

REVISTA
ACADÉMICA

IDITEC



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



**IDITEC INSTITUTO DE INNOVACION TECNOLOGICA PARA LA COMPETITIVIDAD
TERRITORIAL**

N°11 –AÑO 2023

Tucumán, República Argentina

ISSN2525-1597

Editorial: EDUSPT, Avenida Solano Vera y camino a Villa Nougues

Campus Universitario USPT

San Pablo, Tucumán

Revistaiditec@uspt.edu.ar

Directora

Prof. Mg Karina González (USPT)

Consejo Editorial Científico:

Prof. Dra. María José Catalán (UNT-USPT)

Prof. Mg. Margarita Jaramillo (USPT)

Prof. Dr. Alejandro Daniel Ríos (UNT-USPT)

Prof. Mg. Adriana del Valle Pastoriza (UNT)

Prof. Dra. Gabriela Zárate (USPT-CONICET)

Prof. CPN Cecilia Fabiana Gagliardi (USPT)

Prof. Arq. Josefina María del Valle Ocampo (USPT)

Pares evaluadores

Prof. Mg. Marcela Blanca Colombo (UNT - USPT)

Prof. Mg. Adriana del Valle Pastoriza (UNT)

Prof. Dra. Juana Albarracín (USPT)

Dra. Luz Lastres Flores (ADEQRA)

Dra. Eugenia Giamminola (IEAH-UNSA)

Dr. Dariel Cabrera Mederos (IPAV-INTA)

Prof. Héctor Ostengo (UNT)

Prof. Mg. Alicia Margarita Nasif (UNT)

Prof. Dra. Natalia Zavadvker (UNT)

Dra. Pamela Terán Baptista (UNT)

Edición:

Evelyn Pamela Maza Méndez

PRESENTACIÓN IDITEC

Es una publicación semestral que recoge los resultados de los trabajos de investigación de profesores e investigadores nacionales y extranjeros, que sean de interés para la comunidad en las áreas de la Ciencia de los Alimentos; Agricultura y Gestión. La misión de IDITEC es abordar temas multidisciplinarios de investigación y/o análisis que posean un interés regional, nacional e internacional. Las publicaciones pueden realizarse en español, inglés o portugués. La Revista, está puesta al servicio de la comunidad científica y académica en general (docentes, investigadores y estudiantes), dirigida tanto a la teoría como a la práctica.

INDICE

**ELABORACIÓN DE UN ENCURTIDO FERMENTADO POR BACTERIAS LÁCTICAS
SELECCIONADAS POR SUS PROPIEDADES BIOTECNOLÓGICAS.....6**

**EL CLÚSTER AGROINDUSTRIAL DE LA CAÑA DE AZÚCAR DE TUCUMÁN: ANÁLISIS DE
UN PROYECTO DE INVERSIÓN Y EL DESARROLLO SUSTENTABLE DE SUS
ORGANIZACIONES.....19**

**ELABORACIÓN DE GALLETAS A BASE DE HARINA DE MANDIOCA FORTIFICADAS
CON MORINGA Y YACÓN APTA PARA CELÍACOS.....23**

EL USO INADECUADO DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LA POBLACIONES RURALES.....31

ELABORACIÓN DE UN ENCURTIDO FERMENTADO POR BACTERIAS LÁCTICAS SELECCIONADAS POR SUS PROPIEDADES BIOTECNOLÓGICAS**PICKLES MANUFACTURED WITH AUTOCHTHONOUS LACTIC ACID BACTERIA SELECTED BY THEIR TECHNOLOGICAL PROPERTIES**SÁEZ G.D.^{1,2}; FLOMENBAUM L.² y ZÁRATE G.^{1,2*}¹ CERELA-CONICET, Chacabuco 145, San Miguel de Tucumán, Argentina.² Universidad de San Pablo-Tucumán, Av. Solano Vera y Camino a Villa Nougués, San Pablo.*Autor de correspondencia: gzarate@uspt.edu.ar**RESUMEN**

Entre los alimentos susceptibles de fermentación láctica, los 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. En estudios previos, se aislaron y caracterizaron cepas de bacterias lácticas (BL) a partir de vegetales fermentados de elaboración artesanal y se seleccionaron cepas por su potencial aplicación biotecnológica. El objetivo de este trabajo fue elaborar un alimento vegetal fermentado (encurtido tipo pickle) con las cepas de BL con las mejores propiedades. Las cepas que mostraron un mejor desarrollo en las condiciones propias de los encurtidos fueron *Lactiplantibacillus plantarum* GS34 y *Lacticaseibacillus rhamnosus* GS43, las cuales fueron capaces de inhibir por acidez a los patógenos alimentarios y no mostraron incompatibilidad, entre ellas, que impidan su uso conjunto, por lo que fueron seleccionadas como cultivo iniciador mixto e inoculadas en un alimento vegetal tipo pickle a fin de llevar adelante la fermentación y evaluar su comportamiento en el producto durante 60 días. Al respecto, se evaluó su viabilidad y actividad inhibitoria sobre una cepa enteropatógena de *E. coli* inoculada simultáneamente en el encurtido. Como resultado, se observó que las BL se mantienen en elevado número durante todo el periodo de almacenamiento analizado e inhiben completamente el desarrollo de enterobacterias, contribuyendo a la seguridad alimentaria del producto. El encurtido elaborado con estas BL resultó aceptable para un panel de consumidores elegidos al azar por lo que se puede concluir que *Lp. plantarum* GS34 y *Lc. rhamnosus* GS43 presentan potencial como cultivos iniciadores para productos vegetales fermentados.

Palabras clave: pickles, bacterias lácticas, enterobacterias, fermentación.

ABSTRACT

Among foods susceptible to lactic fermentation, vegetables represent an important niche for the study and selection of strains with relevant technological properties for the formulation of starter cultures for this type of matrices. In previous studies, lactic acid bacteria (LAB) were isolated from artisanal fermented vegetables and characterized technologically and strains with potential biotechnological application were selected. The objective of this work was to prepare a fermented vegetable food (pickle-type) with the BL strains with the best properties. The strains that showed better development in the pickling conditions were *Lactiplantibacillus plantarum* GS34 and *Lacticaseibacillus rhamnosus* GS43, which were capable of inhibiting food pathogens through acidity and did not show incompatibility between them that would prevent their use together. Therefore, they were selected as a mixed starter culture and inoculated in a pickle-type vegetable food in order to carry out the fermentation and evaluate their behavior in the product for 60 days. Viability and inhibitory activity of the starter on an enteropathogenic strain of *E. coli* inoculated simultaneously in the pickle were evaluated during fermentation and storage. As a result, it was observed that LAB remain in high numbers throughout the entire storage period analyzed and completely inhibit the development of Enterobacteriaceae, contributing to the food safety of the product. The pickle made with these LAB was acceptable to a panel of randomly chosen consumers, so it can be concluded that *Lp. plantarum* GS34 and *Lc. rhamnosus* GS43 have potential as starter cultures for fermented vegetable products.

