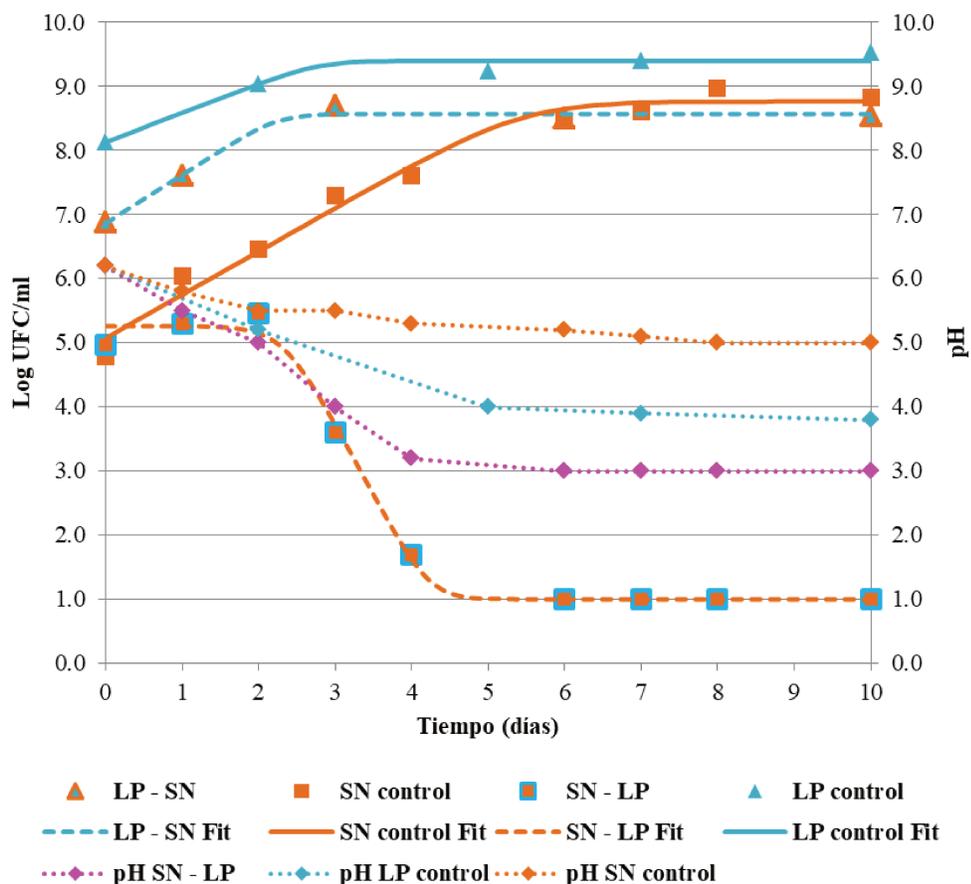


Figura 4.18 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *S. Newport* ITA S12 en cultivo control (SN) y en cocultivo con *L. plantarum* 998 (SN - LP) y de *L. plantarum* 998 en cultivo control (LP) y en cocultivo (LP - SN) a 15°C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

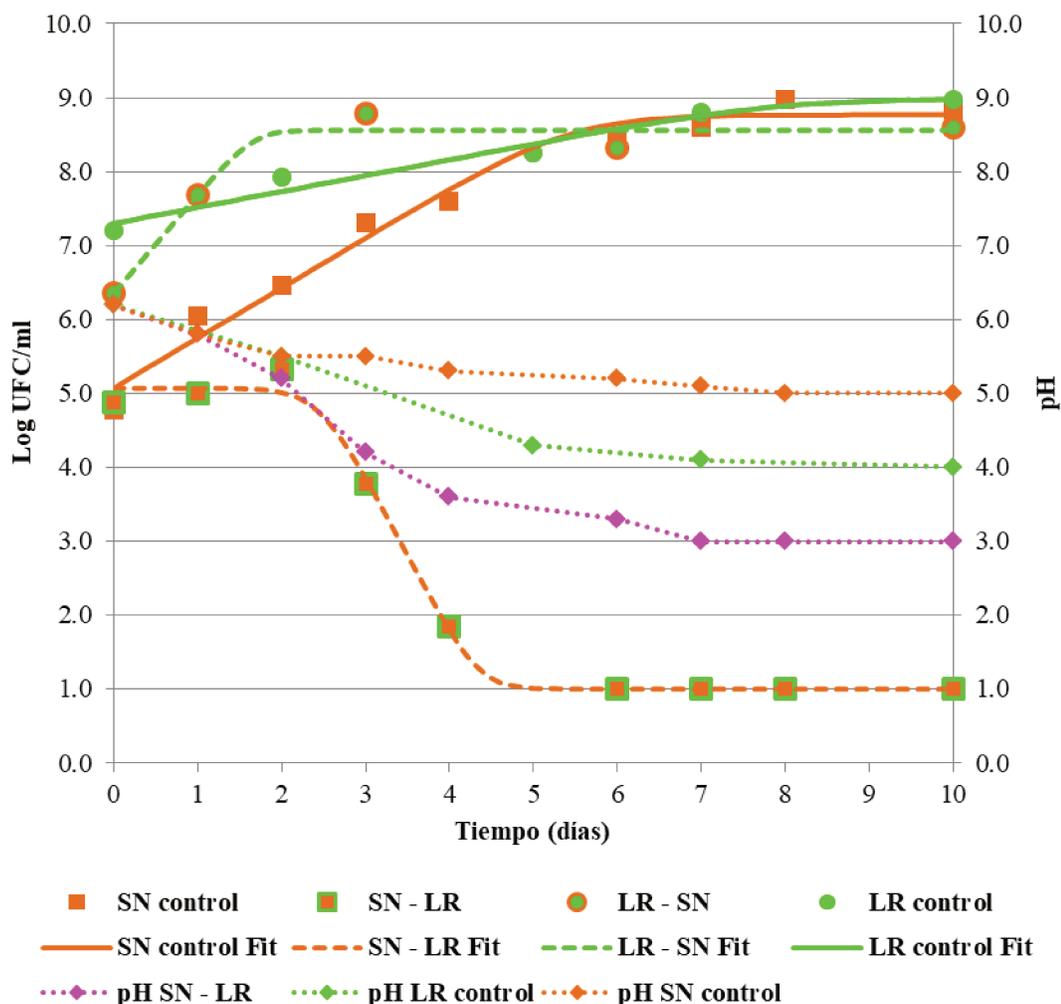


Figura 4.19 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *S. Newport* ITA S12 en cultivo puro (SN) y en cocultivo con *L. rhamnosus* 64 (SN – LR) y de *L. rhamnosus* 64 en cultivo puro (LR) y en cocultivo (LR – SN) a 15°C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

-L. monocytogenes ATCC 15313

El cultivo control de LM desarrolló un modelo de crecimiento completo con una fase lag reducida al tercio y una tasa de crecimiento duplicada con respecto a 10°C (Tabla 4.6). En el cocultivo LM-LP, una cinética de lento crecimiento de LM a 10°C ($\mu = 0,296 \log \text{UFC. ml}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) dio lugar a una de inactivación a 15°C ($\mu = -2,441 \log \text{UFC. ml}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) y tras una fase lag de 6 días, LM

dejó de detectarse al día 9 (Fig. 4.20 y 4.14, Tabla 4.6). En cocultivo con LR, los datos experimentales de LM se ajustaron al mismo modelo (*completo*) y con parámetros cinéticos similares al cocultivo con LP; dejando de detectarse un día después (día 10). LP en cocultivo con LM se mantuvo 7 horas en fase de latencia y luego creció a una tasa de crecimiento ligeramente mayor a la de su control y similar a la desarrollada en el cocultivo a 10°C después de 7 días (Fig. 4.20 y Tabla 4.6). Por su parte, LR en cocultivo duplicó la velocidad de crecimiento de su control y desarrolló una fase lag más extensa que la del cocultivo a 10°C (Fig. 4.21 y Tabla 4.6). Como con EC y SN, en ambos cocultivos se observó la entrada a fase estacionaria por parte de los lactobacilos (entre día 5 y día 7) en coincidencia con el inicio de la inactivación de LM (Fig 4.20 y 4.21). Las curvas de pH muestran un descenso gradual del pH del cultivo control de la bacteria indicadora y descensos más acelerados y de mayor magnitud para los cocultivos y controles de lactobacilos (Fig 4.20 y 4.21). En ambos cocultivos se llegó a registrar pH 3,0 al final del ensayo en coincidencia con la no detección de LM, de forma análoga a los cocultivos con EC y SN. La diferencia radicó en que las curvas de los cocultivos se mantuvieron muy cercanas a las de los controles de los lactobacilos durante la mayor parte del almacenamiento a 15°C.

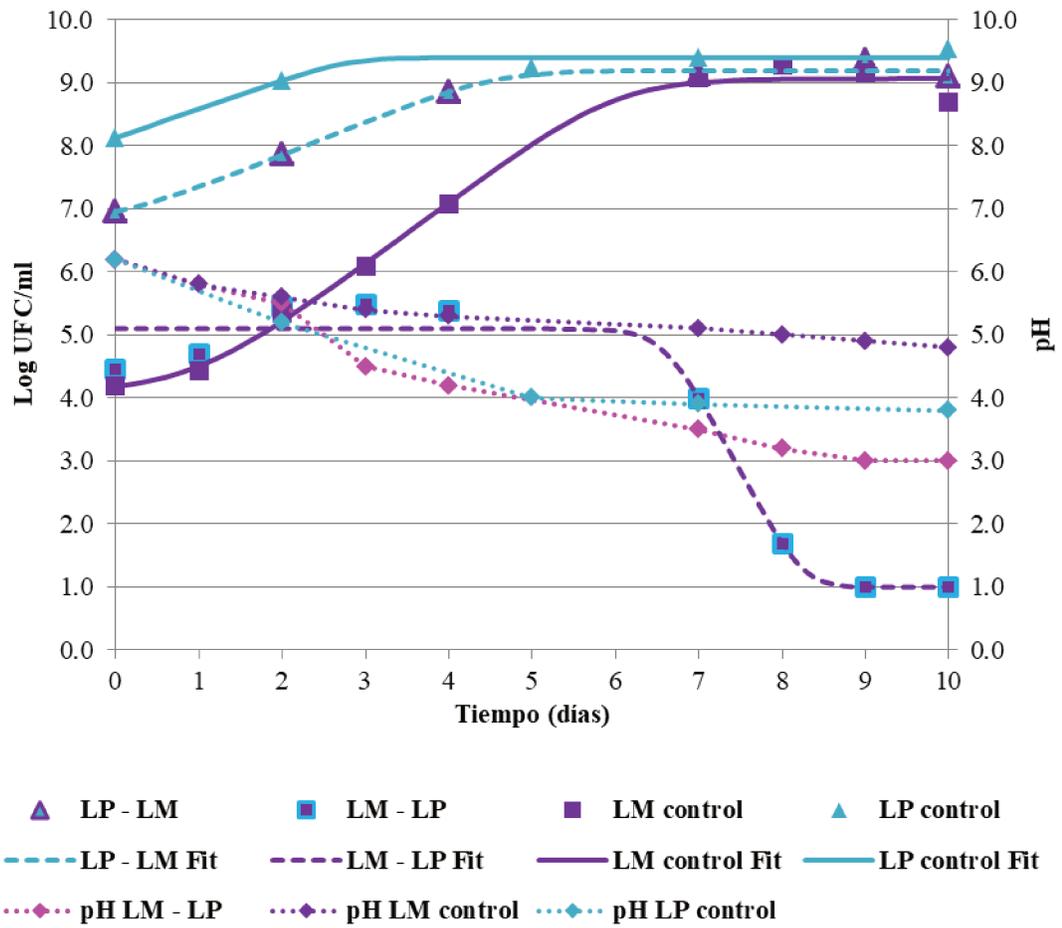


Figura 4.20 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *L. monocytogenes* ATCC 15313 en cultivo control (LM) y en cocultivo con *L. plantarum* 998 (LM – LP) y de *L. plantarum* 998 en cultivo control (LP) y en cocultivo (LP – LM) a 15°C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

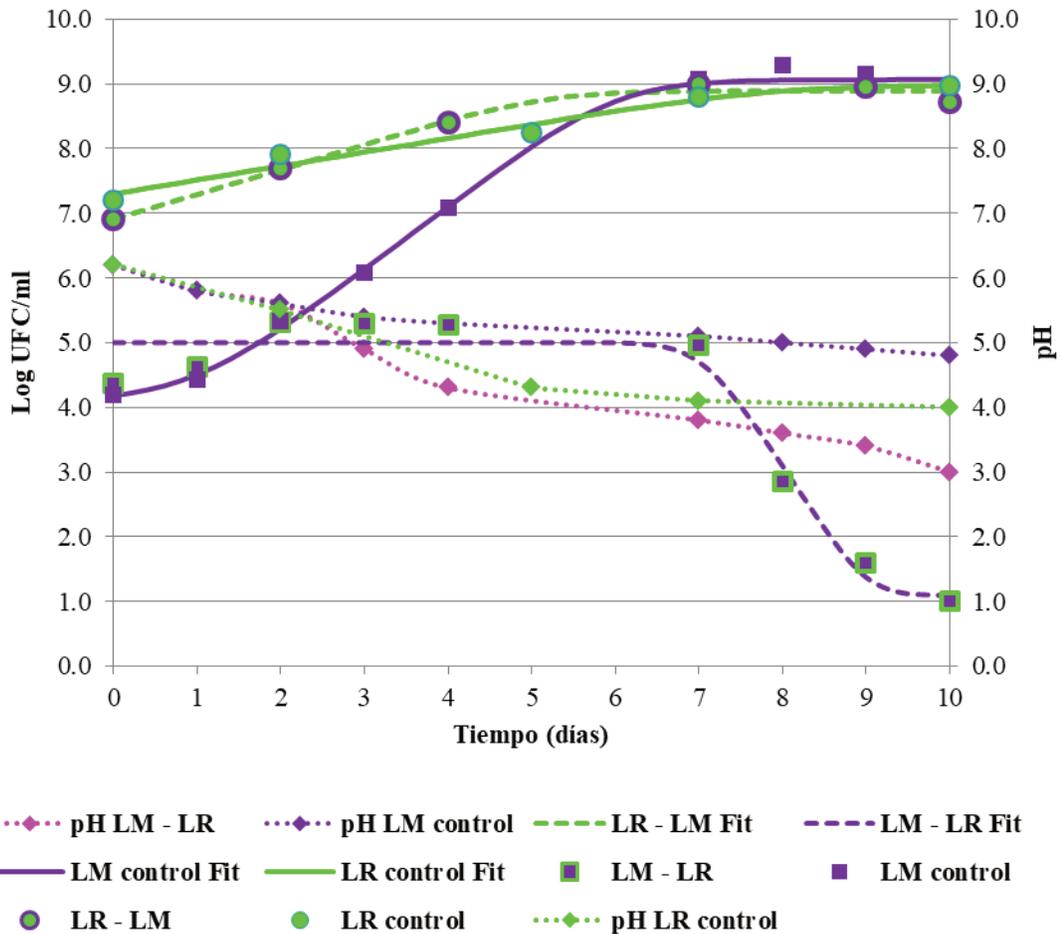


Figura 4.21 Evolución de los recuentos experimentales (símbolos) y predichos (Fit, líneas) de *L. monocytogenes* ATCC 15313 en cultivo puro (LM) y en cocultivo con *L. rhamnosus* 64 (LM – LR) y de *L. rhamnosus* 64 en cultivo puro (LR) y en cocultivo (LR – LM) a 15°C. Curva de pH del cocultivo y de los cultivos controles respectivos. El término Fit se refiere a la curva generada por el modelo.

Conclusiones parciales de las interacciones a 15°C

Con respecto a 10°C, todas las bacterias indicadoras aceleraron su crecimiento en sus cultivos controles y su inactivación en los cocultivos. Frente a LP, dejaron de detectarse más temprano que en cocultivo con LR.

Al igual que a 10°C, tanto LP como LR en todos sus cocultivos presentaron tasas de crecimiento superiores a las de sus controles. El final de la fase de crecimiento e inicio de la fase estacionaria de los lactobacilos coincidió con el inicio de la inactivación de las bacterias indicadoras

y con la meseta de pH de los cocultivos cuando las bacterias indicadoras dejaron de detectarse (Fig. 4.16 a 4.19).

A lo largo del almacenamiento, el pH de los cocultivos transcurrió por valores más bajos que los de los controles de lactobacilos y controles de bacterias indicadoras. La brecha entre los pH de los cocultivos y los de los controles de lactobacilos resultó mayor en el caso de LR ya que su cultivo control alcanzó un pH final (4,0) superior al pH final del cultivo control de LP (3,8) y a su vez estos valores, resultaron mayores que los sus cocultivos (EC-LP: 3,0; SN-LP: 3,0; LM-LP: 3,0 y EC-LR: 3,0; SN-LR: 3,0; LM-LP: 3,0) (Fig. 4.16 a 4.21).

4.2.6 Análisis conjunto de las pruebas de antagonismo y cinéticas de interacción de las bacterias indicadoras frente a los lactobacilos

Los resultados de las pruebas de antagonismo, de doble capa y difusión en agar mostraron que tanto LP como LR pueden inhibir el crecimiento de las bacterias indicadoras. En el primer ensayo no hubo diferencias significativas entre bacterias indicadoras y entre lactobacilos. En el de difusión en agar, EC y SN mostraron inhibición total con ambos lactobacilos mientras que para LM, la inhibición resultó parcial.

A través del estudio de las cinéticas de interacción entre lactobacilos y bacterias indicadoras en cocultivos, pudo concluirse que a 5°C no se evidenció actividad antagonista de los lactobacilos debido a que la baja temperatura de almacenamiento tuvo un efecto inhibitorio predominante sobre el crecimiento de todas las bacterias tanto en monocultivos como en cocultivos. La excepción fue el caso de LM, cuyo control experimentó crecimiento pero que en cocultivo con LP y con LR fue restringido.

A 10° C, en los cocultivos con LP, la inactivación de las bacterias indicadoras llegó a la no detección en los casos de SN y EC mientras que con LR ambas bacterias indicadoras se acercaron al límite de detección al final del almacenamiento. Frente a LM, ambos lactobacilos impidieron su crecimiento mientras que su control creció durante todo el almacenamiento.

A 15°C, la acción inhibitoria de los lactobacilos sobre SN y EC se intensificó con respecto a 10°C, mediante fases de latencia más cortas y fases de inactivación más aceleradas, principalmente en los cocultivos donde estaba presente LP. A esta temperatura ambos lactobacilos ejercieron sobre LM una acción antagónica similar a la ejercida frente a las otras bacterias indicadoras, llegando a niveles no detectables de la bacteria indicadora en los dos cocultivos.

Por lo expuesto, se decidió utilizar a *S. Newport* ITA S12 (SN) como bacteria indicadora en los ensayos a realizarse en manzanas frescas cortadas. Aunque sin grandes diferencias con EC, demostró ser la cepa indicadora más sensible en las pruebas realizadas, sin embargo, su condición de patógena la hacen de mayor interés para el ensayo. A su vez se eligió a *L. plantarum* 998 (LP) porque si bien no hubo diferencias con LR en las pruebas de antagonismo; se observó una inactivación más temprana de las bacterias indicadoras en cocultivo a 10 y a 15°C, especialmente de SN. La elección de LP se fundamentó también en la evaluación de los ensayos para determinar las variables operativas del ensayo con manzanas frescas cortadas, cuyos resultados se presentan a continuación.

4.3 DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES OPERATIVAS PARA LA INCORPORACIÓN DE LOS LACTOBACILOS EN MANZANAS FRESCAS CORTADAS.

4.3.1 Determinación de la concentración inicial de lactobacilos

En el procesamiento de manzanas frescas cortadas se hace imprescindible la aplicación de una solución antioxidante que evite el desarrollo de pardeamiento enzimático durante su almacenamiento. En consecuencia, los lactobacilos probióticos que se deseen incluir en manzanas frescas cortadas deberían sobrevivir tanto a la aplicación de soluciones antioxidantes como a las temperaturas de almacenamiento, manteniendo sus niveles dentro de las concentraciones recomendadas durante toda la vida útil del alimento. En base a estas premisas, se optó por vehiculizar a los lactobacilos en la solución antioxidante empleada para las manzanas y evaluar su estabilidad en dicha solución.

Para seleccionar la cepa de lactobacilo y su concentración inicial o inóculo, a utilizarse en los ensayos con manzanas frescas cortadas, se aplicó un diseño de Box Behnken (Tabla 3.2) cuyas variables fueron la concentración de la solución antioxidante y el inóculo inicial de lactobacilo. Como respuesta se utilizó la concentración relativa del lactobacilo o “delta”, calculada como el log de la relación entre la concentración de lactobacilo al tiempo de contacto t (30 o 60 min) y su concentración inicial o inóculo. Mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) se ajustaron los datos experimentales a las ecuaciones polinomiales de 2° orden y se obtuvieron las gráficas de las superficies de respuesta para 30 y 60 min de contacto.

Los datos experimentales de LP provenientes de la aplicación del diseño experimental se exponen en la Tabla 4.7. Para 30 min de contacto con la solución antioxidante en donde se vehiculizó LP, los resultados se ajustaron al modelo expresado por la Ecuación 1. Manteniendo constante la concentración de ác. ascórbico en 0,5 % p/v, dicha ecuación dio origen a la gráfica de

superficie de respuesta que se observa en la Figura 4.22.a. Esta gráfica indica que los valores de $\log N_{30}/N_0$ tienden a cero, es decir las pérdidas de viabilidad de LP se minimizan, cuando menor es la concentración de ácido cítrico y mayor el inóculo inicial.

Tabla 4.7 Recuentos de *L. plantarum* 998 (N_0 , N_{30} y N_{60}) y su variación relativa ($\log N_{30}/N_0$, $\log N_{60}/N_0$) para los diferentes tiempos de contacto (0, 30 y 60 min) con las distintas combinaciones de soluciones de ácido cítrico (C_{AC}) y de ácido ascórbico (C_{AA}).

Variables independientes			Log N_0 (Log UFC/ml)	Log N_{30} (Log UFC/ml)	Log N_{60} (Log UFC/ml)	Log N_{30}/N_0	Log N_{60}/N_0
C_{AA} (% p/v)	C_{AC} (% p/v)	C_{in} (Log UFC/ml)					
0,5	0	9	9,47	9,48	9,41	0,01	-0,06
0	0	8	8,37	8,24	8,52	-0,12	0,15
0,5	0,5	8	8,54	8,18	8,04	-0,37	-0,50
0,5	0,5	8	8,43	8,16	7,90	-0,27	-0,53
0	0,5	7	7,76	6,85	6,22	-0,90	-1,53
1	1	8	8,09	7,50	7,06	-0,59	-1,03
0,5	0,5	8	8,60	8,39	8,16	-0,20	-0,44
0,5	1	7	6,83	6,20	5,70	-0,63	-1,13
0	0,5	9	9,48	9,48	9,20	0,00	-0,27
0,5	1	9	9,51	9,20	9,29	-0,31	-0,23
1	0,5	7	7,18	5,48	5,60	-1,71	-1,58
1	0,5	9	9,51	9,29	9,30	-0,22	-0,21
0,5	0	7	7,20	6,90	6,83	-0,29	-0,36
1	0	8	8,57	8,36	8,51	-0,21	-0,07
0	1	8	8,60	7,86	7,58	-0,74	-1,02

Ecuación 1

$$\text{Log } N_{30}/N_0 = -1,76 - 2,285 C_{AA} - 1,095 C_{AC} + 0,3875 C_{in} - 0,685 (C_{AA})^2 + 0,21 C_{AA} C_{AC} + 0,325 C_{AA} C_{in} + 0,115 (C_{AC})^2 + 0,055 C_{AC} C_{in} - 0,02125 (C_{in})^2$$

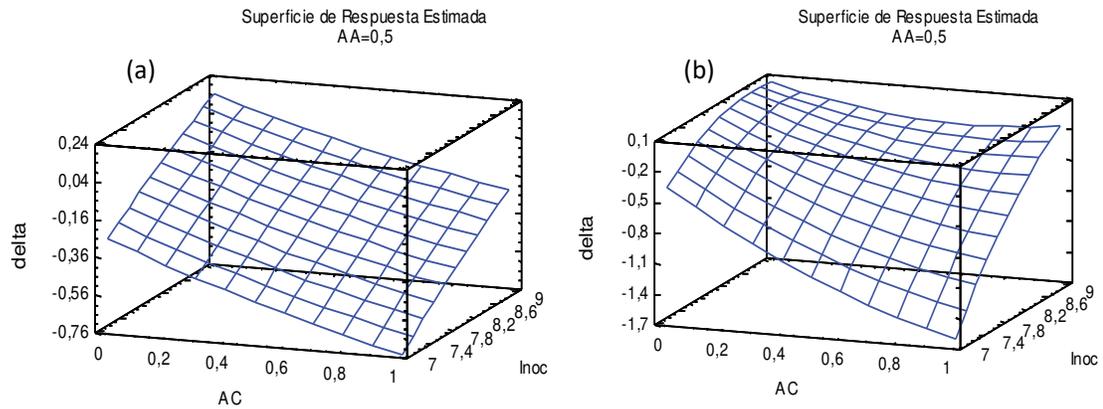


Figura 4.22 Gráfica de superficie de respuesta estimada para (a) 30 min de contacto y (b) 60 min de contacto, de la variación de la concentración de *L. plantarum* 998 en función de C_{AC} y C_{in} manteniendo $C_{AA}= 0,5\%$ p/v ($\text{delta} = \log N / N_0$).

