

N°5 – Año 2016

ISSN 2525-1597



UNIVERSIDAD
DE SAN PABLO-T
Tucumán | Argentina

IDITeC

**Instituto de Desarrollo e Innovación Tecnológica
para la Competitividad Territorial**

Revista Científica

Universidad de San Pablo-Tucumán

Tucumán, República Argentina

SELECCIÓN DE CEPAS PARA EL DESARROLLO DE UN CULTIVO INICIADOR APLICABLE A LA ELABORACIÓN DE ALIMENTOS VEGETALES FERMENTADOS

Selection of strains for the development of a starter culture applicable to the manufacture of fermented vegetables

Sáez, G. D.^{1,2}; Flomenbaum, L.¹ y Zárate, G.^{1,2}

¹ Universidad de San Pablo-Tucumán, Av. Solano Vera y Camino a Villa Nougues, San Pablo. ² CERELA - CONICET, Chacabuco 145, San Miguel de Tucumán, Argentina. gzarate@cerela.org.ar

RESUMEN

La fermentación es un proceso biológico de gran importancia para la producción de alimentos, que se ha utilizado históricamente como método de conservación y/o adición a los mismos, de características organolépticas y nutricionales deseables. En las últimas décadas, la fermentación espontánea de los alimentos de manufactura artesanal ha sido reemplazada por procesos biotecnológicos controlados y estandarizados para la producción industrial, con el objetivo de obtener productos más estables y homogéneos que aseguren la calidad de los mismos. En este sentido, las bacterias lácticas son los microorganismos de elección para ser incluidos en la producción de diferentes alimentos fermentados, debido a la gran diversidad de metabolitos que pueden aportar a la materia prima, potenciando propiedades como sabor, aroma y textura o asegurando la inocuidad de los productos obtenidos. Entre los alimentos susceptibles de fermentación láctica, las conservas vegetales representan un nicho importante para el estudio y selección de cepas con propiedades tecnológicas relevantes para la formulación de cultivos iniciadores para este tipo de matrices. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue caracterizar tecnológicamente cepas de bacterias lácticas, previamente aisladas a partir de productos fermentados artesanales a fin de seleccionar las más apropiadas para ser aplicadas a la fermentación de productos vegetales. A tal fin, seis cepas de bacterias lácticas fueron identificadas por secuenciación del gen ARNr16S y se evaluaron propiedades tecnológicas relevantes para la elaboración de encurtidos: crecimiento en presencia de NaCl (2; 4; 7 y 10%), a pH ácido (5,5; 5,0; 4,5 y 4) e inhibición de microorganismos patógenos (*E. coli* y *Listeria* sp.). La compatibilidad de las cepas se determinó por producción de sustancias inhibitorias y crecimiento conjunto en agar. Los microorganismos usados en este estudio fueron identificados como *Lactobacillus rhamnosus* GS21 y GS43, *L. plantarum* GS31 y GS34, *Weissella viridicens* GS25 y *W. paramesenteroides* GS35. A un pH inicial de 4,5 y una concentración de 7% NaCl, las cepas que mostraron mayor desarrollo fueron *L. plantarum* GS34 y *L. rhamnosus* GS43. Estos microorganismos también fueron capaces de inhibir por acidez a los patógenos alimentarios ensayados y no mostraron incompatibilidad entre ellas que impidan su uso conjunto, por lo que estas cepas fueron seleccionadas para ser evaluadas en estudios futuros como cultivo iniciador para la fermentación de conservas vegetales tipo pickles.

Palabras clave: Bacterias lácticas, cultivos iniciadores, vegetales fermentados.

SUMMARY

Fermentation is a biological process of great significance for food production, which has been historically used as a conservation method and for addition of desirable organoleptic and nutritional properties to food. In last decades, spontaneous fermentation of artisanal manufactured food has been replaced by controlled and standardized biotechnological processes for industrial food production, in order to obtain more stable and homogeneous high quality products. In this sense, lactic acid bacteria are the preferred microorganisms to be included in the production of different fermented foods due to the great variety of metabolites that can provide to raw materials enhancing taste, flavor and texture or ensuring the safety of the obtained products. Among foods sensitive to lactic fermentation, canned vegetables represent an important ecological niche for the study and selection of strains with relevant technological properties for the formulation of starter cultures for these substrates. Then, the objective of this work was to technologically characterize strains of lactic acid bacteria previously isolated from artisanal fermented products in order to select the most appropriated to be applied to the fermentation of vegetables. For this purpose, six strains of lactic acid bacteria, were identified by 16S rRNA gene sequencing and relevant properties for pickles manufacture were assessed: growth in presence of NaCl (2,

4, 7 y 10%) and at different pH (5.5, 5.0, 4.5 and 4) and production of antimicrobial substances against pathogens (*Escherichia coli* and *Listeria sp.*). The compatibility of the six LAB strains was tested by the production of inhibitory substances and set agar growth. The strains used in the present study were identified as: *Lactobacillus rhamnosus* GS21 and GS43, *L. plantarum* GS31 and GS34, *Weissella viridicens* GS25 and *W. paramesenteroides* GS35. At initial pH 4,5 and 7% NaCl, the strains that showed higher growth were *L. plantarum* GS34 and *L. rhamnosus* GS43. These microorganisms were also able to inhibit by acidity both pathogens tested and showed no incompatibility between each other that could prevent their usage together. Therefore, they were selected to be assayed in future studies as starter cultures for the fermentation of canned vegetables like pickles.

Key Words: Lactic acid bacteria, starter cultures, fermented vegetables.

INTRODUCCIÓN

La fermentación es un proceso biológico usado ampliamente en la producción de alimentos. Esta técnica se remonta a 10.000 años atrás en la historia de la humanidad, como un derivado de la práctica de la agricultura y la ganadería en las civilizaciones pasadas (Cordain y col., 2005). Desde el punto de vista bioquímico, se puede definir a la fermentación como un proceso catabólico anaeróbico en el que los carbohidratos y compuestos afines son oxidados con la liberación de energía en ausencia de aceptores externos de electrones. Los aceptores finales de electrones son compuestos orgánicos producidos directamente en el desdoblamiento de los carbohidratos. En la fermentación se produce la oxidación incompleta del compuesto inicial y solamente una pequeña cantidad de la energía es liberada durante la misma (Jay, 2000). Este proceso es característico del metabolismo de los microorganismos, principalmente levaduras y bacterias, las cuales pueden llevar a cabo dichas reacciones en las matrices alimentarias obteniéndose como resultado la modificación fisicoquímica de las mismas.