Keywords: pickles, lactic acid bacteria, enterobacteria, fermentation.

INTRODUCCIÓN

Los cambios alimentarios de las últimas décadas, asociados al estilo de vida moderno, se reflejan en una dieta con alta ingesta de alimentos procesados, grasas y azúcares; y baja ingesta de frutas y verduras. El consumo de vegetales resulta fundamental para garantizar una adecuada nutrición y salud al ser humano. En particular, las hortalizas y las legumbres aportan a la dieta diferentes vitaminas, minerales, fibras y fitoquímicos como polifenoles y péptidos bioactivos (Tiwari y Cummins, 2013; Agrawal et al., 2023). A sus beneficios nutricionales se suma su potencial para prevenir enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) como patologías cardiovasculares, obesidad, diabetes, cáncer colorrectal, entre otras (Septembre-Malaterre et al., 2018). Al respecto, la *Organización Mundial de la Salud* (OMS) y la *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura* (FAO) (www.who.int/ ; www.fao.org) recomiendan el consumo diario de al menos 400 g de vegetales para evitar las ECNT y mitigar varias carencias de micronutrientes, sobre todo en los países menos desarrollados. Sin embargo, se trata de alimentos altamente perecederos por senescencia natural y deterioro microbiano que, además, pueden no estar disponibles en algunas épocas del año por estacionalidad o razones climatológicas. Por este motivo, se suele recurrir a métodos de conservación como tratamientos térmicos, preservantes químicos, alta presión hidrostática, radiación ionizante o campos pulsados, aunque algunos de estos procesamientos pueden afectar las características físicas, químicas y sensoriales del alimento (Das et al., 2016; Silveira Alexandre et al., 2022; Gomes et al., 2023).

Por el contrario, la fermentación es una técnica usada ancestralmente por el hombre para la biopreservación y el mejoramiento organoléptico de los alimentos, que implica el crecimiento y la actividad de microorganismos a expensas de los nutrientes presentes en la matriz alimentaria, con la producción de metabolitos que inhiben el desarrollo de potenciales patógenos y deteriorantes. Se trata, además, de una estrategia biotecnológica que permite incrementar las propiedades nutricionales y nutracéuticas de los alimentos, transformándolos en Alimentos Funcionales (Leroy y DeVuyst, 2014).

La mayoría de los vegetales son susceptibles de ser fermentados. En el caso de las frutas, en años recientes, se ha incrementado el desarrollo de jugos fermentados, mientras que entre las llamadas hortalizas o verduras, los productos fermentados con mayor difusión en el mercado son las coles (repollo y coliflor), pepinos, aceitunas y los encurtidos o pickles (elaborados con zanahorias, pimientos, remolachas, cebollas, calabazas, rábanos, espárragos, brócoli, brotes de bambú, nabos y alcaparras) (Nguyen et al., 2013; Saeedi et al., 2015; Bonatsou et al., 2017; Behera et al., 2020).

Los encurtidos son definidos por el artículo 972 del 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*” y son alimentos con una buena aceptación entre los consumidores de nuestro país.

Actualmente, la mayoría de los encurtidos se obtienen por fermentaciones espontáneas que dan lugar a alimentos de bajos estándares higiénicos y condiciones no reproducibles en parámetros de calidad. Por lo tanto, desde el punto de vista industrial, resulta de interés la selección de microorganismos que puedan llevar adelante la fermentación de vegetales de manera controlada y estandarizada

En general, y particularmente en la cultura occidental, la fermentación láctica es la más buscada y la preferida, por cuanto las bacterias lácticas (BL) son reconocidas por su seguridad (GRAS status, sigla en inglés para “Generalmente Reconocido como Seguro” de la Administración de Alimentos y Medicamentos, y QPS, sigla en inglés para “Presunción Cualificada de Seguridad” de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, EFSA) y por sus beneficios a la salud como probióticos y productores de prebióticos y postbióticos (Novik y Savich, 2019; Collado et al., 2019).

Las bacterias lácticas son un conjunto de microorganismos con morfología de bacilos o cocos Grampositivos, catalasa negativos, anaerobios facultativos, microaerófilos o aerotolerantes, desprovistos de citocromos, no esporulados, acidófilos o acidotolerantes, de metabolismo quimioorganótrofo y estrictamente fermentativo que producen ácido láctico como principal producto final de la fermentación de azúcares. Se encuentran en una amplia variedad de hábitats, especialmente aquellos ricos en carbohidratos, por lo que es posible encontrarlas en alimentos como productos cárnicos, lácteos, masa panaria, vegetales, ensilados, pero también en el suelo, aguas residuales; y los tractos intestinal, genital y respiratorio del hombre y de animales.

Para los microorganismos, la fermentación es un proceso catabólico anaeróbico de oxidación incompleta de moléculas orgánicas en ausencia de aceptores externos de electrones destinados a generar energía para el crecimiento y actividades vitales (Jay, 2000). De acuerdo con los metabolitos finales de la fermentación, las BL son agrupadas como homofermentadoras, es decir, aquellas que producen sólo ácido láctico; y heterofermentadoras, las que producen además de ácido láctico, otros metabolitos como acético, etanol y CO₂). Estos productos metabólicos son los responsables de la modificación fisicoquímica de las matrices alimentarias y de conferir las características distintivas a numerosos alimentos tales como yogur,

queso, encurtidos, vinos tintos, aceitunas y productos cárnicos fermentados. Sin embargo, en ocasiones son responsables de la alteración de algunos productos como por ejemplo la formación de CO₂ en productos cárnicos envasados al vacío que lleva a la hinchazón del envase, la producción de ácidos orgánicos como acético o fórmico que dan lugar a malos olores o la formación de limos que confieren viscosidad en productos cárnicos y en bebidas.

