



**Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco  
Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de La Salud**

**Laboratorio de Biotecnología Bacteriana**

**Selección y uso de bacterias lácticas para el  
procesamiento de crucíferas y del alga undaria  
mediante fermentación.**

**Tesistas: Romina Belén Parada**

**Directoras: Dra. Marisol Vallejo y Dra. Carmen Campos**

**Trabajo de Tesis para optar por el título de Doctora en Ciencias  
Biológicas**

**2022**

*“La ciencia es el alma de la prosperidad de las  
naciones y la fuente de vida de todo progreso.”*

*Louis Pasteur*

## **Agradecimientos**

*A mis directoras Marisol Vallejo y Carmen Campos, al igual que a Rogelio Marguet, por darme la oportunidad de desarrollar el doctorado, por acompañarme a transitar este camino; por la dedicación y la paciencia, sin ellos no hubiese podido lograr llegar a esta instancia tan anhelada. A María Fernanda Gliemmo por su dedicación durante mi pasantía en la UBA.*

*A mis compañeros de laboratorio, Franco, Azul y Débora, por crear un ambiente agradable de trabajo y por estar siempre dispuestos a darme una mano.*

*Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca doctoral recibida.*

*A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco y al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación por los financiamientos otorgados para los proyectos de investigación.*

*A Fernando Dellatorre por su colaboración en la recolección del alga Undaria.*

*Agradezco profundamente a toda mi familia, tanto de Chubut como de Mendoza. A mis padres, por sus palabras de apoyo en los momentos más difíciles. A mi hermana Silvana, por estar en las buenas y en las malas, por escucharme y darme siempre sus consejos. A mi hermano Carlos, por su "aguante" al recibirme durante mi estadía en Buenos Aires y compartir tantos momentos. A mis tíos y padrinos, por sus consejos, por tantos momentos compartidos. A Ezequiel, que siempre me ha brindado su apoyo incondicional para poder cumplir todos mis objetivos personales y académicos, por ser mi compañero en la vida.*

*Un sincero agradecimiento a mis amigos de siempre, Magalí, Franco, Nadine, Cristian y Damaris, por ser incondicionales, por su apoyo, por compartir tantos momentos lindos a lo largo de estos años.*

*Para finalizar agradecer a todos aquellos profesionales que han estado presentes a lo largo de estos años, y que han contribuido en mi formación.*

*A todos muchas gracias...*

## TABLA DE CONTENIDO

Índice de abreviaturas .....	1
RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 La fermentación.....	9
1.1.1 Historia de la fermentación .....	9
1.1.2 Bacterias ácido lácticas (BAL) .....	10
1.1.2.1 Metabolismo de los azúcares.....	11
1.1.2.2 Fermentación láctica de vegetales.....	13
1.1.3 Procesos de fermentación .....	15
1.1.3.1 Fermentaciones espontáneas.....	15
1.1.3.2 Black-slopping .....	16
1.1.3.3 Fermentaciones controladas.....	17
1.1.4 Funciones de los cultivos iniciadores .....	18
1.1.5 Propiedades funcionales y tecnológicas de BAL autóctonas .....	19
1.1.5.1 Producción de compuestos antimicrobianos.....	19
1.1.5.2 Enzimas de las BAL involucradas en el proceso de fermentación de vegetales .....	23
1.1.5.3 Tolerancia a fenoles y polifenoles .....	28
1.1.5.4 Producción de exopolisacáridos (EPS) .....	30
1.1.5.5 Tolerancia al NaCl y al pH ácido.....	31
1.1.5.6 Incremento de la actividad antioxidante .....	31
1.1.6 Factores de virulencia y/o rasgos negativos .....	31
1.1.6.1 Producción de aminas biógenas .....	32
1.1.6.2 Actividad gelatinasa .....	33
1.1.6.3 Actividad hemolítica .....	33
1.1.6.4 Resistencia antibiótica .....	34
1.1.7 Vegetales fermentados tradicionales .....	34
1.2 Las brasicáceas.....	38

1.2.1 Características generales de las brasicáceas .....	38
1.2.2 Taxonomía.....	38
1.2.3 Morfología de la familia Brassicaceae.....	39
1.2.4 Género <i>Brassica</i> L.....	40
1.2.4.1 <i>Brassica rapa</i> L. var. <i>glabra</i> Regel.....	40
1.2.4.2 <i>B. rapa</i> L. ssp. <i>chinensis</i> (L.) Hanelt .....	41
1.2.4.3 <i>B. oleracea</i> L. ssp. <i>capitata</i> (L.) Metzg.....	42
1.2.5 Efectos beneficiosos de los vegetales <i>Brassica</i> en la salud humana .....	43
1.2.6 Moléculas bioactivas.....	44
1.2.6.1 Compuestos nutricionales.....	44
1.2.6.2 Metabolitos secundarios .....	46
1.2.6.3 Glucosinolatos .....	47
1.2.6.4 Compuestos fenólicos.....	47
1.3 <i>Undaria pinnatifida</i> .....	54
1.3.1 Taxonomía del alga <i>U. pinnatifida</i> .....	54
1.3.2 Características generales del alga.....	54
1.3.3 Morfología.....	55
1.3.4 Ciclo de vida .....	56
1.3.5 Propiedades nutritivas .....	57
1.3.6 Origen del alga y aparición en nuestro mar.....	60
1.3.6.1 Impacto ambiental .....	62
1.3.6.2 Aplicaciones de <i>U. pinnatifida</i> .....	63
1.4 Análisis sensorial.....	65
2. OBJETIVOS .....	67
2.1 Objetivos generales.....	68
2.1.2 Objetivos específicos.....	68
2.2 Hipótesis.....	69
3. METODOLOGÍA.....	55
3.1 Material vegetal .....	71

3.1.1	Diseño experimental en matrices vegetales-fermentación espontánea.....	71
3.1.2	Parámetros de fermentación.....	71
3.1.3	Aislamiento de BAL .....	71
3.1.3.1	Purificación y conservación de las cepas.....	72
3.1.3.2	Identificación presuntiva de los aislamientos .....	72
3.1.4	Preselección de las cepas obtenidas durante la fermentación.....	73
3.1.5	Estudio de las propiedades tecnológicas .....	73
3.1.5.1	Evaluación de la viabilidad.....	73
3.1.5.2	Producción de EPS.....	73
3.1.5.3	Tolerancia al ácido gálico, ácido tánico y fenol .....	74
3.1.5.4	Actividad pectinasa.....	74
3.1.5.5	Actividad tanasa .....	74
3.1.6	Estudio de los factores de virulencia y/o rasgos negativos .....	74
3.1.6.1	Actividad gelatinasa.....	75
3.1.6.2	Actividad hemolítica.....	75
3.1.6.3	Producción de aminas biógenas .....	75
3.1.7	Identificación molecular de las BAL seleccionadas .....	75
3.1.7.1	Extracción del ADN.....	75
3.1.7.2	Amplificación por PCR del gen ADNr 16S.....	77
3.1.7.3	Análisis de las secuencias del ADNr 16S.....	77
3.1.8	Caracterización tecnológica de las BAL seleccionadas .....	78
3.1.8.1	Producción de bacteriocinas.....	78
3.1.8.2	Detección molecular de las bacteriocinas .....	79
3.1.8.3	Prueba de antagonismo.....	79
3.1.8.4	Capacidad de acidificación .....	79
3.1.8.5	EPS con el método de la gota.....	80
3.1.8.6	Efecto de la sacarosa en la solidificación de leche fermentada.....	80
3.1.8.7	Actividad dextransacarasa.....	80
3.1.8.8	Tolerancia a las condiciones imperantes durante la fermentación. ....	81

3.2 Fermentación controlada: diseños experimentales.....	81
3.2.1 Material vegetal y alga.....	81
3.2.2 Modelos de brasicáceas.....	81
3.2.3 Modelos combinados, brasicáceas y <i>U. pinnatifida</i> .....	82
3.2.4 Preparación de los inóculos mixtos.....	82
3.2.5 Inoculación en dos etapas.....	83
3.2.6 Fermentación espontánea como parámetro de comparación.....	83
3.2.7 Parámetros de fermentación.....	83
3.2.8 Preparación de los extractos.....	83
3.2.9 Contenido total de fenoles (CTF).....	84
3.2.10 Capacidad antioxidante.....	85
3.3 Análisis microbiológico de los productos fermentados.....	86
3.4 Análisis sensorial de los productos fermentados.....	87
3.5 Análisis de textura de los productos fermentados.....	88
3.6 Propiedades fisicoquímicas de los productos fermentados.....	89
3.6.1 Acidez titulable.....	89
3.6.2 Determinación pH, °Brix y actividad de agua.....	90
3.7 Reto microbiano.....	90
3.7.1 <i>Zygosaccharomyces bailii</i> NRRL-7256.....	90
3.7.2 <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A y <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	91
3.8 Contenido total de fenoles y capacidad antioxidante del RCU almacenado.....	92
3.9 Análisis estadístico.....	92
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	95
4.1 Protocolo de aislamiento y selección de BAL.....	96
4.2 Parámetro de fermentación.....	97
4.3 Obtención de cepas de BAL.....	98
4.3.1 Identificación presuntiva de los aislamientos.....	99
4.4 Estudio de las propiedades tecnológicas.....	100
4.4.1 Evaluación de la viabilidad.....	100

4.4.2 Producción de EPS.....	101
4.4.3 Tolerancia a distintos compuestos fenólicos.....	102
4.4.4 Actividad pectinasa.....	103
4.4.5 Actividad tanasa.....	104
4.5 Determinación de factores de virulencia y/o rasgos negativos.....	105
4.5.1 Actividad gelatinasa y hemolítica.....	105
4.5.2 Producción de aminas biógenas.....	105
4.6 Segunda selección de las cepas.....	106
4.7 Identificación molecular de las BAL seleccionadas.....	106
4.8 Caracterización tecnológica de las BAL seleccionadas.....	108
4.8.1 Prueba de antagonismo.....	108
4.8.2 Producción de bacteriocinas.....	108
4.8.3 Detección molecular de las bacteriocinas.....	109
4.8.4 Capacidad de acidificación.....	111
4.8.5 EPS con el método de la gota.....	115
4.8.6 Efecto de la sacarosa en la solidificación de leche fermentada.....	115
4.8.7 Actividad dextransacarasa.....	116
4.8.8 Tolerancia a las condiciones imperantes durante la fermentación.....	117
4.9 Selección de cepas para conformar los cultivos iniciadores mixtos.....	117
4.10 Fermentación controlada: diseños experimentales.....	118
4.10.1 Modelos brasicáceas.....	118
4.10.1.1 Parámetros de fermentación.....	118
4.10.1.2 Contenido total de fenoles.....	121
4.10.1.3 Capacidad antioxidante según el método de reducción de DPPH.....	124
4.10.1.4 Capacidad antioxidante según el método CUPRAC.....	127
4.10.2 Modelos combinados, brasicáceas y <i>U. pinnatifida</i> .....	129
4.10.2.1 Parámetros de fermentación.....	130
4.10.2.2 Contenido total de fenoles.....	133
4.10.2.3 Capacidad antioxidante según el método de reducción de DPPH.....	137

4.10.2.4 Capacidad antioxidante según el método CUPRAC .....	140
4.10.3 Comparación entre los modelos: brasicáceas y brasicáceas/ <i>U. pinnatifida</i> ..	144
4.10.3.1 Modelo AK vs AKU .....	144
4.10.3.2 Modelo RB vs RBU .....	146
4.10.3.3 Modelo RC vs RCU .....	148
4.11 Análisis microbiológico de los productos fermentados .....	153
4.12 Análisis sensorial .....	155
4.13 Propiedades fisicoquímicas .....	161
4.14 Análisis de textura .....	164
4.15 Reto microbiano .....	166
4.15.1 <i>Zygosaccharomyces bailii</i> NRRL-7256 .....	166
4.15.2 <i>L. monocytogenes</i> Scott A y <i>E. coli</i> ATCC 35218 .....	167
14.16 Contenido total de fenoles y capacidad antioxidante del RCU almacenado ..	170
5. CONCLUSIONES .....	172
6. BIBLIOGRAFÍA .....	176

## Índice de abreviaturas

<b>AA:</b> ácido araquidónico	<b>LDC:</b> lisina descarboxilasa
<b>AB:</b> aminas biógenas	<b>Levine E.M.B:</b> Levine con Eosina y Azul de Metileno
<b>AD:</b> agua destilada	<b>MRS:</b> Man, Rogosa y Sharpe
<b>AK:</b> matriz de akusai	<b>MRSNaCl:</b> MRS con 8% de NaCl
<b>AKU:</b> matriz combinada de akusai/ <i>Undaria pinnatifida</i>	<b>MRSV:</b> MRS suplementado con 15 µg/ml vancomicina
<b>ANOVA:</b> análisis de la varianza	<b>NG:</b> Golfo Nuevo
<b>a<sub>w</sub>:</b> actividad de agua	<b>OMS:</b> Organismo Mundial de la Salud
<b>BAL:</b> bacterias ácido lácticas	<b>PAL:</b> fenilalanina amonio liasa
<b>BE:</b> bilis esculina	<b>PBPs:</b> proteínas fijadoras de penicilina
<b>BHI:</b> agar cerebro-corazón	<b>PC:</b> matriz de pak choi
<b>BLAST:</b> Basic Local Alignment Search Tool	<b>PCA:</b> Plate Count Agar
<b>CAA:</b> Código Alimentario Argentino	<b>PE:</b> pectinesterasa
<b>CTF:</b> contenido total de fenoles	<b>PF:</b> peso fresco
<b>CUPRAC:</b> capacidad antioxidante sobre el cobre	<b>PG:</b> poligalacturonasa
<b>DPPH:</b> radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo	<b>PL:</b> pectinliasa
<b>EAA:</b> equivalente a ácido ascórbico	<b>PS:</b> peso seco
<b>EAG:</b> equivalente a ácido gálico	<b>QPS:</b> presunción cualificada de seguridad
<b>EFSA:</b> Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria	<b>RB:</b> matriz de repollo blanco
<b>EPA:</b> ácido eicosapentaenoico	<b>RBU:</b> matriz combinada de repollo blanco/ <i>U. pinnatifida</i>
<b>EPS:</b> exopolisacáridos	<b>RC:</b> matriz de repollo colorado/morado
<b>FDA:</b> Administración de Alimentos y Medicamentos	<b>RCU:</b> matriz combinada de repollo colorado/ <i>U. pinnatifida</i>
<b>FDP:</b> fructosa-1,6-difosfato	<b>RDP:</b> Ribosomal Database Project
<b>FRAP:</b> poder antioxidante/reductor de iones férricos	<b>ROS:</b> especies reactivas de oxígeno
<b>GRAS:</b> Reconocidas generalmente como seguros	<b>SJG:</b> Golfo San José
<b>HDC:</b> histidina descarboxilasa	<b>SLC:</b> sobrenadante libre de células
<b>HePS:</b> heteropolisacáridos	<b>SMG:</b> Golfo San Matías
<b>HoPS:</b> homopolisacáridos	<b>TAH:</b> tanin acil hidrolasa
<b>JAR:</b> punto ideal o Just-About-Right	<b>TDC:</b> tirosina descarboxilasa
<b>LBB:</b> Laboratorio de Biotecnología Bacteriana	<b>TE:</b> transferencia simple de electrones
	<b>UFC:</b> unidades formadoras de colonia
	<b>VP:</b> Península Valdés
	<b>VRBL:</b> agar violeta rojo bilis lactosa