A los 30 min de contacto, sólo la concentración inicial (C_{in}) influyó significativamente ($p < 0,05$, Tabla 4.8) sobre la estabilidad de LP en la solución antioxidante, en particular para la menor concentración de inóculo ensayada, 7 log UFC/ml. Para 8 o 9 log UFC/ml, el nivel de células viables se mantuvo prácticamente sin cambios durante ese lapso (Tabla 4.8, Fig. 4.22.a). En la gráfica de Efectos Principales (Fig. 4.23.a) puede notarse que a medida que la concentración inicial de lactobacilos aumenta, la variación relativa se acerca a cero. También lo hace cuando la concentración de ácido cítrico disminuye y de manera similar ocurre con la concentración de ácido ascórbico, excepto a baja concentración.

Tabla 4.8 Análisis de varianza de los modelos obtenidos para la variación relativa de la concentración de *L. plantarum* 998 en función de C_{AA} , C_{AC} y C_{in} , para cada tiempo de exposición.

Fuente de variación	G.L.	Suma de Cuadrados	
		30 min	60 min
A: C_{AA}	1	0,14045	0,0028125
B: C_{AC}	1	0,37845	1,0658**
C: C_{in}	1	0,45125*	1,75781***
AA	1	0,108283	0,0762981
AB	1	0,011025	0,01
AC	1	0,105625	0,099225
BB	1	0,00305192	0,0710827
BC	1	0,003025	0,2704*
CC	1	0,00166731	0,105144
Error total	5	0,3092	0,172325
Coef. Determinación (R^2)		79,6%	95,3%

G.L.: grados de libertad; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

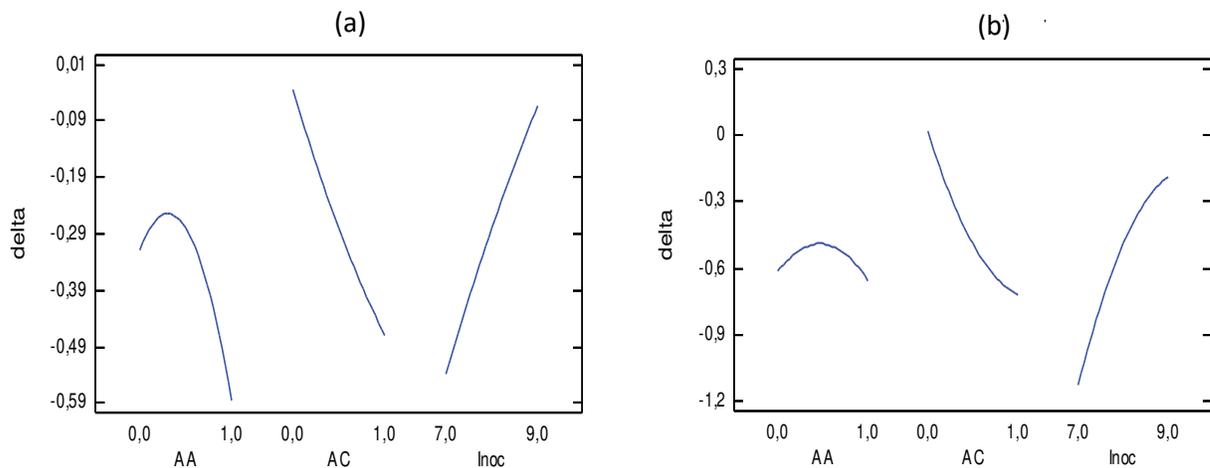


Figura 4.23 Gráfica de Efectos Principales (C_{AA} , C_{AC} y C_{in}) para la variación de la concentración de *L. plantarum* 998 para (a) 30 min de contacto y (b) 60 min de contacto. ($\delta = \log N / N_0$)

Para los 60 min de contacto de LP con las soluciones antioxidantes propuestas en el diseño experimental, la Ecuación 2 del modelo ajustó los datos obtenidos y originó la superficie de respuesta estimada que se muestra en la Fig. 4.22.b. Allí se observa que la variación relativa de la concentración del lactobacilo tiende a cero cuando la concentración de ácido cítrico también lo hace y el inóculo inicial se encuentra alrededor de 9 log UFC/ml. Al duplicarse el tiempo de contacto, se duplica el tiempo en que la bacteria está expuesta a los ácidos de la solución antioxidante. De hecho, al aplicar ANOVA, el efecto del ácido cítrico se hace significativo para 60 min ($p < 0,05$, Tabla 4.8) mientras que no lo fue para 30 min. Dicha comparación se hace más evidente si se analiza el Diagrama de Pareto correspondiente a ambos tiempos (Fig. 4.24.a y 4.24.b).

Ecuación 2

$$\text{Log } N_{60}/N_0 = -11,2712 - 2,0825 * C_{AA} - 5,545 * C_{AC} + 2,75125 * C_{in} - 0,575 * (C_{AA})^2 + 0,2 * C_{AA} * C_{AC} + 0,315 * C_{AA} * C_{in} + 0,555 * (C_{AC})^2 + 0,52 * C_{AC} * C_{in} - 0,16875 * (C_{in})^2$$

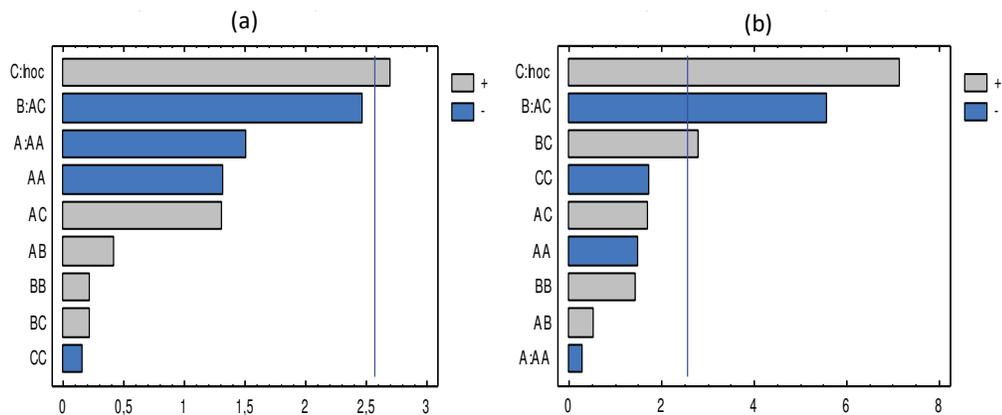


Figura 4.24 Diagrama de Pareto estandarizado para la variación de la concentración de *L. plantarum* 998 para (a) 30 min de contacto y (b) 60 min de contacto (delta = log N / N₀).

Para los 60 min de contacto, también se determinó que la concentración inicial influyó significativamente sobre la variación relativa de los recuentos de LP ($p < 0,001$, Tabla 4.8). Este efecto significativo sobre la viabilidad de la bacteria se observó principalmente para la menor concentración inicial del lactobacilo ($7 \log$ UFC/ml) y en menor grado para las demás concentraciones. También se determinó un efecto significativo de la interacción entre dicha variable y la concentración de ácido cítrico ($p < 0,05$, Tabla 4.8, Fig. 4.22.b). El efecto significativo de esta interacción indica que, a bajas concentraciones de ácido cítrico, la concentración inicial del inóculo no afecta la viabilidad de LP luego de 60 min de contacto. Sin embargo, cuando se incrementa la concentración de ácido cítrico, a mayores C_{in} se producen menores reducciones en LP. En cuanto a la concentración de ácido ascórbico, esta no afectó significativamente la viabilidad de LP para ambos tiempos de contacto (Fig. 4.22.a y 4.22.b, Tabla 4.8).

Los resultados de la aplicación del diseño experimental para LR se presentan en la Tabla 4.9. La viabilidad de LR se vio afectada significativamente sólo por la concentración del inóculo inicial tanto a los 30 min ($p < 0,01$) como a los 60 min ($p < 0,001$) de exposición a las soluciones ácidas propuestas por el diseño experimental (Tabla 4.10).

Tabla 4.9 Recuentos de *L. rhamnosus* 64 (N_0 , N_{30} y N_{60}) y su variación relativa ($\log N_{30}/N_0$, $\log N_{60}/N_0$) para los diferentes tiempos de contacto (0, 30 y 60 min) con las distintas combinaciones de soluciones de ácido cítrico (C_{AC}) y de ácido ascórbico (C_{AA}).

Variables independientes			Log N_0 (Log UFC/ml)	Log N_{30} (Log UFC/ml)	Log N_{60} (Log UFC/ml)	Log N_{30}/N_0	Log N_{60}/N_0
C_{AA} (% p/v)	C_{AC} (% p/v)	C_{in} (Log UFC/ml)					
0,5	0	9	9,59	8,91	9,24	-0,68	-0,36
0	0	8	8,23	8,06	7,97	-0,17	-0,26
0,5	0,5	8	8,59	8,42	7,85	-0,17	-0,75
0,5	0,5	8	8,34	8,10	8,10	-0,24	-0,25
0	0,5	7	7,23	6,60	6,11	-0,63	-1,12
1	1	8	7,79	7,35	7,11	-0,43	-0,68
0,5	0,5	8	8,51	8,00	7,83	-0,51	-0,68
0,5	1	7	6,64	6,06	5,26	-0,59	-1,39
0	0,5	9	9,04	8,97	9,07	-0,07	0,03
0,5	1	9	9,48	9,08	9,09	-0,39	-0,38
1	0,5	7	6,46	5,85	5,40	-0,62	-1,06
1	0,5	9	7,97	7,46	7,25	-0,51	-0,72
0,5	0	7	6,66	6,02	4,85	-0,65	-1,82
1	0	8	8,40	8,36	8,43	-0,04	0,03
0	1	8	8,61	8,26	8,10	-0,36	-0,52

Las ecuaciones 3 y 4 ajustaron los datos experimentales obtenidos a los 30 y 60 min de contacto con las soluciones ácidas. Las superficies de respuesta obtenidas a partir de estas ecuaciones (Fig. 4.25) muestran que la variación relativa de la concentración del lactobacilo disminuye con la C_{in} en forma similar para los dos tiempos de contacto.

Tabla 4.10 Análisis de varianza de los modelos obtenidos para la variación relativa de la concentración de *L. rhamnosus* 64 en función de C_{AA} , C_{AC} y C_{in} , para cada tiempo de exposición.

Fuente de variación	G.L.	Suma de Cuadrados	
		30 min	60 min
A: C_{AA}	1	0,00845	0,0018
B: C_{AC}	1	0,0435125	0,0861125
C: C_{in}	1	0,446513**	2,72611***
AA	1	0,0345026	0,233856
AB	1	0,009025	0,050625
AC	1	0,003025	0,001225
BB	1	0,0000025641	0,00215641
BC	1	0,0049	0,01
CC	1	0,0115103	0,141603
Error total	5	0,0995917	0,200242
Coef. Determinación (R^2)		85,0%	94,2%

G.L.: grados de libertad; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Ecuación 3

$$\text{Log } N_{30}/N_0 = -6,21708 + 0,213333AA + 0,510833AC + 1,19208\text{Inoc} + 0,386667AA^2 - 0,19 AA AC - 0,055AA \text{Inoc} - 0,00333333AC^2 - 0,07 AC \text{Inoc} - 0,0558333\text{Inoc}^2$$

Ecuación 4

$$\text{Log } N_{60}/N_0 = -18,1246 - 0,531667 AA + 0,720833 AC + 3,78458 \text{Inoc} + 1,00667 AA^2 - 0,45 AA AC - 0,035AA \text{Inoc} + 0,0966667AC^2 - 0,1 AC \text{Inoc} - 0,195833 \text{Inoc}^2$$

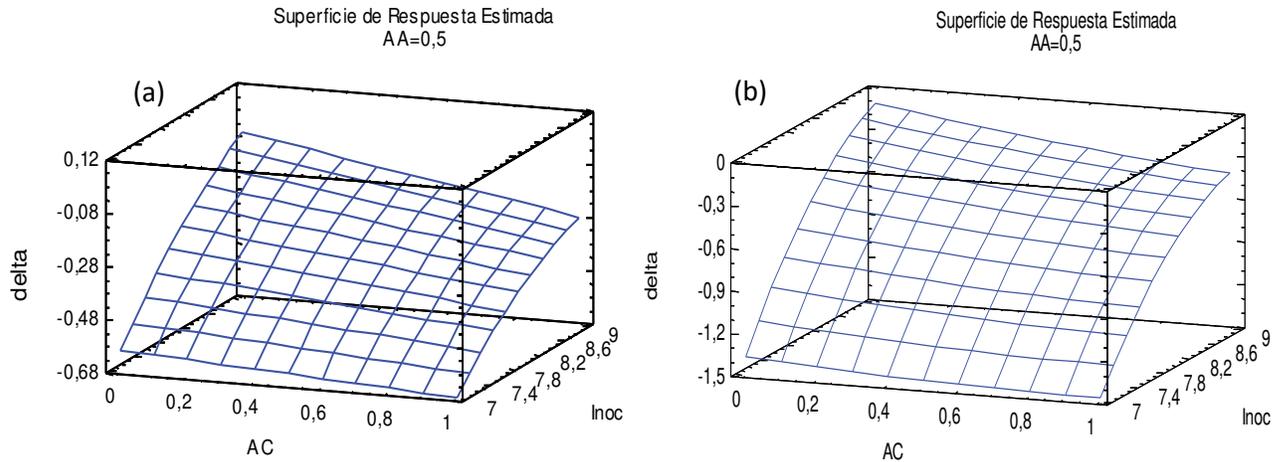


Figura 4.25 Gráfica de superficie de respuesta estimada para (a) 30 min de contacto y (b) 60 min de contacto, de la variación de la concentración de *L. rhamnosus* 64 en función de C_{AC} y C_{in} manteniendo $C_{AA}=0,5\%$ p/v. ($\delta = \log N / N_0$).

A los 30 min, la utilización del inóculo inicial de 7 log UFC/ml resultó en una mayor variabilidad relativa para el lactobacilo frente los de concentración 8 y 9 log UFC/ml, los cuales permitieron una variabilidad relativa cercana a cero y tuvieron un comportamiento similar entre sí. A los 60 min la variabilidad relativa aumentó para las concentraciones iniciales de 7 y 8 log UFC/ml aunque no sucedió así para valores cercanos a log 9 UFC/ml.

Tanto en la Gráfica de Efectos Principales (Fig. 4.26) como en el Diagrama de Pareto estandarizado (Fig. 4.27), se puede discriminar la escasa influencia ejercida por los ácidos y la ausencia de interacciones significativas.

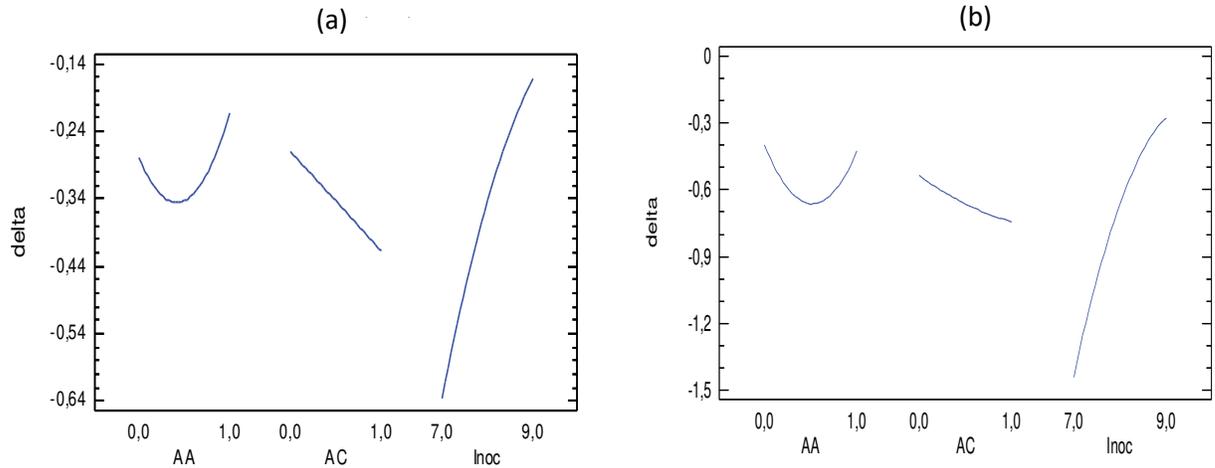


Figura 4.26 Gráfica de Efectos Principales (C_{AA} , C_{AC} y C_{in}) para la variación de la concentración de *L. rhamnosus* 64 para (a) 30 min de contacto y (b) 60 min de contacto. ($\delta = \log N/N_0$)

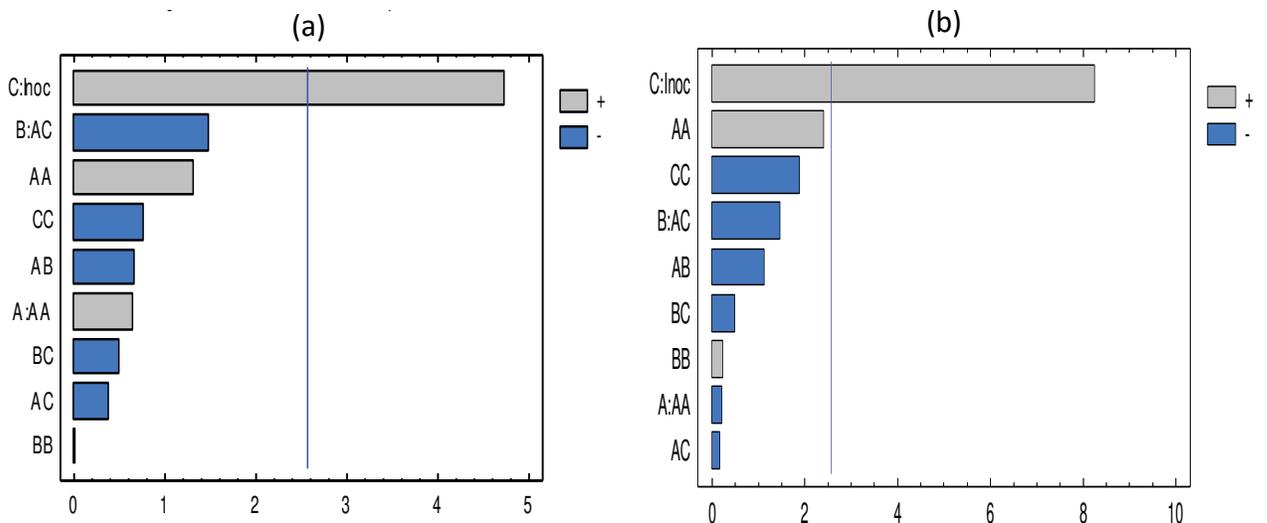


Figura 4.27 Diagrama de Pareto estandarizado para la variación de la concentración de *L. rhamnosus* 64 para (a) 30 min de contacto y (b) 60 min de contacto. ($\delta = \log N/N_0$).

De acuerdo al análisis de los resultados de cada uno de los diseños experimentales aplicados a distintos tiempos de exposición para ambos lactobacilos se puede concluir que la viabilidad de ambas bacterias sólo fue afectada por la concentración inicial del inóculo, considerando el menor tiempo operativo ensayado. En ese sentido, a 30 min, LP estuvo influenciado por la concentración inicial del inóculo con menor significancia ($p < 0,05$) que LR ($p < 0,001$). Además, LP tuvo un mejor

desempeño en las pruebas de antagonismo y en la interacción en cocultivo junto a las bacterias indicadoras ensayadas (ver 4.1 y 4.2 en esta misma sección). Es decir, la supervivencia de LP en las soluciones ácidas normalmente utilizadas en frutas frescas cortadas sumada a la probada actividad antagonista desarrollada *in vitro* hicieron que se seleccionara a *L. plantarum* 998 (LP) para la realización de los ensayos con manzanas frescas cortadas con una concentración inicial de 8 log UFC/ml.

La concentración elegida para los ácidos ascórbico y cítrico que integraron la solución antioxidante aplicada en manzanas frescas cortadas fue de 1% p/v. Para la elección se tuvo en cuenta que para 30 min de exposición, ninguno de los ácidos utilizados tuvo influencia significativa sobre la viabilidad de los dos lactobacilos (a cualquiera de las concentraciones ensayadas). El uso de estas concentraciones permite cumplir con los requerimientos para evitar el pardeamiento enzimático de las manzanas frescas cortadas (Rodríguez Arzuaga y Piagentini, 2018).

4.3.2 Determinación del tiempo de inmersión y la relación volumen solución / peso fruta

Los resultados provenientes de la aplicación del diseño de Box Behnken propuesto en la Tabla 3.4 se exponen en la Tabla 4.11. Los datos experimentales se ajustaron las ecuaciones polinomiales de 2° orden, mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) se determinó la significancia de cada variable, y se aplicó la metodología de Optimización de Respuestas Múltiples para obtener el valor de cada variable independiente que maximiza los recuentos de LP (Derringer y Suich, 1980)

Tabla 4.11 pH, sólidos solubles y concentración *L. plantarum* 998 obtenidos para manzanas frescas cortadas cada tiempo de inmersión (t_{imm}) y relación volumen de solución / peso de fruta (R).

Variables independientes			Respuestas		
Corrida	t_{imm} (min)	R (L/kg)	Ph	Sólidos Solubles (°Brix)	Concentración <i>L. plantarum</i> 998 (Log UFC/g)
1	6	6,5	2,9	13,3	6,81
2	2	10	2,8	11,1	7,00
3	6	3	3,0	13,2	6,54
4	10	6,5	2,9	11,1	7,04
5	10	3	3,0	14,1	6,88
6	2	3	2,9	12,9	6,62
7	10	10	2,9	14,1	6,41
8	2	6,5	2,9	13,4	6,80
9	6	6,5	2,8	12,5	7,00
10	6	6,5	2,8	13,6	6,96
11	6	10	2,9	13,4	6,34

Las variables operativas estudiadas no influyeron significativamente ($p > 0,05$; Tabla 4.12) sobre el pH, los sólidos solubles y la concentración de LP en las manzanas frescas cortadas. Sólo se observó un efecto significativo ($p < 0,05$) del término cuadrático de R sobre la concentración de LP (Tabla 4.12).

Tabla 4.12 Análisis de varianza de los modelos obtenidos para pH, sólidos solubles y concentración de *L. plantarum* 998 en manzanas frescas cortadas función tiempo del inmersión (t_{imm}) y la relación (R).