El uso de BL en la industria alimenticia, se realiza mediante la aplicación de cultivos iniciadores o “starters”, a las materias primas, los que son 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).

Para la formulación de estos cultivos iniciadores es necesaria la selección de cepas con diferentes propiedades tecnológicas relevantes para el producto final, principalmente 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 contribuyen al *flavor* y a la calidad nutricional del producto (Bintsis 2018). 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 pueden causar en su salud (Sáez et al., 2017, 2018).

Los criterios de selección de potenciales microorganismos iniciadores incluyen también la evaluación del poder antimicrobiano de los ácidos orgánicos (láctico y acético), peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas y otros metabolitos secundarios que actuarán como bioprotectores y biopreservantes (Shirai et al., 1996; Axelsson, 1998; Vázquez et al., 2009). Las bacteriocinas que producen las BL han sido intensamente estudiadas por su actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Salmonella* (Holo et al., 2001; Vázquez et al., 2009, Zapaznik et al., 2022). 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 parámetros comúnmente estudiados. Finalmente, la decisión de usar un cultivo único o multicepa dependerá de la compatibilidad biológica, entre ellas.

Actualmente, existen a nivel global, microorganismos iniciadores (conocidos también como fermentos) que se comercializan congelados o deshidratados para la manufactura de alimentos lácteos (yogur, quesos), embutidos cárnicos (salames, chorizo español) y alimentos de origen vegetal (encurtidos, chucrut y aceitunas). Sin embargo, en nuestro país, no existen fermentos comerciales de desarrollo local para este último tipo de alimentos, por lo que se planteó como línea de investigación de la USPT (proyectos IC-400; IC-500) la obtención de BL silvestres a partir de alimentos fermentados artesanales y su caracterización para ser usadas como fermento en el desarrollo de alimentos vegetales encurtidos.

Para ello, 118 aislamientos de BL obtenidos a partir de productos lácteos, cárnicos y vegetales fermentados (aceitunas) fueron evaluados en cuanto a su capacidad acidificante, osmotolerancia, producción de compuestos de aroma y actividad proteolítica. En base a los resultados obtenidos se eligieron seis cepas que fueron identificadas por secuenciación del gen ARNr 16S como *Lacticaseibacillus rhamnosus* GS21 y GS43, *Lactiplantibacillus plantarum* GS31 y GS34, *Weissella viridicens* GS25 y *W. paramesenteroides* GS35 y se evaluaron propiedades tecnológicas relevantes para la elaboración de encurtidos: crecimiento en presencia de NaCl, a pH ácido e inhibición de microorganismos patógenos (*E. coli* y *Listeria* sp.). La evaluación de compatibilidad permitió determinar que todas son potencialmente combinables en un fermento mixto (Sáez et al., 2016) por lo que se decidió formular un fermento compuesto por *L. plantarum* GS34 y *W. viridescens* GS25. Es de esperar que la elaboración de un encurtido con la adición de este cultivo iniciador formulado con bacterias seleccionadas por sus propiedades biotecnológicas permita obtener productos con valor agregado, homogéneos y reproducibles, con un impacto positivo en los parámetros nutricionales, fisicoquímicos, organolépticos y de inocuidad del producto final. En consecuencia, el objetivo de este trabajo fue elaborar un encurtido con las BL seleccionadas evaluando su poder bioprotector y aceptabilidad organoléptica entre los consumidores.

MATERIALES Y MÉTODOS

- *Microorganismos y condiciones de crecimiento*

Se emplearon en este trabajo, las cepas *Lactiplantibacillus plantarum* GS34 (aislada de aceitunas en salmuera) y *Lacticaseibacillus rhamnosus* GS43 (aislada de queso artesanal) seleccionadas en estudios previos (Sáez et al., 2016) y la cepa de *Escherichia coli* C3, provista por el Instituto de Microbiología “Luis Verna” de la Universidad Nacional de Tucumán y aislada de las heces de un niño diagnosticado con diarrea enteropatógena. Los microorganismos almacenados a -20 °C en crioviales con LEL (leche descremada 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 et al., 1961) a 37 °C y subcultivados antes de su uso experimental al menos dos veces en este medio cada 24 horas.

- *Elaboración del encurtido*

Para los ensayos por duplicado se emplearon los ingredientes que se mencionan a continuación y frascos de vidrio tapa a rosca de 360 mL.

Ingredientes: 2 cebollas grandes / 2 pimientos verdes / 2 pimientos rojos / 3 zanahorias / 3 pepinos / la mitad de una coliflor grande / 10 dientes de ajo / 10 hojas de laurel / 2,5 litros de agua / 3 cucharadas de pimienta / 3 cucharadas de azúcar / 200 g de sal / 160 mL de vinagre de manzana.

Selección de la materia prima: la materia prima usada fue fresca, sana, libre de alteraciones, desprovista de brotes, textura firme y en estado de maduración adecuado.

Acondicionamiento de la materia prima: se lavaron los vegetales con abundante agua limpia, se pelaron quitando cuidadosamente la cáscara con cuchillo o pelador debidamente limpio y se fraccionaron a un tamaño razonablemente uniforme para llenar los envases de vidrio con el producto ya elaborado.

Acondicionamiento de los recipientes: los recipientes de almacenamiento del encurtido fueron lavados con detergente y enjuagados con abundante agua. Para su esterilización fueron colocados durante 30 minutos en una olla conteniendo agua hirviendo, luego se dejaron enfriar y se escurrieron boca abajo sobre un repasador o lienzo. Una vez esterilizados, toda manipulación de los frascos se hizo con las manos perfectamente limpias y evitando tocar el interior de estos. Antes de colocar el producto elaborado, el interior de los frascos y la tapa fueron adicionalmente sanitizados con un algodón empapado en alcohol 70 °.

Elaboración de los pickles: para la realización del alimento se colocó agua en una olla de acero inoxidable y se dejó hervir durante 5 minutos con los condimentos antes mencionados y el vinagre. Luego se agregaron coliflores y zanahorias y 5 minutos más tarde se adicionaron el resto de los vegetales y agua para completar un volumen final de 5 litros. Se dejó hervir durante 5 minutos con la olla tapada y luego se dejó reposar 15 minutos (hornalla apagada) antes de proceder al envasado.