En las últimas décadas, la tecnología de la fermentación en la manufactura de alimentos, se ha trasladado de las prácticas artesanales y la ciencia empírica a procesos biotecnológicos industrializados ya que permite la obtención de productos estandarizados, asegurando la calidad y la reproducibilidad de los productos obtenidos (van Hylckama Vlieg y col., 2011). Como se mencionó anteriormente, los principales microorganismos involucrados en la producción de alimentos son levaduras y bacterias, los cuales son seleccionados por su tipo de fermentación para ser incluidos en distintos procesos. Por un lado, las levaduras (principalmente del género *Saccharomyces*) son utilizadas para la producción de bebidas alcohólicas o la elaboración de pan debido a su

capacidad de producir etanol y CO₂ respectivamente (Scott y Sullivan, 2008). Por su parte, la fermentación bacteriana producida por bacterias ácido lácticas es la más buscada para la formulación y biopreservación de alimentos (Ross y col., 2002), aunque también se destacan las fermentaciones producidas por otros géneros como *Propionibacterium* (Zárate y Pérez Chaia, 2015) o *Acetobacter* (Raspor y Goranovic, 2008), cuyos metabolitos de interés son los ácidos propiónico y acético respectivamente.

El empleo de bacterias lácticas en la industria alimenticia, es posible a través de la selección de cepas con diferentes propiedades tecnológicas relevantes para el producto final, como la capacidad acidificante, que tiene en cuenta la cantidad y velocidad de producción de ácido láctico en la matriz alimentaria. De igual manera, se puede seleccionar cepas con elevada actividad proteolítica o lipolítica para la síntesis de péptidos y ácidos grasos volátiles que contribuyan al flavour y a la calidad nutricional del producto. Asimismo, numerosos estudios han demostrado actividades enzimáticas involucradas en la remoción de factores antinutricionales que permiten aumentar la disponibilidad de nutrientes en el alimento y proteger al consumidor de posibles efectos adversos que estos compuestos puedan causar en su salud. La resistencia a diferentes tipos de estrés, como la osmotolerancia (viabilidad a altas concentraciones de sales como NaCl), desarrollo a pH ácidos y/o crecimiento a altas o bajas temperaturas, son también criterios de selección comúnmente estudiados en estos microorganismos para la formulación de cultivos iniciadores o “starters”, los cuales están definidos como *cultivos puros o mezclas de microorganismos que se inoculan en los productos alimenticios con el objetivo de reemplazar a la microbiota endógena de la materia prima para mejorar los procesos de fermentación, contribuir a las propiedades*

organolépticas del producto a través de compuestos generadores de sabor, aroma o textura; y además, obtener productos más estables y homogéneos con calidad sanitaria asegurada (García Ibarra, 2007).

Fermentación de productos vegetales

En cuanto a las matrices alimentarias susceptibles de fermentación láctica, los vegetales constituyen un nicho de gran importancia para el estudio y selección de cultivos iniciadores. Los productos típicos mayormente investigados y con mayor difusión en el mercado internacional son las aceitunas, pepinos y coles, y en menor medida zanahorias, remolachas y pimientos. Por otra parte, en los países orientales se elaboran productos fermentados que incorporan otros vegetales como los rábanos, nabos, coles de Bruselas, lechugas y legumbres (Montaño y col., 1992).

Un producto muy aceptado y consumido en nuestro país son las conservas vegetales tipo pickle o encurtidos, definidas en el Código Alimentario Argentino como *los productos obtenidos a partir de frutas u hortalizas que luego de ser curados en salmuera o haber experimentado una fermentación láctica en condiciones especiales, se conservan en vinagre, en un recipiente bromatológicamente apto*, cuyo proceso de elaboración implica fermentaciones lácticas espontáneas que conducen al dominio de la microbiota láctica. Estos microorganismos, eliminan por una parte a aquellos responsables de alteraciones (principalmente bacterias G (-) y bacterias esporuladas) producto de la acidificación, y por otro lado a sus enzimas pectinolíticas responsables de las putrefacciones blandas. Las bacterias lácticas que predominan en la fase de iniciación y la fermentación primaria incluyen *Streptococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum*. Las dos primeras especies no soportan bien la sal, ni la acidificación, y tienen poca importancia en salmueras con más de un 5% de NaCl. *Lactobacillus plantarum* es el más ácidotolerante, y es el que finaliza la mayor parte de las fermentaciones en los vegetales. Por otro lado, *Pediococcus rhamnosus* y *Pediococcus cerevisiae* también suelen estar implicados en la fermentación de los vegetales (Cabeza Herrera, 2006). Sin embargo, en el mercado nacional no es frecuente el uso de cultivos iniciadores para la elaboración de este tipo de alimentos. Su implementación permitiría obtener productos con cualidades organolépticas

muy apreciables, ya que se ha comprobado que la conservación por este método es más eficiente que otros métodos disponibles como tratamientos térmicos, congelación, o deshidratación, además de extender la disponibilidad de productos vegetales fuera de temporada y de representar una alternativa económica dentro de la cadena productiva (Buckenhüskes, 1997).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue seleccionar cepas de bacterias lácticas, previamente aisladas y caracterizadas, para la formulación de un cultivo iniciador aplicable a la fermentación de pickles. A tal fin, se evaluaron propiedades tecnológicas relevantes como osmotolerancia, crecimiento a pH ácido, inhibición de microorganismos patógenos y compatibilidad entre las cepas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y condiciones de crecimiento

Se emplearon en este trabajo seis cepas de bacterias lácticas aisladas y caracterizadas previamente por sus propiedades tecnológicas (Sáez y col., 2014) en el marco del proyecto IC-500 de la Universidad de San Pablo-Tucumán. Los aislamientos usados fueron denominados GS25, GS31, GS34 (aisladas de aceitunas en salmuera y seleccionadas por su capacidad acidificante y producción de compuestos de aroma) y GS21, GS35 y GS43 provenientes de quesos artesanales. Los microorganismos almacenados a -20°C en crioviales con LEL (leche al 10% conteniendo 0,5% de extracto de levadura) fueron reactivados en caldo Laptg (1.5 % peptona, 1% triptona, 1% glucosa, 1% extracto de levadura y 0.1% Tween 80, pH 6.8) (Raibaud y col., 1961) a 37°C y subcultivados antes de su uso experimental al menos dos veces en este medio cada 24 horas.