Fuente de variación	G.L.	Suma de Cuadrados		
		pH	Sólidos Solubles	Concentración <i>L. plantarum</i> 998
A: T_{imm}	1	0,00666667	0,24	0,00135
B: V/p	1	0,015	0,00666667	0,00106667
AA	1	0,0000701754	0,460421	0,09633
AB	1	0,0	1,3225	0,105625
BB	1	0,00773684	0,189754	0,259413*
Error Total	5	0,0185965	3,40241	0,157708
Coef. Determinación (R^2)		62,1%	38,2%	71,7%

G.L.: grados de libertad; * $p < 0,05$

Al optimizar la respuesta del modelo planteado con el objetivo de maximizar el recuento del lactobacilo, con un valor óptimo de 7 log UFC/g, se obtuvo un valor de R de 7,3. Como ya se ha mencionado, los sólidos solubles y el pH de la fruta no se ven influenciados por las variables del modelo. Por lo tanto, con base en el análisis realizado, se seleccionaron $R = 10$ L/kg y $t = 10$ min para el ensayo con manzanas frescas cortadas. Esto permitiría asegurar como mínimo una concentración en la fruta superior a 7 log UFC/ml ya que concentraciones de microorganismos probióticos entre 10^6 - 10^8 UFC/g son requeridas para que se produzcan efectos benéficos sobre la salud humana (Vinderola y col., 2000; Champagne y col., 2011).

4.4 DETERMINACIÓN DE LOS ATRIBUTOS DE CALIDAD DE MANZANAS FRESCAS CORTADAS

La vida útil de los productos frescos cortados es inferior a la de los vegetales intactos de los que provienen debido a que durante las operaciones de pelado y cortado, se rompen muchas células y se liberan productos intracelulares. Esto incrementa el deterioro microbiológico e induce cambios fisiológicos y bioquímicos que generan degradación del color, la textura y el sabor (Laurila y Ahvenainen 2002, Rodríguez Arzuaga y col. 2016, Yousuf y col. 2020).

Mediante la metodología descrita en el punto 3.5, manzanas frescas cortadas en cubos fueron impregnadas con *L. plantarum* 998, envasadas y almacenadas a 5 y a 15° C durante siete días. Sus atributos de calidad fueron determinados mediante las técnicas detalladas en el inciso 3.6.

Tabla 4.13 pH, sólidos solubles (SS), firmeza (F), concentración de fenoles totales (CFT), concentración de vitamina C (Vit C) y capacidad antioxidante (CAO) de manzanas frescas cortadas durante su almacenamiento a 5°C.

Parámetro	Tiempo (días)	Muestra					
		MP		C		LP	
pH	0	3,31 ± 0,01	aB	3,13 ± 0,03	aA	3,08 ± 0,02	aA
	2	3,72 ± 0,02	bB	3,35 ± 0,04	bA	3,27 ± 0,02	bA
	7	3,34 ± 0,01	aA	3,31 ± 0,03	bA	3,30 ± 0,02	bA
SS (°Brix)	0	10,83 ± 0,37	aC	8,78 ± 0,51	aB	6,88 ± 0,24	aA
	2	10,00 ± 0,48	aA	9,26 ± 0,54	aA	8,50 ± 0,31	bA
	7	11,27 ± 0,39	aB	8,69 ± 0,51	aA	7,48 ± 0,27	abA
F (N)	0	14,04 ± 1,02	aB	8,19 ± 0,57	aA	7,54 ± 0,80	aA
	2	13,60 ± 1,37	aA	12,23 ± 0,69	bA	12,04 ± 0,86	bA
	7	14,45 ± 1,06	aA	13,88 ± 0,54	bA	12,91 ± 0,70	bA
CFT (mgAGE/kg)	0	336,87 ± 6,63	bA	451,82 ± 36,39	aB	552,94 ± 3,00	bC
	7	273,83 ± 5,78	aA	365,88 ± 27,55	aAB	436,60 ± 30,59	aB
Vit C (mg AAT/kg)	0	14,92 ± 2,51	aA	637,35 ± 16,14	aB	689,39 ± 4,53	bC
	7	9,85 ± 0,45	aA	618,81 ± 27,15	aB	584,73 ± 29,50	aB
CAO (mg AA/kg)	0	588,34 ± 6,65	bA	1115,76 ± 110,88	aB	1546,04 ± 29,97	bC
	7	402,81 ± 5,82	aA	1096,47 ± 2,00	aB	1193,56 ± 10,01	aC

Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas en el tiempo de almacenamiento por el test de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre muestras por el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabla 4.14 pH, sólidos solubles (SS), firmeza (F), concentración de fenoles totales (CFT), concentración de vitamina C (Vit. C) y capacidad antioxidante (CAO) de manzanas frescas cortadas durante su almacenamiento a 15°C.

Parametro	Tiempo (d)	Muestra					
		MP		C		LP	
pH	0	3,31 ± 0,02	aB	3,13 ± 0,05	aA	3,08 ± 0,03	aA
	2	3,55 ± 0,02	B				
	7	3,38 ± 0,02	aB	3,25 ± 0,05	aB	3,03 ± 0,04	aA
SS (°Brix)	0	10,83 ± 0,43	bC	8,78 ± 0,31	bB	6,88 ± 0,22	aA
	2	11,83 ± 0,55	Ab				
	7	10,02 ± 0,45	aB	7,26 ± 0,33	aA	6,90 ± 0,28	aA
F (N)	0	14,04 ± 0,84	aB	8,19 ± 0,87	aA	7,54 ± 0,88	aA
	2	14,83 ± 1,14	A				
	7	15,03 ± 0,88	aA	13,27 ± 0,82	bA	12,83 ± 0,82	bA
CFT (mgAGE/kg)	0	336,87 ± 6,63	bA	451,82 ± 36,39	bB	552,94 ± 3,00	bC
	7	190,57 ± 6,74	aA	307,22 ± 15,42	aB	300,04 ± 53,58	aC
Vit C (mg AAT/kg)	0	14,92 ± 2,51	aA	637,35 ± 16,14	bB	689,39 ± 4,53	bC
	7	7,34 ± 0,00	aA	244,52 ± 2,69	aB	443,08 ± 29,85	aC
CAO (mg AA/kg)	0	588,34 ± 56,65	bA	1115,76 ± 110,88	bB	1546,04 ± 29,97	bC
	7	19,07 ± 2,58	aA	552,02 ± 3,33	aB	859,30 ± 9,67	aC

Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas en el tiempo de almacenamiento por el test de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre muestras por el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.4.1 Determinación de pH y sólidos solubles

En el día de la elaboración, día cero, los cubos de manzanas sin ningún tratamiento (MP) presentaron un pH (3,31) mayor que los de las muestras tratadas con la solución antioxidante (Tablas 4.13 y 4.14), como era de esperarse. Varios autores refieren pH similares a los de las muestras MP (entre 3,3 y 3,5) para manzanas frescas cortadas de la variedad 'Granny Smith' sin tratamiento (Rodríguez Arzuaga y col. 2013, Altisent y col. 2014, Comisso y col. 2021).

Al segundo día de almacenamiento a 5°C, el pH de todas las muestras aumentó ligeramente y luego de 7 días, mientras que en las muestras MP se redujo a su valor original, en las muestras C y LP no experimentó cambios significativos. Al finalizar el almacenamiento, no existieron diferencias

significativas en el pH entre las distintas muestras entre sí, que resultaron similares a los de la manzana recién procesada sin tratamiento (Fig 4.28 y Tabla 4.13).

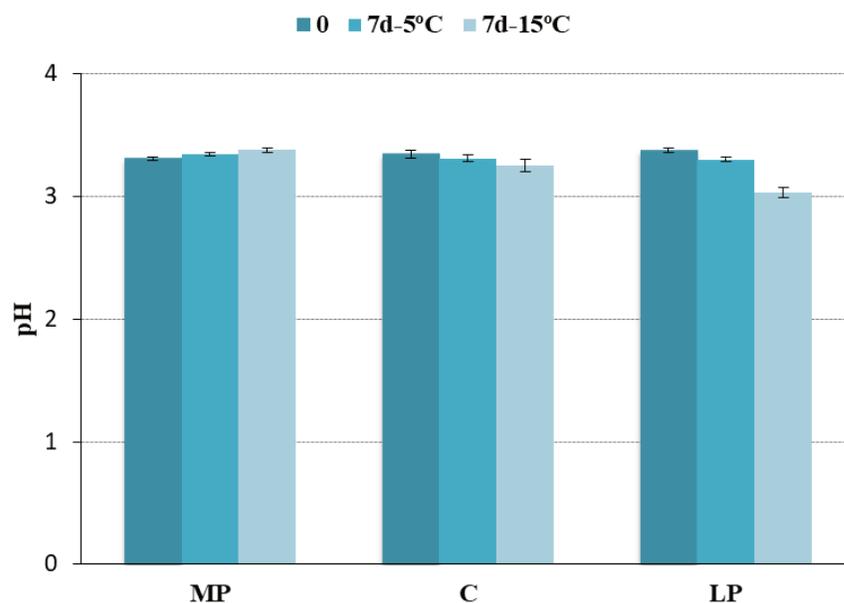


Figura 4.28 pH (promedio \pm SD) de muestras de manzanas MP, C y LP al día cero y luego de 7 días de almacenamiento a 5°C y 15°C.

Luego de 7 días a 15°C, los valores de pH de todas las muestras no presentaron diferencias significativas con los de inicio. Aún así estas variaciones no significativas (ascenso de 0,12 unidades en las muestras C, disminución de 0,05 en las muestras LP y ascenso de 0,07 en las muestras MP) hicieron que al día 7 las muestras MP y C tuvieran un pH significativamente mayor que el de las muestras LP a diferencia de lo ocurrido a 5°C (Fig. 4.28 y Tabla 4.14). En esto tuvo más peso el aumento de pH de las muestras MP y C; que la disminución del pH en las muestras LP. En manzanas 'Granny Smith' tratadas o no con *L. plantarum* TISTR050 (sin tratamiento antioxidante), el pH no experimentó variaciones significativas durante 7 días a 4°C ni durante 2 días a 20°C, partiendo de valores promedio (3,40) similares a los de esta tesis (Rossi 2016). Idéntica situación se halló en rodajas de manzanas 'Branderburg' conservadas durante 10 días entre 2 y 4°C, con y sin la

inclusión de *L. rhamnosus* GG y NatureSeal® como agente antipardecimiento, partiendo en este caso de valores de 3,77 y 3,76, respectivamente (Roble y col. 2010a).

Al inicio del ensayo, los Sólidos Solubles (SS) de todas las muestras de manzanas resultaron diferentes entre sí ($p < 0,05$). Los valores superiores correspondieron a las muestras MP, seguidos por los de las muestras C y luego los de las muestras LP (Fig 4.30 y Tablas 4.13 y 4.14). Esto puede deberse a la inmersión de los cubos de manzanas en la solución antioxidante ya que por diferencia de presión osmótica, las manzanas podrían perder azúcares y otros sólidos solubles al estar en contacto con la solución por 10 min. Aún así, los SS de los cubos de manzana no tratados promediaron un valor ($10,83^{\circ}\text{Brix}$) inferior a los determinados por otros autores para la misma variedad de manzana: 12°Brix , (Piagentini y Pirovani 2017), $12,5^{\circ}\text{Brix}$ (Comisso y col. 2021) y $13,6^{\circ}\text{Brix}$ (Altisent y col. 2014).

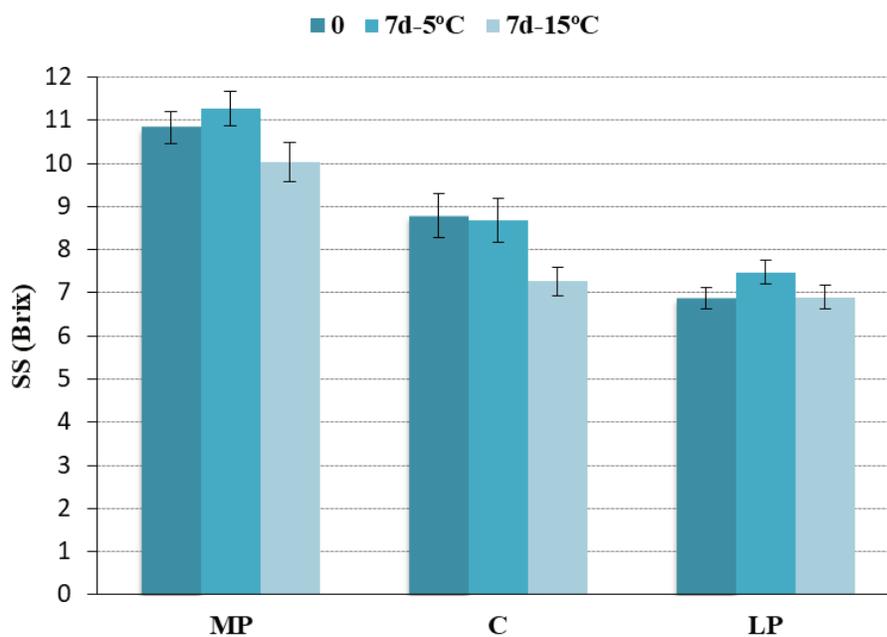


Figura 4.29 Sólidos solubles (promedio \pm SD) de muestras de manzanas MP, C y LP al día cero y luego de 7 días de almacenamiento a 5°C y 15°C .

Durante el almacenamiento refrigerado, los SS de las muestras MP y C se mantuvieron estables en función del tiempo mientras que los de las muestras LP experimentaron un ascenso el día 2 para descender nuevamente al día 7. Así, al final del ensayo, las muestras C y LP presentaron valores similares en torno a los 8 °Brix y las muestras MP continuaron presentando el mayor valor de SS (11,27°Brix) (Fig 4.30 y Tabla 4.13). En consecuencia, la presencia del lactobacilo no introdujo mayores diferencias sobre la materia prima que las propias del tratamiento con la solución antioxidante. En manzanas ‘Granny Smith’, Alegre y col. (2011) no hallaron diferencias en los SS debidas a la presencia de *L. rhamnosus* GG en rodajas conservadas a 5°C, llegando al día 14 con valores de 14,1°Brix respecto a la materia prima (13.9°Brix). Cabe aclarar que en este caso el lactobacilo fue incorporado en solución antioxidante con una menor relación p/v (1:2) y un tiempo de contacto de sólo 2 min. .

Durante el almacenamiento a 15°C, las muestras MP aumentaron sus SS al día 2 para luego alcanzar su valor más bajo el día 7. En el mismo día 7, con respecto al día 0, las muestras C redujeron sus SS mientras que las muestras LP los mantuvieron sin cambios. Así, al término del ensayo las muestras MP siguieron presentando mayores valores que las muestras C y LP, pero a diferencia del día 0, los valores de estas últimas no presentaron diferencias significativas entre sí.

4.4.2 Determinación de Propiedades Mecánicas

En el día de procesamiento, las muestras MP presentaron valores de firmeza (14,04 N) que casi duplicaron a los de las muestras C y LP, debido al efecto del tratamiento con la solución antioxidante. Luego, en el almacenamiento refrigerado, al segundo día las diferencias se anularon principalmente por aumento de los valores en las muestras C y LP y así se mantuvieron hasta el día 7 inclusive (Fig. 4.30, Tablas 4.13 y 4.14). Alegre y col. (2011) no observaron variaciones de los valores de firmeza en el tiempo y, al igual que en esta tesis, no determinaron diferencias

significativas entre el control sin tratamiento antioxidante (22,80 N) y manzanas frescas cortadas ‘Granny Smith’ enriquecidas con *L. rhamnosus* GG (20,53 N) al día 7 de conservación a 5°C.

A 15°C, la firmeza de las manzanas sin ningún tratamiento fue aumentando desde el inicio al igual que la de las muestras C y LP, para culminar el día 7 sin que se encuentren diferencias significativas entre las distintas muestras, que promediaron un valor de 13.71 N (Fig 4.31 y Tabla 4.14).

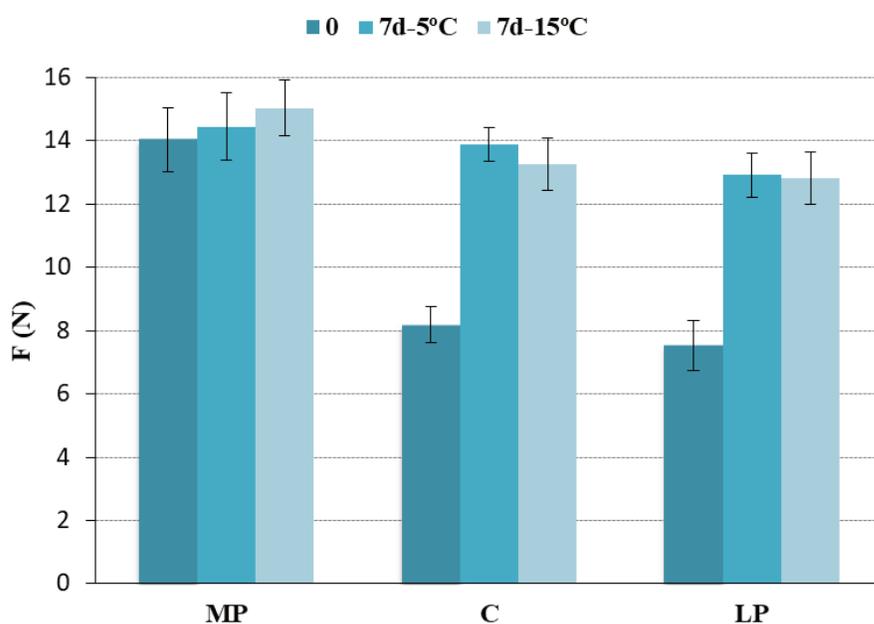


Figura 4.30 Firmeza (promedio \pm SD) de muestras de manzanas MP, C y LP al día cero y luego de 7 días de almacenamiento a 5°C y 15°C.

4.4.3 Determinación del color

Mediante espectrofotometría de reflexión se determinaron los parámetros L^* (luminosidad), a^* (rojo/verde), b^* (amarillo/azul), C^*ab (cromaticidad) y h_{ab} (ángulo de tono) y DE^*ab (diferencia total del color) para describir los cambios de color en las muestras. Los resultados son presentados en las Tabla 4.15 para el almacenamiento a 5°C y en la Tabla 4.16 para el almacenamiento a 15°C.

Tabla 4.15 Parámetros de color a^* y h_{ab} de las muestras de manzanas frescas cortadas durante el almacenamiento a 5°C

Parámetro	Días	Muestras								
		MP			C			LP		
L*	0	74,42	± 1,66	cA	74,67	± 1,28	aAB	75,54	± 1,06	bB
	2	71,75	± 1,84	bA	74,63	± 1,23	aB	73,64	± 2,50	aAB
	7	68,41	± 1,31	aA	75,10	± 1,51	aB	74,20	± 1,91	aB
a*	0	-0,14	± 0,39	aB	-0,62	± 0,22	bA	-0,74	± 0,25	bA
	2	1,60	± 0,68	bB	-0,89	± 0,26	Aab	-0,85	± 0,26	abA
	7	3,00	± 0,67	cB	-0,97	± 0,30	Aab	-1,07	± 0,36	aA
b*	0	16,66	± 2,14	aB	15,25	± 1,58	aAB	13,99	± 1,79	aA
	2	21,81	± 2,92	bB	16,05	± 1,82	Aab	14,35	± 2,34	aA
	7	25,11	± 1,88	cB	14,16	± 2,64	Aab	15,11	± 2,39	aA
Cab*	0	16,67	± 2,14	A	15,27	± 1,59	A	14,01	± 1,80	A
	2	21,87	± 2,95	bB	16,08	± 1,83	abA	14,37	± 2,35	aA
	7	25,30	± 1,90	cB	14,19	± 2,65	Aab	15,15	± 2,41	aA
h_{ab}	0	90,51	± 1,43	cA	92,27	± 0,71	aB	92,99	± 0,74	aB
	2	85,90	± 1,28	bA	93,15	± 0,71	bB	93,36	± 0,61	abB
	7	83,20	± 1,40	aA	93,88	± 0,77	cB	93,99	± 0,84	bB
DEab*	0	0,00	± 0,00	aA	1,87	± 0,70	aB	2,92	± 1,10	aC
	2	4,93	± 1,57	bC	2,23	± 0,76	abA	3,42	± 1,46	abB
	7	10,87	± 2,24	cB	3,50	± 2,02	bA	3,91	± 1,02	bA

Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas en el tiempo de almacenamiento por el test de Tuckey ($p \leq 0,05$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre muestras por el test de Tuckey ($p \leq 0,05$).

Tabla 4.16 Parámetros de color a^* y h_{ab} de las muestras de manzanas cortadas durante el almacenamiento a 15°C

Parámetro	Días	Muestras								
		MP			C			LP		
L^*	0	74,70	± 1,30	bA	74,67	± 1,28	bAB	75,54	± 1,06	bB
	2	69,31	± 2,86	A						
	7	67,57	± 2,41	aB	63,35	± 3,45	aA	66,53	± 4,60	aAB
a^*	0	-0,19	± 0,41	aB	-0,62	± 0,22	aA	-0,74	± 0,25	aA
	2	3,04	± 1,15	B						
	7	2,85	± 0,91	bB	2,23	± 0,65	bB	0,78	± 1,18	bA
b^*	0	15,98	± 1,73	aA	15,25	± 1,58	aA	13,99	± 1,79	aA
	2	23,75	± 3,98	B						
	7	28,75	± 2,68	cB	25,24	± 2,02	bB	19,48	± 5,03	bA
Cab^*	0	15,46	± 1,73	aA	15,27	± 1,59	aA	14,01	± 1,80	aA
	2	23,95	± 4,09	B						
	7	28,90	± 2,74	cB	25,35	± 2,06	bB	19,52	± 5,08	bA
h_{ab}	0	90,67	± 1,51	bA	92,27	± 0,71	bB	92,99	± 0,74	bB
	2	82,91	± 1,47	A						
	7	84,42	± 1,46	aA	84,98	± 1,19	aA	88,18	± 2,81	aB
$DEab^*$	0	0,00	± 0,00	aA	1,89	± 0,81	aB	2,82	± 1,12	Ab
	2	6,34	± 1,69	B						
	7	15,01	± 3,36	cB	15,54	± 3,69	bB	10,10	± 4,88	bA

Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas en el tiempo de almacenamiento por el test de Tuckey ($p \leq 0,05$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre muestras por el test de Tuckey ($p \leq 0,05$).

Al día 0, las muestras de manzanas frescas cortadas C y LP resultaron ligeramente más claras y verdes (mayor L^* y h_{ab} , menor a^*) que las que no recibieron ningún tratamiento antioxidante (Tabla 4.15 y 4.16). Si bien no hubo diferencias significativas, las muestras LP presentaron un tono verde más intenso que las C, lo cual se reflejó en un menor valor de a^* . A su vez, se registró un menor componente amarillo para las muestras LP a través del parámetro b^* , que resultó algo menor que el de las muestras C y MP (Tablas 4.15 y 4.16).

Varios autores han observado, tras realizar un análisis colorimétrico basado en el espacio de color CIE $L^*a^*b^*$, que un aumento del pardeamiento enzimático en los trozos de manzana durante el almacenamiento va acompañado de un aumento de los valores colorimétricos a^* y b^* y de una

disminución de los valores de luminosidad L^* . La disminución de los valores L^* implica que durante el pardeamiento la superficie de la manzana se oscurece, y a la vez su tono pasa a ser rojizo y más intenso, lo que se traduce en un aumento de las coordenadas de color a^* y b^* (Lu et al. 2007, Lunadei y col. 2010, Piagentini y Pirovani, 2017, Sahu y col. 2019).

Después de una semana de almacenamiento a 5°C , las manzanas frescas cortadas LP y C continuaron siendo más claras y verdes que las MP, en las cuales se observó pardeamiento (fig. 4.32). Las muestras LP y C mantuvieron prácticamente sin variación los valores de L^* y h_{ab} del día cero mientras que las muestras MP tuvieron una significativa reducción de ambos parámetros. El parámetro a^* aumentó y su valor se hizo positivo en la muestras MP, lo que señaló el componente rojizo propio del pardeamiento. (Tabla 4.15). A la vez, las muestras C y LP elevaron el parámetro a^* en valor absoluto manteniendo el signo negativo (Tabla 4.15), lo que significó que no se desarrollaron tonos rojizos (Fig. 4.31). Por su parte, Alegre y col. (2010a) observaron un leve aumento en el valor de L^* en función del tiempo durante el almacenamiento refrigerado de manzanas cortadas 'Granny Smith' enriquecidas *L. rhamnosus* GG y utilizando como antioxidante Natureseal®. Con la misma variedad de manzana mínimamente procesada con *L. rhamnosus* GG incorporado, Roβle y col. (2010a) determinaron que en el almacenamiento entre 2 y 4°C (10 días), los valores L^* aumentaron hasta el día 2 para mostrar luego una ligera disminución. A su vez, los valores de a^* se mantuvieron negativos durante todo el almacenameinto, al igual que en esta tesis.