Envasado: el encurtido fue fraccionado en caliente en los frascos, para evitar la presencia de O₂ dentro del recipiente, se tapó con la tapa a rosca y se colocaron invertidos para favorecer el vacío durante 60 minutos. Luego se dejaron a temperatura ambiente para su inoculación (Figura 1).



Figura 1: Encurtidos elaborados con diferentes vegetales antes de la fermentación.

- *Inoculación del alimento con los microorganismos*

Para la inoculación de los microorganismos se definieron 4 condiciones experimentales usándose dos frascos de encurtido para cada una de ellas.

- Condición 1: control sin microorganismos
- Condición 2: inoculado con BL
- Condición 3: inoculado con patógenos.
- Condición 4: inoculado con BL y patógenos.

Los microorganismos crecidos en tubos con 5 mL de medio de cultivo fueron lavados (3000 rpm, 5 min) y resuspendidos al volumen original en solución fisiológica (NaCl, 0,9 %) antes de su inoculación en los frascos para evitar alterar el sabor del alimento.

Para la inoculación con BL (Condiciones 2 y 4) se utilizaron por frasco 5 mL de *Lp. plantarum* GS34 (5×10^7 UFC/mL) y 5 mL de *Lc. rhamnosus* GS43 (5×10^7 UFC/mL). Para la inoculación con patógenos se utilizaron 5 mL de *E. coli* C3 (1×10^6 UFC/mL) por cada frasco de las Condiciones 3 y 4. Los encurtidos inoculados se dejaron fermentar a 25 °C durante 24 h y se almacenaron posteriormente a 4 °C durante 6 meses (Figura 2).



Figura 2: Inoculación de los encurtidos con las BL seleccionadas.

- *Análisis microbiológico de los encurtidos*

Luego de la inoculación se tomaron alícuotas a intervalos para recuento microbiológico de los grupos más relevantes: aerobios mesófilos totales, enterobacterias, bacterias lácticas, hongos y levaduras. Las muestras fueron procesadas por la técnica de diluciones sucesivas y se sembraron en profundidad en medios agarizados selectivos para cada grupo microbiano.

Los tiempos analizados fueron: 0 (luego de la inoculación), 1, 15, 30, 45 y 60 días de almacenamiento.

Los medios de cultivo para el recuento de microorganismos y las condiciones de incubación fueron las siguientes:

- M.R.S. agar: medio selectivo para bacterias lácticas, incubado 72 h en microaerofilia a 37 °C.
- MacConkey agar: medio selectivo para el recuento de enterobacterias (*Escherichia coli* y otras), incubado 24 h en aerobiosis a 37 °C.
- Plate Count Agar (PCA): medio selectivo para recuento de microorganismos mesófilos totales, incubado 48 h en aerobiosis a 37 °C.
- Sabouraud glucosado agar: medio selectivo para el recuento de hongos y levaduras, incubado 72 horas en aerobiosis a 37 °C.

- *Evaluación preliminar de aceptabilidad*

El alimento elaborado con BL (Condición 2) fue degustado por un panel no entrenado, compuesto por 50 personas elegidas al azar en la provincia de Jujuy, solicitándoles que indiquen en base a su percepción sensorial del alimento el grado de aceptación de este. Para ello, se proveyó a cada catador una bandeja limpia con 3 cucharadas de pickles, una cuchara plástica limpia y una hoja para indicar el grado de agrado o desagrado del producto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La fermentación láctica de vegetales representa una estrategia valiosa y accesible para prolongar la vida útil e inocuidad de estos alimentos y ofrece a la vez la posibilidad de mejorar sus características organolépticas y potenciar sus propiedades funcionales al aportar metabolitos bioactivos a la matriz alimentaria. A los fines de evaluar el potencial biotecnológico como cultivos iniciadores de dos cepas de BL aisladas en el laboratorio de la USPT en el marco del Proyecto IC-500, se elaboró en forma

experimental un alimento vegetal fermentado tipo pickles, el cual fue inoculado con *Lp. plantarum* GS34 y *Lc. rhamnosus* GS43 seleccionadas previamente por sus propiedades tecnológicas. A fin de evaluar su efecto en la biopreservación y la seguridad del alimento, se determinó su capacidad para prevenir el desarrollo en el mismo de una cepa enteropatógena de *Escherichia coli*. En las figuras 3 a 7 se muestran los recuentos de los grupos microbianos relevantes en las muestras obtenidas hasta los 60 días de almacenamiento de los encurtidos a 4 °C.

La condición 1 fue usada como control de fermentación y contenía la microbiota endógena del alimento ya que no se introdujo en ella ningún microorganismo exógeno en forma intencional (Figura 3). En este encurtido se observó una microbiota basal de aproximadamente 10^4 UFC/mL de BL y $1,5 \times 10^5$ UFC/mL de aerobios mesófilos totales. Esta microbiota se incrementó con el tiempo de fermentación alcanzando un máximo de $4,7 \times 10^7$ UFC/mL para BL a los 15 días y $2,4 \times 10^8$ UFC/mL de mesófilos a los 30 días de almacenamiento respectivamente. La presencia de enterobacterias, hongos y levaduras fue detectada a los 45 y 60 días respectivamente.

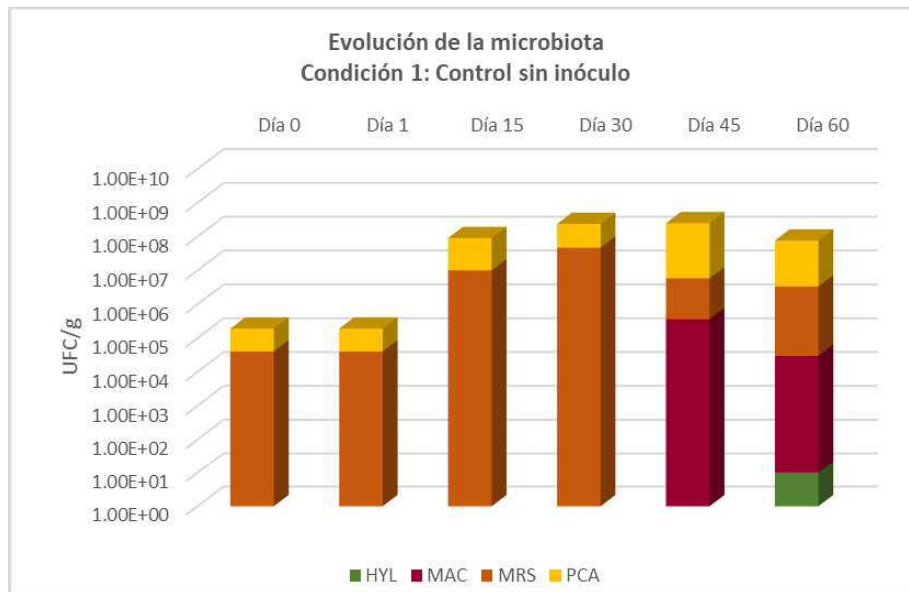


Figura 3: Recuento de microorganismos en el encurtido fermentado naturalmente (Control).HYL: Recuento de hongos y levaduras; MAC: Recuento de enterobacterias; MRS: Recuento de bacterias lácticas; PCA: Recuento de aerobios mesófilos totales.