Identificación molecular de las cepas

La identificación de los microorganismos se realizó a partir de la secuenciación del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S. Para ello el ADN cromosomal fue extraído según el protocolo descrito por Pospiech y Neumann (1995). Cultivos en fase estacionaria de crecimiento, se centrifugaron (10 min a 10.000 rpm), lavaron con buffer TES (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, NaCl 75 mM, EDTA 25 mM) y resuspendieron en este buffer conteniendo lisozima (15 mg/mL). Posteriormente, se incubaron 90 min a 37°C, y 2 horas a 55°C con el agregado de 20 µL de SDS 10 % y 4 µL de

proteínasa K (20 mg/ml). Luego, se añadieron 75 µl de NaCl 5 M y 1 Vol de cloroformo-metanol (24:1) y se dejó en reposo a 4°C por 30 min. Las muestras fueron centrifugadas (12.000 rpm, 10 min), precipitando el ADN de la fase acuosa con isopropanol (1:1 v/v). El precipitado se lavó con etanol 70%, se secó al aire y resuspendió en 30 µL de agua miliQ. La extracción fue corroborada por electroforesis en geles de agarosa llevadas a cabo a un voltaje constante de 65 V durante 2 h en buffer TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). Para la visualización del ADN, los geles fueron teñidos con el colorante GelRed (Biotium) y visualizados en un transiluminador (Syngene, UK). La amplificación de la región variable del gen VI que codifica para el ARN ribosomal 16S se realizó por PCR utilizando los cebadores PLB16 (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') y MLB16 (5' GGC TGC TGG CAC GTA GTT AG 3') (Hebert y col., 2000). El programa de amplificación consistió en 5 min de desnaturalización inicial a 94°C, 30 ciclos de 94°C (30 seg), 52°C (30 seg) y 72°C (45 seg); y finalmente un paso de elongación de 10 min a 72°C. Los amplicones obtenidos de la reacción fueron purificados con solución de PEG (polietilenglicol 8000 al 20% - NaCl 2,5M) y fueron secuenciadas por el Servicio de Secuenciación de ADN brindado por CERELA-CONICET. La identidad de las secuencias resultantes fue determinada por comparación con secuencias depositadas en base de datos online: BLAST GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>) y Ribosomal Database Project (Cole y col., 2009).

Propiedades tecnológicas complementarias

Osmotolerancia: Se evaluó crecimiento de los microorganismos en presencia de concentraciones crecientes de NaCl (0%, 2%, 4%, 7% y 10%). Para ello se determinó por absorbancia a 560 nm, la biomasa alcanzada en Laptg a las 24 horas de incubación a 37°C.

Tolerancia a estrés ácido: Se determinó crecimiento de los microorganismos por absorbancia a las 24 horas de incubación a 37°C en caldo Laptg acidificado con ácido láctico 1N a los siguientes valores de pH: 5,5; 5,0; 4,5 y 4,0.

Inhibición de patógenos: Se evaluó la capacidad de las cepas de producir sustancias antimicrobianas contra 2 especies de patógenos comúnmente encontradas en alimentos. Para

ello se realizaron ensayos de inhibición en placa usando como cepas sensibles a una cepa de *Escherichia coli* y una de *Listeria innocua* (usada por bioseguridad en reemplazo de *Listeria monocytogenes*). Se inoculó un césped de 100 µL de cada patógeno en BHI agar y se realizaron pocillos en los cuales se sembraron 50 µL de los sobrenadantes de cada cepa de BAL sin neutralizar (para determinar inhibición por acidez) y neutralizados a pH 7 con NaOH 1N (para determinar inhibición por bacteriocinas o H₂O₂). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas y la actividad antagonista se evidenció por la aparición de halos de inhibición alrededor de cada pocillo.

Compatibilidad de las cepas

Difusión en agar: Los cultivos activos de las seis cepas se centrifugaron (10000 g, 10 min) y se recolectó el sobrenadante de cada una, el cual fue neutralizado con NaOH 1 N. Por otro lado, se inoculó en profundidad 100 µL de cada cepa en placas de MRS agar para la formación de un césped. A continuación, se realizaron pocillos donde se sembraron 50 µL de cada uno de los sobrenadantes antes obtenidos. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Luego de ese período, se observó la presencia o ausencia de halos de inhibición del crecimiento en los sitios en los que se había depositado el sobrenadante libre de células.

Crecimiento conjunto en agar: Se empleó la técnica descrita por Chapman y col. (2012). Cultivos activos de cada una de las cepas seleccionadas se lavaron 2 veces (10000 g, 10 min, 4 °C) con NaCl 0,9% estéril y se sembraron en MRS en forma de línea recta usando un hisopo estéril; perpendicularmente a la línea de siembra se sembraron con hisopos estériles los cultivos de las restantes 5 cepas. A las 72 horas de incubación a 37°C se observó el tipo de crecimiento de las cepas en las zonas de confluencia de las siembras (estimulación, inhibición, o ausencia de interacción entre las colonias).