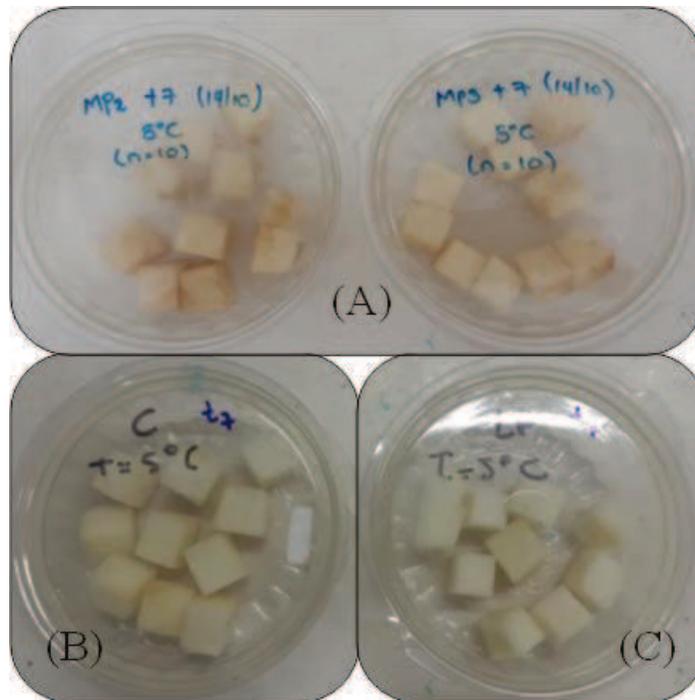


Fig. 4.31 Cambios en el color de cubos de manzanas almacenados 7 días a 5°C. (A) Sin tratamiento, muestras MP; (B) tratados sólo con solución antioxidante, muestras C; (C) tratados con solución antioxidante donde se incorporó *L. plantarum* 998, muestras LP.

Todas las muestras de manzanas frescas cortadas presentaron pardeamiento luego de 7 días a 15°C (Fig. 4.32), en consecuencia, la luminosidad (L) y el ángulo de tono (h_{ab}) se redujeron significativamente en todas ellas. Aún así, las muestras LP presentaron el valor más bajo del parámetro a^* , correspondiente a la menor disminución en la tonalidad verde deseable en manzanas frescas cortadas 'Granny Smith' (tabla 4.15). La muestra LP también presentó, la menor diferencia total del color (DE^*ab) con respecto a la materia prima, luego de 7 días tanto a 5°C como a 15°C.

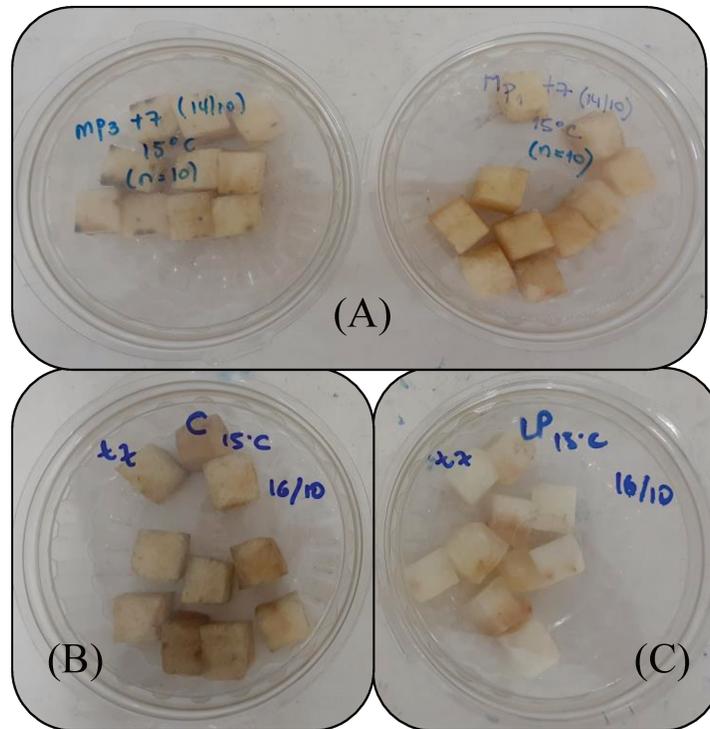


Fig. 4.32 Cambios en el color de cubos de manzanas almacenados 7 días a 15°C. (A) Sin tratamiento, muestras MP; (B) tratados sólo con solución antioxidante, muestras C; (C) tratados con solución antioxidante donde se incorporó *L. plantarum* 998, muestras LP.

4.4.4 Determinación de fenoles totales, capacidad antioxidante y vitamina C

Los compuestos fenólicos presentan grandes beneficios potenciales para la salud humana y se encuentran como constituyentes principales de la capacidad antioxidante total de las frutas y verduras.

La concentración inicial de fenoles totales (CFT) fue mayor para la muestra LP, seguida de la muestra control (C) y por último los cubos de manzana sin tratamiento (MP). Coincidentemente, en ese orden resultaron también los valores de capacidad antioxidante (CAO) (Fig. 4.33, tablas 4.13 y 4.14).

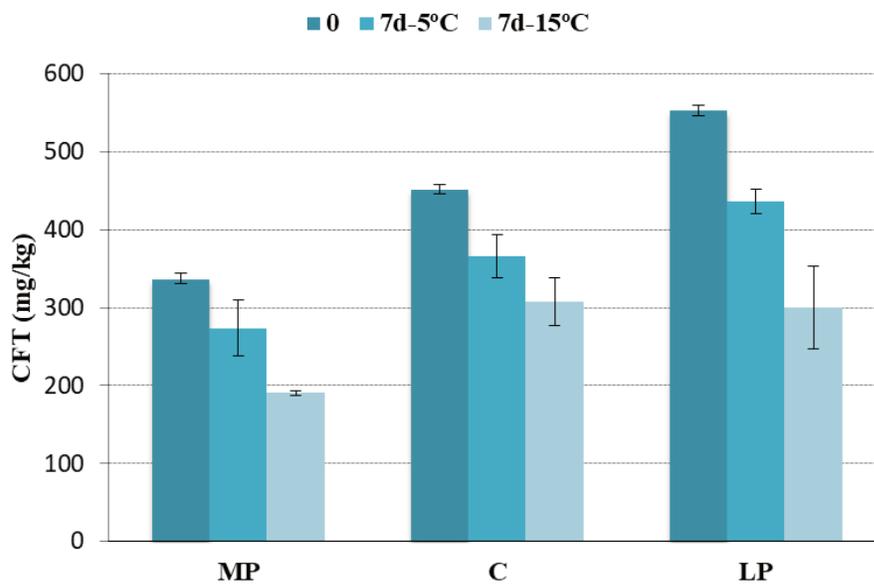


Figura 4.33 Concentración de fenoles totales (CFT), de muestras de manzanas MP, C y LP al día cero y luego de 7 días de almacenamiento a 5°C y 15°C.

Después de 7 días, como se observa en la figura 4.33, disminuyó el contenido de compuestos fenólicos en todas las muestras a ambas temperaturas de almacenamiento. A 5° C, el porcentaje de retención resultó similar para todas las muestras, promediando el 80%. Aún así, el valor de los CFT para las manzanas tratadas con el lactobacilo superó al valor de los cubos de manzana control en 70 mgAGE/kg (Tabla 4.15). Porcentajes de retención similares determinaron Russo y col. (2014), en piña cortada fresca almacenada a 5°C durante 8 días. En la fruta tratada con *L. plantarum* B2 resultó del 80%, seguido por el 74% en las tratadas con *L. fermentum* PBCC11.5 y finalmente por el 72% alcanzado por las muestras control.

En cuanto a la Capacidad Antioxidante a 5°C, en el día 7 se observa una mayor retención en las muestras C (98%) y LP (77%) con valores superiores al doble del obtenido para las muestras MP (Tabla 4.13 y Fig. 4.34). En el estudio de Russo y col. (2014), a diferencia de esta tesis, se registraron aumentos de la CAO, que fueron del 28%, 17% y 11%; para las muestras control, para las tratadas con *L. plantarum* B2 y las tratadas con *L. fermentum* PBCC11.5, respectivamente.

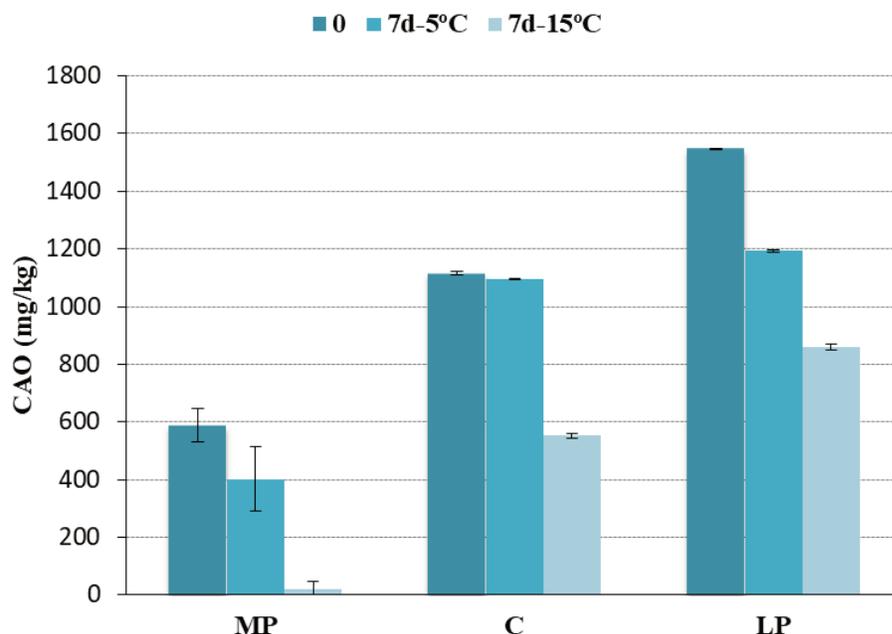


Figura 4.34 Capacidad antioxidante de muestras de manzanas frescas cortadas MP, C y LP al día cero y luego de 7 días de almacenamiento a 5°C y 15°C.

Al final del almacenamiento a 15°C, los CFT de las muestras C y LP promediaron los 300 mgAGE/kg, superando ampliamente los 190,57 mgAGE/kg de las muestras sin tratamiento (Tabla 4.14 y Fig. 4.34). Estos resultados se corresponden con la pérdida de Capacidad Antioxidante que para las muestras MP fue de 97% mientras que para las muestras C fue de 50% y para las LP, de 55%. No obstante, el valor CAO de las manzanas LP superó en 307,28 mg AA/kg a las muestras C (Tabla 4.14 y Fig. 4.34).

En cuanto a los resultados obtenidos en las determinaciones de CFT y CAO a ambas temperaturas para las muestras C y LP, debe considerarse la influencia ejercida por la solución antioxidante *per se*, la cual pudo haber contribuido a lograr una menor reducción que la obtenida en las manzanas cortadas sin ningún tratamiento. Plesoianu y col. (2021) determinaron que el tratamiento de cubos de manzana con soluciones de ácido cítrico (2% p/v) y ácido ascórbico (0,5% p/v) aumentó los niveles fenólicos totales en comparación con las muestras sin tratar, después de dos semanas a 8°C. Además, los valores de CFT de las muestras LP fueron superiores a los de las

muestras MP y en menor medida a los de las muestras C. Esto podría señalar el efecto *per se* de *L. plantarum* 998 sobre la concentración de estos compuestos bioactivos Tabasco y col. (2011) observaron que *L. plantarum* IFPL935 presentó una elevada actividad enzimática dirigida a la hidrólisis de polifenoles aislados de las pepitas de la uva, mediante la síntesis de enzimas específicas: galloil-esterasa decarboxilasa y alcohol bencílico deshidrogenasa. Esta capacidad de *L. plantarum* para metabolizar polifenoles podría deberse en gran parte a que esta especie se encuentra habitualmente en productos de origen vegetal (Radzick y Klewicka, 2021) y podría explicar los niveles significativamente mayores de CFT en las manzanas enriquecidas con *L. plantarum* 998.

En cuanto al contenido de Vitamina C, al día cero, los cubos de manzanas sin tratamiento presentaron un contenido de vitamina C significativamente menor que el de las muestras tratadas con la solución antioxidante (Fig. 4.35, Tabla 4.13 y 4.14). Este resultado es esperable ya que la solución contiene ácido ascórbico al 1% p/v en su composición. Después de 7 días a 5°C, la muestra C retuvo mayor concentración (97%) de vitamina C frente a las muestras LP (84%) y las muestras MP (66%). Una mayor reducción tuvo lugar a 15° C en todas las muestras pero fue la muestra LP la que retuvo vitamina C en mayor porcentaje (64%), frente a las cubos de manzana sin tratar (49%) y tratados con solución antioxidante (38%) (Fig. 4.34, Tabla 4.13 y 4.14).

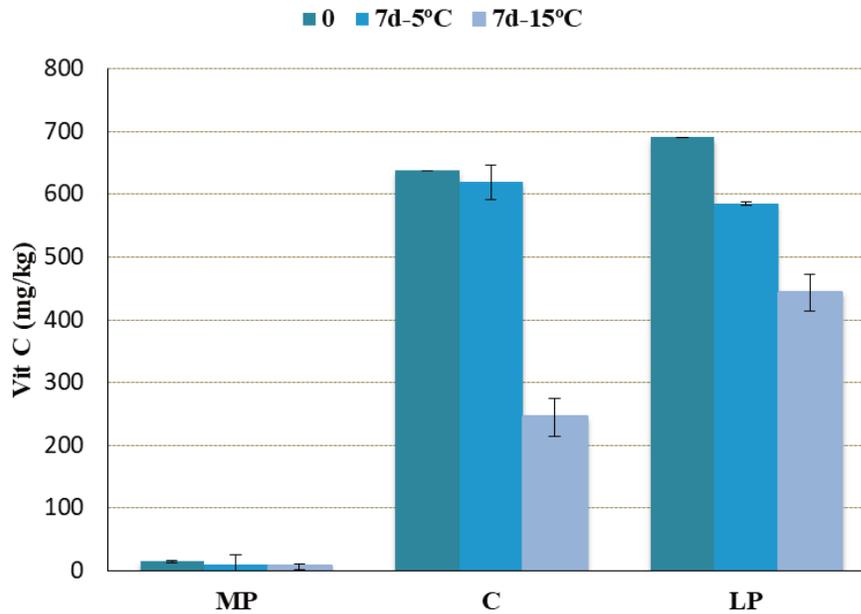


Figura 4.35 Contenido de Vitamina C de muestras de manzanas MP, C y LP al día cero y luego de 7 días de almacenamiento a 5°C y 15°C.

Conclusiones parciales del análisis de atributos de manzanas frescas cortadas enriquecidas con L. plantarum 998.

En las manzanas enriquecidas con LP, durante el almacenamiento a 5 y a 15°C, el pH se mantuvo estable y ligeramente inferior a las muestras sin tratamiento. En forma similar, los valores de SS no experimentaron cambios importantes en el tiempo y se mantuvieron inferiores a los de las muestras MP. La firmeza de las manzanas tratadas con el lactobacilo no presentó diferencias con las demás al término de los 7 días, a ambas temperaturas.

El tratamiento antioxidante evitó el desarrollo de pardeamiento a 5°C y además en las muestras LP se observaron manzanas más claras y verdes después de 7 días. Tanto a 5 como a 15°C el enriquecimiento con LP permitió obtener manzanas con la menor diferencia total de color (DE*ab) respecto al día 0.

En el almacenamiento a 5 y a 15°C disminuyó el contenido de fenoles totales de todas las muestras aunque el de las manzanas LP se mantuvo superior al de las muestras sin tratamiento. Así también ocurrió con la capacidad antioxidante donde las muestras LP presentaron valores superiores a los de las muestras MP y C, al término del almacenamiento.

A 5°C, las manzanas enriquecidas con LP retuvieron Vitamina C en porcentaje inferior a las tratadas sólo con solución antioxidante. A 15°C, si bien existió mayor reducción en todas las muestras respecto a 5°C, las muestras LP retuvieron más Vitamina C.

4.5 INTERACCIÓN ENTRE *L. plantarum* 998 Y LA MICROBIOTA NATIVA DE MANZANAS FRESCAS CORTADAS

Se analizaron los efectos del tipo de muestra, del tiempo y de la temperatura de almacenamiento sobre los distintos grupos microbianos, con el fin de encuadrarlos en tres enfoques principales:

- El efecto exclusivo de la solución antioxidante comparando las muestras MP y C.
- El efecto de la inclusión de *L. plantarum* 998, comparando las muestras C y LP.
- El efecto sinérgico de la solución antioxidante más el lactobacilo incorporado mediante la comparación de las muestras MP, C y LP.

4.5.1 Aerobios Mesófilos Totales

Al día 0 de conservación, no existieron diferencias significativas entre los recuentos de las muestras MP (3,29 log UFC/g) y los de las muestras C (3,51 log UFC/g). Se destaca una ligera reducción de la microbiota aerobia mesófila en las muestras LP (1,85 log UFC/g) (Fig. 4.36). Esto señalaría la influencia de LP ya que el efecto de la solución antioxidante en el día 0 no se observó al no haber diferencias significativas entre las muestras MP y C. Como se trata del análisis inmediatamente posterior al tratamiento de las manzanas, posiblemente, la presencia del lactobacilo en alta concentración en la muestra pudo haber inhibido a los mesófilos naturales de la manzana en las placas de recuento durante la incubación a 30°C durante 48 hs para determinar su número. Si bien el medio de cultivo Agar para Recuento en Placa no brinda todos los nutrientes necesarios como para el desarrollo óptimo de sus colonias, puede permanecer viable y ejercer su acción antagonista sobre la microbiota.

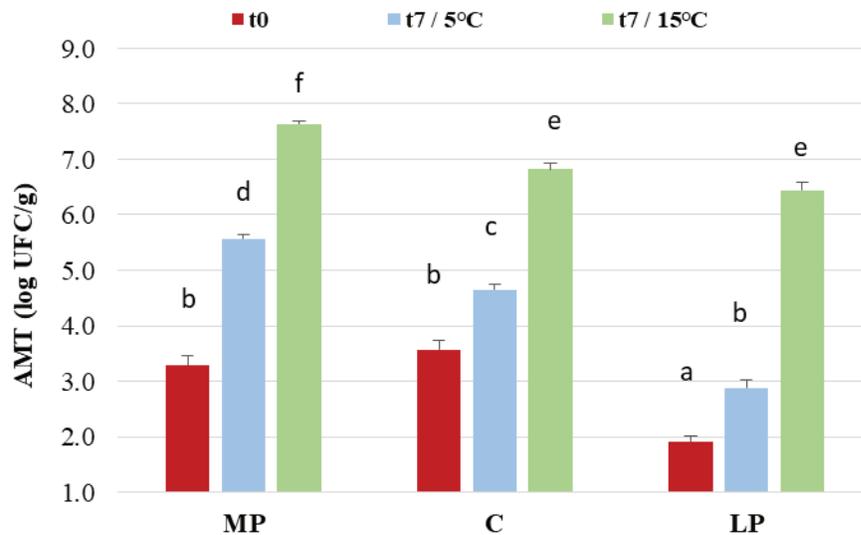


Figura 4.36 Recuentos de **Microorganismos Aerobios Mesófilos Totales**, a los días 0 y 7 de almacenamiento a 5 y a 15 °C, para las muestras MP, C y LP de manzanas frescas cortadas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Transcurridos 7 días a 5°C, todas las muestras experimentaron un aumento de la carga inicial (MP: 69%, C: 33%, LP: 55%). Se evidencia la influencia de la solución antioxidante por el menor aumento de las muestras C. Aún así, los niveles alcanzados en las muestras LP fueron similares a los recuentos iniciales de las muestras MP y C (Fig. 4.36). Y si se tuviera en cuenta la situación antes mencionada para el recuento inicial de las muestras LP y se tomara como carga inicial para estas muestras la de las muestras C, el aumento en la carga para las muestras LP sería sólo del 20%. Considerado así, indicaría el efecto sinérgico de la inclusión de *L. plantarum* 998. Al término del almacenamiento, todas las muestras mantuvieron sus recuentos por debajo del umbral de deterioro de 6 log UFC/g.

Al final de la conservación a 15°C, todas las muestras presentaron valores significativamente mayores que los correspondientes a 5°C por efecto de la mayor temperatura de almacenamiento. Las muestras MP presentaron recuentos que superaron en un 132% su carga inicial frente al aumento del 95% de las muestras C, las cuales no tuvieron diferencias significativas con las muestras LP. A esta

temperatura, sólo se evidenció el efecto de la solución antioxidante a través del menor aumento de la carga mesófila de las muestras C y LP (Fig. 4.36).

Zhao y col. (2020) conservaron a 4°C manzanas ‘Red Fuji’ peladas y cortadas, tratadas con una solución de *Lactiplantibacillus plantarum* BX62 y después de 7 días observaron una reducción del 30% de la carga mesófila en comparación a las muestras sin ningún tratamiento donde hubo un incremento del 25% (concentración final de 3,3 log UFC/g, similar a la inicial de esta tesis) . Vale aclarar que el reporte de este grupo microbiano no es común en los trabajos similares a los de esta tesis, que se centran más en el antagonismo con los patógenos, inoculados experimentalmente. Y de lo escaso reportado existe mucha disparidad debido a la amplia variedad de medios y soluciones empleadas para vehiculizar el cultivo protector y/o prevenir el pardeamiento, tiempo y temperaturas de almacenamiento, cortes y acondicionamientos previos, así como variedades de la materia prima que pueden incidir en la determinación de un grupo microbiano tan amplio.

4.5.2 Microorganismos Psicrótrofos

Este grupo microbiano no fue detectable en ninguna de las muestras al día 0 (Fig. 4.37). Después de 7 días a 5°C, los recuentos de las muestras C mostraron el efecto de la solución antioxidante ya que resultaron un 22% más bajos que los de las muestras MP pero, a su vez, las muestras LP presentaron un valor promedio que fue 55% más bajo que los de las muestras C. Esto último podría señalar una acción antagonista sobre el grupo de microorganismos psicrótrofos debida a la presencia de *L. plantarum* 998 (Fig.4.37). En el estudio de Zhao y col. (2020), la inclusión de *L. plantarum* BX62 en el tratamiento de manzanas frescas cortadas no tuvo efecto sobre la carga microbiana psicrótrofa ya que no se presentaron diferencias significativas entre la fruta tratada y no tratada siendo en ambos casos el incremento tras 7 días a 5°C, de 96% y 102% respectivamente.