En la condición 2 se inocularon las cepas de BL seleccionadas previamente en base a sus propiedades tecnológicas. Si bien no se discriminó en este estudio a los microorganismos inoculados de aquellos pertenecientes a la microbiota láctica endógena ni tampoco la evolución individual de cada uno de ellos en el tiempo, puede observarse que la adición de 10^7 UFC/mL de las BL seleccionadas permite mantener durante todo el almacenamiento una elevada carga de estos microorganismos alcanzando al día 45 un recuento de $1,58 \times 10^8$ UFC/mL. Al igual que en el control la microbiota láctica impidió la proliferación de enterobacterias hasta los 45 días de almacenamiento (Figura 4).

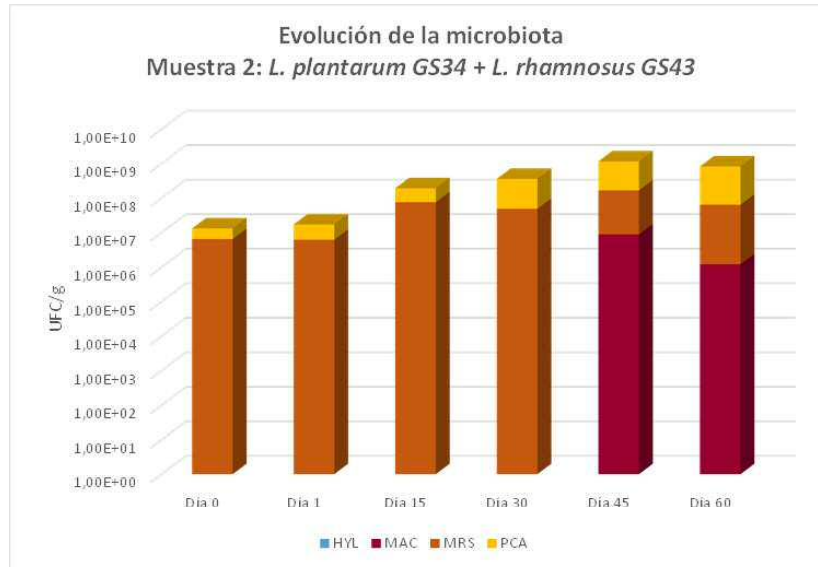


Figura 4: Recuento de microorganismos en el encurtido inoculado con el fermento de BL. HYL: Recuento de hongos y levaduras; MAC: Recuento de enterobacterias; MRS: Recuento de bacterias lácticas; PCA: Recuento de aerobios mesófilos totales.

La condición 3 fue inoculada con una cepa enteropatógena de *E. coli*. En este caso se observó desde el día 0 y durante todo el almacenamiento un elevado recuento de enterobacterias ($6,8 \times 10^6$ UFC/mL a los 60 días). Si bien la microbiota láctica endógena también fue abundante durante todo el ensayo (en forma similar al control) alcanzando valores de 7×10^7 UFC/mL a los 45 días, ésta no fue capaz de inhibir el desarrollo del patógeno inoculado (Figura 5).

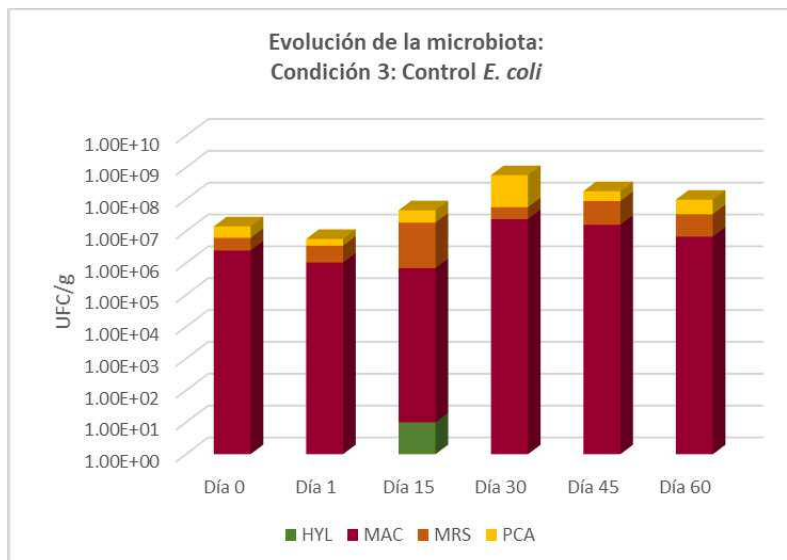


Figura 5: Recuento de microorganismos en el encurtido inoculado con *Escherichia coli* C3. HYL: Recuento de hongos y levaduras; MAC: Recuento de enterobacterias; MRS: Recuento de bacterias lácticas; PCA: Recuento de aerobios mesófilos totales.

Finalmente, la condición 4 fue inoculada con las BL seleccionadas (*Lp. plantarum* GS34 y *Lc. rhamnosus* GS43) y la cepa patógena de *E.coli* C3. En este caso, se puede observar (Figura 6) que la microbiota láctica fue aumentado en el tiempo (en forma similar a la condición 2) alcanzando a los 30 días recuentos de $7,5 \times 10^7$ UFC/mL, valor que se mantuvo hasta el final del ensayo. Además, esta

microbiota láctica fue capaz de inhibir desde las 24 horas de fermentación a la población de enterobacterias (compuesta probablemente en su mayor proporción por el enteropatógeno) no detectándose su presencia desde el día 15 hasta los 60 días de almacenamiento.