## RESUMEN

**Introducción:** las bacterias ácido lácticas (BAL) están involucradas en la producción de alimentos fermentados. Estas bacterias juegan un rol esencial en la industria alimentaria debido a que contribuyen significativamente sobre las características sensoriales y propiedades nutricionales y funcionales de los productos alimenticios. El uso de cultivos iniciadores en la fermentación vegetal se ha implementado recientemente, a diferencia de otros alimentos. Estos reducen la ocurrencia de fermentaciones anormales y, además, garantizan características relativamente uniformes en los productos obtenidos. Se sugirió la selección de cultivos iniciadores autóctonos para lograr una mejor adaptación a la matriz vegetal específica basada en sus propiedades funcionales y tecnológicas, así como, los criterios nutricionales y sensoriales de interés. Los vegetales *Brassica* son cultivados y consumidos ampliamente en todo el mundo. Estos vegetales son ricos en fibras, minerales y compuestos bioactivos. Además, los antioxidantes, como los compuestos fenólicos, las vitaminas y los carotenoides de estos vegetales, contribuyen a la defensa contra el estrés oxidativo. A su vez, diversos estudios presentan a las algas marinas como nuevas candidatas para ser utilizadas como ingrediente alimentario que promueve la salud gracias a su valor nutricional equilibrado y a la abundancia de compuestos bioactivos. Las costas Patagónicas fueron invadidas por *Undaria pinnatifida* hace 30 años; estas algas pardas se dispersaron sobre las costas de la Argentina, formando densos lechos submareales y modificando el ecosistema. Por lo tanto, la abundancia de este recurso constituye un escenario atractivo para la producción local de nuevos alimentos funcionales. **Objetivos de estudio y metodología:** El principal objetivo de este estudio fue la selección de BAL sobre la base de sus propiedades biotecnológicas para fermentar material de origen vegetal (*Brassica*) y alga *Undaria*, dando lugar a productos de calidad estable, inocuos, con alto valor nutricional y funcional. Se realizó la fermentación espontánea de cuatro vegetales *Brassica* (pak choi, repollo blanco, repollo colorado y akusai) para aislar y seleccionar BAL autóctonas, evaluando su habilidad como cultivo iniciador y sus propiedades tecnológicas. Se realizó la identificación molecular de las cepas de BAL seleccionadas mediante la amplificación del gen ADNr 16s. La fermentación controlada en dos etapas se realizó con las BAL seleccionadas por sus propiedades biotecnológicas. Se estudiaron modelos simples y combinados durante la fermentación controlada (18 °C durante 30 días). Los tres modelos simples se realizaron con akusai, repollo blanco y repollo colorado, fermentados individualmente. Luego, los tres modelos combinados se llevaron a cabo con cada vegetal *Brassica* y un 20% de alga: akusai/*Undaria*, repollo blanco/*Undaria* y repollo colorado/*Undaria*. Se realizó la fermentación espontánea de cada modelo como parámetro de comparación. La

evolución de las BAL y el pH se monitorearon durante las distintas fermentaciones y modelos estudiados. Se realizaron extractos metanólicos y acuosos a partir de las muestras obtenidas durante las diferentes fermentaciones de los modelos estudiados. Se utilizaron los métodos del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y la capacidad antioxidante reductora del cobre (CUPRAC) para medir la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos y acuosos; mientras que el ensayo Folin-Ciocalteu se empleó para determinar el contenido total de fenoles. La calidad microbiológica y el análisis sensorial se evaluaron en los productos fermentados de los modelos seleccionados. Además, el pH, la acidez titulable, los °Brix y la actividad de agua se determinaron antes y después del periodo del almacenamiento (50 días, 5 °C) de los productos. La prueba de retroextrusión de los productos fermentados se evaluó con un equipo de testeo Instron Universal y se calculó el porcentaje de ablandamiento durante el período de almacenamiento. Además, se evaluó la viabilidad de *Listeria monocytogenes* Scott A y *Escherichia coli* ATCC 35218 durante el periodo de fermentación del repollo colorado/*Undaria*. Mientras que, la viabilidad de *Zygosaccharomyces bailli* NRRL-7256 se estudió durante el periodo de almacenamiento a 5 °C. Por último, se evaluó la capacidad antioxidante y el contenido total de fenoles del producto repollo colorado/*Undaria* al finalizar el periodo de almacenamiento (50 días, 5 °C).

**Resultados y discusión:** Se aislaron 407 cepas a partir de las fermentaciones espontáneas de los vegetales *Brassica* y se seleccionaron aleatoriamente 120. Solo cinco BAL autóctonas se seleccionaron por sus propiedades funcionales y tecnológicas. Las cepas seleccionadas exhibieron habilidad para adaptarse a las condiciones imperantes durante la fermentación (pH bajo, 3% de NaCl y tolerancia a polifenoles). Además, las cepas exhibieron una alta tasa de acidificación, actividad pectinasa y tanasa, producción de exopolisacáridos, y ausencia de los factores de virulencia evaluados. Las cepas de BAL seleccionadas se identificaron genótipicamente como *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii*, *Ln. mesenteroides* ssp. *dextranicum*, *Lactiplantibacillus plantarum* ssp. *argenteratensis*, *L. plantarum* y *L. pentosus*. Dos cepas de *Lactiplantibacillus* spp. seleccionadas exhibieron actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas Gram positivas y amplificaron genes de plantarinas. La población de BAL exhibió una evolución similar durante la fermentación espontánea y controlada; sin embargo, los valores de pH decrecieron significativamente durante el primer día en la fermentación controlada de ambos modelos. El contenido total de fenoles no exhibió una tendencia al comparar los diferentes tipos de fermentaciones (controlada y espontánea); esto dependió del tipo de extracto y vegetal utilizado. La fermentación controlada de ambos modelos exhibió una mayor actividad antioxidante que la fermentación espontánea correspondiente para todos los vegetales. Los modelos

combinados con *Undaria* presentaron mayor o similar concentración de contenido total de fenoles que los modelos *Brassica* correspondientes al finalizar el proceso controlado, los resultados dependieron del tipo de extracto y vegetal estudiado; sin embargo, en ningún caso se observaron valores significativamente menores. Un comportamiento similar se determinó para la capacidad antioxidante, al finalizar la fermentación, los modelos combinados con algas exhibieron igual o mayor capacidad que los modelos de *Brassica* correspondientes; a excepción de los extractos acuosos del modelo akusai/*Undaria*, el cual alcanzó un menor valor que el modelo akusai mediante el método CUPRAC. Los extractos de repollo colorado y repollo colorado/*Undaria* exhibieron un contenido total de fenoles y una capacidad antioxidante mayor que los otros modelos, independientemente del tipo de fermentación. Al finalizar la experiencia, los productos fermentados obtenidos a partir de los modelos combinados exhibieron un similar recuento microbiano,  $\approx 10^5$  UFC/g de BAL y de aerobios totales,  $\leq 10^2$  UFC/g de levaduras y  $< 10^1$  UFC/g de coliformes totales. En el análisis sensorial,  $> 50\%$  de los panelistas calificaron el sabor de los alimentos con un valor  $\geq 5$ , "Me gusta levemente". El producto repollo colorado/*Undaria* exhibió el mayor porcentaje de panelistas, en comparación con los demás modelos combinados, que calificaron los atributos *acidez* y *salado* con una intensidad ideal, 50% y 64,3%, respectivamente. Los modelos akusai/*Undaria* y repollo blanco/*Undaria* presentaron algunos cambios en las propiedades fisicoquímicas y la textura durante el periodo de almacenamiento, mientras que el repollo colorado/*Undaria* se mantuvo relativamente estable. El proceso de fermentación controlada del modelo repollo colorado/*Undaria* aseguró la reducción de la población de *Listeria monocytogenes* Scott A y *Escherichia coli* ATCC 35218, logrando un producto final inocuo. Además, este modelo exhibió un efecto antifúngico sobre el desarrollo de *Zygosaccharomyces bailii* NRRL-7256 durante el periodo de almacenamiento. Por último, se observó una reducción significativa en la capacidad antioxidante y en el contenido total de fenoles del repollo colorado/*Undaria* almacenado durante 50 días a 5 °C. **Conclusión:** El modelo repollo colorado/*Undaria* se seleccionó entre los estudiados. Este producto fermentado exhibió un mayor contenido total de fenoles y capacidad antioxidante, entre los modelos combinados estudiados. Aunque el alga utilizada no incrementó la capacidad antioxidante en repollo colorado/*Undaria*, tampoco la redujo, al realizar la comparación con el modelo simple (repollo colorado). Además, la incorporación de *Undaria* permite una mayor diversidad de compuestos bioactivos, minerales y vitaminas, aportando así elementos adicionales a la dieta. A diferencia de los otros modelos combinados, el repollo colorado/*Undaria* fue el más aceptado por los consumidores y no presentó cambios durante el almacenamiento. Sin embargo, este producto exhibió una reducción significativa en el contenido total de

fenoles y en la capacidad antioxidante al finalizar un extenso periodo de almacenamiento. Posteriormente, sería necesario evaluar los diferentes factores que influyen sobre las propiedades nutricionales de este producto durante el almacenamiento refrigerado.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Lactic acid bacteria (LAB) are involved in the production of fermented foods. These bacteria play an essential role in the food industry due to their significant contribution to the sensory characteristics, therapeutic and nutritional properties of food products. The use of starter cultures in vegetable fermentation has been increasing only recently, a difference from other fermented food. They reduce the occurrence of abnormal fermentations and, in addition, the products obtained guarantee relatively uniform characteristics. The selection of autochthonous starters was suggested to achieve better tailored for the specific plant matrix. Technological and functional properties, as well as sensorial and nutritional criteria of interest for the selection LAB starters, have been described. *Brassica* vegetables are widely cultivated and consumed all over the world. These vegetables are rich in fiber, minerals, and bioactive compounds. Besides, dietary antioxidants, such as phenolic compounds, vitamins, and carotenoids in these vegetables, contribute to defense against oxidative stress. In parallel, several reports exhibited seaweed as a new candidate to be used as a health-promoting food ingredient due to its balanced nutritional value and abundance of bioactive compounds. The Patagonia coasts were invaded by *Undaria pinnatifida* 30 years ago; this brown seaweed spread over Argentina's coastline, forming dense subtidal seaweed beds and, consequently, changing the ecosystem. Therefore, the abundance of this resource constitutes an attractive scenario for the local production of new functional food. **Study objects and methods:** This study aimed to select LAB based on their biotechnological properties to ferment plant-based material (*Brassica*) and *Undaria* algae, giving rise to products of stable quality, innocuous, and with high nutritional and functional value. Spontaneous fermentation of four *Brassica* vegetables (pak choi, white, red, and chinese cabbage) was performed to isolate and select autochthonous LAB, which were evaluated for technological properties and tested for their capacity as starter cultures. Molecular identification of selected LAB strains was conducted by amplification of the 16S rDNA gene. The two-step controlled fermentation was carried out with LAB selected by their biotechnological properties. Simple and combined models were studied during its controlled fermentation (18 °C for 30 days). The three simple models were performed with chinese, white, and red cabbage, fermented individually. Then, the three combined models were carried out with each *Brassica* vegetable and 20% algae: chinese

cabbage/*Undaria*, white cabbage/*Undaria*, and red cabbage/*Undaria*. Spontaneous fermentations of each model were carried out as a comparison parameter. Microbiological changes and pH were monitored throughout spontaneous and controlled fermentations. Water and methanol extracts were carried out from samples obtained throughout the different fermentations of the studied models. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) scavenging assay and cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay were used to measure the antioxidant activity and the Folin-Ciocalteu method to determine total phenolic content in the water and methanol extracts. Microbiological quality and sensory analysis were evaluated in the fermented products of the sectioned model. Moreover, the pH, titratable acidity, °Brix, and water activity were determined in the products before and after of storage period (50 days, 5 °C). The back extrusion test of fermented products was evaluated with an Instron Universal testing machine, and the percentage of softening was calculated during the storage period. Moreover, the survival characteristic of *Listeria monocytogenes* Scott A and *Escherichia coli* ATCC 35218 during red cabbage/*Undaria* model fermentation were investigated. While the survival characteristic of *Zygosaccharomyces bailii* NRRL-7256 throughout storage at 5 °C of red cabbage/*Undaria* model was studied. Finally, the antioxidant capacity and total phenolic content of the red cabbage/*Undaria* were determined at the end of the storage period (50 days, 5 °C). **Results and discussion:** Four hundred-seven strains were isolated from the spontaneous fermentations of *Brassica* vegetables, and 120 strains were randomly selected. Only five autochthonous LAB were selected for their technological and functional properties. Selected strains displayed the ability to adapt to the fermentation conditions (low pH, 3% NaCl, tolerance to polyphenols). They exhibited high acidification rate, pectinase and tannase activity, exopolysaccharide production, and absence of virulence factors. Selected bacteria were genotypically identified as *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii*, *Ln. mesenteroides* ssp. *dextranicum*, *Lactiplantibacillus plantarum* ssp. *argentoratensis*, *L. plantarum* and *L. pentosus*. Two selected *Lactiplantibacillus* spp. strains exhibited antimicrobial activity against Gram-positive pathogenic bacteria and amplified plantaricin genes. The LAB population exhibited a similar evolution in the controlled and spontaneous fermentation; however, the pH values decreased significantly during the first days in the controlled fermentation of both models. In both models, the total phenolic content did not show a trend when comparing the different fermentations (spontaneous and controlled); it depended on the type of extract and vegetable. Controlled fermentation of both models exhibited higher antioxidant activity than the corresponding spontaneous fermentations for all the vegetables. Models combined with *Undaria* exhibited a higher or comparable total phenolic content concentration than the

corresponding *Brassica* models at the end of the controlled fermentation; the result depended on the type of extract and vegetable studied; however, in no case were significantly lower values observed. The same behavior was determined for the antioxidant capacity; at the end of the fermentation, the models combined with the algae showed equal or higher capacity than the corresponding *Brassica* models; except for the aqueous extract of the chinese cabbage/*Undaria* model, which exhibited lower reducing capacity than the chinese cabbage model using the CUPRAC method. Red cabbage and red cabbage/*Undaria* extracts exhibited a total phenolic content and antioxidant activity higher than other models, regardless of the type of fermentation. At the end of the experience, fermented products obtained from combined models, displayed similar microbial counts between them, LAB and total aerobes  $\approx 10^5$  CFU/g, yeast count  $\leq 10^2$  CFU/g, and total coliforms  $< 10^1$  CFU/g. In the sensory analysis, >50% of the judges scored the flavor of all the ferments with a value  $\geq 5$ , "I like mild". The red cabbage/*Undaria* model exhibited the highest percentage of judges who rated the attributes *acidity* and *salty* with an ideal intensity, 50% and 64.29%, respectively, compared to the other products. In general, the chinese cabbage/*Undaria* and white cabbage/*Undaria* models exhibited some changes in the physicochemical properties and texture, while the red cabbage/*Undaria* model remained stable during store period. The controlled fermentation process of the red cabbage/*Undaria* model ensured the reduction of the population of *Listeria monocytogenes* Scott A and *Escherichia coli* ATCC 35218, achieving an innocuous final product. Moreover, this model exhibited a fungistatic effect on the development of *Zygosaccharomyces bailii* NRRL-7256 during the storage period. Refrigerated storage for 50 days caused a significant reduction on the antioxidant capacity and total phenolic content of the red cabbage/*Undaria*. **Conclusion:** Red cabbage/*Undaria* was selected among the models studied. Red cabbage/*Undaria* exhibited higher total phenolic content and antioxidant capacity between the combination models. Although this seaweed did not increase the antioxidant capacity in red cabbage/*Undaria*, it was neither reduced compared to the simple model (red cabbage). Moreover, incorporating *Undaria* allows for a broader diversity of bioactive compounds, minerals, and vitamins, thus supplying additional elements to the diet. Unlike the other combined models, red cabbage/*Undaria* was the most accepted by consumers and did not exhibit changes during storage. However, this product exhibited a significant reduction in total phenolic content and antioxidant capacity at the end of the refrigerated storage period. Subsequently, would be necessary to evaluate the different aspects that influence the nutritional properties of this product during chilled storage.



# 1. *INTRODUCCIÓN*

## 1.1 La fermentación

### 1.1.1 Historia de la fermentación

La fermentación ha sido utilizada por el hombre desde el período Neolítico (alrededor de 10.000 años AC), momento en que aparecen los primeros poblados y asentamientos. Más tarde, se cree que iniciaron las fermentaciones alcohólicas involucradas en la elaboración del vino, las cuales se desarrollaron durante el período 4.000-2.000 AC por parte de los egipcios y sumerios. Los egipcios también desarrollaron fermentaciones de masa para la producción de panes con levadura desde 4.000–3.500 AC (Prajapati & Nair, 2003). Sin embargo, el fundamento científico de la fermentación comenzó en 1665 con la identificación de microorganismos por Van Leeuwenhoek y Hooke (Gest, 2004). Luego en 1859, Louis Pasteur revocó la "teoría de la generación espontánea" y dio inicio a la microbiología moderna. Surgió el término "fermentación", que deriva del latín "fervere" (hervir), que fue definida por Louis Pasteur como "la vie sans l' air" (vida sin aire). Este término se utilizó en sus orígenes para describir la formación de CO<sub>2</sub> que se producía cuando las levaduras se desarrollaban sobre un sustrato azucarado; pero actualmente define a un proceso en el que un sustrato se transforma en uno o más productos, por la acción de los microorganismos. Posteriormente, la definición del término sufrió modificaciones. La fermentación desde el punto de vista bioquímico se refiere al mecanismo de obtención de energía a través del catabolismo de compuestos orgánicos prescindiendo del oxígeno u otros compuestos inorgánicos como aceptores de electrones. Mientras que, en microbiología industrial se amplía este concepto y se designa a los procesos que emplean microorganismos para obtener un determinado producto.

En la actualidad, se conocen diferentes beneficios que produce la fermentación en el procesamiento de alimentos como, por ejemplo:

-Permite la conservación de los alimentos, al sintetizarse diferentes metabolitos como bacteriocinas, ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico), etanol y CO<sub>2</sub>; que tienen la capacidad de controlar el crecimiento de microorganismos deteriorantes. Muchas veces, esta conservación se produce en combinación con la disminución de la actividad del agua (por secado o uso de sal).