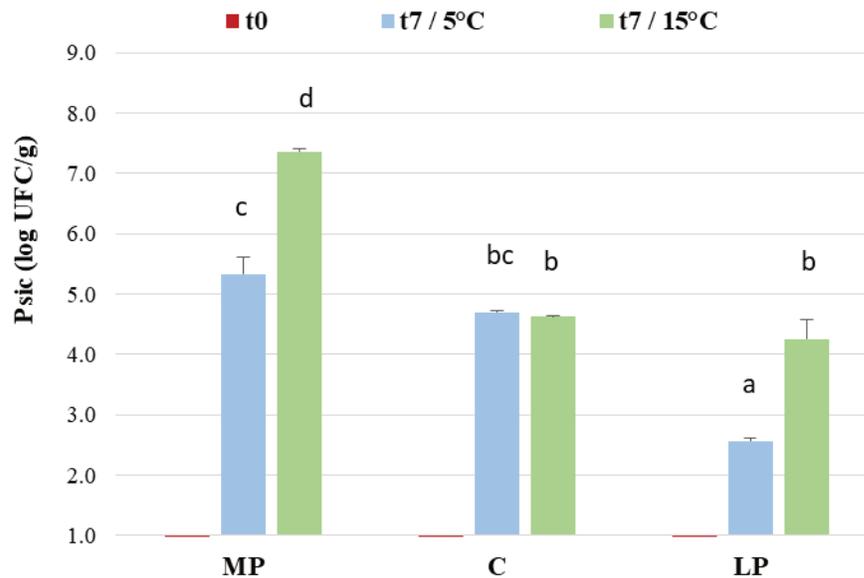


Figura 4.37 Recuentos de **Microorganismos Psicrótrofos**, a los días 0 y 7 de almacenamiento 5 y a 15 °C, para las muestras de manzanas MP, C y LP. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

A 15°C, después de 7 días, la carga de microorganismos psicrótrofos fue significativamente mayor que a 5°C en las muestras MP y LP, mientras que los niveles en las muestras C fueron similares a ambas temperaturas de almacenamiento (4,7 y 4,6 log UFC/g a 5° y 15°C, respectivamente) (Fig. 4.37). Las muestras C presentaron al día 7, recuentos inferiores a los de las muestras MP en un 37%. Esto evidenció la influencia de la solución antioxidante durante la conservación. Los niveles de psicrótrofos en muestras LP no mostraron diferencias significativas con los de las muestras C (no se determina el efecto sinérgico del lactobacilo), pero aún así, la inclusión de *L. plantarum* 998 en el tratamiento de las manzanas frescas cortadas mantuvo el recuento prácticamente en 2 log UFC/g por debajo del correspondiente a las muestras sin ningún tratamiento al cabo de 7 días (Fig. 4.37).

4.5.3 Mohos y levaduras

En el día de inicio de la experiencia, los recuentos de mohos y levaduras resultaron significativamente diferentes al comparar las muestras MP (2.06 log UFC/g) con las muestras C (3.56 log UFC/g) y LP (1.85 log UFC/g) (Fig. 4.38). La composición ácida de la solución antioxidante (ácido cítrico y ácido ascórbico al 1% p/v) así como el pH de la fruta podrían haber favorecido el desarrollo de levaduras en las muestras C. Plesoianu y col. (2022) han observado que el tratamiento de manzanas frescas cortadas con ácido ascórbico al 0.5% promovió el crecimiento de levaduras durante el almacenamiento refrigerado.

Al cabo de 7 días de almacenamiento refrigerado, los recuentos aumentaron en los tres grupos de muestras. Sin embargo, la presencia de *L. plantarum* 998 en las muestras LP hizo que la carga de mohos y levaduras (3 log UFC/g), se mantuviera por debajo de las correspondientes a las muestras MP y C (4,6 y 4,4 log UFC/g, respectivamente) (Fig. 4.38). En el final de la conservación a 15°C, los recuentos de los tres tipos de muestras no difirieron significativamente entre sí, y superaron ampliamente su carga inicial acorde al aumento en la temperatura de almacenamiento, con valores que sobrepasaron 6 log UFC/g en todas las muestras (Fig. 4.38).

Siroli y col. (2015) determinaron que la incorporación de *Lacticaseibacillus paracasei* M3B6 a cubos de manzanas ‘Golden Delicious’ (tratadas con solución antioxidante similar a la de esta tesis), significó una reducción de 1 log UFC/g de levaduras con respecto al resto de las muestras al final de su conservación (6°C, 16 días). Por su parte, Zhao y col. (2020), en las mismas condiciones de esta tesis en cuanto a tiempo y temperatura, no obtuvieron diferencias significativas entre muestras de manzanas tratadas y no tratadas con *L. plantarum* BX62.

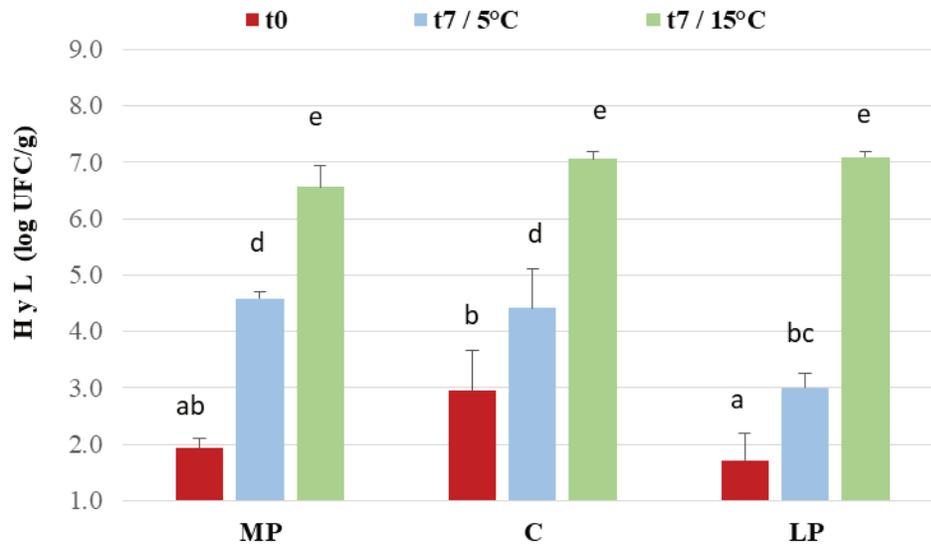


Figura 4.38 Recuentos de **Mohos y Levaduras**, a los días 0 y 7 de conservación a 5 y a 15 °C, para las muestras de manzanas MP, C y LP. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

4.5.4 Bacterias Ácido Lácticas

Al día cero, no se detectaron bacterias ácido lácticas (BAL) provenientes de la microbiota de las manzanas en las muestras MP y C pero después de 7 días, alcanzaron 4,5 log UFC/g en las muestras C almacenadas a 15°C (Fig. 4.39). Es posible que el pH ligeramente más bajo de estas muestras debido al tratamiento con la solución antioxidante, haya favorecido el desarrollo de las BAL existentes desde el inicio en estado viable pero no cultivable.

A 15°C, la carga de *L. plantarum* 998 presente en las muestras LP se mantuvo estable al cabo de 7 días de almacenamiento. En cambio, a 5°C disminuyó significativamente (0,6 log UFC/g) ($p < 0,05$) pero aún así su valor se mantuvo por encima de 6 log UFC/g (Fig. 4.39). Varios autores refieren la estabilidad de las potenciales cepas protectoras a lo largo del almacenamiento, principalmente refrigerado, ya que se trata de una condición indispensable para su empleo en fruta cortadas fresca. Speranza y col. (2018) hallaron una reducción similar (0,5 log UFC/g) de *L.*

plantarum c19 incorporado a rodajas de 'Granny Smith', después de 14 días a 4°C. Mientras que en cubos del mismo cultivar, tras 7 días a 4°C, Rossi (2016) no observó variaciones significativas (0,1 log UFC/g) de una cepa de *L. plantarum*. A la misma temperatura de refrigeración que la utilizada en este estudio, se obtuvo una reducción mayor (0,9 log UFC/g) de *L. plantarum* B12 en piña cortada almacenada 8 días (Russo y col. 2014).

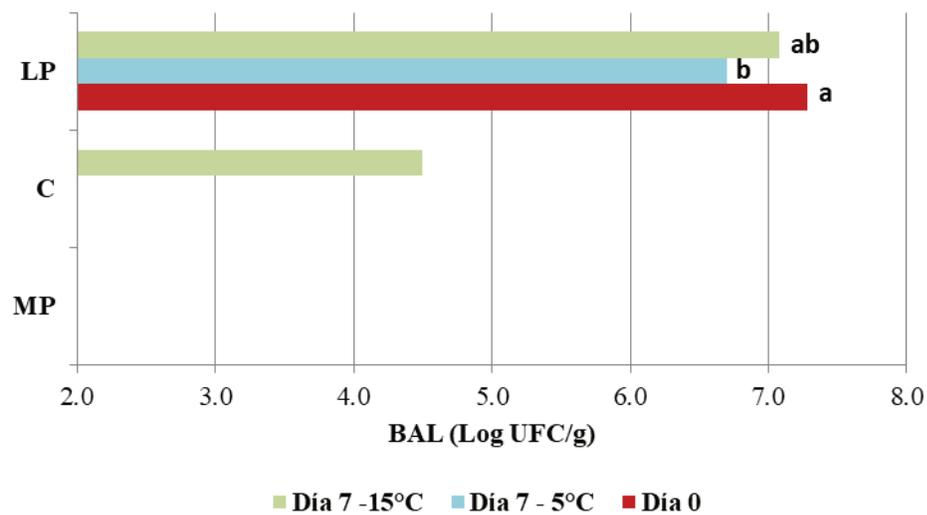


Figura 4.39 Valores de recuento de **Bacterias Ácido Lácticas** a los días 0 y 7 de su conservación a 5 y a 15°C para las muestras MP, C y LP de manzanas frescas cortadas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Más allá de que en esta tesis se explore su funcionalidad como cultivo protector, como se ha mencionado en la sección 3.1, *L. plantarum* 998 es una cepa potencialmente probiótica (Zago y col., 2011; Ferrando y col., 2016; Lavari y col. 2017). Con la idea de que su adición a las manzanas frescas cortadas pudiera cumplir un rol dual, como cultivo protector y probiótico, resulta deseable que su incorporación tenga en cuenta las concentraciones recomendadas para productos probióticos. La Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, Food and Drug Administration) de los Estados Unidos de Norteamérica y la industria alimentaria en general, han tomado como índice una

concentración de 10^6 UFC/ ml ó g (Boylston y col. 2004; Karimi y col. 2011, Tripathi y Giri 2014). A su vez, la Asociación Científica Internacional para Probióticos y Prebióticos (ISAPP, por sus siglas en inglés), recomienda que la ingesta diaria de probióticos se encuadre entre 10^8 y 10^9 células viables, lo cual implicaría un consumo diario de alrededor de 100g de un alimento que contenga probióticos (Hill y col., 2014). En este contexto, si se consideraran como probióticas a las manzanas frescas cortadas, la concentración de *L. plantarum* 998 ($> 6 \log$ UFC/g) se mantuvo acorde a lo recomendado hasta el final de su almacenamiento.

4.6. INTERACCIÓN ENTRE *L. plantarum* 998 y *S. Newport* ITA S12 EN MANZANAS FRESCAS CORTADAS.

Se eligió a *L. plantarum* 998 y *S. Newport* ITA S12 para realizar el ensayo en manzanas mínimamente procesadas, de acuerdo a las variables operativas y la metodología descrita en los incisos anteriores. *S. Newport* ITA S12 fue inoculada en cubos de manzanas frescas sin tratar (MP), tratadas con solución antioxidante de ácido cítrico y ácido ascórbico al 1% p/v (C) o tratadas con solución antioxidante en donde se vehiculizó *L. plantarum* 998 (LP). Posteriormente los cubos de manzana se conservaron a 5 y a 15°C durante 7 días.

4.6.1 Estudio de la evolución de *S. Newport* ITA S12 en manzanas frescas cortadas enriquecidas con *L. plantarum* 998, almacenadas a 5°C y a 15°C.

Muestras MP+SN

A 5°C, la población inicial de SN en las muestras sin ningún tratamiento (MP+SN) fue disminuyendo hasta llegar al día 7 con una reducción de 1,41 log UFC/g con respecto al día cero. Al día 2 se obtuvo el 57% de dicha reducción ya que los valores correspondientes a los días

subsiguientes no presentaron diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$) (Fig. 4.40 y 4.41, tabla 4.17). Con rodajas de manzanas del mismo cultivar, Rossi (2016) halló una reducción similar (1,5 log UFC/g) de un mix de cepas de *Salmonella* tras 7 días a 4°C y Alegre y col. (2010a), tras 9 días a 5°C, registraron un descenso de *Salmonella* Michigan de 1 log UFC/ cilindro de manzana. He y col. (2021) determinaron una reducción menor (0,7 log UFC/g) a la de este estudio para el mismo serotipo de esta tesis y para *S. Typhimurium* (0,6 log UFC/g) en cubos de manzanas 'Royal Gala', almacenados 7 días a 4°C. La supervivencia de *Salmonella* (Mezcla de 4 serotipos: Agona, Michigan, Montevideo y Gaminara) en manzanas 'Golden Delicious' cortadas en rodajas fue estudiada por Alegre y col. (2011), refiriendo una disminución de sólo 0,5 log UFC/g tras 28 días a 5°C. Y en fresas mínimamente procesadas pero con el mismo serotipo de esta tesis, Yin y col. (2022) obtuvieron una reducción de 1,9 log UFC/g de *S. Newport* durante el almacenamiento a 4°C durante 7 días.

Se observa aquí que el uso de una temperatura de refrigeración de alrededor de 5°C efectivamente inhibe el crecimiento y favorece la inactivación de *Salmonella*, en especial para la cepa utilizada en este estudio que experimentó un descenso muy cercano o algo mayor que el de trabajos similares. Si se tiene en cuenta que la variedad de manzana utilizada en esta tesis, 'Granny Smith', está considerada entre las más ácidas (pH 3,31, Tabla 4.13), esto podría contar como un factor adicional que explicaría el mayor descenso. Aún así, se destaca que Alegre y col. (2010a) no hallaron diferencias significativas en el crecimiento de distintos patógenos alimentarios en manzanas 'Golden Delicious' (pH 4,16), 'Granny Smith' (pH 3,32) y 'Shampion' (pH 4,44) recién cortadas y almacenadas a 25 y a 5°C. A su vez, He y col. (2021) encontraron que *S. Typhimurium* y *S. Newport* parecían sobrevivir mejor en tomate recién cortado (pH 4,38) y en melón (pH 6,73) que en manzana recién cortada (pH 4,15) y en pepino (pH 6,40) tras 7 días de almacenamiento a 4°C. Esto sugiere que a la acidez de la fruta se sumarían otros factores de importancia que afectarían la

supervivencia del patógeno en las frutas recién cortadas a temperaturas de refrigeración. Entre esos factores están los carbohidratos disponibles de los diferentes tipos de frutas frescas cortadas, los cuales desempeñan un papel importante para la adaptación, el metabolismo y la supervivencia de las bacterias. La respuesta transcriptómica (genes que han sido leídos/transcritos a ARN) de *S. Newport* en los vegetales mencionados fue estudiada por He y col. (2021) observando el alza de los genes de la triosa-fosfato isomerasa (TPI) en el melón y el tomate, lo que sugiere la posibilidad de utilización de vías alternativas de utilización del carbono ya que la TPI desempeña un papel fundamental en la glucólisis y la gluconeogénesis, el metabolismo de la fructosa y la manosa, así como el metabolismo del inositol fosfato, todos ellos importantes para la producción eficiente de energía en la célula bacteriana.

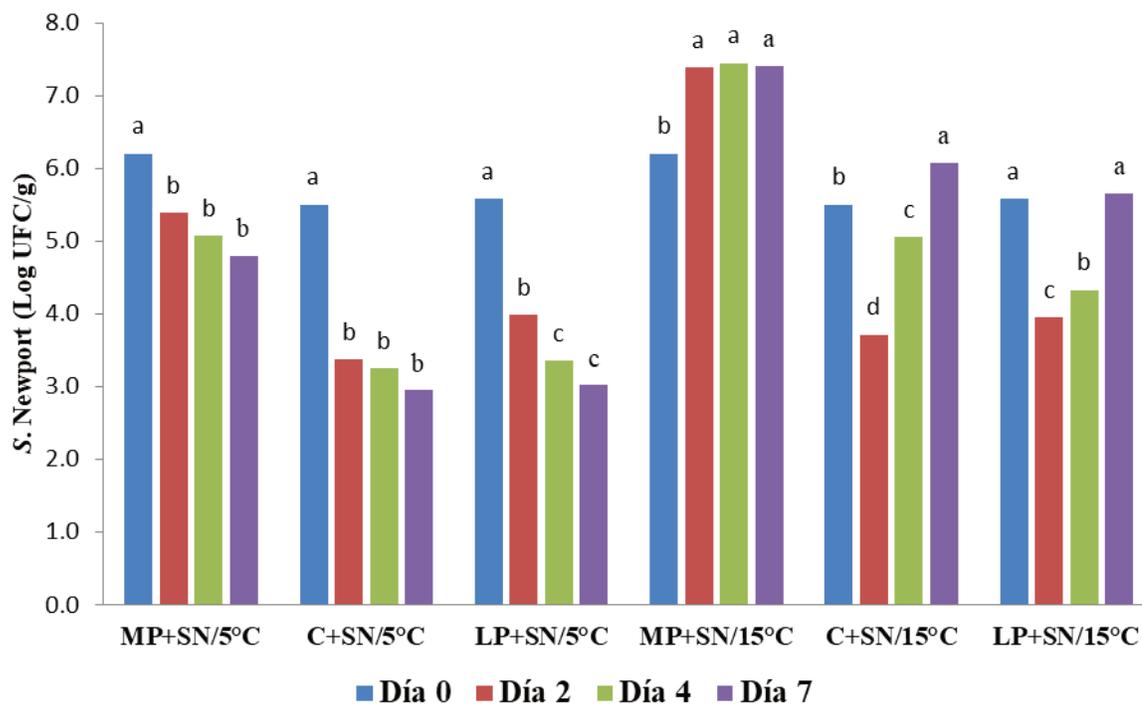


Figura 4.40. Valores de recuento de *S. Newport* ITA S12 en los distintos grupos de muestras de manzanas frescas cortadas conservadas a 5 y a 15°C. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos días para cada muestra.

Tabla 4.17 Recuentos de *S. Newport* ITA S12 en las distintas muestras de manzanas frescas cortadas almacenadas a 5 y a 15°C.

Muestra	Tiempo (día)	S. Newport ITA S12 (UFC/g)	
		5° C	15° C
MP+SN	0	6,2±0,2a	6,2±0,2b
	2	5,4±0,1b	7,4±0,3a
	4	5,1±0,1b	7,5±0,2a
	7	4,8±0,3b	7,4±0,1a
C+SN	0	5,5±0,0a	5,5±0,0b
	2	3,4±0,1b	3,7±0,1d
	4	3,3±0,2b	5,1±0,0c
	7	3,0±0,5b	6,1±0,0a
LP+SN	0	5,6±0,1a	5,6±0,1a
	2	4,0±0,1b	4,0±0,0c
	4	3,4±0,1c	4,4±0,1b
	7	3,0±0,0c	5,7±0,0a

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos días para cada muestra por el test de Tukey.

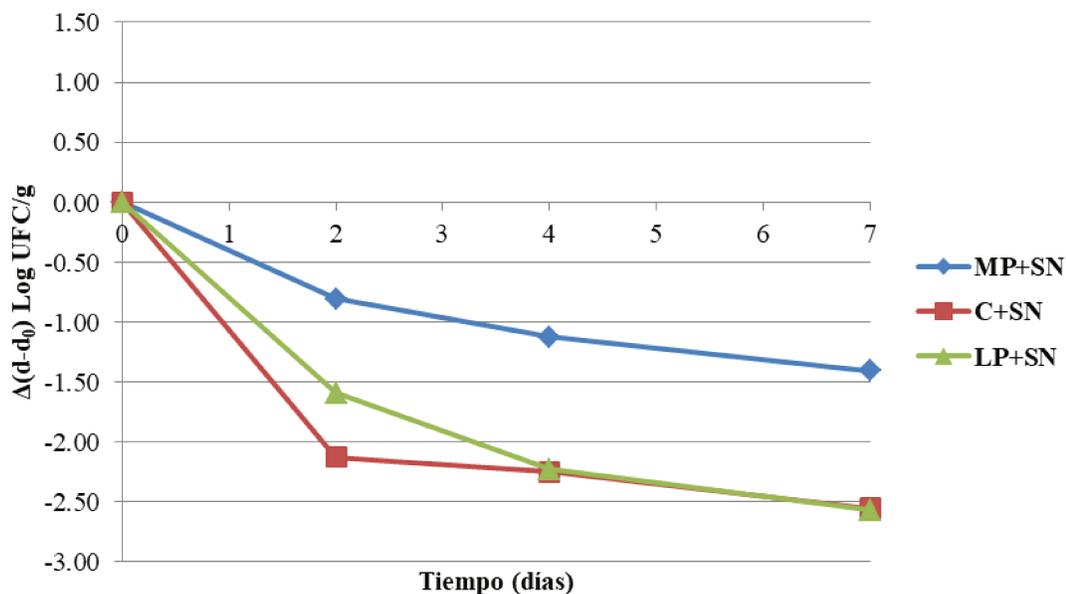


Figura 4.41 Variación de los recuentos de *S. Newport* ITA S12 para cada día de muestreo con respecto al día cero, en las distintas muestras de manzanas frescas cortadas conservadas a 5° C

Durante el almacenamiento a 15°C, al día 2 se obtuvo el 98% del aumento total de la población de SN en las muestras MP+SN. Este aumento se mantuvo y totalizó los 1,2 log UFC/g al finalizar la conservación (Fig. 4.40 y 4.42, tabla 4.17). Incluso con temperaturas de abuso más bajas como 10°C y al cabo de 10 días, Alegre y col. (2013) observaron que un mix de serotipos de *Salmonella* (Agona, Michigan, Montevideo y Gaminara) aumentaron sus conteos en 1,5 log UFC/g en cilindros de manzana ‘Golden Delicious’, un aumento similar al de esta tesis. Así también, Luo y col. (2014) registraron un aumento similar de *S. enteritidis* (1,3 log UFC/g) en rodajas de ‘Granny Smith’ almacenadas a la misma temperatura durante 7 días. Alegre y col. (2010a) determinaron aumentos de alrededor de 1,3 log UFC/g no sólo para *S. Michigan* sino también para una cepa no patógena de *E. coli* O157:H7 (NCTC 12900), y un aumento de 2 log UFC/g para *Listeria innocua* (subrogante de *L. monocytogenes* en el estudio) en cilindros de manzana ‘Golden Delicious’ almacenados a 10°C por 6 días. Esta vez utilizando una mayor temperatura de abuso (20°C) y menor tiempo de almacenamiento (72 horas), Luo y col. (2014) observaron aumentos en torno a 2 log

UFC/g en rodajas de 'Granny Smith' tanto para *S. enteritidis* como para *E. coli* O157:H7 y para *L. monocytogenes*.

De lo expuesto se destaca que tanto *Salmonella* como así también otros patógenos alimentarios importantes como *E. coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* pueden pasar de cinéticas de inactivación a cinéticas de crecimiento en la misma matriz alimentaria con incremento de pocos grados centígrados en la temperatura de conservación. De allí, la relevancia del control de este parámetro durante la vida útil de frutas mínimamente procesadas.

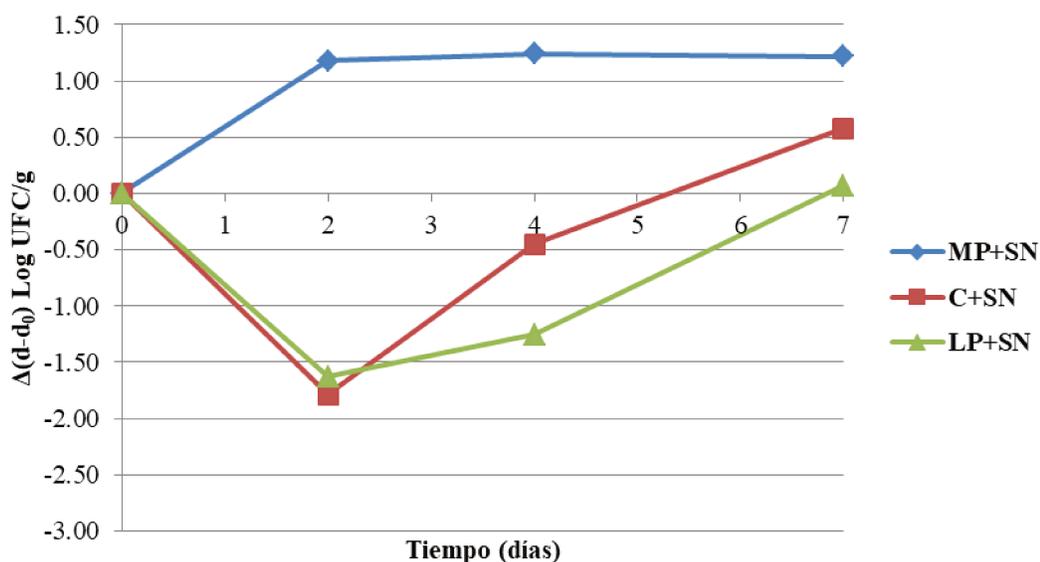


Figura 4.42 Variación de los recuentos de *S. Newport* ITA S12 para cada día de muestreo con respecto al día cero, en los distintos grupos de muestras de manzanas frescas cortadas conservadas a 15° C.