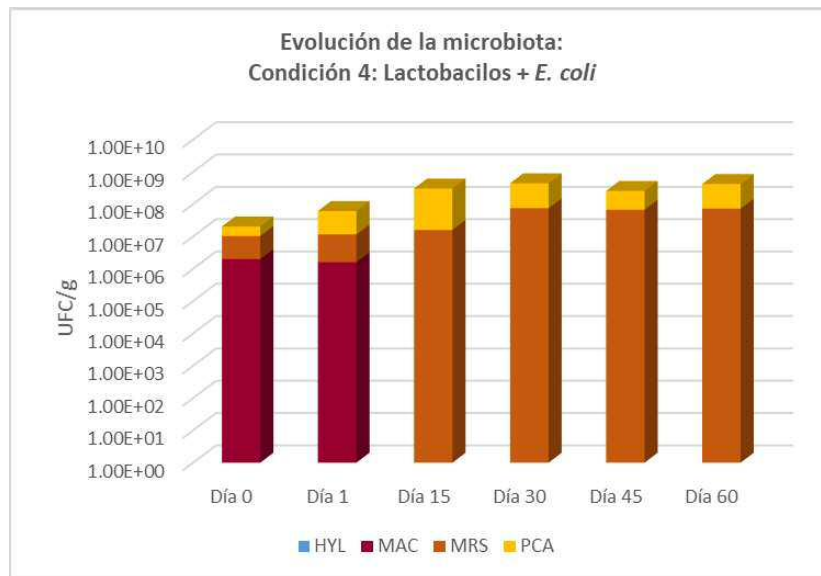


Figura 6: Recuento de microorganismos en el encurtido inoculado con BL y *E. coli* C3. HYL: Recuento de hongos y levaduras; MAC: Recuento de enterobacterias; MRS: Recuento de bacterias lácticas; PCA: Recuento de aerobios mesófilos totales.

Con respecto a la aceptabilidad del encurtido, 5 personas respondieron que el alimento les resultaba desagradable, 20 personas manifestaron que les resultaba aceptable, 15 agradable, y 10 de los encuestados manifestaron que era muy agradable y recomendarían el producto (Figura 7).



Figura 7: Resultado de la encuesta de aceptabilidad del encurtido inoculado con BL.

DISCUSIÓN

Las frutas y vegetales constituyen una parte vital de nuestra alimentación ya que aportan hidratos de carbono, vitaminas, minerales, fibra vegetal y diferentes fitoquímicos beneficiosos para la salud. Se consumen como alimentos frescos crudos o cocinados o transformados en diferentes productos como conservas enlatadas, encurtidos, licuados o papillas vegetales, etc. En la actualidad, los consumidores buscan además de conocer los componentes nutritivos de lo que ingieren, productos con bajo contenido de aditivos y grasas saturadas por lo que se han inclinado por el consumo de productos naturales con el objetivo de cuidar su salud. Al respecto, organizaciones como la OMS recomiendan aumentar el consumo

de frutas y vegetales para disminuir el riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles (Allende et al., 2006). Su importancia actual en la salud los lleva a ser considerados como alimentos nutracéuticos y funcionales (es decir, aquellos que más allá de sus beneficios nutricionales pueden prevenir enfermedades) por lo que su consumo marcará significativamente la tendencia en la industria alimenticia en los próximos años. Además de los beneficios para la salud, los cambios en el estilo de vida actual han incrementado la demanda de los consumidores hacia alimentos saludables listos para consumir o mínimamente procesados, por lo que la búsqueda de técnicas de biopreservación de alimentos que incrementan el tiempo de vida útil y la seguridad microbiológica del alimento, mejorando a la vez su calidad y valor nutricional resultan de gran interés. En este sentido, existe una larga historia y trayectoria en el empleo artesanal e industrial de BL como biopreservantes y aditivos de alimentos a los que confieren propiedades organolépticas, nutricionales y funcionales mejoradas con respecto a aquellos no inoculados.

Considerados como matriz alimentaria, los vegetales constituyen un nicho de gran importancia para el estudio y selección de BL con potencial para ser usados como cultivos iniciadores. Los productos típicos más investigados son las aceitunas, pepinos y coles y en menor medida zanahorias, remolachas y pimientos. En los países orientales se elaboran y consumen otros productos vegetales fermentados que incorporan rábanos, nabos, coles de Bruselas, lechugas y legumbres (Montaño et al., 1992).

Un producto aceptado y consumido regularmente en nuestro país son las conservas vegetales tipo pickle o encurtidos, cuyo proceso de elaboración implica fermentaciones lácticas espontáneas que conducen al dominio de la microbiota láctica. Estos microorganismos eliminan, como consecuencia de la acidificación, a aquellos responsables de alteraciones (principalmente bacterias G (-) y bacterias esporuladas), y por otro lado a sus enzimas pectinolíticas responsables de las putrefacciones blandas. Las BL que predominan en la fase de iniciación y la fermentación primaria de los vegetales incluyen a *Leuconostoc mesenteroides*, *Levilactobacillus brevis* y *Lactiplantibacillus 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. *Lp. plantarum* es el más acidotolerante y es el que finaliza la mayor parte de las fermentaciones en los vegetales. Por otro lado, *Pediococcus rhamnosus* y *P. cerevisiae* también suelen estar implicados en la fermentación de los vegetales (Cabeza-Herrera, 2006).

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). Ahora bien, la incorporación de las BL en la producción de alimentos vegetales fermentados requiere la evaluación previa de las propiedades tecnológicas relevantes para el producto al cual pretenden aplicarse, a fin de seleccionar las cepas más apropiadas que formarán parte del “cultivo iniciador” del mismo.

En estudios previos se aislaron y caracterizaron las BL endógenas de alimentos fermentados artesanales y se seleccionaron las cepas con las mejores posibilidades para sobrevivir en el ambiente ácido y salino de los encurtidos. Los microorganismos seleccionados fueron *Lactiplantibacillus plantarum* GS34 y *Lacticaseibacillus rhamnosus* GS43, los cuales fueron inoculados como cultivo iniciador en un encurtido tipo pickles formulado con 4% NaCl y vinagre de manzana el cual se dejó fermentar a 25 °C durante 60 días. A fin de evaluar el potencial bioprotector de los lactobacilos seleccionados se inoculó un lote de encurtidos con una cepa de enteropatógenos en forma simultánea a las BL.