-Incrementa la seguridad de los alimentos, al reducir la presencia de compuestos tóxicos como las aflatoxinas y/o los compuestos cianogénicos.

-Mejora la calidad nutricional del alimento, mediante la síntesis de vitaminas, aminoácidos esenciales y proteínas producidas por los microorganismos, y por la degradación de factores antinutricionales, como por ejemplo el fitato.

-Incrementa la calidad sensorial y las características organolépticas en general, al modificar la textura, el aroma y el sabor de los alimentos.

-Genera un valor agregado a la materia prima, sobre todo de los productos agrícolas, permitiendo ampliar el periodo de suministro al mercado, problema importante por la corta estacionalidad de frutas y hortalizas (Hansen, 2002; Holzapfel, 2002).

### 1.1.2 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Cuando se consideran las fermentaciones de alimentos (a diferencia de las fermentaciones alcohólicas que involucran levaduras), las BAL son las principales responsables de muchas de las transformaciones que se producen en los alimentos fermentados más comunes (Seseña Prieto, 2007). Estas bacterias son utilizadas en la industria alimentaria, no solamente por su habilidad de acidificar y preservar alimentos, sino también por su influencia en la textura, sabor, olor y desarrollo de aroma en los alimentos fermentados (Parra Huertas, 2010).

La clasificación de BAL fue iniciada por Orla-Jensen (1919), comprende un diverso grupo de organismos Gram positivos, con forma de coco o bacilos de longitud variable e inmóviles, con bajo contenido de guanina-citosina (G+C). Se caracterizan por ser anaerobias facultativas, catalasa negativa y no esporuladas. Dependiendo de su temperatura óptima de crecimiento, estas bacterias se pueden clasificar en especies mesófilas (22 a 34 °C) o termófilas (37 a 45 °C). Son quimiorganotróficas, los azúcares son la principal fuente de energía y son metabolizados por vía fermentativa.

Esta primera clasificación sufrió diversas modificaciones con el paso de los años, por la implementación de nuevas técnicas bioquímicas y moleculares, como la determinación de la composición de bases G+C del ADN, la hibridación y/o secuenciación de los ácidos nucleicos, entre otras. La mayor parte de las BAL pertenecen al Phylum Firmicutes (bajo contenido de G+C), orden Lactobacillales; mientras que el resto corresponden al Phylum Actinobacteria (alto contenido de G+C), orden Bifidobacteriales, cuyo principal representante es el género *Bifidobacterium*. Los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Weissella* son los más frecuentes en la fermentación de los alimentos (Mokoena, 2017). Sin embargo, recientemente se propuso fusionar Lactobacillaceae y Leuconostocaceae en una sola familia Lactobacillaceae. El género *Lactobacillus* también se reclasificó en 25 géneros:

*Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus* y *Secundilactobacillus* (Zheng *et al.*, 2020). Esta reclasificación fue necesaria debido al alcance de la diversidad del género original, lo que hizo que fuera muy difícil clasificar, nombrar y distinguir entre los diferentes lactobacilos.

Adicionalmente, las BAL se clasifican como organismos homofermentativos (*Lactococcus* y *Streptococcus*) o heterofermentativos (*Leuconostoc* y *Weissella*) por su habilidad para fermentar carbohidratos (Mokoena, 2017). Los lactobacilos, por su diversidad, se clasificaron en tres grupos dependiendo de la presencia o ausencia de las enzimas fructosa-1,6-difosfato aldolasa y fosfocetolasa, claves del metabolismo homo y heterofermentativo, respectivamente (Tabla 1). El grupo I comprende a los lactobacilos homofermentativos obligados, el grupo II a los lactobacilos heterofermentativos facultativos y el grupo III a los lactobacilos heterofermentativos obligados (Kandler & Weiss, 1986).

**Tabla 1:** Distribución de los lactobacilos según el metabolismo para fermentar carbohidratos.

Características	Grupo I Homofermentativo obligado	Grupo II Heterofermentativo facultativo	Grupo III Heterofermentativo obligado
Fermentación de pentosa	-	+	+
CO <sub>2</sub> a partir glucosa	-	-	+
CO <sub>2</sub> a partir de gluconato	-	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>
FDP aldolasa	+	+	-
fosfocetolasa	-	+ <sup>b</sup>	+
Especies	<i>L. acidophilus</i> <i>L. delbrückii</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. salivarius</i>	<i>L. casei</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. sake</i>	<i>L. brevis</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. reuteri</i>

<sup>a</sup> Cuando fermenta

<sup>b</sup> Inducible por la pentosa.

Fuente: adaptado de Kandler & Weiss (1986) y Sharpe (1981).

### 1.1.2.1 Metabolismo de los azúcares.

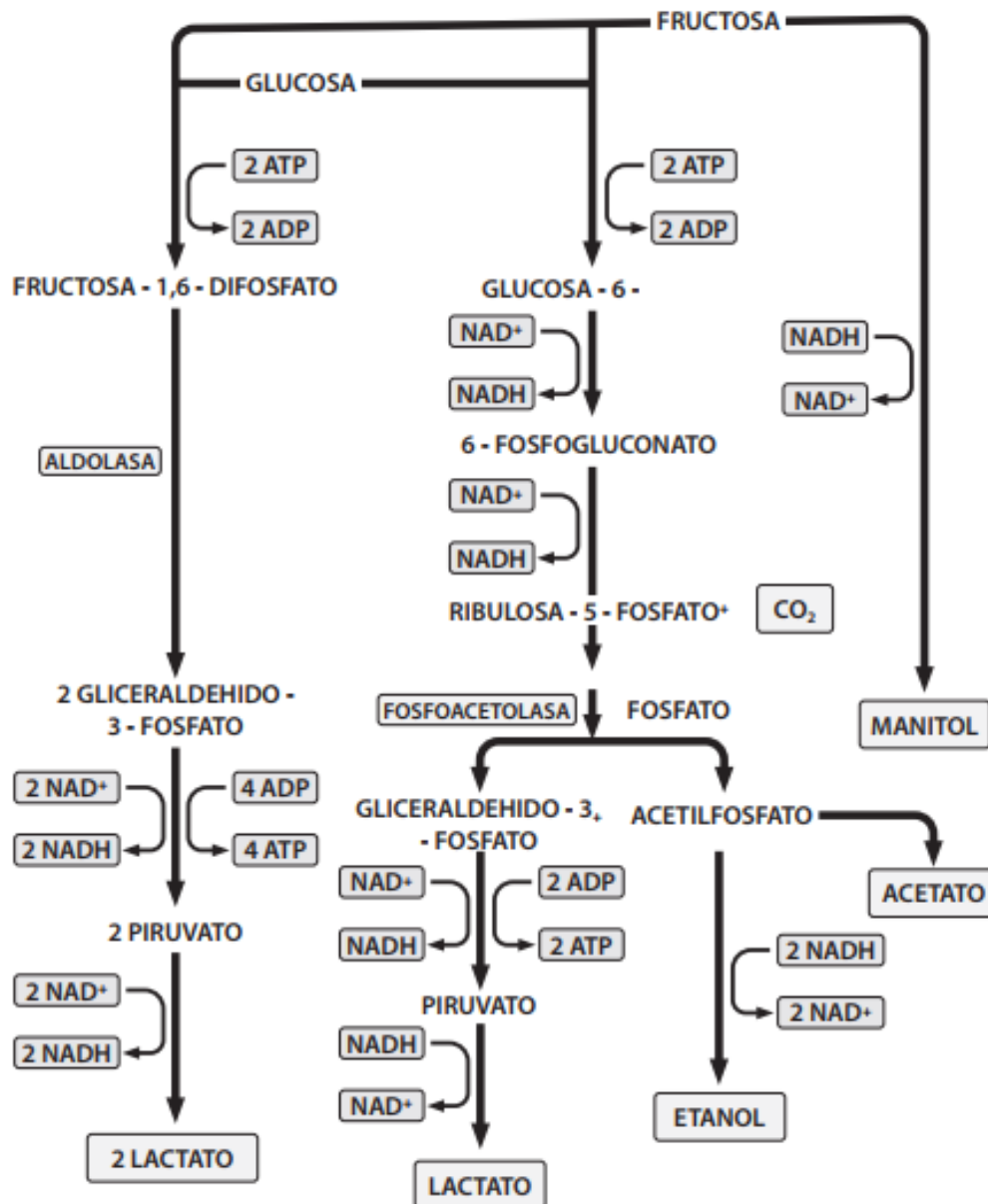
Las BAL tienen una gran capacidad para metabolizar diferentes carbohidratos y otros compuestos relacionados, siendo los azúcares el mejor sustrato para su crecimiento (Fig. 1). Las rutas metabólicas principales que pueden utilizar son:

-Glucólisis o vía Embden-Meyerhof-Parnas: esta ruta involucra las BAL con metabolismo homofermentativo, donde en condiciones de crecimiento estándar metabolizan las hexosas produciendo 2 moles de ácido láctico y 2 moles de ATP por cada mol de hexosa fermentada. Las especies homofermentativas presentan la enzima fructosa-1,6-difosfato aldosa, y carecen de las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa. La ausencia de fosfoacetolasa en los microorganismos homofermentativos les impide fermentar las pentosas.

Mediante esta ruta metabólica, además de la glucosa, algunas BAL también pueden fermentar fructosa y manosa (y otras hexosas) que ingresan a nivel de glucosa-6P o de la fructosa-6P, después de una isomerización y/o fosforilación.

Vía del 6-fosfogluconato/fosfoacetolasa: incluye las bacterias con metabolismo heterofermentativo. El rendimiento energético de esta reacción es 1 mol de ATP y 3 moles de NADH por mol de hexosa fermentada. Poseen una enzima denominada fosfoacetolasa que está ausente en los microorganismos homofermentativos. Las especies heterofermentativas pueden a su vez ser facultativas o estrictas. Las primeras metabolizan las hexosas por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas y además son capaces de transformar las pentosas en lactato y acetato, al poseer una fosfoacetolasa inducible por la presencia de pentosas (Kandler, 1983). Por el contrario, las especies heterofermentativas estrictas presentan únicamente la enzima fosfoacetolasa. Las hexosas son fermentadas por la vía del fosfogluconato produciendo lactato, etanol (ácido acético) y CO<sub>2</sub> en cantidades equimolares. Las pentosas, luego de ser fosforiladas, también pueden ser fermentadas por esta misma vía, produciendo lactato y acetato.

Con respecto al metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados, puede concluirse que, si bien la glucólisis es la ruta metabólica más utilizada por las BAL y los productos resultantes de la misma son los que con mayor frecuencia se encuentran en los alimentos fermentados, éstas son capaces de actuar sobre otros compuestos por exigencias de sus respectivos metabolismos, dando lugar a una gran variedad de productos (como acetaldehído, diacetilo, 2,3-butanodiol, propanona o dextranos), que van a influir notablemente en la textura, el gusto, el aroma y el color de los alimentos y, en definitiva, en las propiedades organolépticas de los mismos (Blajman & Zárate, 2020).



Fuente: Blajman & Zárata (2020).

**Figura 1:** Principales rutas metabólicas de fermentación de hexosas utilizadas por las BAL.

#### 1.1.2.2 Fermentación láctica de vegetales

Los vegetales son una fuente fundamental de vitaminas hidrosolubles (vitamina C y vitaminas del grupo B), provitamina A, fitoesteroles, fibra dietaria, minerales y fitoquímicos necesarios para la dieta humana. Trabajos previos evidencian que el consumo de vegetales previene patologías crónicas tales como la hipertensión, enfermedades coronarias y riesgo de accidente cerebrovascular. Desafortunadamente, se estima que la ingesta diaria de verduras y frutas es menor que la dosis recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2004). Sin embargo, actualmente los consumidores tienden a preferir alimentos frescos o poco procesados, altamente

nutricionales, que promueven la salud y que estén listos para consumir (Swain *et al.*, 2014). Por lo tanto, la fermentación se convierte en una alternativa para promover este tipo de características en los alimentos; y en el caso de los vegetales son susceptibles a este proceso.

La fermentación láctica se considera una simple y valiosa herramienta biotecnológica para mantener y/o mejorar la calidad microbiológica, nutricional y sensorial, así como para prolongar la vida útil de verduras y frutas (Di Cagno *et al.*, 2013). Los productos típicos más investigados y reconocidos en el mercado internacional son las aceitunas, pepinillos y coles, en menor grado, otros como cebolla de verdeo, zanahorias, coliflor, berenjenas y alcaparras (Seseña Prieto, 2007).

Un aspecto importante de las fermentaciones de los vegetales, que las hace diferentes de otras (por ejemplo, de los productos lácteos), es que se trata de un tejido vegetal inmerso en una fase líquida; donde la velocidad de crecimiento microbiano depende de la disponibilidad de nutrientes, es decir, por la salida de solutos desde el vegetal a la salmuera. Previamente se pensaba que la fermentación tenía lugar exclusivamente en la salmuera, lo que ha sido desmentido por algunos autores como Montano *et al.* (1992), quienes han comprobado que este proceso ocurre simultáneamente en el interior de los tejidos y en la salmuera.

Los factores principales propuestos por Montano *et al.* (1992), que influyen en el desarrollo y metabolismo de los microorganismos, para controlar el proceso de las fermentaciones vegetales son la concentración de sal, la temperatura y el nivel de acidez.

-Concentración de sal: previene el ablandamiento de los vegetales, regula el tipo y extensión del crecimiento microbiano y, en consecuencia, la calidad y estabilidad del producto fermentado. La concentración no debe exceder el 8% (m/v) con el fin de no retardar excesivamente el desarrollo de las BAL.

-Temperatura: diferentes microorganismos pueden predominar durante una fermentación dependiendo de la temperatura en que se lleva adelante el proceso. La producción de chucrut es particularmente sensible a este parámetro. Cuando la fermentación se realiza entre 8 a 18 °C, predomina la especie *Leuconostoc mesenteroides*, pero a altas temperaturas (32 o 37 °C) se acorta su período de crecimiento y se favorece el desarrollo de *Lactobacillus plantarum* (Montano *et al.*, 1992).

-Acidez: la liberación de ácidos por fermentación implica inhibir el crecimiento de bacterias sensibles que se encuentran en el vegetal de partida en mayor número que las BAL. El ácido láctico es el producto mayoritario generado en la fermentación, pero el ácido acético puede ser importante dependiendo el desarrollo de bacterias heterofermentativas y el potencial redox del medio.

### 1.1.3 Procesos de fermentación

La fermentación de vegetales se puede lograr utilizando uno de los tres tipos de procesos: fermentación espontánea, *black-slopping* y fermentación controlada.

#### 1.1.3.1 Fermentaciones espontáneas

La población microbiana epífita de las plantas está en gran medida sujeta a fluctuaciones de las condiciones físicas y nutricionales. Cada tipo de vegetal proporciona un nicho único en términos de composición química, capacidad de amortiguación, biota competitiva y compuestos antagonistas naturales (Lindow & Brandl, 2003). Por lo tanto, cada especie de plantas alberga una microbiota dominante y constante (Yang *et al.*, 2001). Los vegetales frescos pueden presentar altas cargas microbianas, fluctuando entre 5 y 7 log UFC g<sup>-1</sup>. Las bacterias principales que se encuentran en la microbiota de los vegetales son especialmente aerobios (*Pseudomonas* sp., Enterobacteriaceae). Los estafilococos coagulasa positivos y algunas bacterias fecales también pueden estar presentes en las verduras crudas, pero no constituyen un riesgo debido a su baja densidad celular, la inhibición por condiciones ambientales hostiles y la competencia microbiana. Las BAL son las menos prevalentes, representando tan solo una pequeña proporción (2 a 4 log UFC g<sup>-1</sup>) de la población microbiana autóctona. Este grupo de bacterias requieren un medio rico en nutrientes como aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y ciertos minerales para su crecimiento y metabolismo. Las especies más frecuentes aisladas en los vegetales frescos y sus fermentaciones espontáneas son *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Enterococcus* y *Pediococcus* (Di Cagno *et al.*, 2013).

El proceso de fermentación espontánea ocurre por la microflora bacteriana láctica natural de la superficie del vegetal. Durante el proceso de fermentación, se producen elevadas concentraciones de ácido láctico y acético, provocando una disminución del pH, que inhibe el desarrollo de bacterias Gram negativas y esporuladas; en estas condiciones, solo las BAL pueden crecer.

El crecimiento microbiano, en una fermentación espontánea, se divide en cuatro etapas definidas:

a) *Iniciación*: durante esta etapa, los microorganismos Gram negativos y Gram positivos presentes en el vegetal fresco compiten por el predominio. Se produce el crecimiento de algunos microorganismos anaerobios estrictos y facultativos, originalmente presentes en el vegetal fresco. Luego, las BAL comienzan a estabilizarse generando una disminución del pH, fenómeno que produce la inhibición de los microorganismos indeseables, tales como las bacterias Gram negativas y las formadoras de esporas.

b) *Fermentación primaria*: implica el crecimiento de BAL con o sin el desarrollo de levaduras fermentativas, conformando la microflora predominante. Su crecimiento continúa hasta agotar los carbohidratos fermentables o hasta ser inhibidas por la alta concentración de ácidos orgánicos sintetizados por las propias BAL. Los géneros más predominantes son *Leuconostoc*, *Weissella* y *Lactobacillus*.