RESULTADOS

Identificación molecular de las cepas seleccionadas

La amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región VI que codifica para el gen del ARNr 16S utilizando los cebadores universales PLB16 y MLB16, permitió obtener productos de ≈ 500 pb a partir de los cuales se pudo secuenciar

parcialmente el gen del ARNr 16S para todos los aislamientos. La alineación de las secuencias obtenidas se realizó utilizando el programa BLAST (GenBank) y la base de datos curada Ribosomal Database Project. Las secuencias de las cepas GS21 y GS43 presentaron una identidad del 99% con *Lactobacillus rhamnosus*, con un puntaje BLAST de 857:0.0 y 845:0.0. Las cepas GS31 y GS34 se correspondieron en un 98 y 97% respectivamente con *Lactobacillus plantarum*

(Score 809:0.0 y 805:0.0), mientras que las cepas GS25 y GS35 se identificaron como *Weissella viridicens* (100% de identidad, score 865:0.0) y *Weissella paramesenteroides* (99% de identidad, score 837:0.0) respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Identificación genotípica de las cepas

Cepa	Especie	% Identidad	Score	E value
GS 21	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99%	857	0.0
GS 25	<i>Weissella viridicens</i>	100%	865	0.0
GS 31	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98%	809	0.0
GS 34	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97%	805	0.0
GS 35	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99%	837	0.0
GS 43	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99%	845	0.0

Propiedades tecnológicas complementarias
Osmotolerancia

Una propiedad tecnológica relevante para la formulación de un cultivo iniciador para pickles es la osmotolerancia de los microorganismos, por cuanto el NaCl es un aditivo fundamental en la manufactura de este tipo de alimentos. En la figura 1 se representa el crecimiento de los microorganismos en medio de cultivo conteniendo concentraciones crecientes de NaCl. En presencia de 2% NaCl todas las cepas fueron capaces de alcanzar más del 70% de la biomasa alcanzada en ausencia de esta sal. Con

concentraciones intermedias (4%) las cepas que mostraron mayor desarrollo con respecto a los cultivos control fueron *Weissella viridicens* GS25, *Lactobacillus plantarum* GS34 y *L. rhamnosus* GS43. A una concentración del 7% de este aditivo, las cepas más resistentes fueron *L. plantarum* GS34 y *L. rhamnosus* GS43, aunque su biomasa no superó el 30% con respecto al control, mientras que a la mayor concentración de NaCl ensayada (10%) ninguno de los microorganismos fue capaz de desarrollar.

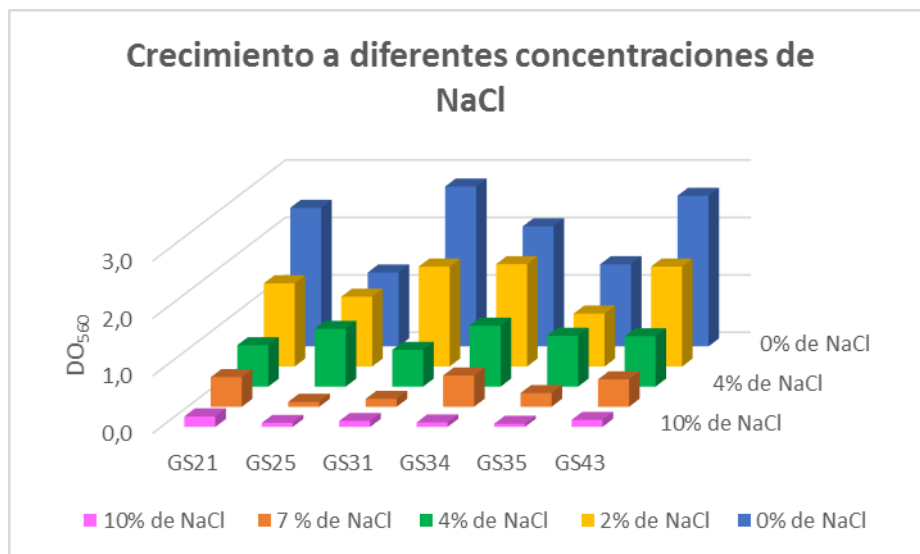


Figura 1. Crecimiento de bacterias lácticas en medio Laptg con diferentes concentraciones de NaCl

Crecimiento en condiciones ácidas

La evaluación del crecimiento de las cepas a diferente pH se realizó considerando que los pickles son alimentos de elevada acidez, ya sea por el agregado de vinagre, como por el ácido generado a partir de la fermentación espontánea. En la figura 2 se presenta el crecimiento de los microorganismos medido por densidad óptica a 560 nm en caldo Laptg acidificado con ácido láctico. A pH 5,5 la cepa GS43 mostró un crecimiento superior al observado en el cultivo control inoculado a pH 7, mientras que las cepas GS21, GS25, GS34 y GS35 crecieron hasta alcanzar valores superiores al 90% de la biomasa del control, y la cepa GS31 alcanzó solo un 70% de su biomasa. Con un pH inicial

de 5,0, las cepas GS21, GS31 y GS34 mantuvieron un crecimiento cercano al 90% del control y las cepas GS25, GS35 disminuyeron su desarrollo un 30%, destacándose la cepa GS43 que mostró mejor desarrollo a este pH inicial que a 5,5. Con un pH inicial de 4,5 las cepas GS21, GS31, GS34 y GS43 mostraron un crecimiento similar al observado a pH 5,0 es decir en el orden del 80-90% de la biomasa control, por el contrario, la cepa GS35 redujo su crecimiento y la cepa GS25 fue incapaz de iniciar su desarrollo a este valor de pH. Por último, a pH 4, las únicas cepas capaces de proliferar fueron GS21, GS31 y GS43, pero en proporción significativamente menor que el control a pH 7.