Como resultado se pudo observar que los encurtidos no inoculados presentaban naturalmente una carga de 10^5 UFC/mL de BL propias de la materia prima, población que evolucionó hasta 3 logaritmos en 30 días. La adición del cultivo iniciador con LpGS34 y LrhGS43 permitió iniciar la fermentación con 10^7 UFC/mL y alcanzar la misma población máxima de BL que el encurtido control (10^8 UFC/mL) pero en menos tiempo (15 días), lo que pone de manifiesto la rápida adaptación de estos microorganismos al ambiente extremo del encurtido. Tanto las BL endógenas (Condición 1) como las del cultivo iniciador (Condición 2) evitaron el desarrollo de enterobacterias en los encurtidos hasta los 45 días, siendo estas cepas de BL capaces de evitar completamente la aparición de hongos y levaduras.

Es de destacar particularmente que cuando se inoculó el encurtido con *E.coli* enteropatógena, las BL del iniciador LpGS34 y LrhGS43 (Condición 4) fueron capaces de inhibir progresivamente al patógeno, el cual no fue detectado desde los 15 días de almacenamiento. Por el contrario, las BL

endógenas (Condición 3) no pudieron inhibir, ni eliminar la presencia de la cepa de *E. coli* enteropatógena durante los 60 días analizados.

Las ventajas del empleo de BL seleccionadas han sido demostradas y puestas de manifiesto previamente por otros autores. Por ejemplo, Vescovo et al. (1995, 1996) observaron un significativo efecto inhibitorio en la dinámica de crecimiento de la microbiota asociada a vegetales listos para consumir (ensaladas comerciales), en particular la reducción y eliminación de mesófilos, coliformes y enterococos desde los primeros días de almacenamiento por acción de *Lactocaseibacillus casei* y en menor medida por pediococos. De igual manera, Kim et al. (2008) observaron que el crecimiento de las BL en el kimchi (producto vegetal fermentado coreano) es importante para el control de patógenos alimentarios como *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, y *Staphylococcus aureus*.

En un trabajo similar desarrollado en la Universidad del Norte Santo Tomás de Aquino (Barrionuevo, 2009) en el que se formuló encurtidos con *Lc. casei* que luego fueron inoculados con 10^2 o 10^5 UFC/mL de *E. coli* solo se observó capacidad de las BL de inhibir a las enterobacterias cuando éstas se encontraban en baja dosis, lo que pone de manifiesto la importancia de las prácticas higiénicas en la elaboración del alimento para evitar la contaminación elevada de la materia prima.

El uso de BL para la elaboración de encurtidos presenta ventajas adicionales con respecto a aquellos elaborados de manera artesanal. Si bien el agregado de un cultivo iniciador puede implicar un costo más elevado, también favorecería la obtención de productos de mayor calidad y con características y propiedades constantes y reproducibles.

En cuanto a los datos de aceptabilidad recolectados, la mayoría de los encuestados respondieron que el encurtido formulado con BL les resultó aceptable, agradable o recomendable y solo un 10 % manifestó desagrado, lo que marca una tendencia que puede resultar predictiva de la aceptación general del producto entre un grupo masivo de consumidores. En estudios similares, Yu et al. (2023) aislaron BL de pickles en China a fin de seleccionar aquellos que puedan inocularse intencionalmente para mejorar la calidad de la fermentación. En comparación con los pickles fermentados naturalmente aquellos inoculados con BL como *Limosilactobacillus fermentum* y *Lp. plantarum* requirieron menor tiempo de fermentación y tuvieron menores niveles de nitritos. Además, la evaluación sensorial mostró que los pickles inoculados con *Lp. plantarum* FM 17 tuvieron los mayores índices de aceptabilidad general lo que puede estar relacionado a la producción de compuestos relacionados al flavor como ácidos orgánicos, aminoácidos libres y compuestos volátiles. Otros autores han reportado que las BL tienen diferentes efectos en la calidad sensorial de los encurtidos (Choi et al., 2019). Xiong et al. (2014) reportaron que *Lp. plantarum* produce menos ácido acético y cítrico que *Leuconostoc mesenteroides* pero más ácido láctico cuando son inoculados deliberadamente para la fermentación de pickles y Wu et al., (2014) informaron que la inoculación con *Lp. plantarum* puede incrementar el contenido de compuestos volátiles, incluyendo ácidos, alcoholes, ésteres y fenoles cuando son inoculados en pickles.

CONCLUSIÓN

Lp. plantarum GS34 y *Lc. rhamnosus* GS43 empleadas como cultivo iniciador de pickles se adaptaron satisfactoriamente al producto manteniendo un elevado recuento de BL durante 60 días. Se demostró el potencial bioprotector del fermento mixto, ya que su inoculación permitió inhibir el desarrollo de un enteropatógeno como *Escherchia coli*. La adición del cultivo iniciador no alteró en forma negativa las características del alimento elaborado, resultando un producto organolépticamente aceptable para.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo forma parte de los resultados de la Tesis de Grado del Lic. en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Leandro Flomenbaum y fue realizado en el marco de su participación como estudiante integrante del proyecto de investigación IC-500 financiado por la USPT.

BIBLIOGRAFÍA

- Allende A, Martinez B, Selma V, Gil ML, Suarez JE, Rodríguez A. 2006. Minimal processing for healthy Traditonal foods. Trends Food Sci Technol, 17:513-19.
- Agrawal RS, Ranveer RC, Rathod NB, Nirmal NP. 2023. Phytochemicals as bioactive ingredients for functional foods. In Pati S, Sarkar T, Lahiri D, editors. Recent Frontiers of Phytochemicals, Elsevier, pp. 95-108.