Muestras C+SN

En las muestras tratadas sólo con solución antioxidante (C+SN), SN experimentó un descenso de 0,7 log UFC/g al día cero con respecto a las muestras MP+SN (Fig 4.40, tabla 4.17). Al día 2 a 5°C ocurrió el descenso mayor magnitud (2,1 log UFC/g) ya que constituyó el 83% del

descenso total. Finalmente la disminución de los recuentos totalizó los 2,5 log UFC/g al día 7 (Fig. 4.41, tabla 4.17). A 15°C, al descenso inicial también le siguió el del día 2 (1,8 log UFC/g) pero luego prevaleció el efecto de la mayor temperatura de almacenamiento. Así, SN aumentó gradualmente hasta que al día 7 llegó a superar en 0,6 log UFC/g su carga inicial (Fig 4.40 y 4.42).

Al día 2 a 15°C, SN aumentó sus valores sólo en las muestras MP+SN mientras que a 5°C el descenso de SN con respecto al día 0 en las muestras MP+SN (13%) resultó significativamente menor ($p < 0.05$) que el determinado en las muestras C+SN (39%) y en las LP+SN (28%) (Tabla 4.17). Los descensos de los días 0 y 2 a ambas temperaturas de almacenamiento, pueden indicar la influencia del tratamiento con la solución antioxidante sobre el crecimiento de SN.

Se han determinado efectos antibacterianos significativos del ácido cítrico al 1% y 2% p/v para reducir la carga de *E. coli* O157:H7, *S. Tiphymurium* y *Listeria innocua* en manzanas rojas enteras después de 10 min de contacto (Park y col. 2011). Aún así, su efectividad es menor a la del ácido acético y ácido láctico, tanto para inhibir la formación de biofilms como para inhibir la producción de EPS (sustancias poliméricas extracelulares), de *E. coli* y *Salmonella* sp. aisladas de frutas y hortalizas frescas (Amrutha y col. 2017). Por otro lado, algunos autores como Alegre y col. (2010a) hallaron que los tratamientos de cilindros de manzana 'Golden Delicious' y 'Granny Smith' con ácido ascórbico (2%) y NatureSeal (6%) en forma individual, no afectaron el crecimiento de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Michigan y *Listeria innocua*.

Muestras LP+SN

SN descendió 0,6 log UFC/g al día cero en las muestras LP+SN con respecto a las muestras sin ningún tratamiento. Al día 2 a 5°C se produjo el 61% de la reducción total a esta temperatura que correspondió a 2,6 log UFC/g. Ambas reducciones resultaron similares lo observado en las muestras

C+SN, indicando el efecto de la solución antioxidante presente en ambas muestras. Sin embargo, los valores de SN para los días 4 y 7 resultaron significativamente inferiores al del día 2, diferente a lo ocurrido en las muestras C+SN (Fig. 4.40, tabla 4.17). Si se consideran las reducciones totales de SN en las muestras, sólo una diferencia de 0,1 log UFC/g se adjudicaría a la presencia del lactobacilo a 5°C, y el mayor efecto protector se debería a la solución antioxidante y a la temperatura. En rodajas de manzanas del mismo cultivar utilizado en esta tesis, almacenadas por el mismo tiempo pero a 4°C, la presencia de *L. plantarum* (TISTR050) provocó una reducción de 1,7 log UFC/g de un mix de 3 cepas de *Salmonella* (serotipos Enteritidis, Orangienburg y cepa NFPA 7100), mientras que en las muestras sin tratar fue de 1,5 log UFC/g (Rossi 2016). La diferencia debida a la presencia del lactobacilo correspondió a solo 0,2 log UFC/g, valor similar al obtenido en esta tesis a una temperatura 1°C mayor. En manzanas Golden Delicious cortadas y conservadas a 4°C por 7 días se observó una reducción de tan solo 0,5 log UFC/g de otra mezcla de serotipos de *Salmonella* (Agona, Michigan, Montevideo y Gaminara) coinoculadas con una cepa de *L. rhamnosus* GG, no difiriendo significativamente esta reducción de las manzanas inoculadas con el patógeno pero no tratadas con el lactobacilo (Alegre y col. 2011). El tratamiento tanto con *L. acidophilus* LA-5 como con *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 en peras cortadas almacenadas durante 10 días a 5°C, no marcó diferencias significativas en los recuentos de *Salmonella* (mezcla de serotipos Agona, Michigan, Montevideo, Gallinarum y Enteritidis) con el control, ni ambos con la población inicial (Iglesias y col. 2017).

Calix-Lara y col. (2014) no observaron diferencias significativas entre las poblaciones de una mezcla de cinco serotipos de *Salmonella* (Agona, Anatum, Montevideo, Michigan y Saintpaul) inoculadas en espinacas, a una concentración de 4,0 log UFC/g almacenadas durante 12 días a 7°C, en presencia o ausencia de los componentes de LactiGuard TM (antimicrobiano alimentario compuesto por bacterias ácido lácticas). Pero, hallaron una diferencia significativa entre las mismas

poblaciones de *Salmonella* inoculadas a una concentración de 2,0 log UFC/g en presencia de los constituyentes de LactiGuard™. Esto sugiere que la eficacia de las bacterias ácido lácticas también depende de la concentración del microorganismo patógeno al que se enfrentan, a temperaturas de refrigeración. En nuestro estudio, SN fue inoculada de forma de obtener cubos con una ca. de 6 log UFC/g, lo que podría resultar elevado para una simulación de contaminación.

En el almacenamiento de las muestras LP+SN a 15°C, SN disminuyó al día 2 en igual magnitud que a 5°C para posteriormente aumentar su carga por prevalencia del efecto de la temperatura. Así continuó hasta alcanzar el día 7 valores (5,7 log UFC/g) que no se diferenciaron significativamente de su concentración inicial (Fig. 4.40 y 4.42). En comparación, las muestras control C+SN al día 7 presentaron poblaciones de SN significativamente mayores (6,1 log UFC/g) respecto a su concentración inicial (Fig. 4.40). Esto señalaría un efecto protector adicional proveniente de la presencia del lactobacilo. En gajos de manzanas rojas, Luo y col. (2014) no registraron cambios en la población inicial de *S. enteritidis* (CICC21482) coinoculada con *L. plantarum* (NR_042394.1) durante 7 días a 10°C mientras que en las muestras control mostraron un aumento de 1 log UFC/g. Iglesias y col. (2017) refieren un aumento de 1,8 log UFC/g de la población de *Salmonella* coinoculada con *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 en peras cortadas frente al aumento de 3,8 UFC/g en las muestras control durante un almacenamiento de 48 hs a 20° C. A su vez, Alegre y col. (2013) al estudiar la influencia de una bacteria no BAL (*Pseudomonas graminis* CPA-7) como cultivo protector para rodajas de manzanas 'Golden Delicious', no observaron diferencias en la población de *Salmonella* entre el control y las muestras tratadas con el cultivo protector a 5°C pero a 10°C se alcanzó la no detección de *Salmonella* frente al aumento de 1,5 log UFC/g del control. Lo hasta aquí expuesto indicaría que, en el almacenamiento refrigerado, la presencia de LP no constituyó un obstáculo significativo para sumarse a la baja temperatura y a la solución antioxidante en el objetivo de impedir el crecimiento o reducir las poblaciones de

Salmonella. Pero, a temperatura de abuso, pudo determinarse un mínimo efecto protector en las muestras LP+SN debido a la presencia del lactobacilo.

4.6.2 Estudio de la evolución de *L. plantarum* 998, en manzanas frescas cortadas inoculadas con *S. Newport* ITA S12, almacenadas a 5° C y a 15° C.

La evolución de los recuentos de LP en las muestras LP+SN se muestran en la Fig. 4.43. A 5°C y para el día 2, se observó una disminución de 0,5 log UFC/g para luego mantenerse sin variaciones significativas hasta el final de la conservación. A 15°C, también al día 2 hubo una disminución de 0,28 log UFC/g que tal como en el caso de 5°C pudo deberse a la influencia de la solución antioxidante sobre el lactobacilo. Posteriormente, prevaleció el efecto de la temperatura con un aumento en los recuentos que culminó con valores similares al día cero (Fig. 4.43).

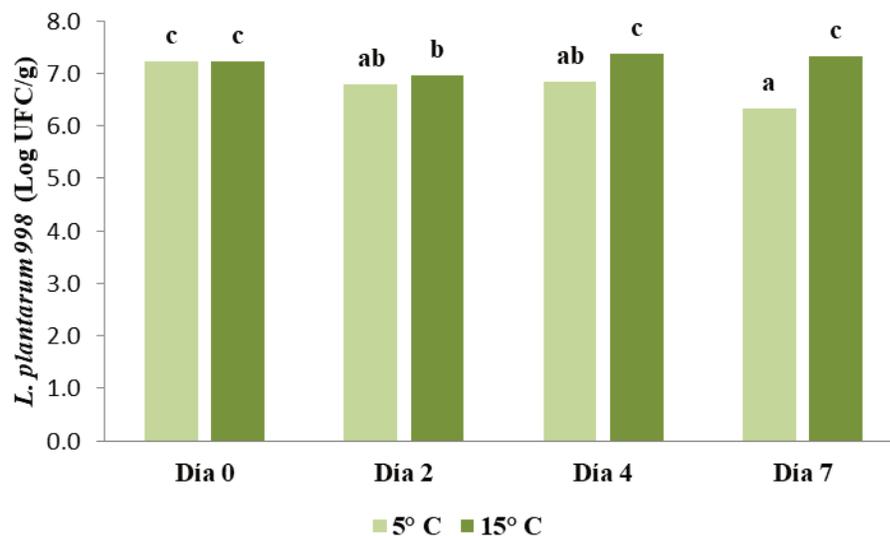


Figura 4.43 Valores de recuento de *L. plantarum* 998 en muestras de manzanas frescas cortadas, inoculadas con *S. Newport* ITA S12 (muestras LP+SN) almacenadas a 5 y a 15° C. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La comparación entre las muestras LP+SN con las muestras LP indica que la presencia de SN no influyó en los recuentos de LP al término de la conservación a 15°C (Fig.4.44). A 5°C no

existe diferencia significativa ($p>0.05$) entre los valores de las muestras inoculadas o no con SN. Ambas muestras difirieron significativamente ($p<0,05$) con respecto a sus valores de inicio pero permanecieron por encima de los 6 Log UFC/g. Como ya se ha mencionado en el punto 4.5.4, es la mínima concentración a mantener durante la vida útil de los alimentos, necesaria para que las cepas bacterianas potencialmente probióticas y/o protectoras puedan desarrollar con eficacia sus acciones benéficas (Boylston y col. 2004; Karimi y col. 2011, Tripathi y Giri 2014). Durante la conservación a 4°C por 5 días de rodajas de manzanas ‘Granny Smith’ tratadas con *L. plantarum* TISTR 050, la presencia de cinco serotipos de *Salmonella* no modificó significativamente la población del lactobacilo con respecto a las muestras control (Rossi 2016), al igual que lo presentado en esta tesis. Idéntica situación refieren otros autores como Luo y col. (2014) con *L. plantarum* (NR_042394.1), Iglesias y col. (2017) con *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 y *L. acidophilus* LA-5 y Yin y col. (2022) con *L. plantarum* 42-3 en fresas frescas

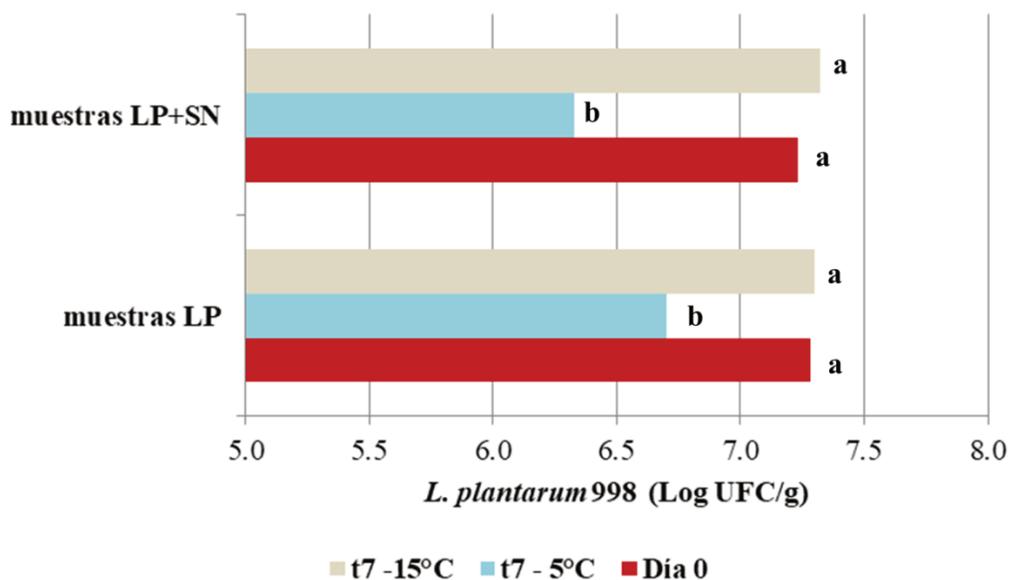


Figura 4.44 Valores de recuento de *L. plantarum* 998 en muestras de manzanas frescas cortadas con (LP+SN) y sin inoculación (LP) con *S. Newport* ITA S12 durante su conservación a 5° C y a 15° C. Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$).

4.6.3 Correlación del comportamiento de *L. plantarum* 998 y *S* Newport ITA S12 *in vitro* y en manzanas frescas cortadas, almacenadas a 5 y a 15°C.

El comportamiento de SN a 5 y a 15°C en cultivos puros y en cocultivo con LP se comparó con el observado en manzanas frescas cortadas (Fig. 4.45). En manzanas sin ningún tratamiento (MP+SN), la reducción de los recuentos de SN luego de 7 días (1.4 log UFC/g) a 5°C superó en 4.6 veces la reducción obtenida en el cultivo control (0,3 log UFC/ml) utilizado para determinar las cinéticas de interacción (Fig. 4.45). La disminución de la carga bacteriana por acción de la baja temperatura podría haberse potenciado en las muestras MP+SN debido al bajo pH natural de las manzanas. Esta condición de la matriz alimentaria, a su vez, pudo haber impedido un mayor aumento de la población de SN a 15°C. Así también, la mayor disponibilidad de nutrientes del medio de cultivo pudo haber favorecido el crecimiento de SN *in vitro*, a la misma temperatura. El aumento en manzanas sin tratamiento (1,2 log UFC/g), correspondió a aproximadamente un tercio del aumento experimentado por el cultivo control (4 log UFC/ml) (Fig. 4.45).

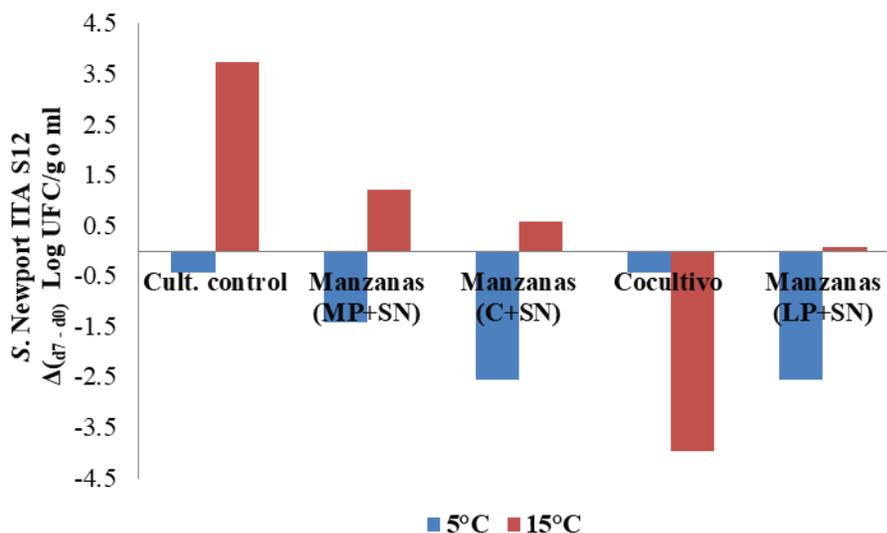


Figura 4.45. Variación de los recuentos de *S. Newport ITA S12*, entre los días 0 y 7 de conservación a 5 y a 15°C, *in vitro* y en muestras de manzanas frescas cortadas

Cuando SN estuvo frente a LP se observó que la reducción de sus recuentos a 5°C resultó mayor en manzanas cortadas (2,6 log UFC/g) que en cocultivo con LP (0,2 log UFC/ml) (Fig 4.45). Frente a esto, es conveniente aclarar que en las muestras de manzanas donde interaccionan SN y LP se adiciona el efecto de la solución antioxidante, necesaria para evitar el pardeamiento y en donde se vehiculiza el lactobacilo para impregnar la fruta. En las manzanas cortadas tratadas con la solución antioxidante pero sin LP (muestras C+SN), la reducción de SN fue de 2,5 log UFC/g. Al restar este efecto (que también incluye el de la matriz alimentaria), se puede observar que la reducción de SN en manzanas tratadas con LP (0,1 log UFC/g) se acerca mucho a la experimentada en cocultivo.

Por otro lado, SN en cocultivo con LP a 15°C, experimentó un descenso de 3,9 log UFC/ml frente al aumento de 0,1 log UFC/g en manzanas LP+SN (Fig. 4.45). Podría decirse que la acción antagonista de LP no tuvo la contundencia del cocultivo pero teniendo en cuenta el aumento de 0,6 log UFC/g en las manzanas C+SN, LP logró impedir un mayor crecimiento de SN en la fruta cortada fresca.

La supervivencia de LP se vio más afectada por el uso de la temperatura de refrigeración en manzanas frescas cortadas que en los ensayos *in vitro* como lo muestran las reducciones de las muestras LP (0,6 log UFC/g) y muestras LP+SN (0,9 log UFC/g) frente a las variaciones del cultivo control y el cocultivo con SN (Fig. 4.46). Al aumentar la temperatura de conservación, el crecimiento de LP *in vitro* con (1,7 log UFC/ml) y sin presencia (1,4 log UFC/ml) de SN, se contrapuso a los aumentos casi inexistentes de los recuentos de LP en manzanas inoculadas (0,1 log UFC/g) o sin inocular (0,02 log UFC/g) con SN (Fig. 4.46).

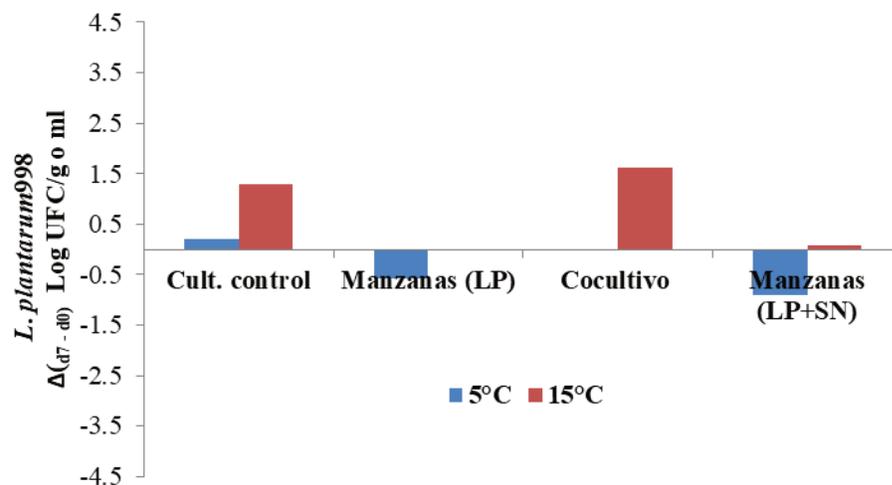


Figura 4.46 Variación de los recuentos de *L. plantarum* 998, entre los días 0 y 7 de conservación a 5°C, *in vitro* y en muestras de manzanas frescas cortadas

Finalmente, si se analiza **el comportamiento conjunto de SN y LP en manzanas**, en conjunto y a lo largo de las experiencias a 5 y a 15° C, se pueden destacar los siguientes aspectos:

-El efecto inhibitor de la solución antioxidante al día 2 fue notorio para las poblaciones de SN y de LP a ambas temperaturas de conservación (Fig. 4.47 y 4.48).

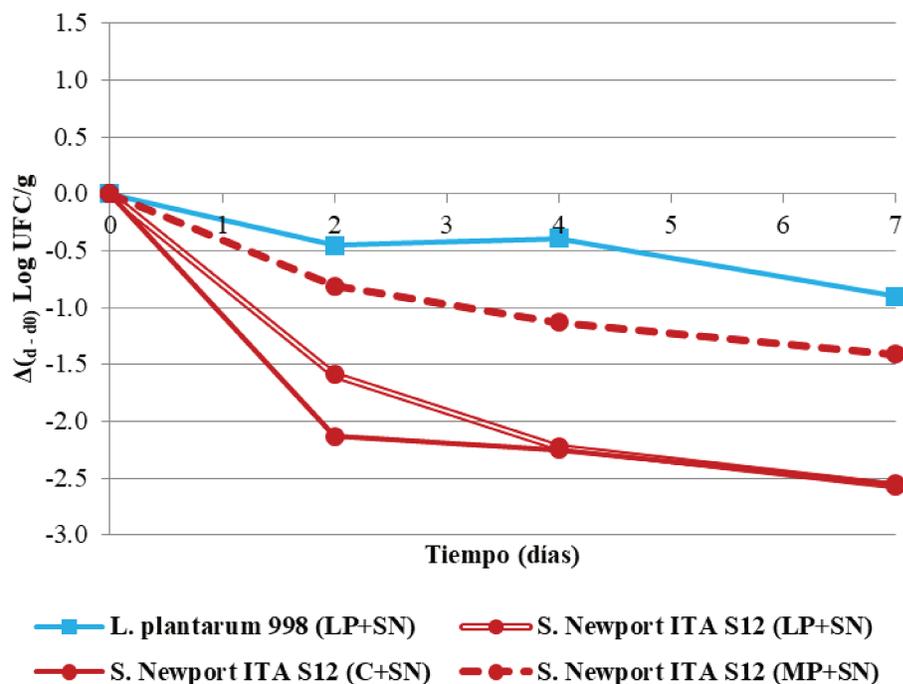


Figura 4.47 Variación de los recuentos de *L. plantarum* 998 y de *S. Newport* ITA S12 para cada día de muestreo con respecto al día cero; en muestras de manzanas frescas cortadas sin ningún tratamiento (MP+SN), con tratamiento antioxidante (C+SN) y con la incorporación de *L. plantarum* 998 (LP+SN), almacenadas a 5°C.