La capacidad amortiguadora y la concentración de carbohidratos fermentables del material vegetal son factores importantes que determinan la magnitud de la fermentación de las BAL.

c) *Fermentación secundaria*: se caracteriza por el crecimiento de levaduras a partir de la materia fermentable que permanece después de que el desarrollo de BAL resulta inhibido por los bajos valores de pH.

d) *Post-fermentación*: comienza cuando los carbohidratos fermentados se han agotado, y se caracteriza por el crecimiento de microorganismos oxidativos en la superficie de la salmuera cuando ésta se encuentra expuesta a la atmósfera (Blajman & Zárate, 2020).

Este tipo de fermentación determina que la calidad del producto final dependa enormemente de la carga microbiana y de la variedad de microorganismos presentes en la materia prima. Esto conduce a variaciones en las propiedades sensoriales de los productos que difieren según la calidad de la materia prima, la temperatura y las condiciones de cosecha (Aires *et al.*, 2011).

#### 1.1.3.2 *Black-slopping*

Parte del material de un anterior lote de un producto fermentado se utiliza para inocular el nuevo lote para iniciar el nuevo proceso. A través de esta práctica de retroceso, la fase inicial del proceso de fermentación se acorta y el riesgo de contaminación durante la fermentación se reduce (Holzapfel, 2002). Esta técnica es muy utilizada en productos lácteos y bebidas fermentadas como la cerveza, pero también es una forma tradicional de fermentar vegetales. En este último caso, se utiliza parte de la salmuera del producto final fermentado para iniciar un nuevo proceso.

### 1.1.3.3 Fermentaciones controladas

Actualmente, la mayor parte de las fermentaciones industriales son procesos dirigidos en los que se añaden de forma deliberada cultivos de microorganismos específicos llamados cultivos iniciadores o “starters”. Los cultivos iniciadores, se definen como una o más cepas de una o más especies bacterianas, que se utilizan para inocular un producto fresco o pasteurizado con el fin de iniciar su fermentación.

De acuerdo con el número y tipo de cepas presentes, los cultivos iniciadores se clasifican en las siguientes categorías (Cogan, 1996):

- *Cultivo de cepa única*, formado por una cepa de una determinada especie.
- *Cultivo definido múltiple*, formado por varias cepas conocidas de una especie determinada.
- *Cultivo definido mixto*, formado por varias cepas conocidas de distintas especies.
- *Cultivo indefinido o artesano*, formado por numerosas especies y cepas, total o parcialmente desconocidas.

Los cultivos iniciadores pueden clasificarse como autóctonos o alóctonos/comerciales, dependiendo del origen del aislamiento. Los cultivos iniciadores autóctonos son aislados y reutilizados en la misma matriz cruda, independientemente del origen geográfico. Por otro lado, los iniciadores alóctonos son aislados de ciertas matrices crudas pero utilizados para fermentar diferentes productos (Di Cagno *et al.*, 2013). En general, el uso de los cultivos autóctonos resulta más recomendable, ya que proporcionan propiedades nutricionales y sensoriales más deseables y una vida útil más prolongada al producto fermentado (Blajman & Zárate, 2020) (Tabla 2). Actualmente se cuenta con listas autorizadas de microorganismos con uso certificado en fermentaciones de alimentos, que cubren una amplia gama de matrices alimentarias, incluidos los vegetales (Bourdichon *et al.*, 2012). Estas listas son utilizadas de referencia para consultar y seleccionar los cultivos iniciadores en la fermentación de vegetales crudos.

**Tabla 2:** Características diferenciales de los cultivos iniciadores alóctonos y autóctonos usados para la fermentación de vegetales.

Cultivos alóctonos	Cultivos autóctonos
-Aislados de una matriz y usados en otra.	-Aislados y usados en la misma matriz.
-Son de uso general.	-Son de uso específico.
-Actividad acidificante.	-Actividad acidificante y propiedades tecnológicas/funcionales.
-Escasa adaptación y flexibilidad metabólica.	-Alta adaptación y competencia.
-Crecimiento lento y menor biomasa.	-Crecimiento rápido y mayor biomasa.
-Escaso aporte a las propiedades sensoriales y funcionales.	-Aseguran propiedades nutricionales y sensoriales.
	-Larga vida útil al producto.

Fuente: Blajman & Zárate (2020).

#### 1.1.4 Funciones de los cultivos iniciadores

Al utilizar cultivos iniciadores se consiguen diferentes ventajas, tales como reducir el tiempo de fermentación, disminuir la probabilidad de que se produzcan alteraciones y permitir la obtención de productos de mejor calidad sensorial, más estables y homogéneos (Di Cagno *et al.*, 2013).

Las características deseables en los cultivos iniciadores que se utilizan en las fermentaciones de los productos vegetales son las siguientes:

- Capacidad acidificante. Una rápida producción de ácidos hace descender el pH de la salmuera, lo que produce la inhibición del crecimiento de los microorganismos indeseables en la etapa inicial de fermentación.
- Tolerancia a la sal, las exigencias varían según el producto a elaborar.
- Capacidad para producir metabolitos antimicrobianos (peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, entre otros).
- Generación de productos con características sensoriales aceptables y propias.
- Capacidad de incrementar el valor nutritivo del vegetal.
- Propiedades que permitan su congelación o liofilización, sin que se vean afectadas sus características.
- Los microorganismos deben ser GRAS (Reconocidas Generalmente como Seguros). La OMS recomienda a las industrias alimentarias, utilizar BAL exentas de mecanismos de resistencia a los antibióticos transferibles, ya que esta característica es considerada una amenaza para la salud (OMS, 2015).

- El cultivo iniciador debe tener la capacidad de predominar sobre la microbiota espontánea y desarrollar su actividad metabólica bajo las condiciones fisicoquímicas determinadas en la elaboración del producto.

### 1.1.5 Propiedades funcionales y tecnológicas de BAL autóctonas

#### 1.1.5.1 Producción de compuestos antimicrobianos.

Un aspecto interesante de las BAL, es su capacidad de prologar la vida útil de determinados alimentos, al inhibir el desarrollo de los microorganismos causantes de alteraciones (Mokoena, 2017). Las BAL producen diversos metabolitos secundarios de interés como el ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo, etanol, dióxido de carbono y bacteriocinas (Fan & Truelstrup Hansen, 2012); siendo estas últimas las que han despertado mayor interés tecnológico.

#### *Generalidades de las bacteriocinas*

El término bacteriocina fue propuesto por Jacob *et al.* (1953) para designar a un grupo de sustancias de naturaleza proteica con actividad antimicrobiana, producidas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Se pensaba que las bacteriocinas solo actuaban contra bacterias estrechamente relacionadas con la cepa productora (espectro reducido), en años recientes este concepto ha cambiado, ya que se han encontrado bacteriocinas que pueden actuar contra cepas filogenéticamente distantes de la cepa productora (amplio espectro) (Cintas *et al.*, 2001).

La capacidad de producir bacteriocinas, es un fenotipo muy extendido entre las BAL, como lo demuestra el hecho de que hayan sido descritas cepas productoras de bacteriocinas de todos sus géneros asociados con los alimentos: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium* y *Enterococcus* (de Vuyst & Vandamme, 1994). Algunas de las ventajas que se han considerado para la aplicación y uso de las bacteriocinas son: la ausencia de toxicidad para células eucariotas, su mayor inhibición comparada con las producidas por bacterias Gram negativas y la degradación que se produce en el tracto intestinal sin la producción de compuestos secundarios. Sin embargo, en la actualidad, sólo la nisina, la pediocina PA-1 y Micocin® producida por *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici* y *Carnobacterium maltaromaticum* CB1, respectivamente, son consideradas seguras para el consumo humano (GRAS), de acuerdo con la Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration-FDA) de los EE. UU (Radaic *et al.*, 2020).

Las condiciones de incubación de organismos bacteriocinógenos influyen en el rendimiento efectivo de la bacteriocina. La producción de estos principios activos se

favorece optimizando diferentes factores asociados al crecimiento, como el pH, la temperatura, los nutrientes o el tiempo de incubación, los cuales varían en cada organismo productor (de Vuyst, 1995). Se ha determinado que la composición y el origen de las fuentes de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo son de importancia para la producción óptima de bacteriocinas (Vallejo *et al.*, 2014). En condiciones naturales, la biosíntesis ocurre en la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma y, por lo general, presenta una correlación positiva con la biomasa producida (Piard & Desmazeaud, 1992). Sin embargo, la producción máxima en los medios de cultivos puede ocurrir en diferentes fases del ciclo de crecimiento (Tagg *et al.*, 1976).

#### *Clasificación de las bacteriocinas*

Las bacteriocinas han sido agrupadas en clases según varios criterios de clasificación, como por ejemplo: microorganismos productores, pesos moleculares, propiedades físicas, estructuras químicas, modo de acción, y características genéticas y bioquímicas (Monroy *et al.*, 2009; Nes *et al.*, 2007). Las bacteriocinas más comunes producidas por BAL son descritas en la Tabla 3.

-Clase I, *los lantibióticos*: son péptidos de muy bajo peso molecular (<5kDa) resistentes a altas temperaturas, presentan aminoácidos no comunes en su estructura, tales como lantionina, metillantionina, dehidroxilamina y dehidrobutirina. Los lantibióticos pueden encontrarse en forma lineal (tipo A) o de forma globular (tipo B), caracterizados por la nisina y la mersacidina, respectivamente. La nisina es producida por cepas aisladas de productos vegetales, lácteos y embutidos; es una bacteriocina de amplio espectro, presentando actividad frente a bacterias Gram positivas, incluyendo *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Cintas *et al.*, 1998; Hurtst, 1981). Además, la nisina previene el crecimiento de esporas e inhibe a las células vegetativas de *Bacillus* spp. y *Clostridium* spp.

-Clase II, *los no lantibióticos*: son péptidos pequeños termoestables (<10kDa), sin aminoácidos modificados en su estructura. Por lo general, son catiónicos y a menudo anfifílicos (Nes *et al.*, 1995), lo que les permite permeabilizar la membrana y producir la muerte celular. Se subdividen en cinco subclases (IIa, IIb, IIc, IId y IIe):

-La subclase IIa, son una de las bacteriocinas más estudiadas, actúan fuertemente contra patógenos transmitidos por alimentos, especialmente *L. monocytogenes*; se ha descrito y caracterizado un gran número de este tipo de bacteriocinas, producidas por una amplia variedad de cepas como *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Carnobacterium* (Cintas *et al.*, 2001). Estas bacteriocinas se sintetizan como precursores con una secuencia líder N-terminal, conocida como secuencia líder

del tipo “doble glicina” (Havarstein *et al.*, 1994) la cual es escindida por un transportador ABC y una proteína accesoria, durante el proceso de secreción al medio extracelular del péptido activo (Havarstein *et al.*, 1995). La subclase IIa también se conoce como la familia de la pediocina, debido a que se refiere a la pediocina PA-1, la primera y más caracterizada bacteriocina dentro del grupo (Drider *et al.*, 2006).

-La subclase IIb son bacteriocinas formadas por dos péptidos y requieren la acción complementaria para una actividad completa. Normalmente, los genes se ubican en el mismo operón y se expresan simultáneamente, y los dos péptidos actúan en combinación con frecuencia mostrando una acción sinérgica importante. Su mecanismo de acción también implica la disipación del potencial de membrana y una disminución en la concentración intracelular de ATP (Balciunas *et al.*, 2012). Este grupo incluye lactococcina G, lactacina F, lactococcina M, plantaricina S (Cintas *et al.*, 2001).

-En la subclase IIc se encuentran las bacteriocinas que no comparten homología con ninguna otra y recientemente se demostró que se exportan por la vía secretora general (Cintas *et al.*, 2001). Incluye la bacteriocina 31 (Tomita *et al.*, 1996) y enterocina P (Cintas *et al.*, 1997), entre otras.

-En la subclase IId, se incluye todas aquellas bacteriocinas de la clase II que no se ajustan a ninguno de los subgrupos anteriores. En este subgrupo están presentes la enterocina L50 (EntL50A y EntL50B) y enterocina Q producidas por *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 2000), entre otros.

-Clase III: son péptidos termolábiles de alto peso molecular (>30 kDa), se han identificado dentro del género *Lactobacillus* (Joerger & Klaenhammer, 1986) y en *Enterococcus* (Nilsen *et al.*, 1998). Estas bacteriocinas se inactivan mediante un tratamiento térmico y su mecanismo de acción es diferente al de otras bacteriocinas, ya que promueven la lisis de la pared celular del microorganismo blanco.

**Tabla 3:** Principales bacteriocinas producidas por las BAL.

Bacteriocinas	Organismo productor
Lactacina F	<i>L. johnsonii</i> ssp.
Lactocina 705	<i>L. casei</i> ssp.
Lactococcina G	<i>Lc. lactis</i> ssp.
Lactococcina MN	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>
Nisina	<i>Lc. lactis</i> ssp.
Leucocina	<i>Leuconostoc</i> spp.
Plantaricina EF, Plantaricina W Plantaricina JK, Plantaricina S	<i>L. plantarum</i> ssp.

Fuente: Zacharof & Lovitt (2012).

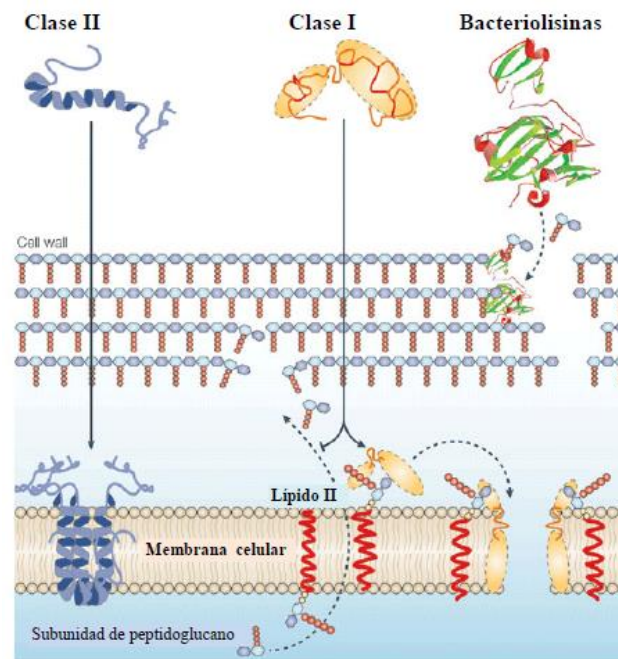
*Mecanismo de acción de las bacteriocinas de BAL*

Las bacteriocinas pueden presentar un modo de acción bactericida o bacteriostático sobre las células sensibles; este accionar está influenciado por diversos factores como la dosis de bacteriocina, el estado fisiológico de las células indicadoras, las condiciones experimentales, entre otras (Cintas *et al.*, 2001). Cotter *et al.* (2005) determinaron que las bacteriocinas de las bacterias Gram positivas presentan diferentes modos de acción de acuerdo con su clasificación (Fig. 2).

-Los lantibióticos (clase I) actúan desestabilizando la membrana plasmática, mediante la formación de poros. La estructura  $\alpha$ -hélice o  $\beta$ -laminar de estos péptidos, les permite tener dos caras, una hidrofílica y otra hidrofóbica, creando oligómeros que pueden atravesar la membrana formando poros. Como consecuencia, se produce un vaciamiento intracelular, generando la pérdida de iones K, de energía en forma de ATP y en algunos casos, de aminoácidos y moléculas de bajo peso molecular. Esto genera una disminución del potencial de membrana y una escasa disponibilidad de las reservas energéticas de la célula, lo que conlleva a la disminución de la síntesis de ADN, ARN y proteínas, que finalmente desencadena la muerte de la célula (McAuliffe *et al.*, 2001).

-Los péptidos no-lantibióticos (clase II) tienen una estructura anfifílica helicoidal que les permite insertarse en la membrana de la célula diana, lo que lleva a la despolarización y la muerte. La interacción inicial con las cabezas de los fosfolípidos de la membrana aniónica tiene lugar en el extremo N hidrofílico de los péptidos. El C-terminal del péptido es más hidrófobo que el N-terminal y se cree que está involucrado en interacciones hidrofóbicas con la membrana (Cotter *et al.*, 2005).

-Las proteínas bacteriolíticas grandes (bacteriolisinas o bacteriocinas de clase III) como la lisostafina pueden actuar directamente sobre la pared celular de las células diana Gram-positivas, provocando la muerte y la lisis celular (Cotter *et al.*, 2005).