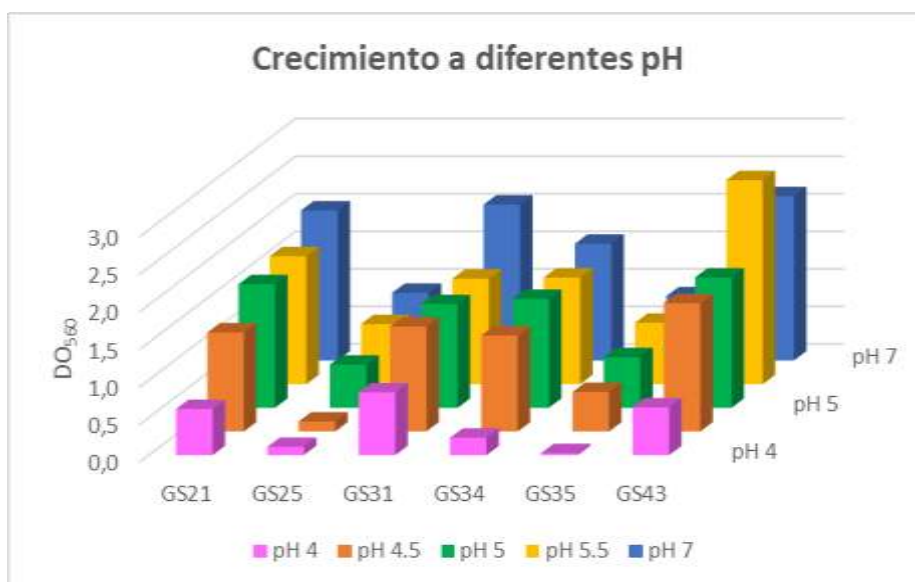


Figura 2. Crecimiento de bacterias lácticas en medio Laptg con diferentes pH

Inhibición de patógenos

Teniendo en cuenta la importancia que revisten los microorganismos patógenos presentes en los alimentos, se realizaron ensayos de inhibición por sustancias antimicrobianas producidas por las cepas en estudio, contra los patógenos alimentarios *Escherichia coli* y *Listeria sp.* En el caso de los sobrenadantes sin neutralizar todas las cepas ensayadas mostraron actividad inhibitoria contra *E. coli*, siendo las cepas GS31, GS34 y GS43 las que produjeron los halos de mayor diámetro. Sin embargo, solo los sobrenadantes de las cepas GS31, GS34 y GS43

produjeron inhibición del desarrollo de *L. innocua* siendo mayores los halos producidos por las dos primeras (Figuras 3 y 4). Al ensayarse los sobrenadantes neutralizados, no se evidenció actividad antagonista de ninguna de las cepas lácticas contra los dos patógenos evaluados, lo que sugiere la incapacidad de las mismas de producir sustancias inhibitorias oxidantes o proteicas como H₂O₂ o bacteriocinas respectivamente; por lo que el mecanismo de inhibición observado solo puede adjudicarse a la producción de ácidos orgánicos.



Figura 3. Actividad inhibitoria de los sobrenadantes de las cepas de BAL sobre un césped de *E. coli*.

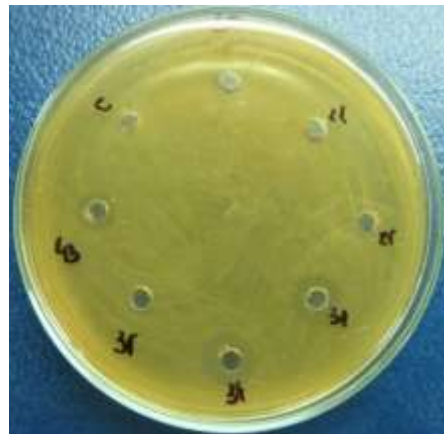


Figura 4. Actividad inhibitoria de los sobrenadantes de las cepas de BAL sobre un césped de *L. innocua*.

Compatibilidad de las cepas:

La compatibilidad de las cepas de bacterias lácticas se determinó por dos métodos: difusión en agar y crecimiento conjunto. El primer método, se empleó para evaluar si las cepas en estudio producían y secretaban sustancias antagonicas que puedan inhibir el crecimiento

de alguno de los otros microorganismos. En todas las combinaciones de cepas y sobrenadantes ensayados, se observó la ausencia de halos de inhibición de crecimiento indicando que ninguna de las cepas estudiadas inhibe ni es inhibida por las demás cepas. (Figura 5).

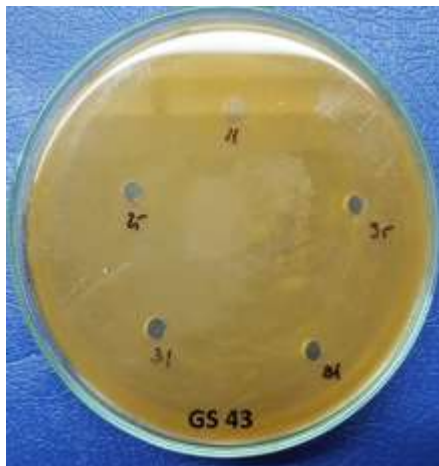


Figura 5. Efecto de los sobrenadantes de las otras cepas de BAL sobre *L. rhamnosus* GS43.



Figura 6. Prueba de compatibilidad de las cepas por crecimiento conjunto en agar.

En el caso del ensayo de crecimiento conjunto en agar se evaluó la interacción de las colonias de las cepas seleccionadas desarrolladas en la superficie de Laptg agar.

Como se puede observar en la tabla 2, la interacción de las bacterias lácticas entre sí en medio sólido no tuvo efectos inhibitorios, permitiendo realizar cualquier combinación en pares (Figura 6).

Tabla 2. Influencia de la interacción entre cepas en el desarrollo bacteriano. “+” Indica que hubo crecimiento.

Cepa	GS21	GS25	GS31	GS34	GS35	GS43
GS21						
GS25	+ / +					
GS31	+ / +	+ / +				
GS34	+ / +	+ / +	+ / +			
GS35	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +		
GS43	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	

DISCUSIÓN

La inclusión de bacterias lácticas como cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos, representa una alternativa importante para la manufactura de productos homogéneos y de calidad reproducible. Su particular tipo de metabolismo, en conjunto con actividades enzimáticas desarrolladas en el sustrato, permiten conferir distintos caracteres desde el punto de vista nutricional (aumento de la disponibilidad de nutrientes o compuestos bioactivos), organolépticos (incremento o adición de sabores, aromas y texturas deseables) y de inocuidad (producción de sustancias que impiden el deterioro o la proliferación de microorganismos patógenos). Si bien existe una gran variedad de alimentos donde las bacterias lácticas son utilizadas como cultivos iniciadores, la elaboración de conservas vegetales fermentadas representa un campo interesante para el estudio de la aplicación de estos microorganismos, ya que estos alimentos son obtenidos tradicionalmente a través de un proceso de fermentación láctica espontánea, y no es común disponer en el mercado local de productos resultantes de una fermentación controlada con cultivos iniciadores comerciales, que ofrezcan a los consumidores estándares de calidad y seguridad superiores. Para ello, es necesario contar con cepas que reúnan características tecnológicas de interés que compatibilicen con la matriz alimentaria que se desea fermentar, lo que requiere una serie de evaluaciones para la selección de las cepas con mayor potencial.