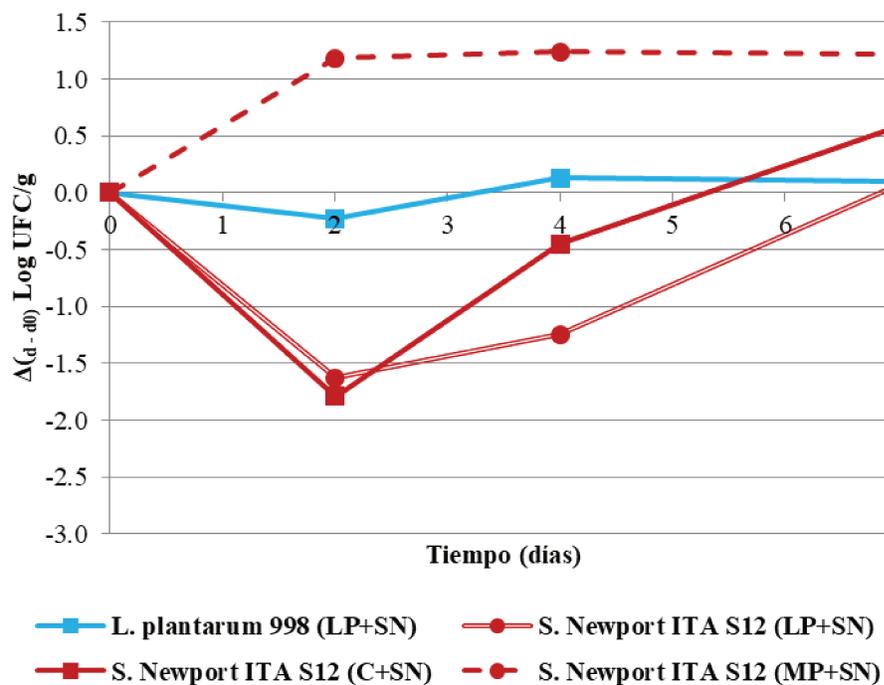


Figura 4.48 Variación de los recuentos de *L. plantarum* 998 y de *S. Newport* ITA S12 para cada día de muestreo con respecto al día cero; en muestras de manzanas frescas cortadas sin ningún tratamiento (MP+SN), con tratamiento antioxidante (C+SN) y con la incorporación de *L. plantarum* 998 (LP+SN), almacenadas a 15°C.

- En el día 4, prevaleció el efecto de la temperatura ya que a 15°C los recuentos tanto de SN como de LP aumentaron salvo SN en las muestras sin ningún tratamiento. El aumento fue mayor en las muestras C+SN que en las LP+SN, lo que marcaría el inicio de la influencia de LP a esta temperatura (Fig. 4.48). A 5°C ocurrieron descensos más graduales de ambas poblaciones (Fig. 4.47).

- Al día 7 a 5°C, continuó el descenso de todas las poblaciones en las muestras a 5°C por efecto de la baja temperatura de conservación (Fig. 4.47). Por otro lado, a 15°C, la tendencia del día 4 se mantuvo en las poblaciones de SN para lograr que la muestra LP+SN prácticamente no superara los niveles iniciales mientras que en las muestras C+SN se superaron en más de 0,5 log UFC/g. La presencia de *L. plantarum* 998 pudo ejercer un efecto antagonista adicional sobre el crecimiento de *S. Newport* ITA S12 según lo analizado a 15°C. Esta situación podría ser relevante para la inocuidad de un alimento fresco, listo para consumir, expuesto a un ligero pero continuo abuso de temperatura que favorecería el desarrollo de algún eventual patógeno que haya podido sortear las condiciones del procesamiento y conservación.

5. CONCLUSIONES

Se demostró la existencia de actividad antagonista *in vitro* por parte de los dos lactobacilos potencialmente probióticos en estudio, *Lactiplantibacillus plantarum* 998 y *Lactocaseibacillus rhamnosus* 64, sobre el crecimiento de tres bacterias indicadoras, relacionadas a la inocuidad de alimentos: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 y *Salmonella* Newport ITA S12. Dicha capacidad se basó principalmente en la producción de compuestos ácidos.

La interacción entre los lactobacilos y las bacterias indicadoras fue estudiada en cocultivos almacenados a 5, 10 y 15°C. Las evoluciones de cada bacteria en cocultivo y cultivo control fueron modeladas, pudiéndose determinar y comparar sus parámetros cinéticos. La temperatura fue el factor determinante para la supervivencia de las distintas poblaciones bacterianas a 5°C, ya que prácticamente no experimentaron variaciones durante el almacenamiento. A medida que aumentó la temperatura (10 y 15°C), las cinéticas de inhibición de las cepas indicadoras presentaron fases de latencia con menor duración, seguidas de fases de inactivación que culminaron en la no detección de las tres bacterias indicadoras a 15°C. La acción antagonista de los lactobacilos en cocultivo resultó menos efectiva sobre *L. monocytogenes* ATCC 15313, la cual desarrolló cinéticas de inhibición de crecimiento antes que cinéticas de inactivación, tal como las desarrolladas principalmente por *E.coli* ATCC 25922 y *Salmonella* Newport ITA S12. Todos estos comportamientos ocurrieron más tempranamente y con mayor frecuencia frente a *L. plantarum* 998. *Salmonella* Newport ITA S12 fue la bacteria indicadora más rápidamente inactivada por ambos lactobacilos a 10 y 15°C, en particular por *L. plantarum* 998. Aunando estos resultados con el establecimiento de las variables operativas, se decidió utilizar la dupla *L. plantarum* 998 - *Salmonella* Newport ITA S12 para llevar a cabo los ensayos en manzanas frescas cortadas.

El enriquecimiento de manzanas ‘Granny Smith’ frescas cortadas con *L. plantarum* 998 mostró un efecto beneficioso sobre el contenido de compuestos fenólicos, ya que mejoró la retención de los mismos durante el almacenamiento a 5°C, en comparación a las muestras tratadas sólo con solución antioxidante y las que no recibieron ningún tratamiento. Además, las muestras enriquecidas con el lactobacilo almacenadas 7 días a 5°C, presentaron mayor retención de vitamina C, y a 15°C su contenido de vitamina C fue superior al de las muestras tratadas sólo con solución antioxidante y al de las que no recibieron ningún tratamiento. Como consecuencia, las muestras enriquecidas con el *L. plantarum* 998 presentaron mayor capacidad antioxidante que el resto de las muestras luego de 7 días de almacenamiento a 5 y 15°C. Además, las manzanas ‘Granny Smith’ frescas cortadas, con la inclusión de *L. plantarum* 998, presentaron la menor diferencia total del color con respecto a la materia prima luego del almacenamiento a 5 y a 15°C.

L. plantarum 998 pudo sobrevivir en manzanas frescas cortadas almacenadas a 5 y a 15°C durante 7 días, con mínima variación de sus niveles y ejerciendo un mayor efecto inhibitorio sobre la carga de microorganismos psicrotrofos que sobre la de aerobios mesófilos totales y mohos y levaduras.

Durante la conservación a 5°C, en presencia de *L. plantarum* 998, *Salmonella* Newport ITA S12 redujo su población en las muestras de manzanas en la misma magnitud que en las muestras tratadas sólo con la solución antioxidante. Sin embargo, a 15°C, los niveles de *Salmonella* Newport ITA S12 no sobrepasaron su carga original, situación que sí sucedió en las demás muestras no enriquecidas con el lactobacilo.

Estos resultados promueven la incorporación de *L. plantarum* 998 en frutas mínimamente procesadas como una excelente opción de bioconservación a sumarse en el procesamiento. Además de su potencial acción probiótica ya establecida, durante la conservación refrigerada incrementaría el potencial saludable de las manzanas a través del aumento en la matriz alimentaria de compuestos

fenólicos con una importante actividad antioxidante. A la vez, podría moderar el crecimiento de la microbiota no deseable y contribuir a mantener la inocuidad del alimento, especialmente ante abusos de temperatura.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADROGUÉ C. Y ORLICKI (2018). Factores relacionados al consumo de frutas y verduras en base a la Encuesta Nacional de Factores de Riesgo en Argentina. *Rev. Pilquen. Secc. Cienc. Soc.* vol.22 no.3 Viedma.
- AGUILAR C. y KLOTZ B. (2010). Effect of the temperature on the antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Safety* 30 (4) p.996 – 1015. DOI: 10.1111/j.1745-4565.2010.00257.x
- ALAKOMI, H. L., SKYTTÄ, E., SAARELA, M., MATTILA-SANDHOLM, T., LATVA-KALA, K., HELANDER, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2001-2005.
- ALEGBELEYE O., SINGLETON I., SANT'ANA A. S. (2018). Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiology* 73 (2018) 177e208. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.003>
- ALEGRE I., ABADIAS M., ANGUERA M., OLIVEIRA M. y VIÑAS I. (2010a). Factors affecting growth of foodborne pathogens on minimally processed apples. *Food Microbiology* 27 (2010) 70–76. doi:10.1016/j.fm.2009.08.005
- ALEGRE I., ABADIAS M., ANGUERA M., USSALL J. y VIÑAS I. (2010b). Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Listeria innocua* on minimally-processed peaches under different storage conditions. *Food Microbiology* 27 (2010) 862e868. doi:10.1016/j.fm.2010.05.008
- ALEGRE I., VIÑAS I., USALL J., ANGUERA M. y ABADÍAS M. (2011). Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Microbiology*, 28 (2011) 59-66. DOI:10.1016/j.fm.2010.08.006
- ALEGRE I., VIÑAS I., USALL J., ANGUERA M., ALTISENT R. Y ABADIAS M. (2013). Antagonistic effect of *Pseudomonas graminis* CPA-7 against foodborne pathogens in fresh-cut apples under simulated commercial conditions. *Food Microbiology* 33 (2013). <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.007>
- ALEGRE VILAS, I., ABADIAS SERÓ, M., COLÁS MEDÀ, P., COLLAZO CORDERO, C. Y VIÑAS ALMENAR, I. (2020). Bioconservación frente a patógenos de transmisión alimentaria en frutas y hortalizas mínimamente procesadas. *Arbor*, 196 (795): a543. <https://doi.org/10.3989/arbor.2020.795n1007>
- ALTISENT R., PLAZA L., ALEGRE I., VIÑAS I., ABADIAS M. (2014) Comparative study of improved vs. traditional apple cultivars and their aptitude to be minimally processed as ‘ready to eat’ Apple Wedges. *Food Science and Technology* 58 (2014) 541e549
- AMRUTHA B., SUNDAR K. Y HALADY SHETTY P. (2017) Effect of organic acids on biofilm formation and quorum signaling of pathogens from fresh fruits and vegetables. *Microbial Pathogenesis* 111 (2017) 156-162. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.042>
- ARENAS M., SILVAIN A., NORMANNO G., GRIECO F., DRIDER D., SPANO G. y FIOCCO D. (2016). Use of *Lactobacillus plantarum* as a biocontrol strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Frontiers in Microbiology* Art 464. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00464>

- ARMACHIUS J. y YOUSHEG W. (2019). Characterization, health benefits and applications of fruits and vegetable probiotics. *CyTA – Journal of Food*, 17:1, 770-780. DOI:10.1080/19476337.2019.1652693.
- ARRIOJA-BRETÓN D., MANI-LÓPEZ E., PALOU E. y LÓPEZ-MALO A. (2020). Actividad antimicrobiana y estabilidad de almacenamiento de sobrenadantes libres de células de bacterias del ácido láctico y sus aplicaciones en carne fresca. *Food Control* Volumen115- septiembre 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107286>
- ARTÉS, F., ALLENDE, A. (2014). Minimal processing of fresh fruit, vegetables, and juices. *Emerg. Technol. Food Process.* 583-597. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411479-1.00031-0>
- ARUMUGAM M., RAES J., PELLETIER E. y col. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174–180 (2011). <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- BALAGOPAL AMRUTHA, KOTHANDAPANI SUNDAR Y PRATHAPKUMAR HALADY SHETTY (2017) Study on E. coli and Salmonella biofilms from fresh fruits and vegetables. *J Food Sci Technol* (April 2017) 54(5):1091–1097. DOI 10.1007/s13197-017-2555-2
- BALALI G., YAR D., DELA V. y ADJEI-KUSI P. (2020). Microbial contamination, an increasing threat to the consumption of fresh fruits and vegetables in today's world. Review Article. *International Journal of Microbiology*. Article ID 3029295. <https://doi.org/10.1155/2020/3029295>
- BARANYI J., ROBERTS T.A. (1994) A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*. 23 (1994) 277-294.
- BARANYI J., TAMPLIN M.L. (2004) ComBase: A Common Database on Microbial Responses to Food Environments. *Journal of Food Protection* 67 (9) 1967-1971. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.9.1967>
- BEN SAID L., GAUDREAU H., DALLAIRE L., TESSIER M. y FLISS I. (2019). Bioprotective Culture: A New Generation of Food Additives for the Preservation of Food Quality and Safety. *Industrial Biotechnology* 15(3) 138-147. DOI: 10.1089/ind.2019.29175.lbs
- BOYLSTON, T. D., VINDEROLA, C. G., GHODDUSI, H. B., & REINHEIMER, J.A. (2004). Incorporation of Bifidobacteria into cheeses: Challenges and rewards. *International Dairy Journal*, 14, 375-387. DOI: 10.1016/j.idairyj.2003.08.008
- BOUAYED, J., HOFFMANN, L. Y BOHN, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*. 128: 14-21.
- BOYER, J. y LIU, R.H. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal* 3, 5 (2004). <https://doi.org/10.1186/1475-2891-3-5>
- CANON F, MARIADASSOU M, MAILLARD M-B, FALENTIN H, PARAYRE S, MADEC M-N, VALENCE F, HENRY G, LAROUTE V, DAVERAN-MINGOT M-L, COCAIGN-BOUSQUET M, THIERRY A AND GAGNAIRE V. (2020) Function-Driven Design of Lactic Acid Bacteria Co-cultures to Produce New Fermented Food Associating Milk and Lupin. *Front. Microbiol.* 11:584163. doi: 10.3389/fmicb.2020.584163
- CDC. (2011). The CDC guide to strategies to increase the consumption of fruits and vegetables. <https://www.cdc.gov/obesity/downloads/strategies-fruits-and-vegetables.pdf>

- CDC. (2018). *National Outbreak Reporting System (NORS)*. <https://www.cdc.gov/norsdashboard/>
- CALIX-LARA T., RAJENDRAN M., TALCOTT S., SMITH S., MILLER R., CASTILLO A., STURINO J. Y TAYLOR M. (2014). Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on spinach and identification of antimicrobial substances produced by a commercial Lactic Acid Bacteria food safety intervention. *Food Microbiology*. 38: 192-200. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.006>
- CALLEJÓN R. M., RODRÍGUEZ-NARANJO M. I., UBEDA C., HORNEDO-ORTEGA R., GARCÍA 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. DOI: 10.1089/fpd.2014.1821.
- CARRIEL J. M., OBREBSKA A., BRU-MARTÍNEZ R., CARRANZA PATIÑO M., PICO-SALTOS R. Y NIETO RODRIGUEZ E. (2014). Distribución, localización e inhibidores de las polifenol oxidasas en frutos y vegetales usados como alimento. *Ciencia y Tecnología*. UTEQ. Quevedo-Ecuador. 2014, 7(1): 23-31. doi:10.18779/cyt.v7i1.95
- CASTRO ACOSTA M. L. (2019). Polifenoles: compuestos bioactivos con efectos benéficos en la prevención de diabetes tipo 2. *Revista digital RED CieN* Vol. 1, número 3, enero-junio, 2019
- CASTRO I., GIL M. I. y ALLENDE A. (2016) Ready-to-eat vegetables: Current problems and potential solutions to reduce microbial risk in the production chain. *LWT – Food Science and Technology* 85 (2017) 284-292. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.11.073
- CHEN L., WEN-JIAO X., HAO D., CHAO A., SAI-JIAN M. y YAO L. (2022). Probiotic Potential of Lactobacillus Strains Isolated From Fermented Vegetables in Shaanxi, China. *Frontiers in Microbiology* . February 2022 | Volume 12 | Article 774903. doi: 10.3389/fmicb.2021.774903
- CISNEROS-ZEVALLOS, L.Y JACOBO-VELAZQUEZ, D. A. (2020). Controlled abiotic stresses revisited: from homeostasis through hormesis to extreme stresses and the impact on nutraceuticals and quality during pre- and postharvest applications in horticultural crops. *J. Agric. Food Chem.* 68, 11877–11879. doi:10.1021/acs.jafc.0c06029
- COMMISSO, M.; BIANCONI, M.; POLETTI, S.; NEGRI, S.; MUNARI, F.; CEOLDO, S.Y GUZZO, F. (2021). Metabolomic Profiling and Antioxidant Activity of Fruits Representing Diverse Apple and Pear Cultivars. *Biology* 2021, 10, 380. <https://doi.org/10.3390/biology10050380>
- CORTEZ J., FAICAN M., PIROVANI M. y PIAGENTINI A. (2018) Determinación de polifenoles en frutas con vitamina C incorporada: Metodología para mejorar la especificidad del ensayo de Folin-Ciocalteu. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 19 (2). ISSN (online) 1665-0204. Asociación Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, S.C., México. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81357541002>
- CORREIA PERES COSTA J. C., BOLIVAR A., VALERO A., CARRASCO E., ZURERA G.Y PEREZ-RODRIGUEZ F. (2020). Evaluation of the effect of *Lactobacillus sakei* strain L115 on *Listeria monocytogenes* at different conditions of temperature by using predictive interaction models. *Food Research International* 131 (2020) 108928. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108928>
- CRIM S., CHAI S., KARP B., JUDD M., REYNOLDS J., SWANSON K. C. 1, NISLER A., MCCULLOUGH A. Y GOULD L. (2018). *Salmonella enterica* serotype Newport infections in the United States, 2004–2013: increased incidence investigated through four surveillance systems. *Foodborne Pathog Dis.* 15(10): 612–620. doi:10.1089/fpd.2018.2450

- D'AOUST J. Y. (1993). Psychrotrophy and foodborne Salmonella. *International Journal of Food Microbiology*, 13 (1993) 207-216
- DE CORATO U. (2019): Improving the shelf-life and quality of fresh and minimally-processed fruits and vegetables for a modern food industry: A comprehensive critical review from the traditional technologies into the most promising advancements, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, DOI: 10.1080/10408398.2018.1553025
- DE AZEREDO G., MONTENEGRO STAMFORD T. L., CAMPOS NUNES P., GOMES NETO N. J., GOMES DE OLIVEIRA M. E., LEITE DE SOUZA E. (2011). Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International* 44 (2011) 1541-1548.doi:10.1016/j.foodres.2011.04.012
- DERRINGER G AND SUICH R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology* 12(4): 214–219.
- DINEV T., BEEV G., TZANOVA M., DENEV S., DERMENDZHIEVA D. y STOYANOVA A (2017). Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic and food spoilage microorganisms: a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 2017. ISSN 1311-1477; DOI: 10.15547/bjvm.1084
- DOBREVA L., DANOVA S., GEORGIEVA V., GEORGIEVA S. y KOPRINAROVA M. (2020). Anti-*Salmonella* activity of lactobacilli from different habitats. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 2020. ISSN 1311-1477; DOI: 10.15547/bjvm.2395
- DOKKA A., REDDY Y., SPOORTHY G.S. y SANKARA REDDY I. (2018). Protective Cultures - A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7(6): 228-238. ISSN: 2319-7706. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.706.028>
- DOORES S. (1983). The microbiology of apple and apple products. *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition* 19 (12) 133-149. DOI: 10.1080/10408398309527372
- DYDA A., NGUYEN P., CHUGHTAI A. Y MACINTYRE C. (2020). Changing epidemiology of *Salmonella* outbreaks associated with cucumbers and other fruits and vegetables. *Global Biosecurity*, 1(3).
- EFSA and ECDC - European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2019).The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. DOI: 10.2903/j.efsa.2019.5926
- FAO. (2018). FAO-WHO fruit and vegetable for health initiative (PROFAV/PROFEL). <https://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/hort-indust-crops/fao-who-fruit-and-vegetable-for-health-initiative-profavprofel/en/>
- FERRANDO V., QUIBERONI A., REINHEIMER J. Y SUÁREZ V. (2016). Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains: A study in vitro of heat stress influence. *Food Microbiology* 54 (2016) 154-161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.003>
- FUFA D. (2021) Novel Approach to Enhance the Shelf Life of Fresh Cut Fruits and Vegetables: a Review. *J Food Process Technol.* 12: 891.
- GAGGIA F., DI GIOIA D., BAFFONI L Y BIAVATTI B (2011). The rol of protective and probiotics cultures in food and feed and their impact in food safety. *Trends in Food Science & Technology* 22 (2011) S58 - S66. DOI:10.1016/j.tifs.2011.03.003

- GÁLVEZ A., PÉREZ PULIDO R., HIKMATE A., BENOMAR N. y GRANDE BURGOS M. J. (2012). Section 3: Biological Decontamination Strategies. Chapter 17: Protective Cultures. En *Decontamination of Fresh and Minimally Processed Produce*. Editado por Vicente M. Gómez-López. ISBN 978-0-8138-2384-3.
- GIL M. I. Y ALLENDE A. (2012) Capítulo 6: Minimal processing. *Decontamination of Fresh and Minimally Processed Produce*. Editado por Vicente M. Gómez-López. Publicado por John Wiley & Sons, Inc. ISBN-13: 978-0-8138-2384-3/2012
- GUO S., GUAN L., CAO Y., LI C., CHEN J., LI J., LIU G. Y LI S. Y WU B.(2016). Diversity of polyphenols in the peel of apple (*Malus* sp.) germplasm from different countries of origin. *International Journal of Food Science and Technology* 2016, 51, 222–230. doi:10.1111/ijfs.12994
- GREGORET V., PEREZLINDO M., VINDEROLA G., REINHEIMER J. Y BINETTI A. (2013). A comprehensive approach to determine the probiotic potential of human-derived lactobacillus for industrial use. *Food Microbiology* 34 (2013) 19-28.<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.11.004>
- HE Y., CHEN R., QI Y., SALAZAR J. K., ZHANG S., TORTORELLO M., DENG X. y ZHANG W. (2021). Survival and transcriptomic response of *Salmonella enterica* on fresh-cut fruits. *International Journal of Food Microbiology* 348 (2021) 109201. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109201>
- HILL, C., GUARNER, F., REID, G., GIBSON, G. R., MERENSTEIN, D. J., POT, B., MORELLI, L., CANANI, R. B., FLINT, H.J., SALMINEN, S., CALDER, P.C. y SANDERS, M. E. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, **11**(8), 506-514. DOI:10.1038/nrgastro.2014.66
- HORN, G., HOFWEBER, R., KREMER, W. y KALBITZER, H.R. (2007). Structure and function of bacterial cold shock proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1457–1470.
- HOSSAIN I., SADEKUZZAMAN M. y HA S. (2017) Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: A review. *Food Research International* 100 (2017) 63-73.<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.077>
- HU W., SARENGAOWA, GUAN Y. Y FENG K. (2022). Biosynthesis of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Fresh-Cut Fruits and Vegetables. *Frontiers Microbiology, Food Microbiology*. <https://internal-journal.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.906069/full>
- IBRAHIM, S.A.; AYIVI, R.D.; ZIMMERMAN, T.; SIDDIQUI, S.A.; ALTEMIMI, A.B.; FIDAN, H.; ESATBEYOGLU, T.; BAKHSHAYESH, R.V. (2021) Lactic Acid Bacteria as Antimicrobial Agents: Food Safety and Microbial Food Spoilage Prevention. *Foods* 2021, 10, 3131. <https://doi.org/10.3390/foods10123131>
- ICHWAN M., WALKER T. L., NICOLA Z., LUDWIG-MULLER J., BOTTCHE C., OVERALL R. W., ADUSUMILLI V., BULUT M., SYKES A. M., HUBNER N., RAMIREZ-RODRIGUEZ G., ORTIZ-LÓPEZ L., LUGO-HERNANDEZ E Y KEMPERMANN G. (2021). Apple Peel and Flesh Contain Pro-neurogenic Compounds. *Stem Cell Reports* j Vol. 16 j 548–565 j March 9, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.01.005>

- ICMSF International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1996) *Microorganisms in Foods 5, Microbiological Specifications of Food Pathogens*. Ed. Blackie Academic & Professional. Londres, Reino Unido. ISBN 0-412-47350-X.
- ICMSF International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1998). *Microorganismos de los Alimentos 6. Ecología Microbiana de los Productos Alimentarios*". Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- IGLESIAS M. B., ABADÍAS M., ANGUERA M., SABAT A. J. y VIÑAS I.(2017). Antagonistic effect of probiotic bacteria against foodborne pathogens on fresh-cut pear. *LWT Food Science and Technology* 81 (2017) 243-249. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.057>
- INOCENTE-QUIROZ F. E., ECCOÑA-SOTA A. Y SILVA-PAZ R. J. (2021). Alimentos mínimamente procesados: generalidades, procesamiento, consumo y cambios físicos, químicos y biológicos. *Agroind. Sci.* 11(1): 117 - 126 (2021). DOI: <http://dx.doi.org/10.17268/agroind.sci.2021.01.14>
- IWU C. D. Y OKOH A. I. (2019). Preharvest transmission routes of fresh produce associated bacterial pathogens with outbreak potentials: a review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2019, 16, 4407; doi: 10.3390/ijerph16224407
- JOSHI H. (2022). Screening of *Lactobacillus rhamnosus* CM19 for probiotic attributes. *International Journal of Progressive Research in Science and Engineering*, vol.3, n°.02. ISSN (Online): 2582-7898; SJIF: 5.59
- JIMÉNEZ S., ARCHELASQUI R., SALSI M. S., TIBURZI M.C., MOGUILVSKY M. A.Y PIROVANI M.E. (2015). Assessment of fate of argentinean *Salmonella* serotypes studied under different conditions of growing factors. *Journal of Virology & Microbiology*. IBIMA Publishing. Art. ID 985090. 16 pag. DOI: 10.5171/2015.985090
- KARIMI, R., MORTAZAVIAN, A.M. y DA CRUZ, A.G. (2011). Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy Science & Technol.* 91, 283–308 (2011). <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0005-x>
- KOREN O., KNIGHTS D., GONZALEZ A., WALDRON L., SEGATA N., KNIGHT R., HUTTENHOWER C.y LEY R. (2013). A Guide to Enterotypes across the Human Body: Meta-Analysis of Microbial Community Structures in Human Microbiome Datasets. *PLOS Computational Biology* 9(1): e1002863. DOI:10.1371/journal.pcbi.1002863
- KRISCH J. y VUCSETA K. (2018). Antioxidant properties of different apple cultivars. *Review on Agriculture and Rural Development* 2018 vol. 7 (1-2) ISSN 2063-4803
- KUMAR, P., SETHI, S., SHARMA, R.R (2018) Caracterización nutricional de la manzana en función del genotipo. *J Food Sci Technol* **55**, 2729–2738 (2018). <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3195-x>
- KUMAR A., KUNDU S. y DEBNATH M. (2018). Effects of the probiotics *Lactococcus lactis* (MTCC-440) on *Salmonella* enteric serovar Typhi in co-culture study. *Microbial Pathogenesis*. Vol 120, Julio 2018, 42-46. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.045>
- LAURILA E. y AHVENAINEN R. (2002). Chapter 9: Minimal processing in practice: fresh fruits and vegetables. En Ohlsson T. y Bengtsson N (Ed.) *Minimal processing technologies in the food industry* (pp227). Abington Cambridge CB1 6AH, Reino Unido CRC Press. ISBN 0-8493-1454-2.
- LAVARI L., BURNS P., PÁEZ R., REINHEIMER J. Y VINDEROLA G. (2017). Study of the effects of spray drying in whey-starch on the probiotic capacity of *Lactobacillus rhamnosus* 64 in

the gut of mice. *Journal of Applied Microbiology* 123 (2017) 992-1002.
<https://doi.org/10.1111/jam.13567>

-LEVERENTZ, B., W. CONWAY, Z. ALAVIDZE, W. JANISIEWICZ, Y. FUCHS, M. CAMP, E. CHIGHLADZE, Y A. SULAKVELIDZE. (2001). Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. *Journal of Food Protection*. 64(8): 1116-1121.