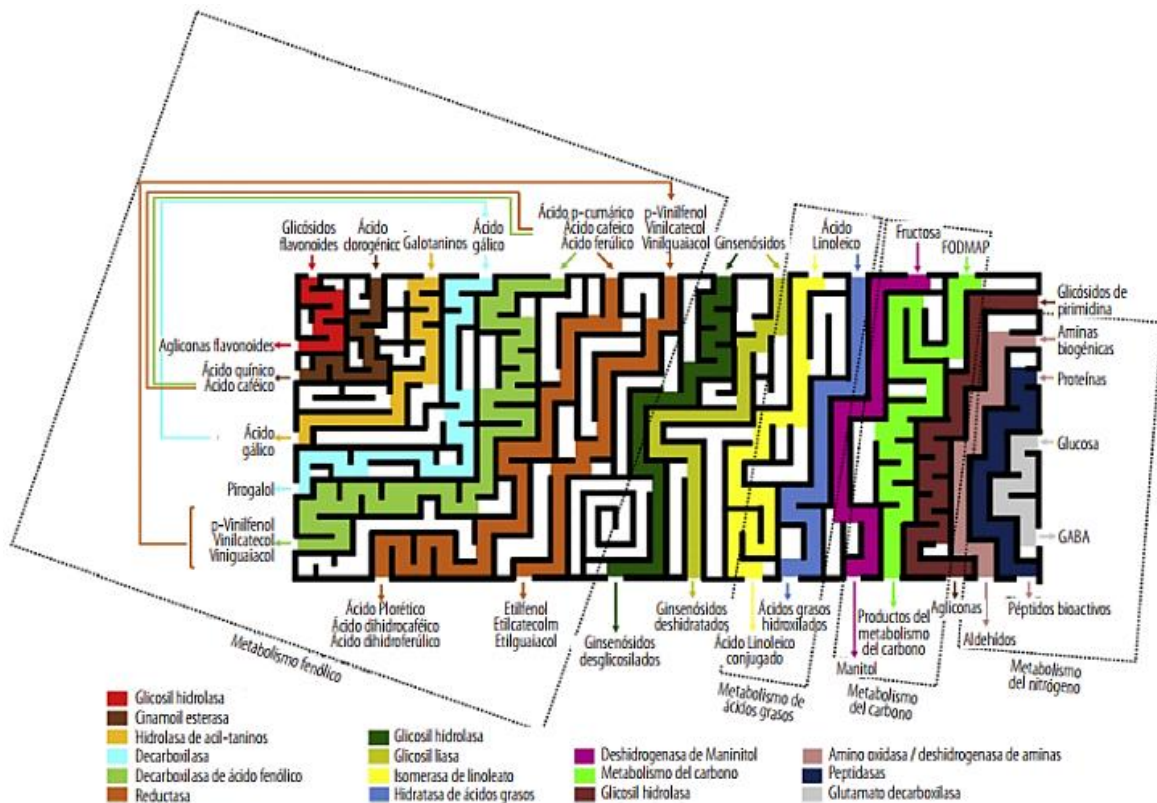
Fuente: Cotter *et al.* (2005).

**Figura 2:** Mecanismo de acción de las bacteriocinas de la clase I, II y III.

#### 1.1.5.2 Enzimas de las BAL involucradas en el proceso de fermentación de vegetales

La riqueza de los vegetales como sustrato y el amplio conjunto de enzimas que presentan las BAL les permite utilizar durante la fermentación un complejo laberinto de rutas metabólicas, obteniendo como resultado un producto fermentado enriquecido en compuestos bioactivos y/o reducidos en factores antinutricionales (Filannino *et al.*, 2018) (Fig. 3).

Entre toda la batería enzimática que tienen las BAL, a continuación, se describirán las de mayor interés en la fermentación vegetal:



Fuente: Filannino *et al.* (2018); Blajman & Zárate (2020).

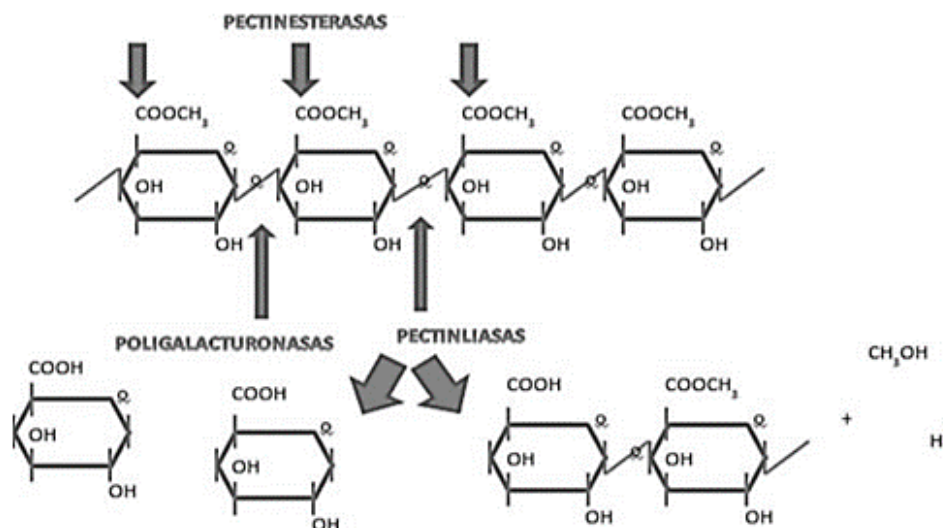
**Figura 3:** Laberinto funcional y metabólico de las BAL durante la fermentación de vegetales.

### Actividad pectinasa

Las bacterias son fuente de producción de diversas enzimas extracelulares de interés industrial. Estudios previos se han enfocado en investigar enzimas producidas por las BAL, como la  $\beta$ -galactosidasa y proteasas, pero son escasos los dedicados a la producción de pectinasa (Karam & Belarbi, 1995; Sakellaris *et al.*, 1989).

Las pectinasas actúan sobre las pectinas, polisacáridos presentes en la pared celular vegetal que pueden estar entrecruzados con otros polisacáridos estructurales y proteínas para formar una protopectina insoluble. El componente más abundante de la pectina es el ácido galacturónico, que forma el esqueleto principal de la molécula consistente en una cadena de residuos de ácido D-galacturónico unidos mediante enlaces  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  (Garg *et al.*, 2016). Según el tipo de acción de las pectinasas sobre el sustrato, se pueden clasificar en tres grupos: la poligalacturonasa (PG, EC. 3.2.1.15), capaz de hidrolizar los enlaces glucosídicos próximos a un grupo carboxilo libre; pectinesterasa (PE, EC. 3.1.1.11), que a través de la reacción de hidrólisis libera metanol de los grupos carboxilos esterificados y genera pectinas de bajo metóxilo y

pectatos, y finalmente la pectinliasa (PL, EC. 4.2.2.2), sintetiza la pectina al romper los enlaces glucosídicos próximos a un grupo metil-éster (Mejjide *et al.*, 2016) (Fig. 4).



Fuente: Mejjide *et al.* (2016).

**Figura 4:** Acción de las enzimas pécicas sobre la estructura del galacturoano presentes en sustratos de pectina.

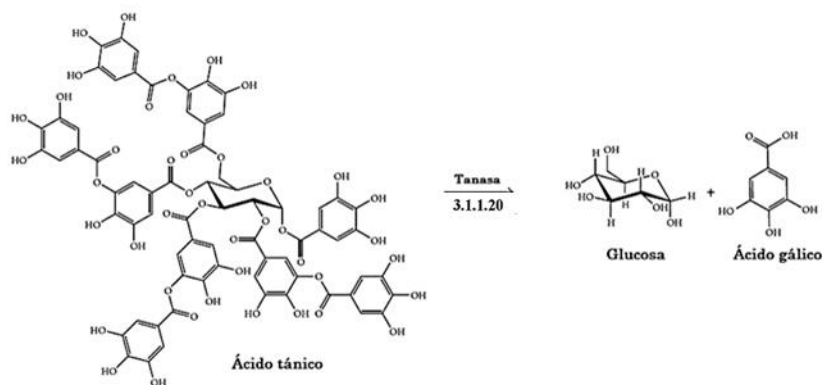
La selección de microorganismos productores de endopectinasas es de interés en el procesamiento de vegetales, ya que actúan disminuyendo la viscosidad, mejorando el rendimiento y la clarificación del producto final (Seseña Prieto, 2007).

#### *Actividad Tanasa*

Los taninos son compuestos polifenólicos naturales con diferentes pesos moleculares que están presente naturalmente en el reino vegetal (Vaquero *et al.*, 2004). Los taninos no juegan un papel directo en el metabolismo de las plantas, por lo que son considerados metabólicos secundarios. Después de la lignina, los taninos son el segundo grupo más abundante de compuestos fenólicos en los vegetales (Aguilar *et al.*, 2007). Una de sus principales características es la capacidad para formar complejos con proteínas y otras macromoléculas como el almidón, la celulosa y los minerales (Bhat *et al.*, 2013). Los taninos son clasificados por su estructura y susceptibilidad a la hidrólisis ácida en hidrolizables y condensados. Los taninos hidrolizables están compuestos por un núcleo de poliol carbohidrato (generalmente D-glucosa) esterificado a ácidos fenólicos como el ácido gálico o el ácido elágico, formando gallotaninos y elagitaninos, respectivamente. Mientras que los taninos condensados son compuestos complejos

formados por bloques de flavonoides (de 2 a más de 50) que no resultan fácilmente hidrolizables (Aguilar *et al.* 2007). En general, los taninos son considerados compuestos antinutricionales ya que, inhiben las enzimas digestivas, afectan la absorción de vitaminas, minerales y proteínas, formando complejos no digeribles. La ingestión de grandes cantidades de taninos puede provocar efectos adversos para la salud (Bhat *et al.*, 2013).

La tanin acil hidrolasa (TAH, EC. 3.1.1.20), comúnmente conocida como tanasa, hidroliza el ácido tánico completamente a ácido gálico y glucosa (Lekha & Lonsane, 1997), inhibiendo sus propiedades de formación de complejos no digeribles (Fig. 5). Este tipo de enzima puede ser producida por cepas de hongos, levaduras y bacterias (Vaquero *et al.*, 2004). Por lo general, las bacterias productoras de tanasa son encontradas en la microflora intestinal de diversas especies de mamíferos; pero también existen evidencias de aislamientos provenientes de alimentos fermentados a base de vegetales, incluyendo diferentes variedades de pickles y kimchi (Osawa *et al.*, 2000).



**Figura 5:** Hidrólisis del ácido tánico catalizado por la TAH.

#### *Actividad dextransacarasa*

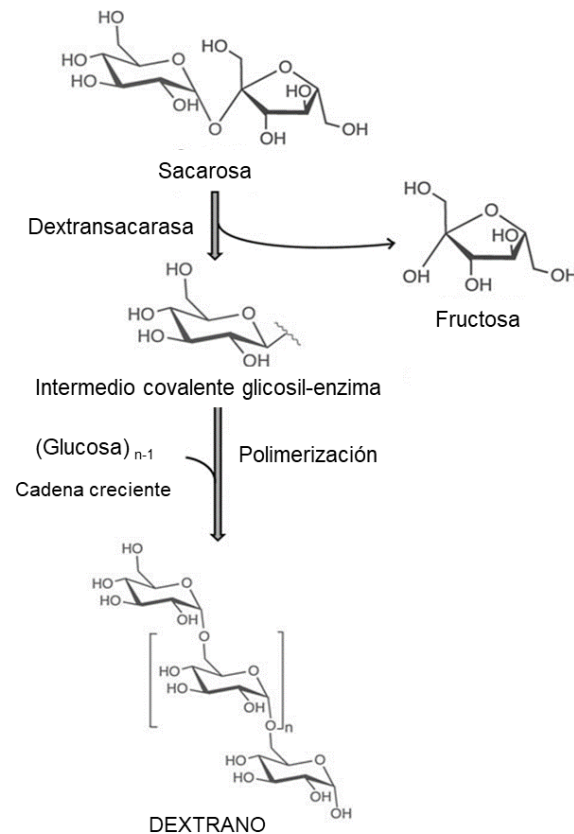
Las enzimas dextransacarasa (E.C. 2.4.1.5.) son producida por diferentes géneros de BAL, como *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* (denominado antiguamente), *Pediococcus* y *Weissella* (Kothari *et al.*, 2014). Estas enzimas son extracelulares, pueden ser secretadas al medio o permanecer unidas a la superficie de la célula.

Las dextransacarasa pertenecen a la familia de las glucansacarasa, que catalizan la transferencia de residuos D-glucopiranososa provenientes de la sacarosa al dextrano, liberándose fructosa. La estructura de cada tipo de dextrano depende de la cepa microbiana y, por tanto, de la dextransucrasa específica (Leemhuis *et al.*, 2013). Los dextranos son polisacáridos de elevada masa molecular, presentan una cadena

principal con enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$  y ramificaciones unidas a esta por enlace  $\alpha(1\rightarrow3)$ ,  $\alpha(1\rightarrow2)$  o  $\alpha(1\rightarrow4)$  (Kothari *et al.*, 2014).

La reacción catalizada por las dextransacarasas se la puede dividir en dos etapas para su análisis. En la primera etapa, se escinde un enlace  $\alpha(1\rightarrow2)$  de la sacarosa con la liberación de fructosa y se forma un intermediario de glucosil-enzima, en el que la unidad de glucosilo se une covalentemente al nucleófilo catalítico mediante un enlace  $\beta$ -glicosídico. La energía involucrada en el enlace entre la glucosa y fructosa ( $16,7-20,9$   $\text{kJ mol}^{-1}$ ) se utiliza para la síntesis del dextrano, sin necesidad de algún cofactor o ATP (Leathers, 2002). En la segunda etapa de la reacción, el residuo glucosilo unido covalentemente se transfiere al extremo aceptor no reductor del azúcar de una cadena del dextrano en crecimiento, con un enlace  $\alpha$ -glicosídico (Leemhuis *et al.*, 2013) (Fig. 6).

En los últimos años, se incrementó el interés en el uso de prebióticos como ingrediente en alimentos funcionales para modular la composición de la microbiota intestinal y proporcionar beneficios para la salud del huésped (Saad *et al.*, 2013). Los alimentos que contienen prebióticos están asociados con la protección contra el riesgo de distintas enfermedades como cáncer de colon, inflamación intestinal, diarrea, enfermedad coronaria, obesidad, colesterolemia y diabetes tipo 2. Existen evidencias que los enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$  son resistentes a la hidrólisis por las enzimas intestinales humanas, lo que da como resultado la lenta digestión del dextrano; mientras que los enlaces ramificados, fácilmente hidrolizables, actúan como prebióticos con efecto selectivo sobre la microbiota intestinal (Remaud-Simeon *et al.*, 2000). Además, se ha informado que el dextrano y sus derivados de oligosacáridos incrementan el desarrollo de especies beneficiosas como *Bifidobacterium* sp. y *Lactobacillus* sp., exhibiendo actividad prebiótica (Das *et al.*, 2014; Olano-Martin *et al.*, 2000).



Fuente: Kothari *et al.* (2014).

**Figura 6:** Reacción catalizada por las enzimas dextranasacarasa.

### 1.1.5.3 Tolerancia a fenoles y polifenoles

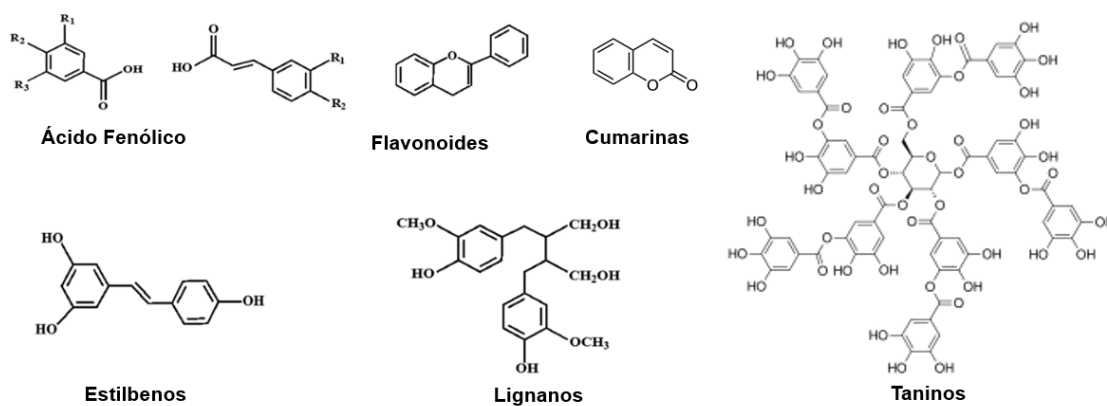
En los últimos años, las industrias alimentarias han comenzado a interesarse por los compuestos fenólicos. Los polifenoles son constituyentes naturales de una gran variedad de vegetales, que se trasladan a los alimentos procesados luego de su elaboración. En los alimentos, los polifenoles contribuyen al amargor, la astringencia, el color, el aroma y la estabilidad oxidativa (Pandey & Rizvi, 2009).