Considerando el atractivo que representa para la industria la inclusión de microorganismos seleccionados para la formulación controlada de alimentos, en

investigaciones previas (Proyecto IC 400, USPT 2013) se aislaron y caracterizaron a partir de diferentes tipos de productos artesanales fermentados, cepas de bacterias lácticas no pertenecientes al cultivo iniciador del alimento (cepas silvestres o no starter) por cuanto se conoce que estos microorganismos se encuentran entre los más representativos de esta población (Settanni y Moschetti, 2010). En el presente estudio se seleccionaron seis de estas cepas, denominadas GS25, GS31, GS34 (aisladas de aceitunas en salmuera y seleccionadas por su capacidad acidificante y producción de compuestos de aroma) y GS21, GS35 y GS43 provenientes de quesos artesanales y seleccionadas principalmente por su actividad proteolítica (Sáez y col., 2014) y se evaluaron propiedades tecnológicas adicionales.

Si bien estos aislamientos presentaban características pertenecientes al género *Lactobacillus* [bacilos Gram (+), catalasa (-), nitrato reductasa (-)], uno de los más representativos de las BAL (Settanni y Moschetti, 2010), la identificación precisa a nivel de género y especie implica recurrir a una serie de pruebas bioquímicas, que pueden no resultar eficientes en cuanto a tiempo y costo, o a técnicas moleculares. Al respecto, existen diferentes técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con acceso libre a secuencias nucleotídicas en bases de datos curadas que permiten una rápida y fehaciente identificación de los microorganismos (Cole y col., 2009). Una de las técnicas más utilizadas es la secuenciación del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S, debido a su relevancia en cuanto a propiedades evolutivas y filogenéticas, que se refleja en la presencia de dominios variables y altamente conservados, además de

poseer un alto poder discriminatorio y una vasta disponibilidad de secuencias en bases de datos públicas (Juste y col., 2008). Mediante esta técnica, las cepas fueron identificadas como *Lactobacillus rhamnosus* (GS21 y GS43), *Lactobacillus plantarum* (GS31 y GS34), y *Weissella viridicens* GS25 y *Weissella paramesenteroides* GS35 con un porcentaje de identidad de las secuencias entre el 97 y el 100% de acuerdo a los alineamientos realizados en las bases nucleotídicas consultadas. Teniendo en cuenta el origen, el aislamiento de cepas de *L. plantarum* es coincidente con la elevada frecuencia con que esta especie ha sido encontrada e identificada mediante esta técnica en diferentes matrices alimentarias de origen vegetal, destacándose por su robustez en cuanto a ubicuidad y tolerancia a distintos tipos de estrés que forman parte del proceso de elaboración de alimentos vegetales fermentados (Gou y col., 2011; Yu y col., 2012; Saedi y col., 2015). Por su parte, los nichos de aislamiento de cepas de *L. rhamnosus* resultan muy variables, encontrándose principalmente en el intestino humano, de donde provienen cepas utilizadas comercialmente como probióticos (Salminen y col., 2002), aunque también se obtuvieron aislamientos con propiedades relevantes en las fases finales del proceso de maduración de quesos (Succi y col., 2005; Olbrich dos Santos y col., 2015). En cuanto al origen de las cepas del género *Weissella* es común encontrarlas en alimentos fermentados, en coincidencia con las cepas aisladas GS25 (aceitunas verdes) y GS35 procedente de un queso artesanal, en cuya matriz puede tener relevancia la producción de exopolisacáridos característicos de este género, que influyen en la textura final del producto (Fusco y col., 2015).

Ahora bien, el empleo de estas cepas para el diseño de fermentos o cultivos iniciadores implica la evaluación de las potencialidades que cada una o el conjunto de las mismas puede ofrecer. Para ello es necesario evaluar diferentes propiedades que son relevantes en el producto en el cual se las desea incorporar. En el caso de los encurtidos la inclusión de los vegetales en salmuera con o sin la adición de vinagre representa el paso más característico de su elaboración. La adición de NaCl en el proceso de manufactura tiene un doble objetivo: potenciar sabores y evitar el desarrollo de microorganismos perjudiciales. Dado que los vegetales permanecen expuestos a soluciones salinas durante toda su vida de estante la capacidad de desarrollar y permanecer viables en este ambiente es altamente deseable. Por este motivo, se evaluó en primera instancia la

capacidad de las bacterias lácticas para desarrollar en presencia de diferentes concentraciones de NaCl. Las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* (GS21 y GS43) mostraron la mayor osmotolerancia con buen desarrollo a 7% NaCl y un desarrollo incipiente a 10% NaCl, seguidas en desempeño por *L. plantarum* GS34. Estos resultados se diferencian de los obtenidos por Pundir y col., (2013) cuyas cepas de origen vegetal desarrollaron hasta una concentración de NaCl del 6,5%.

De igual manera, la proliferación de las BAL en medios ácidos representa una propiedad valiosa por cuanto puede contribuir a incrementar la acidez del producto y por lo tanto su bioconservación como así también prolongar la sobrevida de los microorganismos en el producto y su capacidad de aportar características organolépticas deseables al mismo. Nuevamente, las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* (GS21 y GS43) presentaron la mayor tolerancia a la acidez, con capacidad para desarrollar a pH 4 al igual que *L. plantarum* GS31. A pH 4,5 tanto las cepas de *L. rhamnosus* como *L. plantarum* alcanzaron 89-90% de la biomasa de sus respectivos controles desarrollados a pH 7. Yu y col. (2012) caracterizaron la microbiota láctica presente en pickles de China y observaron que todos los aislamientos identificados como *L. alimentarius*, *L. casei*, *L. plantarum* y *L. sakei* fueron capaces de desarrollar a pH 4,0 y 4,5, y en 6.0% y 6.5% NaCl, mientras que una elevada proporción de *L. plantarum* y *L. sakei* (62-74%) desarrollaron con 8% de NaCl lo que respalda la frecuente selección de estas especies como cultivos iniciadores para este tipo de alimentos fermentados.