-LEVERENTZ, B., W. CONWAY, M. CAMP, W. JANISIEWICZ, T. ABULADZE, M. YANG, R. SAFTNER, Y A. SULAKVELIDZE. (2003). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut product by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(8): 4519-4526.

-LIMOLI, D. H., JONES, C. J., y WOZNIAK, D. J. (2015). Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiology Spectrum*, 3(3).
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014>, 10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014

-LU S., LUO Y., TURNER E. Y FENG H. Efficacy of sodium chlorite as an inhibitor of enzymatic browning in apple slices. *Food Chemistry* 104 (2007) 824-829.
doi:10.1016/j.foodchem.2006.12.050

-LUNADEI, L.; GALLEGUILLOS P.; DIEZMA IGLESIAS B. y LLEÓ GARCÍA, L. (2010). *Evaluation of enzymatic browning in fresh-cut apple slices applying a multispectral vision system*. En: "International Conference on Agricultural Engineering. AgEng 2010. Towards Environmental Technologies", 06/09/2010 - 08/09/2010, Clermont-Ferrand, Francia.

-LUO W., CHEN M., CHEN A., DONG W., HOU X.Y PU B. (2014). Isolation of lactic acid bacteria from pao cai, a Chinese traditional fermented vegetable, with inhibitory activity against *Salmonella* associated with fresh cut apple, using modeling study. *Journal of Applied Microbiology* 118(4). doi: 10.1111/jam.12741

-MACHADO-MOREIRA, B., RICHARDS K. , BRENNAN F., ABRAM F. Y BURGESS C. (2019) Microbial Contamination of Fresh Produce: What, Where, and How?. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. doi: 10.1111/1541-4337.12487

-MALDONADE I. R., CORTEZ GINANI V., FIGUEIREDO RESENDE RIQUETTE V., GURGEL-GONÇALVES R., SILVEIRA MENDES V.Y RODRIGUES MACHADO E. (2018). Good manufacturing practices of minimally processed vegetables reduce contamination with pathogenic microorganisms. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2019; 61:e14.
<http://doi.org/10.1590/S1678-9946201961014>

-MARTÍN, I.; RODRÍGUEZ, A.; DELGADO, J.; CÓRDOBA, J.J. (2022) Strategies for Biocontrol of *Listeria monocytogenes* Using Lactic Acid Bacteria and Their Metabolites in Ready-to-Eat Meat and Dairy-Ripened Products. *Foods* (2022).11, 542. <https://doi.org/10.3390/foods11040542>

-MARTIN-VISSCHER, L., S. YOGANATHAN, C. SIT, C. LOHANS, AND J. VEDERAS. (2011). The activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against g-negative bacteria in combination with EDTA treatment. *Federation of European Microbiological Society (FEMS) Microbiology Letters*. 317(2): 152-159.

-MEIRELES A., GIAOURIS E. y SIMOES M. (2016). Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry. *Food Research International*, 82, 71- 85.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.021>

- MENDOZA I. C., ORTIZ LUNA E. , DREHER POZO M., VILLAVICENCIO VASQUEZ M, COELLO MONTOYA D., CHUCHUCA MORAN G., GALARZA ROMERO L., YÉPEZ X., SALAZAR R., ROMERO-PEÑA Y LEÓN J. C (2022). Conventional and non-conventional disinfection methods to prevent microbial contamination in minimally processed fruits and vegetables. *LWT - Food Science and Technology* 165 (2022) 113714. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113714>
- MILLER L. y KASPAR C. (1994). *Escherichia coli* 0157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *Journal of Food Protection* 57(6) 460-464.
- MOSTAFIDI M., SANJABI M. R., SHIRKHAN F.y ZAHEDI M. T. (2020). A review of recent trends in the development of the microbial safety of fruits and vegetables. *Trends in Food Science & Technology* 103 (2020) 321–332. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.009>
- MRITUNJAY, S. K., y KUMAR, V. (2015). Fresh farm produce as a source of pathogens: A review. In *Research journal of environmental toxicology* (Vol. 9, pp. 59–70). <https://doi.org/10.3923/rjet.2015.59.70>, 2.
- MURRAY K., WU F., SHI J., JUN XUE S.y WARRINER K. (2017). Challenges in the microbiological food safety of fresh produce: Limitations of post-harvest washing and the need for alternative interventions. (2017). *Food Quality and Safety*, 1(4), 289–301 doi:10.1093/fqsafe/fyx027
- NAKAYAMA J., WATANABE K., JIANG J., MATSUDA K., CHAO S-H., HARYONO P., LA-ONGKHAM O., SARWOKO M-A., NENGAH SUJAYA I., ZHAO L., CHEN K.-T., CHEN Y-P., CHIU H-H., HIDAKA T., HUANG N- X., KIYOHARA CH., KURAKAWA T., SAKAMOTO N., SONOMOTO K., TASHIRO K., TSUJI H., CHEN M-J., LEELAVATCHARAMAS V., LIAO CH-CH., NITISINPRASERT S., RAHAYU E., REN F-Z., TSAI Y-CH. Y LEE Y-K. (2015). Diversity in gut bacterial community of school-age children in Asia. *Scientific Reports* 5: 8397. DOI: 10.1038/srep08397
- NARDI, R.D., SANTOS, A.R.M., CARVALHO, M.A.R., FARIAS, L.M., BENCHETRIT, L.C. y NICOLI, J.R.(1999). Antagonism against anaerobic and facultative bacteria through a diffusible inhibitory compound produced by a *Lactobacillus* sp. isolated from the rat fecal microbiota. *Anaerobe* 5: 409-411.
- NIEUWENHUIJSEN M. J., TOLEDANO M. B., ELLIOTT P. (2000) Uptake of chlorination disinfection byproducts; a review and a discussion of its implications for exposure assessment in epidemiological studies. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*. 2000;10: 586-599. DOI: 10.1038/sj.jea.7500139
- NOHA K., NASSRA D., EL-ZINEY, M. Y KHEADR, E.(2021). Food Bio-Preservation: An Overview with Particular Attention to *Lactobacillus plantarum*. *Alex. J. Fd. Sci. & Technol.* Vol. 18, No. 1, pp. 33-50, 2021
- OLAIMAT A. N. Y HOLLEY R. A. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiology* 32 (2012) 1e19. doi:10.1016/j.fm.2012.04.016
- OLDAK K, ZIELINSKA D., RZEPKOWSKA A. y KOTOZYN – KRAJEWSKA A. (2017). Comparison of Antibacterial Activity of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Two Different Kinds of Regional Cheeses from Poland: Oscypek and Korycinski Cheese. *Hindawi BioMed Research International* Vol. 2017, Article ID 6820369, 10 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/6820369>

- OLIVEIRA, M., USALL, J., SOLSONA, C., ALEGRE, I., VIÑAS, I., ABADIAS, M. (2015). Effects of packaging type and storage temperature on the growth of foodborne pathogens on shredded 'Romaine' lettuce. *Food Microbiol.* 27, 375-380. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.014>
- ORTIZ S. G., DUVERNE L.B., LÓPEZ O. C., RAFFELLINI S. y MANS M. C. (2014). Efecto de cultivos lácticos sobre el desarrollo a bajas temperaturas de microorganismos causantes de ETA. *Rev. Cienc. Tecnol.* Año 16 / N° 21 / 2014 / 27-32.
- 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.
- PARK S-H., CHOI M-R., PARK J-W., PARK K-H., CHUNG M-S., RYU S.Y KANG D-H (2011). Use of organic acids to inactivate *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh apples and lettuce. *Journal of Food Science*. Vol. 76, Nr. 6, 2011 . doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02205.x
- PEHRSON, M. E. S. F., MANCILHA, I. M. y PEREIRA, C. A. S. (2015). Antimicrobial activity of probiotic *Lactobacillus* strains towards gram-negative enteropathogens. *European International Journal of Science and Technology* Vol. 4 No. 3. ISSN: 2304-9693
- PIAGENTINI A.Y PIROVANI M.E. (2017) Total Phenolics Content, Antioxidant Capacity, Physicochemical Attributes, and Browning Susceptibility of Different Apple Cultivars for Minimal Processing, *International Journal of Fruit Science*, 17:1, 102-116, DOI: 10.1080/15538362.2016.1262304
- RODRÍGUEZ ARZUAGA M., SALSÍ M. S., PIAGENTINI A. M. (2016). Efecto del mínimo procesamiento y tratamiento con yerba mate sobre el potencial saludable y los atributos de calidad de manzanas 'Granny Smith'. *INNOTEC*, núm. 12, pp. 7-14, 2016. <https://www.redalyc.org/journal/6061/606163652003/html/>
- PIAGENTINI A.M. y PIROVANI, M.E. (2017). Total phenolic content, antioxidant capacity, physicochemical attributes and browning susceptibility of different apple cultivars for minimal processing. *International Journal of Fruit Science* 1(17), 102-116. ISSN 1553-8362 (impresa), 1553-8621 (online). DOI: 10.1080/15538362.2016.1262304.
- PLESOIANU A. M., NOUR V. TUTULESCU F. y IONICA M. E. (2021) Quality of fresh-cut apples as affected by dip wash treatments with organic acids and acidic electrolyzed water. *Food Sci. Technol*, Campinas, v42, e62620, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.62620>
- QADRI O. S., YOUSUF B.Y SRIVASTAVA A. K. (2015) Fresh-cut fruits and vegetables: Critical factors influencing microbiology and novel approaches to prevent microbial risks—A review, *Cogent Food & Agriculture*, 1:1, 1121606, DOI:10.1080/23311932.2015.1121606
- RADZIK L. y KLEWICKA E. (2021). Mutual influence of polyphenols and *Lactobacillus* spp. bacteria in food: a review. *European Food Research and Technology* (2021) 247:9-24. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03603-y>
- RAMOS, B, MILLER F. A., BRANDÃO T. R. S., TEIXEIRA P., SILVA C. L. M. (2013) Fresh fruits and vegetables—An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (2013). <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.002>

- RANADHEERA, R. D. C. S., BAINES, S. K. y ADAMS, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International* 43 (2010) 1–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.009>.
- RÖBLE C., AUTY M. A., BRUNTON N., GORMLEY R. T. Y BUTLER F. (2010a). Evaluation of fresh-cut apple slices enriched with probiotic bacteria. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11 (2010) 203–209. doi:10.1016/j.ifset.2009.08.016
- ROBLE C., BRUNTON N., GORMLEY R., ROSS P.R., BUTLER F. (2010b). Development of potentially synbiotic fresh-cut apple slices. *Journal of Functional Foods* 2. (2010b) 245-246. doi:10.1016/j.jff.2010.09.001
- RODRÍGUEZ ARZUAGA M., GÜEMES D., BENAVIDES M., RIVAS M., PIROVANI M., PIAGENTINI A. (2013). Evaluación preliminar del efecto del tratamiento químico sobre atributos fisicoquímicos, sensoriales y bioactivos de manzanas frescas cortadas. *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha* Vol 14(2):223-229
- RODRÍGUEZ ARZUAGA M, SALSÍ, M. S. y PIAGENTINI, A. M. (2016) Efecto del mínimo procesamiento y tratamiento con yerba mate sobre el potencial saludable y los atributos de calidad de manzanas 'Granny Smith'. *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay*. INNOTEC 2016, No. 12 (7 - 14). ISSN 1688-6593
- RODRÍGUEZ-ARZUAGA, M.; PIAGENTINI, A. M. (2018). New antioxidant treatment with yerba mate (*Ilex paraguariensis*) infusion for fresh-cut apples: modeling, optimization and acceptability. *Food Science and Technology International* 24 (3) 223-231. ISSN: 1082-0132, Online ISSN: 1532-1738. DOI [10.1177/1082013217744424](https://doi.org/10.1177/1082013217744424)
- ROLDÁN M.L., OTERO J.L., VILLARREAL F., BARONI M. R., CARRASCO M. S., ÁLVAREZ C., RUSSELL-WHITE K., MÉNDEZ E., SIMONETTA A. C. (2011) Efecto inhibidor de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157:H7. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2011; 31:37-41
- ROSSI F. G. (2016) The use of lactic acid bacteria to control the growth of foodborne pathogens on fresh-cut fruits and sprout vegetables. *Tesis presentada a la Facultad de la Universidad Estatal Politécnica de California, San Luis Obispo*. Disponible en <https://digitalcommons.calpoly.edu/theses/1559/>
- RUSSO P., DE CHIARA M., VERNILE A., AMODIO M. L., ARENA M. P., CAPOZZI V., MASSA S. y SPANO G. (2014). Fresh-cut pineapple as a new carrier of probiotic lactic acid bacteria. *BioMed Research International*. Vol 2014. Article 309183. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/309183>
- SADEGHI M. PANAH B., MAZLUMI A., HEJAZI M. A., ALI KOMI D. E. y NAMI Y. (2022). Screening of potential probiotic lactic acid bacteria with antimicrobial properties and selection of superior bacteria for application as biocontrol using machine learning models. *LWT - Food Science and Technology* 162 (2022) 113471. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113471>
- SAHU G., PARADKAR V. Y KUMAR R. (2019). Effect of anti-browning solutions on quality of fresh-cut apple slice. *International Journal of Chemical Studies* 2019; 7(1): 602-607.
- SAMANJE J. y KILIÇ A. O. (2020). Antimicrobial Action of isolated Probiotic *Lactobacillus plantarum* from Different Fermented Dairy Products from Trabzon City. *Research J. Pharm. and Tech* 2020; 13(5):2445-2451. DOI: 10.5958/0974-360X.2020.00438.2

- 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 Res. Int.* 2018, 104, 86–99.
- SHENG L., EDWARDS K., TSAI H.-CH., HANRAHAN I. y ZHU M.-J. (2017). Fate of *Listeria monocytogenes* on fresh apples under different storage temperatures. *Frontiers in Microbiology*. Vol.8 - Art. 1396. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01396>
- SHENG L. y ZHU M.J. (2021) Practical in-storage interventions to control foodborne pathogens on fresh produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2021; 20:4584–4611. DOI: 10.1111/1541-4337.12786
- SHI S, QI Z, SHENG T, TU J, SHAO Y, QI K. (2019). Antagonistic trait of *Lactobacillus reuteri* S5 against *Salmonella enteritidis* and assessment of its potential probiotic characteristics, *Microbial Pathogenesis* (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103773>.
- SINGH V. P. (2018). Recent approaches in food bio-preservation. *Open Veterinary Journal* 8(1):104-111. ISSN: 2226-4485 (Print) ISSN: 2218-6050 (Online). DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ovj.v8i1.16>
- SIROLI L., PATRIGNANI F., SERRAZANETTI D., VANNINI L., SALVETTI E., TORRIANI S., FAUSTO GARDINI F. 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 (2016) 11-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.004>
- SIROLI, L.; PATRIGNANI, F.; SERRAZANETTI, D.I.; TABANELLI, G.; MONTANARI, C.; GARDINI, F. (2015) Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce. *Food Microbiol.* 2015, 47, 74–84.
- SOCCOL C. R., VANDENBERGHE L. P., SPIER M. R., MEDEIROS A. B., YAMAGUISHI C. T., LINDNER, J. D., PANDEY A. y THOMAS SOCCOL V. (2010). The potential of probiotics. *Food Technology Biotechnology* 48 (4), 413–434.
- SPRICIGO D., BARDINA C., CORTES P. y LLAGOSTERA M. (2013). Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *International Journal of Food Microbiology*. 165(2): 169-174.
- STATISTA (2020). Global production of fresh fruit from 1990 to 2020. Disponible en: <https://www.statista.com/statistics/262266/global-production-of-fresh-fruit/> (Acceso: 25/05/2022)
- SUN Y, WANG D., MA Y., GUAN H., LIANG H.Y ZHAO X. (2019) Elucidating *Escherichia coli* O157:H7 Colonization and Internalization in Cucumbers Using an Inverted Fluorescence Microscope and Hyperspectral Microscopy. *Microorganisms* 2019, 7, 499; doi:10.3390/microorganisms7110499
- SUSLOW T. V. (1997) Postharvest Chlorination- Basic Properties and Key points for Effective Disinfection. University of California: Division of Agriculture and Natural Resources; 1997. p. 8003
- SYBESMA W., KORT R. Y LEE Y- K. (2015). Locally sourced probiotics, the next opportunity for developing countries? *Trends in Biotechnology*, April 2015, 33 (4) 197-200. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.01.002>
- TABASCO R, SANCHEZ-PATAN F, MONAGAS M, BARTOLOME B, VICTORIA MORENO-ARRIBAS M, PELAEZ C, REQUENA T (2011) Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria

and bifidobacteria growth: resistance and metabolism. *Food Microbiol* 28(7):1345–1352. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.005>

-TOURNAS, V. H., HEERES, J., Y BURGESS, L. (2006). Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology*, 23, 684-688. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.01.003>

-TRIPATHI M. K. y GIRI S. K (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods* 9 225–241. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>

-VALENTE G. L. C., ACURCIO L. B., FREITAS L. P. V., NICOLI J. R., SILVA A. M., SOUZA M. R. Y PENNA C. F. A. M. (2019). Short communication: In vitro and in vivo probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* B7 and *Lactobacillus rhamnosus* D1 isolated from Minas artisanal cheese. *J. Dairy Sci.* 102:5957–5961 <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15938>

-VINDEROLA G., CAPELLINI B., VILLARREAL F., SUÁREZ V., QUIBERONI A. y REINHEIMER J. (2008). Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LWT - Food Science and Technology* 41 (2008) 1678-1688. DOI:10.1016/j.lwt.2007.10.008

-WANG, X., OUYANG, Y., LIU, J., ZHU, M., ZHAO, G., BAO, W. Y HU, F. B. (2014). Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ: British Medical Journal*, 349, g4490. <https://doi.org/10.1136/bmj.g4490>

-WANG Y., WU J., LV M., SHAO Z., HUNGWE M., WANG J., BAI X., XIE J., WANG Y. Y GENG W. (2021) Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9:612285. doi: 10.3389/fbioe.2021.612285

-YAN Y., ZHANGA F., CHAIA Z., LIU M., BATTINO M. y MENG X. (2019) Mixed fermentation of blueberry pomace with *L. rhamnosus* GG and *L. plantarum*-1: Enhance the active ingredient, antioxidant activity and health-promoting benefits. *Food and Chemical Toxicology* 131 110541. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.05.049>

-YIN H-B, CHEN CH-H, COLORADO-SUAREZ S. y PATEL J. (2022) Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella entérica* on fresh strawberries with lactic acid bacteria during refrigerated storage. *Foodborne Pathogens and Disease* Volume 19, Number 5. DOI: 10.1089/fpd.2021.0091

-YOON, J. y LEE, S. (2018). Review: Comparison of the effectiveness of decontaminating for fresh fruits and vegetables and related limitations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(18), 3189-3208. DOI: 10.1080/10408398.2017.1354813

-YOUSUF B., DESHI V., OZTURK B. y SIDDIQUI M. W. (2020). Chapter 1: Fresh-cut fruits and vegetables: Quality issues and safety concerns. *Fresh-Cut Fruits and Vegetables. Technologies and Mechanisms for Safety Control*. Academic Press. ISBN 978-0-12-816184-5 <https://doi.org/10.1016/C2017-0-02847-1>

-ZHANG X., ESMAIL G. A, ALZEER A. F., VALAN ARASU M., VIJAYARAGHAVAN P., CHOON CHOI K. y AL-DHABI N. A. (2020). Probiotic characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from cheese and their antibacterial properties against gastrointestinal tract pathogens. *Saudi Journal of Biological Sciences* 27 (2020) 3505–3513. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.022>

- ZHAO, Q.; TANG, S.; FANG, X.; WANG, Z.; JIANG, Y.; GUO, X.; ZHU, J. ZHANG, Y (2021). The effect of *Lactiplantibacillus plantarum* BX62 alone or in combination with chitosan on the qualitative characteristics of fresh-cut apples during cold Storage. *Microorganisms*, 9, 2404. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112404>
- ZHENG J.; WITTOUCK S.; SALVETTI E.; FRANZ C.M.A.P.; HARRIS H.M.B.; MATTARELLI, P.; O'TOOLE, P.W.; POT, B.; VANDAMME, P.; WALTER, J., WATANABE K., WUYTS S., FELIS G. E., MICHAEL G. GÄNZLE M. G.Y LEBEER S. (2020) A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijeirinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020, 70, 2782–2858. DOI 10.1099/ijsem.0.004107
- ZAGO M., FORNASARI M., CARMINATI D., BURNS P., SUÁREZ V., VINDEROLA G., REINHEIMER J. y GIRAFFA G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology* 28 (2011) 1033-1040. DOI:10.1016/j.fm.2011.02.009
- ZAPATA, M Y ROVIROSA A. (2021) La alimentación en la Argentina: una mirada desde distintas aproximaciones: CAPA II: Consumo aparente de alimentos y nutrientes a nivel hogar - 1a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Centro de Estudios sobre Nutrición Infantil - CESNI, 2021. Libro digital, PDF. ISBN 978-987-48306-0-9. <https://cesni-biblioteca.org/archivos/CAPA-2.pdf>