Los polifenoles son metabolitos secundarios de plantas y están involucrados con la protección contra la radiación ultravioleta y/o la agresión provocada por patógenos. En varias especies de plantas se han encontrado más de 8.000 compuestos fenólicos (Pandey & Rizvi, 2009). Desde el punto de vista químico, el término "polifenol" engloba a un grupo heterogéneo de compuestos, que se caracterizan por presentar un anillo aromático con al menos un radical hidroxilo y una cadena lateral funcional. Los polifenoles pueden ser clasificados en diferentes grupos, en función al número de anillos de fenoles que contienen y sobre la base de elementos estructurales que se unen a estos entre sí. Los compuestos fenólicos y polifenólicos se pueden clasificar en varias

clases: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas, ligninas y taninos (Shahidi & JuDong, 2018) (Fig. 7).

Los ácidos fenólicos representan aproximadamente un tercio de los compuestos polifenólicos en nuestra dieta y se encuentran en todo el material vegetal; el ácido cafeico, el ácido gálico y el ácido ferúlico son los más comunes (Pandey & Rizvi, 2009).

Los flavonoides son los polifenoles más abundantes en la dieta humana y comparten una estructura básica común que consiste en dos anillos aromáticos, que están unidos por tres átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado. La cumarina pertenece a la familia de las benzopironas, a su esqueleto se le pueden adicionar diferentes residuos y conformar la familia de las cumarinas. Los estilbenos contienen dos restos fenilo conectados por un puente de metileno de dos carbonos. La mayoría de los estilbenos en las plantas se sintetizan solo en respuesta a una infección o lesión y el más estudiado es el resveratrol. Los lignanos son compuestos difenólicos que contienen una estructura de 2,3-dibencilbutano que se forma por la dimerización de dos residuos de ácido cinámico (Pandey & Rizvi, 2009). Dentro de los polifenoles vegetales se encuentran los taninos, estos se dividen en dos grupos: taninos hidrolizables como elagitaninos y gallotaninos; y taninos condensados, también denominados como proantocianidinas (Shahidi & JuDong, 2018).



Fuente: Pandey & Rizvi (2009).

**Figura 7:** Estructura química de las diferentes clases de polifenoles.

Tradicionalmente los compuestos fenólicos, han sido considerados nutricionalmente indeseables, ya que precipitan las proteínas, inhiben enzimas digestivas y afectan la utilización de minerales y vitaminas, disminuyendo la calidad nutricional del alimento. Sin embargo, la evidencia epidemiológica ha demostrado que los fenoles promueven

notables efectos sobre la salud contrarrestando enfermedades crónicas, debido a sus propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias y antioxidantes. La capacidad anticancerígena de los fenoles es un efecto preventivo primario de enfermedades; retardan el inicio y la progresión de los cánceres al limitar la transformación de las células normales, los tumores en crecimiento, la angiogénesis y la metástasis (Huang *et al.*, 2009; Shahidi & JuDong, 2018).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a su habilidad para captar radicales libres y/o donar átomos de hidrógeno o electrones (Amarowicz *et al.*, 2004). Esta actividad depende de su estructura química y en especial del número y posición de los grupos hidroxilos, así como de la naturaleza del anillo aromático de sustitución (García Ruiz, 2012).

Las BAL pueden metabolizar los compuestos fenólicos presentes en el medio, pero al mismo tiempo su propio metabolismo y crecimiento puede verse afectado por los polifenoles del medio (García Ruiz, 2012). El balance final de esta interacción está regulado por diversos factores como la concentración y la estructura química de los compuestos fenólicos, las características propias de las cepas bacterianas implicadas, la presencia de agentes antimicrobianos, entre otros (García Ruiz, 2012). Por lo tanto, es fundamental seleccionar BAL que toleren ciertas concentraciones de fenoles y polifenoles, presentes en la matriz vegetal a utilizar.

#### 1.1.5.4 Producción de exopolisacáridos (EPS)

Algunas bacterias pueden sintetizar extracelularmente polímeros de monosacáridos, conocidos como polisacáridos exocelulares o EPS. Atendiendo a su composición química y a su modo de síntesis, los EPS de las BAL se dividen en homopolisacáridos (HoPS), los cuales están compuestos por un único tipo de monosacárido como el dextrano, y los heteropolisacáridos (HePS) que están constituidos por 2 o más tipos de monosacáridos como glucosa, galactosa, ramnosa, manosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalatosamina y ácido glucónico (Ross *et al.*, 2002). Los HePS se encuentran de forma habitual en las BAL, y los azúcares más frecuentes son glucosa, galactosa y ramnosa en diferentes proporciones (Laws *et al.*, 2001). Como se mencionó anteriormente, las BAL son consideradas GRAS, por esta razón son candidatas a la producción segura de EPS funcionales (Rodríguez *et al.*, 2003). Estos tipos de EPS se utilizan para mejorar las propiedades sensoriales de los alimentos fermentados (Tieking *et al.*, 2003), contribuyendo a la textura, reología, sabor y estabilidad final del producto.

#### 1.1.5.5 Tolerancia al NaCl y al pH ácido

La salinidad y el pH son factores, como la temperatura, que regulan el desarrollo y metabolismo de las bacterias. Por lo tanto, es necesario que las BAL, en el momento de su selección, toleren ciertas concentraciones de NaCl y que su desarrollo no se vea afectado por los bajos valores de pH; condiciones imperantes en la fermentación de vegetales.

#### 1.1.5.6 Incremento de la actividad antioxidante

Los antioxidantes son capaces de prevenir o retardar la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de diversas moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos (Pisoschi & Negulescu, 2011). La actividad antioxidante es la capacidad de eliminar radicales libres en la célula y en los alimentos. Los antioxidantes se usan en los alimentos para protegerlos de los efectos nocivos de la oxidación y también se emplean como suplementos dietarios para neutralizar los efectos adversos del estrés oxidativo (Hur *et al.*, 2014). Los antioxidantes más comunes son los polifenoles, la quercetina, el ácido ascórbico y los flavonoides.

La fermentación mejora la actividad antioxidante de los alimentos de origen vegetal, al aumentar la liberación de metabolitos que ejercen esta función. Las enzimas microbianas, como la glucosidasa, la amilasa, la celulasa, la quitinasa, la inulinasa, la fitasa, la xilanasas, la tanasa, la esterasa, la invertasa o la lipasa producidas durante la fermentación pueden hidrolizar los glucósidos y descomponer las paredes celulares de las plantas o las moléculas de almidón. Estas enzimas desempeñan un papel en la desintegración de la matriz de la pared celular de la planta y, en consecuencia, facilitan la extracción de los flavonoides y la inducción y/o liberación de diversos compuestos bioactivos (Hur *et al.*, 2014). Los efectos de las BAL en la actividad antioxidante también podrían explicarse por la liberación de compuestos fenólicos simples después de la hidrólisis ácida y enzimática de compuestos fenólicos polimerizados durante la fermentación.

#### 1.1.6 Factores de virulencia y/o rasgos negativos

Históricamente, las BAL han sido reconocidas como seguras con un estado GRAS y QPS (presunción cualificada de seguridad) otorgado por la FDA y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por su sigla en inglés), respectivamente.

Actualmente, las autoridades de la División de Biotecnología perteneciente a la FDA exigen la realización de pruebas de seguridad más estrictas a las cepas de BAL aisladas, antes de su aplicación en biotecnología alimentaria (Ji *et al.*, 2013).

Por lo tanto, es fundamental determinar que las BAL que conformen el/los inóculo/s iniciales no presenten factores de virulencia y/o rasgos negativos como: producción de aminas biógenas (AB), actividad hemolítica, actividad gelatinasa y resistencia antibiótica.

#### 1.1.6.1 Producción de aminas biógenas

Las BAL son consideradas como las principales productoras de AB en alimentos fermentados. Estos compuestos derivan de la descarboxilación de aminoácidos a través de actividades microbianas y pueden causar efectos tóxicos en los humanos (Barbieri *et al.*, 2019). La ingestión de alimentos con elevadas concentraciones de AB pueden causar dolor de cabeza, palpitaciones, vómitos, diarrea e hipertensión (Alvarez & Moreno Arribas, 2014). Sin embargo, el efecto tóxico depende del tipo de AB, de la sensibilidad individual y del consumo de medicamentos que interactúan con la aminooxidasa, responsable del proceso de desintoxicación de AB exógenas (Silla Santos, 1996).

Las AB se han clasificado según su estructura química en aromáticas (tiramina y 2-feniletilamina), alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina y espermidina) y heterocíclicas (histamina y triptamina) (Barbieri *et al.*, 2019).

Las AB exógenas derivan de la descarboxilación bacteriana de los aminoácidos correspondientes a través de las descarboxilasas. La histamina deriva de la histidina por la acción de la histidina descarboxilasa (HDC), mientras que la cadaverina se produce por la acción de la lisina descarboxilasa (LDC) sobre la lisina. La tirosina se convierte en tiramina por la tirosina descarboxilasa (TDC), que también puede actuar en la obtención de fenilalanina 2-feniletilamina. Esta última AB aromática es producida por TDC con una menor eficiencia con respecto a la tiramina y se acumula cuando la tirosina se agota casi por completo (Bargossi *et al.*, 2015; Pessione *et al.*, 2009). La putrescina deriva de la descarboxilación de la arginina y agmatina, mediante la acción de la ornitina descarboxilasa y la agmatina deiminasa, respectivamente (Benkerroum, 2016).

Las vías de descarboxilación se activan por varias razones fisiológicas. Trabajos previos reportan que la acumulación de AB puede representar un mecanismo de defensa para resistir en medios ácidos mejorando el rendimiento celular en estas condiciones (Pessione *et al.*, 2009). Se ha informado la capacidad de producir histidina, cadaverina y putrescina por parte de las BAL (Benkerroum, 2016). Es importante señalar que la capacidad de producir AB es generalmente una característica específica de cada bacteria, mostrando una fuerte variabilidad en el potencial amino biogénico entre diferentes cepas pertenecientes a la misma especie (Barbieri *et al.*, 2019).

El contenido de AB en los alimentos fermentados es de gran interés, no solo por sus posibles problemas de salud sino también desde el punto de vista económico (EFSA, 2011). En el proceso de fermentación de los vegetales por las BAL, se observa un incremento de la concentración de ácido láctico acompañado de un descenso de pH, por lo que es necesario evaluar la producción de AB en estas condiciones. Sin embargo, la presencia de pequeñas concentraciones de estos compuestos en los alimentos fermentados es inevitable. La EFSA (2011) establece que la concentración de AB debe ser inferior a 20 mg/kg en vegetales fermentados y, hasta 100 mg/kg en embutidos y quesos.

#### 1.1.6.2 *Actividad gelatinasa*

La gelatinasa es una metaloendopeptidasa extracelular capaz de degradar diferentes tipos de sustratos como gelatina, fragmentos insolubles de colágeno, la cadena  $\beta$  de la insulina y la hemoglobina. Esta enzima proteolítica, presente en ciertas bacterias, les permite desdoblarse a los polipéptidos y obtener aminoácidos simples desde el tejido del hospedero. Por esta razón, los microorganismos que sintetizan gelatinasa son considerados no seguros, ya que no solo producen daños tisular sino que en ciertos casos logran migrar y difundir a través de los tejidos lesionados del hospedador provocándoles distintos tipos de enfermedades (Waters *et al.*, 2003), como la endocarditis infecciosa, lesiones renales agudas, entre otras.

#### 1.1.6.3 *Actividad hemolítica*

La hemolisina  $\beta$  o citolisina es una toxina extracelular capaz de lisar los eritrocitos, como diferentes células eucariotas y procariotas (Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003). En la década del 90 se reconoció a esta toxina como una bacteriocina, perteneciente a la clase I o lantibióticos, siendo la única de este grupo capaz de lisar células eucariotas (Gilmore *et al.*, 1994). Esta toxina/bacteriocina despierta un interés especial porque su actividad incrementa la virulencia, principalmente en enterococos (Chow *et al.*, 1993; Huycke & Gilmore, 1995). Estudios actuales revelaron que la síntesis de la citolisina está regulada por la expresión de ocho genes situados en un único operón que bien puede estar localizado en el cromosoma, en plásmidos regulados por feromonas o en la isla de patogenicidad (Garsin *et al.*, 2014). En trabajos previos se ha informado que la presencia del operón *cyl* y el potencial hemolítico están muy extendidos principalmente en el género *Enterococcus*, independientemente de su origen o localización (hospedadores humanos y animales, alimentos o ambiente). Por lo tanto, siempre es recomendable la evaluación de la expresión de citolisina particularmente en cepas de enterococos que pudieran emplearse en la industria alimentaria (Semedo *et al.*, 2003).

#### 1.1.6.4 Resistencia antibiótica

La resistencia antibiótica es la capacidad de un microorganismo para resistir la actividad inhibitoria de un antimicrobiano, más allá de la susceptibilidad normal de la especie bacteriana específica (Verraes *et al.*, 2013). La resistencia antibiótica puede ser intrínseca o adquirida, dependiendo de su naturaleza. La resistencia intrínseca o innata es una propiedad específica de las bacterias, su aparición es anterior al uso de los antibióticos y tiene la característica de ser inherente a una especie en particular (Zhang, 2007). La ausencia del blanco molecular de acción es una clara forma de resistencia intrínseca. Los géneros *Leuconostoc* y *Lactiplantibacillus* exhiben resistencia intrínseca a la vancomicina como consecuencia de la ausencia del dipéptido D-alanina-D-alanina que en estos microorganismos se sustituye de forma natural por D-alanina-D-lactato (Verraes *et al.*, 2013). Otro ejemplo es la resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, la cual se ha asociado con la alteración del sitio receptor de las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs- Penicillin Binding Protein) en algunas bacterias Gram positivas, disminuyendo de esta manera su afinidad (Colautti *et al.*, 2022). Este tipo de resistencia solo se transmite de forma vertical, ya que los genes que codifican las PBPs se encuentran en el cromosoma (Colautti *et al.*, 2022; Mathur & Singh, 2005). La resistencia adquirida ocurre cuando las bacterias pueden incorporar a su estructura celular, material genético móvil capaz de otorgar resistencia a ciertos antibióticos. Esta transferencia horizontal de genes permite al microorganismo incrementar su espectro de resistencia. Los tres mecanismos principales de transferencia génica horizontal son conjugación, transformación y transducción. Este tipo de transferencia puede potencialmente ocurrir incluso entre bacterias que son distantes filogenéticamente (Álvarez-Cisneros & Ponce-Alquicira, 2018), ocasionando graves riesgos para la salud pública en todo el mundo.

#### 1.1.7 Vegetales fermentados tradicionales

En general, los vegetales se consumen frescos o mínimamente procesados pero su naturaleza extremadamente perecedera condiciona su vida útil debido al rápido deterioro microbiano. La fermentación se convierte en una excelente alternativa, ya que logra la preservación biológica y modifica favorablemente a los alimentos (Di Cagno *et al.*, 2013). Los métodos tradicionales para elaborar vegetales fermentados comenzaron hace más de 2.000 años (Blajman & Zárate, 2020). En Asia y en Oriente, los productos fermentados se elaboraban a partir de repollo, nabos, rábanos, zanahorias y otros vegetales endémicos de las regiones locales. Esta tecnología se expandió a Europa en el siglo XVI, junto a la introducción de algunas hortalizas regionales, como el repollo. Luego, los europeos introdujeron variedades de repollos en América y divulgaron el procedimiento para la elaboración de chucrut (Hutkins, 2006). Sin embargo, los

vegetales fermentados ya representaban un componente importante de la dieta de los pueblos originarios de Latinoamérica. Estos alimentos fermentados eran elaborados a base de cereales, tubérculos, frutos y leguminosas. Entre los numerosos ejemplos de alimentos y bebidas fermentadas latinoamericanas pueden mencionarse: calugi, cauim, caxiri, chicha, masa agria, pozol, pulque, polvillo, tarubá, tejuino y yakupa (Blajman & Zárate, 2020). En general, en todas las regiones del mundo donde se cultivan y consuman vegetales, es muy probable que existan versiones fermentadas. Sin embargo, al igual que otros alimentos fermentados, se observan algunas diferencias en las preparaciones, así como en las variedades de materias primas disponibles en cada región. Los vegetales fermentados de mayor consumo en el mundo son las aceitunas, el chucrut, los pepinillos y el kimchi (Russo *et al.*, 2017).