Una característica de las fermentaciones vegetales espontáneas no controladas es su sensibilidad a la contaminación con microorganismos adventicios deteriorantes y patógenos que representan una amenaza para la salud. Los principales patógenos alimentarios reportados son *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, los cuales también sobreviven en otros vegetales fermentados (Breidt y Caldwell 2011; Chang y Chang 2011). Los métodos convencionales usados para controlar esta microbiota indeseable en los encurtidos incluyen aditivos químicos (ácidos propiónico, sórbico o benzoico) o elevadas concentraciones salinas, los cuales pueden afectar el crecimiento del cultivo iniciador si este fuera usado y las cualidades organolépticas y nutricionales de los pickles. Por lo tanto, el uso de estrategias de

biopreservación resulta de interés para controlar durante la fermentación de los vegetales a microorganismos indeseables. En este sentido, las BAL producen numerosos antimicrobianos incluyendo ácidos orgánicos (láctico, acético, fórmico, fenil-láctico, caproico), CO₂, H₂O₂, diacetilo, etanol, y bacteriocinas, que pueden inhibir el desarrollo de bacterias patógenas y deteriorantes (Garcha y Natt, 2012; Aslam y col., 2011) por lo que pueden usarse en la tecnología de la fermentación de vegetales y en la industria de los pickles como alternativa natural a los conservantes químicos. Todas las cepas de BAL usadas en este estudio fueron capaces de inhibir por acidez a *E. coli* y solo las cepas de *L. plantarum* y una cepa de *L. rhamnosus* inhibieron por este mecanismo a *L. innocua*, mientras que ninguna fue capaz de producir H₂O₂ o bacteriocinas activas frente a estos patógenos. Otros estudios han demostrado también la capacidad de *L. plantarum* y otros lactobacilos provenientes de vegetales fermentados de inhibir patógenos alimentarios. Santos y col. (2003) identificaron aislamientos de *L. plantarum* de aceitunas con actividad inhibitoria frente a *L. monocytogenes* mientras que Con y Karasu (2009) observaron que todas las cepas de *L. plantarum* aisladas de aceitunas y pickles del oeste de Turquía fueron capaces de inhibir por acidez a *L. monocytogenes* y *E. coli* y en menor medida a otros patógenos como *Proteus vulgaris* o *Aeromonas hydrophila*. Por su parte, Rao y col. (2013) demostraron que la cepa *L. plantarum* E11 aislada de pickles de China produce una sustancia tipo bacteriocina que inhibe a *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* desde el quinto día de fermentación del encurtido prolongando la seguridad y vida de estante del mismo.

Los cultivos iniciadores utilizados en la industria se formulan según las características que se quieran atribuir al producto, y pueden estar constituidos por una sola cepa (monocepa), más de una cepa de la misma especie (multicepa) o distintas cepas de diferentes especies (multiespecie), las cuales se combinan buscando un sinergismo en el proceso de fermentación y las propiedades del producto final (Timmerman y col., 2004). Para ello resulta importante realizar ensayos de compatibilidad entre cepas, a fin de evitar la inclusión de microorganismos que muestren efectos inhibitorios entre sí, ya sea por la producción de sustancias inhibitorias de origen proteico (Kailasapathy y Chin, 2000), o por la competición por nutrientes o interacciones intercelulares (Chapman y col., 2011). En este

estudio, el crecimiento de ninguna de las seis cepas ensayadas fue afectado negativamente por los sobrenadantes neutralizados de las cepas restantes, por lo que puede inferirse que las mismas no secretan compuestos con actividad inhibitoria para los otros cinco cultivos. El ensayo de crecimiento conjunto en agar mostró resultados similares al no observarse competencia evidente en los sitios de crecimiento conjunto, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Chapman y col. (2012) donde cepas de bacterias lácticas no son inhibidas entre sí, al menos cuando su crecimiento es evaluado en MRS agar, un medio de cultivo rico que cumple con las exigencias nutricionales de este grupo de microorganismos (de Man y col., 1960).

En conclusión, en el presente trabajo, las cepas *L. plantarum* GS34 y *L. rhamnosus* GS 43 fueron seleccionadas por su potencial tecnológico para conformar un cultivo iniciador aplicable a la elaboración de vegetales fermentados. Su capacidad para desarrollar *in situ* y biopreservar por fermentación diferentes encurtidos se encuentran actualmente en estudio.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en el marco del Proyecto IC500, convocatoria 2014 del Instituto de Competitividad de la Universidad de San Pablo Tucumán

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aslam, M.; Shahid, M.; Rehman, F.U.; Naveed, N.H.; Batool, A.I.; Sharif, S. and Asia, A. (2011) Purification and characterization of bacteriocin isolated from *Streptococcus thermophilus*. *African Journal of Microbiology Research* 5 (18), 2642 - 2648.
- Buckenhüskes, H.J. (1997) Fermented vegetables, In: Doyle, P.D., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2nd ed. *ASM Press*, Washington, DC, USA, p 595 – 609.
- Cabeza Herrera, E. A. (2006) Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica. Conferencia dada en el: Simposio Regional de Microbiología —Microorganismos Eficientes en el Sector Productivo, Universidad Libre, Barranquilla.
- Chang, J.Y. and Chang, H.C. (2011) Growth inhibition of foodborne pathogens by Kimchi prepared with bacteriocin-producing starter culture. *Journal of Food Science* 76, M72–M78.
- Chapman, C.M.C.; Gibson, G.R. and Rowland, I. (2011) Health benefits of

probiotics: are mixtures more effective than single strains. *European Journal of Nutrition* 50, 1 - 17.

Chapman, C.M.C.; Gibson, G.R. and Rowland, I. (2012) In vitro evaluation of single- and multi-strain probiotics: Inter-species inhibition between probiotic strains, and inhibition of pathogens. *Anaerobe* 18, 405- 413.