- Axelsson L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In Salmien S, von Wright, A, editors. Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects, 2nd edition, Marcel Dekker Inc, pp. 1-72.
- Barrionuevo MB. 2009. Elaboración de encurtidos con menor contenido de sodio y con adición de bacterias lácticas. Perspectivas nutricionales. Tesis Licenciatura en Nutrición, Universidad del Norte Santo Tomás de Aquino, Tucumán, Argentina.
- Behera SS, El Sheikh AF, Hammami R, Kumar A. 2020. Traditionally fermented pickles: How the microbial diversity associated with their nutritional and health benefits?. *J Funct Foods*, 70:103971.
- Bintsis T. 2018. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS microbiol*, 4(4):665-684.
- Bonatsou S, Tassou CC, Panagou EZ, Nychas GE. 2017. Table Olive Fermentation Using Starter Cultures with Multifunctional Potential. *Microorganisms*, 285(2):30.
- Buckenhüsches HJ. 1997. Fermented vegetables. In Doyle PD, Beuchat LR, Montville TJ, editors. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2nd edition, ASM Press, Washington, DC, USA, pp. 595-600.
- Cabeza Herrera EA. 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.
- Choi YJ, Yong S, Lee MJ, Park SJ, Yun YR, et al. 2019. Changes in volatile and non-volatile compounds of model kimchi through fermentation by lactic acid bacteria. *LWT*, 105:118-26.
- Código Alimentario Argentino – Capítulo XI: Artículo 972.
- Collado MC, Vinderola G, Salminen S. 2019. Postbiotics: facts and open questions. A position paper on the need for a consensus definition. *Benef microbes*, 10(7):711-19.
- Das R, Pandey H, Das B, Sarkar S. 2016. Fermentation and its application in vegetable preservation: a review. *Int J Food Ferment Technol*, 6(2):207-17.
- García Ibarra JA. 2007. Identificación de bacterias ácido-lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Gomes BAF, Alexandre ACS, de Andrade GAV, Zanzini AP, de Barros HEA, Costa PA, et al. 2023. Recent advances in processing and preservation of minimally processed fruits and vegetables: A review—Part 2. Physical methods and global market outlook. *Food Chem Advances*, 2:100304.
- Holo H, Jeknic Z, Daeschel M, Stevanovic S, Nes IF. 2001. Plantaricin w from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide Lantibiotics. *Microbiol*, 147:643-51.
- Jay JM. 2000. Fermentation and fermented dairy products. *Modern food microbiology*, 6th edition. Aspen Publishers Inc. Gaithersburg, USA, pp. 113-30.
- Kim YS, Zheng ZB, Shin DH. 2008. Growth inhibitory effects of kimchi (Korean traditional fermented vegetable product) against *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*. *J Food Prot*, 71(2):325-32.
- Leroy F, De Vuyst L. 2014. Fermented food in the context of a healthy diet: how to produce novel functional foods?. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 17(6):574-81.
- Montaño A, de Castro A, Rejano L. 1992. Transformaciones bioquímicas durante la fermentación de productos vegetales. *Grasas y Aceites*, 43(6):352-60.
- Nguyen DTL, Van Hoorde K, Cnockaert M, De Brandt E, Aerts M, Vandamme P. 2013. A description of the lactic acid bacteria microbiota associated with the production of traditional fermented vegetables in Vietnam. *Int J Food Microbiol*, 163(1):19-27.
- Novik G, Savich V. 2019. Beneficial Lactic Acid Bacteria. In Balamurugan K, Udayakumar P, editores. *Pocket Guide to Bacterial Infections*, CRC Press, Boca Raton, USA pp. 225.
- Raibaud P, Caulet M, Galpin JV, Mocquot G. 1961. Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs II. Streptococci: selective enumeration and differentiation of the dominant group. *J Appl Bacteriol*, 24:285-91.
- Saeedi M, Shahidi F, Mortazavi SA, Milani E, Yazdil FT. 2015. Isolation and identification of lactic acid bacteria in winter salad (local pickle) during fermentation using 16S rRNA gene sequence analysis. *J Food Saf*, 35(3):287-94.
- Sáez GD, Flomenbaum L, Zárate G. 2016. Selección de cepas para el desarrollo de un cultivo iniciador aplicable a la elaboración de alimentos vegetales fermentados. *IDITEC*, 5:11-22.
- Sáez GD, Hébert EM, Saavedra L, Zárate G. 2017. Molecular identification and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented kidney beans flours (*Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus*) in northwestern Argentina. *Food Res Int*, 102:605-15.
- Sáez GD, Saavedra L, Hébert EM, Zárate G. 2018. Identification and biotechnological characterization of lactic acid bacteria isolated from chickpea sourdough in northwestern Argentina. *LWT*, 93:249-56.
- Septembre-Malaterre A, Remize F, Poucheret P. 2018. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Res Int*, 104:86-99.

- Shirai K, Guerrero L, Lara P. 1996. Bacterias lácticas en alimentos fermentados. *Ciencia*, 47:125-37.
- Silveira Alexandre AC, Ferreira Gomes BA, Duarte GN, Piva SF, Barros Zauza S, de Barros Vilas Boas EV. 2022. Recent advances in processing and preservation of minimally processed fruits and vegetables: A review–Part 1: Fundamentals and chemical methods. *J Food Process Preserv*, 46(8):e16757.
- Tiwari U, Cummins E. 2013. Factors influencing levels of phytochemicals in selected fruit and vegetables during pre-and post-harvest food processing operations. *Food Res Int*, 50(2):497-506.
- Vázquez SM, Suarez H, Zapata S. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Rev Chil Nutr*, 36(1):64-71.
- Vescovo M, Torriani S. 1995. Inhibitory effect of selected lactic acid bacteria on microflora associated with ready-to-use vegetables. *Lett Appl Microbiol*, 21:121-25.
- Vescovo M, Torriani S, Orsi C, Macchiarolo F, Scolari G. 1996. Application of antimicrobial-producing lactic acid bacteria to control pathogens in ready-to-use vegetables. *J Appl Microbiol*, 81:113-19.
- Wu C, Zheng J, Huang J, Zhou R. 2014. Reduced nitrite and biogenic amine concentrations and improved flavor components of Chinese sauerkraut via coculture of *Lactobacillus plantarum* and *Zygosaccharomyces rouxii*. *Ann Microbiol*, 64(2):847–57.
- Xiong T, Li X, Guan Q, Peng F, Xie M. 2014. Starter culture fermentation of Chinese sauerkraut: Growth, acidification and metabolic analyses. *Food Control*, 41:122-27.
- Yu Y, Xu Y, Li L, Chen S, An K, Yu Y, et al. 2023. Isolation of lactic acid bacteria from Chinese pickle and evaluation of fermentation characteristics. *LWT*, 180:114627.
- Zapašnik A, Sokółowska B, Bryła M. 2022. Role of lactic acid bacteria in food preservation and safety. *Foods*, 11(9):1283.