La producción de aceitunas se extendió desde el Medio Oriente a través del Mediterráneo, a Grecia, Italia, Francia, España y el norte de África. Las aceitunas no se introdujeron en América hasta el siglo XVIII (Hutkins, 2006). Su preparación varía según la región geográfica; siendo los métodos de elaboración principalmente tres: i) las aceitunas verdes españolas se tratan con NaOH y luego se fermentan; ii) las aceitunas griegas, naturalmente negras, se fermentan sin tratamiento con NaOH; iii) Las aceitunas de California (negras o verdes maduras) no se fermentan, sino que simplemente se tratan con NaOH y puede ser sometidas a aireación para promover la oxidación del pigmento, convirtiendo así el color verde en negro (Russo *et al.*, 2017). En el método griego como en el español, la fermentación es dirigida por la microflora nativa, principalmente por el género *Lactiplantibacillus* sp. (Hutkins 2006). En todos los casos es necesario tratar a las aceitunas con NaOH para hidrolizar la oleuropeína que confiere un sabor amargo e inhibe el desarrollo de las BAL (Blajman & Zárate, 2020). Luego de su elaboración, las aceitunas de mesas sin pasteurizar se pueden almacenar hasta 6 meses a 5 °C sin disminuir significativamente las propiedades organolépticas (Argyri *et al.*, 2015). Debido a su contenido de ácidos grasos monoinsaturados (omega-9), el consumo de aceitunas y su aceite pueden prevenir el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Además, otros componentes menores, como los tocoferoles y compuestos fenólicos, tienen propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Argyri *et al.* 2015; Blajman & Zárate, 2020).

Se entiende por chucrut (del francés *choucroute*), sauerkraut (del alemán *sauer*: agrio, *kraut*: repollo), repollo ácido, col agria, col ácida, el producto elaborado mediante la fermentación láctica de hojas finamente cortadas de diversas variedades de repollo blanco (*B. oleracea*), limpios, sanos con o sin especias; el contenido de cloruro de sodio no debe ser menor de 2% ni superar el 3,5%; debe presentar una acidez

expresada en ácido láctico no inferior de 1% y un pH no mayor de 4,1, según el Código Alimentario Argentino (CAA, art. 976). Es una preparación culinaria originaria de los países de Europa central (Alemania, Austria, Francia, Suiza, Hungría, Polonia y Ucrania). Su uso culinario se ha extendido a otros continentes, de América y Asia a partir del siglo XVII (Hutkins, 2006). El proceso de fermentación incluye una fase heterofermentativa, en la que se desarrollan las BAL menos tolerantes al medio ácido, seguida por especies homofermentativas (Di Cagno *et al.*, 2013). *Ln. mesenteroides*, *Lactiplantibacillus* sp. y *Weissella* sp. son las especies más representativas en la fermentación (Russo *et al.*, 2017). La adición de sal se realiza en seco y es necesaria para inhibir el crecimiento de microorganismos deteriorantes. El tiempo de fermentación varía dependiendo de la temperatura empleada (Blajman & Zárate, 2020). El chucrut se puede pasteurizar, o distribuir de manera fresca o natural; sólo este último contiene microorganismos vivos. En caso de someterse a un tratamiento térmico, el periodo de almacenamiento es más prolongado hasta aproximadamente dos años (Hutkins, 2006). Además de su alto valor nutricional, numerosas investigaciones *in vitro* y algunos datos epidemiológicos sugieren los posibles efectos positivos del consumo del chucrut para la salud. Los fitoquímicos específicos del chucrut exhiben acción antioxidante, antiinflamatoria y quimiopreventiva contra ciertos tipos de cáncer (Peña *et al.*, 2017).

Los pepinillos fermentados se encuentran entre los encurtidos de mayor difusión a nivel mundial (Jaafir *et al.*, 2021). En su fermentación participan principalmente *Leuconostoc* sp., *Lactiplantibacillus* sp., *Lactobacillus* sp. y *Pediococcus* sp. que se van sucediendo conforme sus resistencias a la salinidad y acidez del medio (Russo *et al.*, 2017). En estos alimentos los recuentos de BAL oscilan entre niveles indetectables ( $<10^1$  UFC/g) a  $10^8$  UFC/g (Blajman & Zárate, 2020). Durante la fermentación se liberan ácidos orgánicos, CO<sub>2</sub>, ésteres, aldehídos, entre otros, que causan el descenso del pH, cambios en las características organolépticas y finalmente se alcanzan las condiciones óptimas de conservación (Jaafir *et al.*, 2021). Frecuentemente se añaden especias o hierbas aromáticas para mejorar el sabor y puede usarse a nivel industrial conservantes químicos. Los pepinillos pasteurizados pueden almacenarse durante dos años, mientras que sin este tratamiento térmico, se conservan hasta dos meses a 5 °C (Jaafir *et al.*, 2021). Desde el punto de vista tecnológico y de la salud, los pepinillos pueden considerarse una fuente de BAL con capacidad para producir bacteriocinas, oligosacáridos y polisacáridos. Además, polímeros de dextrano,  $\alpha$ -glucanos y  $\beta$ -glucanos y oligosacáridos prebióticos sintetizados por las BAL de pepinos fermentados han mostrado potencial inmunomodulador y anticancerígeno (Blajman & Zárate, 2020).

El kimchi fue declarado “Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad” por Unesco (Blajman & Zárate, 2020), es un producto fermentado preparado con variedades de repollo chino/akusai y otros vegetales, a manera de condimento como pimentón rojo, ajo, pimienta, mostaza, jengibre, pepino y rábano (Patra *et al.*, 2016). El proceso principalmente ocurre mediante una fermentación láctica espontánea, en la que intervienen los géneros *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactococcus* y *Pediococcus* (Russo *et al.*, 2017). El kimchi resultante generalmente contiene elevadas concentraciones de BAL ( $10^8$ - $10^9$  UFC/g). Durante el proceso de fermentación ocurre una sucesión de microorganismos, *Ln. mesenteroides* se encuentra en la primera etapa, pero se inhibe rápidamente por la concentración creciente de ácido láctico siendo sustituido por especies más tolerantes como *L. plantarum* y *L. brevis* (Blajman & Zárate, 2020). Las condiciones de fermentación dependen de las necesidades de consumo y almacenamiento. El consumo a corto plazo requiere una fermentación a temperatura ambiente, mientras que más tiempo de almacenamiento requiere una fermentación a baja temperatura. Finalizada la fermentación, el kimchi se madura bajo refrigeración, generalmente se almacena de dos maneras, durante tres semanas a 4 °C o hasta cuatro días a temperatura ambiente (Patra *et al.*, 2016). Las BAL presentes en este producto producen varios compuestos además de ácidos orgánicos, incluyendo CO<sub>2</sub>, etanol, manitol, bacteriocinas, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, ornitina, ácido linoleico conjugado y oligosacáridos que contribuyen a sus características nutricionales y funcionales. El kimchi exhibe efectos anticancerígenos, antioxidantes, antidiabéticos y antiobesidad adjudicables a sus compuestos bioactivos (Blajman & Zárate, 2020).

## 1.2 Las brassicáceas

### 1.2.1 Características generales de las brassicáceas

La familia Brassicaceae incluyen a las especies angiospermas dicotiledóneas pertenecientes al orden Brassicales. Constituyen un grupo monofilético con alrededor de 338 géneros y 3.709 especies de plantas distribuidos en todo el mundo, pero principalmente en las regiones templadas (Warwick *et al.*, 2006). Se cree que la gran diversidad genética existente en esta familia le permitió al hombre primitivo domesticar, cultivar, seleccionar y propagar cultivos deseables y morfológicamente distintos de los tipos silvestres (Dixon, 2007). Involucra una gran cantidad de especies cultivadas de importancia económica y hortícola mundial, como *Brassica oleracea* L., *Brassica napus* L., *Brassica rapa* L. y *Raphanus sativus* L. Los principales vegetales son de la especie *B. oleracea* L., tales como col rizada, repollo rojo y blanco, brócoli, coles de Bruselas, coliflor y otros. Luego, *B. rapa* L. incluye formas vegetales, como nabo, akusai y pak choi, junto con forraje y semillas oleaginosas. Los cultivos de *B. napus* L. se utilizan generalmente como semillas oleaginosas (canola), pero también integra algunos forrajes y vegetales. Por último, el grupo de la mostaza que está formado por tres especies, *B. carinata* L. (mostaza etíope), *B. nigra* L. (mostaza negra) y *B. juncea* L. (mostaza castaña)(Cartea *et al.*, 2011).

### 1.2.2 Taxonomía

La familia Brassicaceae está compuesta por aproximadamente 50 tribus, 332 géneros y 3.000 especies, distribuidas en todo el mundo. La tribu Brassiceae está integrada por 48 géneros, incluyendo el género *Brassica*, este cuenta con alrededor de 313 especies (USDA, 2022). Existieron dificultades taxonómicas al usar solamente características morfológicas para clasificar las numerosas y variadas formas de las especies de *Brassica* de interés agroeconómico. La primera aproximación a la solución del problema fue la diferenciación sobre la base del número cromosómico, logrando reducir su clasificación a un número limitado de especies botánicas, aunque igualmente, dentro de cada especie hay frecuentemente formas diferenciables. Actualmente, las técnicas genéticas avanzadas y las investigaciones químicas han logrado mejorar las relaciones taxonómicas, pero aún existen ciertos desacuerdos (OECD, 2016).

Clasificación taxonómica del género de interés *Brassica*:

Reino Plantae

Phylum Tracheophyta

Clase Magnoliopsida

Orden Brassicales

Familia Brassicaceae

Tribu Brassiceae

Género *Brassica* L.

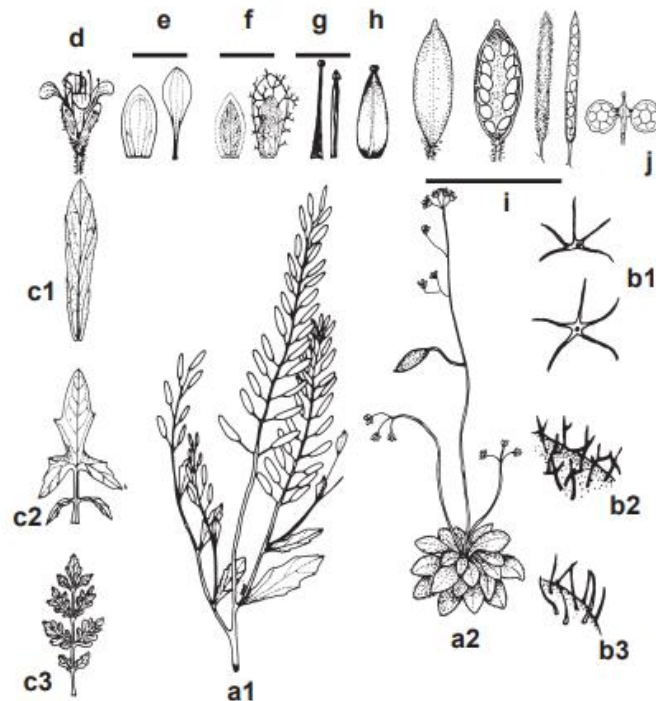
### 1.2.3 Morfología de la familia Brassicaceae

La familia incluye plantas anuales, bianuales o perennes, herbáceas, a veces subarborescentes o rara vez arbustos; pueden ser glabras o pubescentes con tricomas variados (Fig. 8). La raíz axonomorfa poco a muy ramificada, cáudice delgado o leñoso, a veces con rizomas tuberosos, raramente estoloníferos; terrestres o rara vez acuáticas sumergidas, con líquido acuoso urticante, papilas o nódulos glandulares multicelulares ausentes o rara vez presentes; tricomas unicelulares, simples, pedunculados o sésiles, bifurcados, estrellados, dendríticos o malpigiáceos (mediifijos, bífidios, adpresos), rara vez peltados o escumiformes. Los tallos son erectos, ascendentes o prostrados, típicamente herbáceos, algunas veces sufrutescentes o rara vez leñosos, con hojas o áfilos, a veces poco desarrollados. Las hojas están a menudo en una roseta basal, y las hojas del tallo (cuando están presentes) son alternas o raramente opuestas. Estas son simples o raramente compuestas y sin estípulas. Las flores son radialmente simétricas y agrupadas en racimos o, a veces, solitarias en pedicelos que se originan en las rosetas basales. Por lo general son bisexuales, las flores unisexuales son muy raras. Los cuatro sépalos son libres o rara vez unidos, y se alternan con cuatro pétalos que forman una corola crucífera, de ahí el nombre antiguo de la familia Cruciferae, actualmente denominado Brassicaceae. Presentan cuatro pétalos, alternisépalos; blancos, amarillos, rojos, lilas o púrpuras, en ocasiones están reducidos o ausentes. Exhiben seis estambres, dispuestos en dos ciclos; tetradínamos, filamentos filiformes, cilíndricos o aplanados hacia la base; anteras con inserción dorsifija, bilobadas, a veces con el conectivo alargado. Las glándulas nectaríferas siempre están presentes, son altamente variables en número, forma, tamaño y disposición alrededor de los filamentos, siempre opuestas a la base de los filamentos laterales. Los frutos son de morfología muy variada, son típicamente cápsulas alargadas, a menudo se las denominan silículas (frutas menos de tres veces más largas que anchas) o silicua (frutas tres o más veces más largas que anchas), pero también se encuentran frutas indehiscentes, esquizocarpías, aladas o segmentadas. Las semillas son de color variables; presentan una superficie lisa o

diversamente reticulada; el embrión es aceitoso, ocupa las semillas enteras y está fuertemente curvado o doblado de forma diversa. La curvatura de la radícula (raíz embrionaria) en relación con los cotiledones es importante taxonómicamente. La información descrita se recolectó desde trabajos previos (Dixon, 2007; Monsalve & Cano, 2003; OECD, 2016).

#### 1.2.4 Género *Brassica* L.

Este género se destaca por incluir muchas de las especies cultivadas de gran importancia para agricultura y horticultura. Presenta más de 313 especies, incluyendo a *B. rapa* L. var. *glabra* Regel (antiguamente *B. rapa* subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt), conocida comúnmente como col china, repollo chino o akusai (Kim *et al.*, 2017); *B. rapa* L. ssp. *chinensis* (L.) Hanelt denominada tradicionalmente como pak choi; *B. oleracea* L. var. *capitata* (L.) Metzg donde se encuentra el brócoli, repollo blanco y morado, entre otras (OECD, 2016).



Fuente: Monsalve & Cano (2003).

**Figura 8:** Características generales de la familia Brassicaceae. a) Hábito: a1. sufrutescente, a2. cepitoso, b) Tricomas: b1. estrellados, b2. bifurcados, b3. simples, c) Hojas: c1. simples, c2. pinnatisecta, c3. bipinnatífida, d) flor tretrámera, e) pétalos, f) sépalos, g) estambres, h) gineceo, i) silicua, j) silículas. Imagen obtenida de.

##### 1.2.4.1 *Brassica rapa* L. var. *glabra* Regel

El akusai es utilizado principalmente en los países de Asia, aunque en los últimos tiempos su consumo aumentó de forma gradual en occidente (Garbi, 2016). Es una

planta anual y herbácea, presenta hojas enteras (pubescentes cuando son pequeñas), alargadas e irregularmente dentadas, con nervaduras muy marcadas y limbo que se prolonga en forma de ala hasta la base del pecíolo, que es ancho y blanquecino. Las hojas externas son verdes, de distinta intensidad y brillo según el cultivar, y las internas, arrolladas, de color verde muy claro, tornándose casi blancas hacia el centro (Fig. 9). Presenta una inflorescencia racimosa con flores amarillas, hermafroditas y su fruto es una silicua dehiscente con una variable cantidad de semillas, generalmente mayor a cinco. El repollo chino se destaca por su composición rica en fibras, vitaminas y minerales, convirtiéndose en el principal componente de las dietas equilibradas en todo el mundo. En Corea, este vegetal es utilizado para realizar el kimchi, pero cada vez más consumidores lo eligen por su apariencia, sabor y textura. Las hojas verdes externas se utilizan en sopas, mientras que las interiores amarillentas se usan para acompañar los platos de cerdo, res, pollo y mariscos asados (OECD, 2016).

La especie tolera diversas temperaturas desde 10 a 25 °C, las temperaturas bajas menores a 10 °C generan la emisión del tallo floral. Se adapta a un amplio rango de suelos, desde arenosos a arcillosos, prefiriendo los de buena estructura, bien drenados y ricos en materia orgánica. Crece muy bien con un rango de pH entre 5,5 a 7,0. Por último, con respecto a la salinidad, el akusai es una planta moderadamente sensible, tolerando valores límites de conductividad eléctrica de 1,8 dS/m (Garbi, 2016).



**Figura 9:** *B. rapa* L. var. *glabra* Regel, nombre común akusai o repollo chino.

#### 1.2.4.2 *B. rapa* L. ssp. *chinensis* (L.) Hanelt

Este vegetal es originario del extremo oriente, se cultiva en China desde hace más de 1.500 años; es comúnmente denominado pak choi, bok choi o acelga china. Posee un elevado contenido de vitaminas y fibras, con bajo nivel calórico (USDA, 2019).