Cole, J.R.; Wang, Q.; Cardenas, E.; Fish, J.; Chai, B.; Farris, R.J.; Kulam-Syed-Mohideen, A.S.; McGarrell, D.M.; Marsh, T.; Garrity, G.M. and Tiedje, J.M. (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 37 (1), 141 – 145.

Con, A.H and Karasu, N. (2009) Determination of Antagonistic Starter Cultures for Pickle and Olive Fermentation Processes. *Czech Journal of Food Science* 27 (3), 185 – 193.

Cordain, L.; Eaton, S.B.; Sebastian, A.; Mann, N.; Lindeberg, S.; Watkins, B.A.; O'keefe, J.H. and Brand-Miller, J. (2005) Origins and evolution of the Western diet: Health implications for the 21st century. *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 341 - 354.

De Man, J.C.; Rogosa, M. and Sharpe, E. (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 23, 130 - 155.

Fox P.F. (1993) Cheese chemistry physics and microbiology. Vol. 1. *Chapman and Hall*. London, UK, p 303 - 340.

Fusco, V.; Quero, G.M.; Cho, G.; Kabisch, J.; Meske, D.; Neve, H.; Bockelmann, W and Franz, C.M.A.P. (2015) The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology* 6, 155.

Garcha, S. and Natt, N.K. (2012) In situ control of food spoilage fungus using *Lactobacillus acidophilus* NCDC 291. *Journal of Food Science and Technology*, 49 (5), 643-648.

García Ibarra, J.A. (2007) Identificación de bacterias ácido lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Gou, J.; Dong, W. and Zeng, Q. (2011) Isolation and identification of probiotic lactic acid bacteria from pickles. 2011 International Conference on Human Health and Biomedical Engineering. Jilin, China.

Hebert, E.M.; Raya, R.R.; Tailliez, P. and Savoy de Giori, G. (2000) Characterization of natural isolates of *Lactobacillus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation.

International Journal of Food Microbiology 59, 19 - 27.

Jay, J. M. (2000) Fermentation and fermented dairy products. Modern food microbiology. 6th edition. *Aspen Publishers Inc*. Gaithersburg, USA, p 113 - 130.

Juste, A.; Thomma, B.P.H.J. and Lievens, B. (2008) Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology* 25, 745 – 761.

Kailasapathy, K. and Chin, J. (2000) Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology* 78, 80 - 88.

Montaño, A., de Castro, A. y Rejano, L. (1992). Transformaciones bioquímicas durante la fermentación de productos vegetales. *Grasas y Aceites* 43 (6), 352 - 360.

Olbrich dos Santos, K.M.; Vieira, A.D.S.; Buriti, F.C.A. et al. (2015) Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Dairy Science & Technology* 95, 209 – 230.

Pospiech, A. and Neumann, B. (1995) A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends in Genetics* 11, 217 - 218.

Pundir, R.K.; Rana, S.; Kashyap, N. and Kaur, A. (2013) Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from food Samples – an in Vitro study. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 3(3), 085 - 093.

Raibaud, P.; Caulet, M.; Galpin, J.V. and Mocquot, G. (1961) Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs II. Streptococci: selective enumeration and differentiation of the dominant group. *Journal of Applied Bacteriology* 24, 285 - 291.

Rao, Y.; Chang, W.; Xiang, W.; Li, M.; Che, Z. and Tang, J. (2013) Screening and performance of *Lactobacillus plantarum* e11 with bacteriocin-like substance secretion as fermentation starter of Sichuan pickle. *Journal of Food Safety* 33, 445 – 452.

Raspor, P. and Goranovic, C. (2008) Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology* 28 (2), 101 - 124.

Ross, R.P.; Morgan, S. and Hill, C. (2002) Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 3 - 16.

Saedi, M.; Shahidi, F.; Mortazavi, S.A.; Milani, E. and Yazdil F.T. (2015) Isolation and identification of lactic acid bacteria in winter salad (local pickle) during fermentation using

16S rRNA gene sequence analysis. *Journal of Food Safety* 35 (3), 287 - 294.

Sáez, G.D.; Flomenbaum, L.; Palacios, J. y Zárate, G. (2014) Evaluación tecnológica de microorganismos relevantes para la industria alimentaria. *IDITeC* 3, 53 – 62.

Salminen, M.K.; Tynkkynen, S.; Rautelin, H.; Saxelin, M.; Vaara, M.; Ruutu, P.; Sarna S.; Valtonen, V. and Järvinen, A. (2002) Lactobacillus Bacteremia during a Rapid Increase in Probiotic Use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clinical Infectious Diseases* 35, 1155 –1160.

Santos, A.; San Mauro, M.; Sanchez, A.; Torres, J.M. and Marquina, D. (2003) The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *Systematic and Applied Microbiology* 26, 434 – 437.

Scott, R. and Sullivan, W.C. (2008) Ecology of Fermented Foods. *Human Ecology Review* 15(1), 25 -31.

Settanni, L. and Moschetti, G. (2010) Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology* 27, 691 – 697.

Succi, M.; Tremonte, P.; Reale, A.; Sorrentino, E.; Grazia, L.; Pacifico, S. and Coppola, R. (2005) Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated

from Parmigiano Reggiano cheese. *FEMS Microbiology Letters* 244, 129 – 137.

Timmerman, H.M.; Koning, C.J.M.; Mulder, L.; Rombouts, F.M. and Beynen, A.C. (2004) Monostrain, multistrain and multispecies probiotics - A comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology* 96, 219 - 233.

van Hylckama Vlieg, J.E.T., Veiga, P., Zhang, C., Derrien, M. y Zhao, L. (2011). Impact of microbial transformation of food on health — from fermented foods to fermentation in the gastro-intestinal tract. *Current Opinion in Biotechnology* 22, 1–9.

Yu, J.; Gao, W.; Qing, M.; Sun, Z.; Wang, W.; Liu, W.; Pan, L.; Sun, T.; Wang, H.; Bai, N. and Zhang, H. (2012) Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles in Sichuan, China. *Journal of General and Applied Microbiology* 58, 163 – 172.

Zárate, G. and Perez Chaia, A. (2015). Propionibacteria also have probiotic potential. In: Probiotics and Prebiotics: Current Research and Future Trends. Ed. Caister Academic Press. Poole, UK, p 69-91.