La planta se caracteriza por no formar cabeza, su aspecto es similar a la acelga (Fig. 10). Presenta hojas grandes, oblongas y de bordes lisos; los pecíolos son carnosos de base ensanchada, alcanzando entre 20 a 25 cm de longitud. Las flores son actinomorfas de 1,5 cm de diámetro, amarillas, hermafroditas y con cuatro pétalos libres en forma de cruz (característico de la familia). Las hojas son suaves y pueden usarse hervidas, en sopas, tartas o salteadas. Las pencas son crocantes, jugosas; cuando son largas y angostas se utilizan en salteados. Los corazones del pak choi, conocidos como bok sum, son dulces y pueden consumirse hervidos o cocinados al vapor (Garbi, 2016).

El pak choi requiere para su crecimiento temperaturas medias entre 12 a 21 °C, las temperaturas interiores a 12 °C prolongadas pueden provocar la floración prematura. El cultivo se adapta a una amplia gama de suelos, desde arenosos a arcillosos. Sin embargo, son preferibles suelos bien drenados con alto contenido de materia orgánica y con un pH de 6,5 a 7,0 (Garbi, 2016).



**Figura 10:** *B. rapa* L. ssp. *chinensis* (L.) Hanelt, nombre común pak choi.

#### 1.2.4.3 *B. oleracea* L. ssp. *capitata* (L.) Metzg

Es una planta perenne cultivada como anual, de tallo corto y raíz pivotante, profunda y gruesa pero no dominante. El sistema radical es ramificado y superficial, encontrándose el 80% de las raíces entre los 5 y 30 cm de profundidad. Las hojas sésiles o cortamente pecioladas pueden ser de color verde claro y lisas, como ocurre en el repollo blanco, rojizas o de color púrpura y lisas en el repollo colorado, y verde oscuras, abolladas, en el repollo crespo. Las hojas se cubren parcialmente abrazándose unas a otras formando una "cabeza" compacta que constituye la parte comestible; su forma es variable según el cultivar (Fig. 11). El fruto es una silicua; la semilla es redonda o algo angulosa, de color castaño-rojizo o negruzco. En el primer año de crecimiento produce una cabeza densa y terminal de hojas bien envueltas en un tallo corto y robusto. Mientras que, en el

segundo año, la cabeza se abre y el tallo floreciente crece alcanzando 1,5-2 m de altura (OECD, 2016).



**Figura 11:** *B. oleracea* L. ssp. *capitata* (L.) Metzg. a) repollo blanco, b) colorado/morado c) crespo.

La temperatura óptima para su crecimiento es entre los 15 a 20 °C. Se clasifica como un cultivo de época fría y la humedad ambiental lo beneficia. Las plantas cuando se exponen al frío durante un tiempo prolongado inducen a la producción temprana de flores y semillas. El repollo es moderadamente tolerante a la salinidad (hasta 4 dS/m) y a la acidez del suelo, con un pH óptimo entre 6,0 y 6,8 (Fornaris Rullán, 2014).

#### 1.2.5 Efectos beneficiosos de los vegetales *Brassica* en la salud humana

Estos vegetales son ampliamente investigados por sus propiedades nutricionales y antioxidantes, las cuales promueven la salud. Se caracterizan por presentar compuestos fenólicos, vitaminas, ácido fítico, fibra, carbohidratos, glucosinolatos, minerales, polifenoles, grasas y carotenoides (Manchali *et al.*, 2011). Investigaciones recientes apuntan a identificar fitoquímicos con actividad biológica en los alimentos y conocer su efecto beneficioso para la salud humana. Los fitoquímicos presentes en los vegetales *Brassica* pueden actuar en niveles complementarios; logrando prevenir el estrés oxidativo, inducir enzimas de desintoxicación, estimular el sistema inmunológico y disminuir el riesgo de cáncer (Boivin *et al.*, 2009; Herr & Büchler, 2010; Kestwal *et al.*, 2011; M. Kim & Park, 2009).

El estrés oxidativo puede ser causado por una deficiencia de antioxidantes en las dietas o una mayor producción de radicales libres por el estrés, el tabaquismo, o por las contaminaciones ambientales, que se trasladan al agua y a los alimentos (metales pesados, nitratos, nitritos, pesticidas, etc.), es decir, por un desbalance entre las especies reactivas de oxígeno (ROS, por su sigla en inglés) y los antioxidantes. Las

ROS en el organismo pueden causar la oxidación de lípidos y proteínas, alteración de bases nucleotídicas y de la modulación de la expresión génica (Lee *et al.*, 2004). Como consecuencia aumenta el riesgo de presentar numerosas enfermedades crónicas tales como cáncer, arterosclerosis, desórdenes metabólicos (diabetes), asma y Alzheimer (Wplyw *et al.*, 2012). Investigaciones previas demuestran los beneficios de las brasicáceas para reducir la probabilidad de presentar estos tipos de enfermedades crónicas, mencionadas anteriormente. Entre los desórdenes metabólicos, diversos trabajos sugieren que una dieta rica en isotiocinatos se asocia con una incidencia reducida de diabetes tipo II (van Dam *et al.*, 2002; Villegas *et al.*, 2008). La enfermedad de Alzheimer y el asma están asociadas con el estrés oxidativo y se ha demostrado que los compuestos bioactivos de estos vegetales pueden prevenirlos (Ahmad *et al.*, 2012; Butterfield *et al.*, 2001). Una investigación clínica sugiere que una mayor ingesta de estos vegetales también se asocia con una tasa más lenta de deterioro cognitivo en la edad avanzada (Morris *et al.*, 2006). Por otro lado, diferentes tipos de extractos de este grupo de vegetales han mostrado un mayor efecto antimicrobiano contra bacterias patógenas Gram negativas tales como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* y *Shigella sonnei*, comparado con organismos Gram positivos (Hu *et al.*, 2004).

## 1.2.6 Moléculas bioactivas

### 1.2.6.1 Compuestos nutricionales

Los componentes nutricionales presentes en este grupo de vegetales son las proteínas, carbohidratos y vitaminas (ácido ascórbico, ácido fólico, tocoferoles y provitamina A). El contenido de proteínas en estos vegetales es de 1,0% a 3,0% en relación con el peso fresco (PF); también presentan diversas fuentes de carbohidratos, que van de un rango de 0,3% a 10%. Su bajo contenido de grasas (menos del 1,0%) los convierte en un componente importante de una dieta baja en grasas y amigable para el corazón. La composición nutricional de los vegetales *Brassica*, comúnmente más consumidos, se observa en la Tabla 4. Estos vegetales también son fuente de vitamina C, donde el repollo morado se destaca con 57 mg/100g de PF (USDA, 2019), pero el brócoli NS-50 lo supera conteniendo 82 mg/100 g de PF (Singh *et al.*, 2007).

**Tabla 4:** Principales componentes nutricionales de especies brasicáceas más consumidas.

<b>Vegetales</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Fibras</b>	<b>Grasas</b>	<b>Carbohidratos</b>
<b><i>Brassica</i></b>	<b>(g/100 g PF)</b>			
Rúcula	2,58	1,60	0,66	3,65
Pak Choi	1,50	1,00	0,20	2,18
Brócoli	2,82	30,40 <sup>a</sup>	0,37	6,64
Repollitos de Bruselas	2,55	26,94 <sup>a</sup>	0,51	8,67
Repollo blanco	1,53	2,50	0,09	5,80
Repollo colorado	0,97	2,10	0,16	7,37
Coliflor	29,9 <sup>a</sup>	26,70 <sup>a</sup>	0,45 <sup>b</sup>	4,11 <sup>b</sup>
Akusai	1,20	1,20	0,20	3,23
Berza	3,00	4,60	0,40	7,10
Nabo Daikon	<2,00	<2,00	0	4,00
Kale	3,28	1,94	0,74	10,00
Colinabo	1,70	3,62	0,07	6,22
Rábano	0,68	37,40 <sup>a</sup>	0,08	3,45
Nabos	0,90	1,76	0,10	6,43
Berros	3,00	1,50	1,00	0,35

<sup>a</sup> Peso seco; <sup>b</sup> hervido. PF: peso fresco

Fuente: Manchali *et al.* (2011), USDA (2019), <http://www.nutritiondata.com/facts>.

Los vegetales *Brassica* contienen diversos minerales esenciales, dentro de los macroelementos se encuentra el calcio, fósforo, magnesio, sodio y potasio; y entre los micronutrientes el cobre, manganeso, hierro, selenio y zinc (Tabla 5).

Se ha descrito que las verduras de hoja verde intenso aportan una gran cantidad de calcio en la dieta. Sin embargo, se considera que su nivel de absorción es bajo en comparación con el calcio proveniente de la leche, debido a la presencia de oxalatos y taninos que ligan el calcio de origen vegetal e impiden su adecuada absorción (Heaney & Weaver, 1990).

**Tabla 5:** Macro y micronutrientes presentes en los principales brasicáceas.

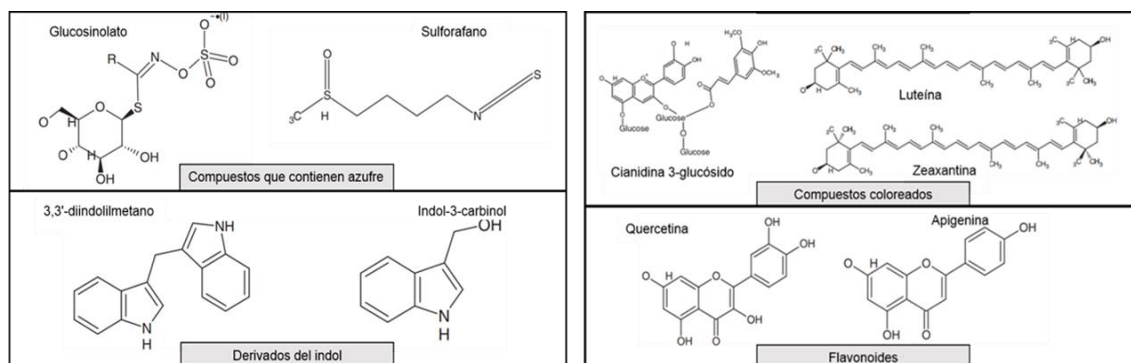
Vegetales	Macronutrientes (mg/g de PF)					Micronutrientes (µg/g de PF)				
	P	K	Mg	Na	Ca	Fe	Se	Cu	Mn	Zn
<b>Brassica</b>										
Rúcula	0,50	3,70	0,45	0,25	1,60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pak Choi	0,37	2,50	0,19	0,92	1,06	8,00	-	-	1,42	1,00
Brócoli	0,66	3,17	0,21	0,33	0,47	7,70	0,025	-	2,20	4,40
Repollitos de Bruselas	0,69	3,89	0,23	0,25	0,42	14,0	0,016	1,10	3,40	4,50
Repollo	0,23	2,46	0,15	0,18	0,47	5,60	0,009	0,22	1,50	1,70
Coliflor <sup>a</sup>	0,44	3,03	0,15	0,30	0,22	4,00	0,006	-	2,00	0,30
Akusai	0,37	2,51	0,19	0,65	1,05	8,50	0,004	-	1,40	1,40
Rábano	0,23	2,27	0,16	0,21	0,27	4,10	0,007	1,20	0,30	1,50
Kale	0,56	4,46	0,34	0,43	1,35	16,0	0,009	3,00	7,50	0,45
Colinabo	0,46	3,34	0,19	0,20	0,24	3,70	0,007	1,50	1,50	0
Nabos	0,42	2,96	0,31	0,40	1,90	10,0	0,013	3,60	5,40	1,80
Berros	0,60	3,30	0,20	0,40	1,20	3,00	0,009	0	3,00	0

Nota: "- "dato ausente, n.d. niveles no detectables; <sup>a</sup> contiene 0,001 µg/g de fluoruro. PF: peso fresco.

Fuente: Manchali *et al.* (2011), <http://www.nutritiondata.com/facts>.

### 1.2.6.2 Metabolitos secundarios

En este grupo de vegetales, los compuestos que contienen nitrógeno constituyen la principal clase de metabolitos secundarios; mientras que los glucosinolatos y el sulfóxido de S-metilcisteína que presentan azufre son considerados los de mayor importancia. Se debe tener en consideración los compuestos coloreados biológicamente activos, representados por los flavonoides, antocianinas y carotenoides. Los polifenoles, las cumarinas, las enzimas antioxidantes terapéuticas y los terpenos constituyen los principales compuestos beneficiosos para la salud. Las estructuras químicas de los compuestos biológicamente representativos de los vegetales *Brassica* se encuentran en la Fig. 12.

**Figura 12:** Estructura química de compuestos biológicamente activos de las brasicáceas.

Fuente: modificada desde Manchali *et al.* (2011).

### 1.2.6.3 *Glucosinolatos*

Los glucosinolatos se generan a partir de la biosíntesis de aminoácidos y están relacionados con la defensa de las plantas frente a enfermedades. Más de 120 glucosinolatos y precursores de isotiocianatos han sido identificados, principalmente en especies pertenecientes a Brassicaceae (Hirai *et al.*, 2007). Son destacados por su carácter fungicida, bactericida, nematocida y sus propiedades alelopáticas (Moreno *et al.*, 2006); recientemente están ganando popularidad como agentes quimiopreventivos y quimioterapéuticos para el cáncer (Keck & Finley, 2004). En los vegetales *Brassica*, las principales clases de estos compuestos son clasificado como glucosinolatos alifáticos, x-metilalquilo, aromáticos y heterocíclicos (Fahey *et al.*, 2001).

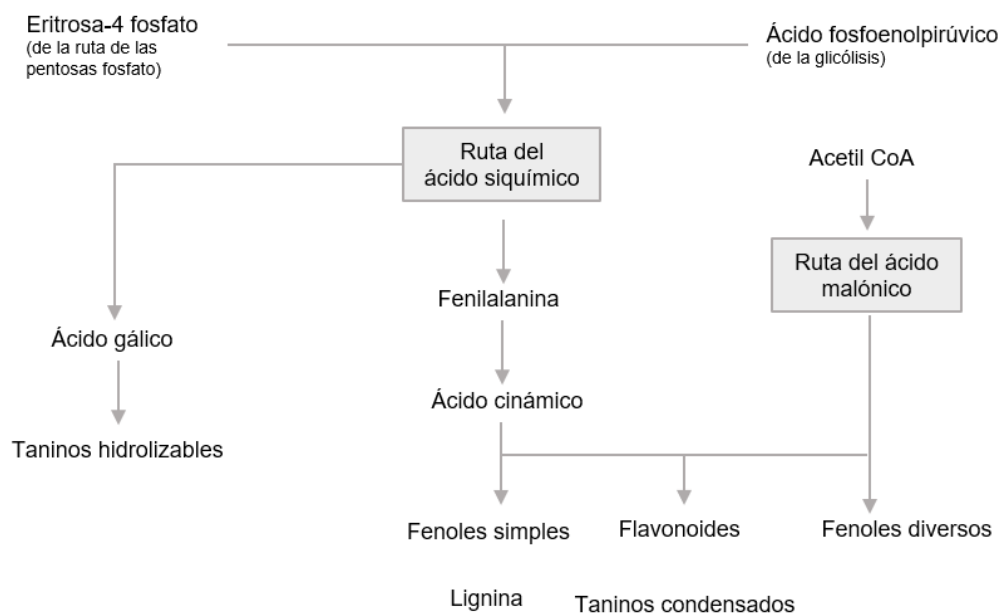
La enzima mirosinasa, que se libera con el glucosilato tras una lesión, convierte estos compuestos en isotiocianatos. La flora intestinal humana también puede realizar esta transformación, quedando los isotiocianatos disponibles en el suero para la actividad biológica (Shahidi *et al.*, 1990). La rápida naturaleza reactiva de los isotiocianatos es responsable de su interacción con las enzimas específicas para desintoxicar los carcinógenos. El metabolismo de los carcinógenos y la aceleración de su excreción son los mecanismos principales por el cual los compuestos de azufre pueden prevenir el cáncer (Zhang & Talalay, 1994). Sin embargo, estos compuestos presentan tanto efectos positivos (propiedades anticancerígenas) como negativos, siendo las reacciones toxicológicas un ejemplo. Los efectos de productos específicos de degradación de glucosinolatos en organismos individuales varían y no siempre se conocen. Si se consume en cantidad excesiva, muchos de los derivados pueden ser altamente tóxicos (Brown & Morra, 2005).

### 1.2.6.4 *Compuestos fenólicos*

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, desempeñan diversas funciones biológicas y actúan como agentes reductores, contribuyendo a mejorar la salud. Los tipos de compuestos y cantidades varían según la especie, variedad del vegetal, órgano de la planta, grado de madurez, condiciones del cultivo y del almacenamiento (Knaggs, 2003).

Los compuestos fenólicos presentan un anillo de benceno hidroxilado común en sus estructuras moleculares, las cuales pueden incluir grupos funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. (Duthie & Crozier, 2000). Estos tipos de compuestos son solubles en agua y son sintetizados en el cloroplasto o citoplasma de la célula, y posteriormente glicosilados y transportados a vacuolas donde son almacenados. La mayor parte de los compuestos fenólicos de las plantas tienen como origen metabólico

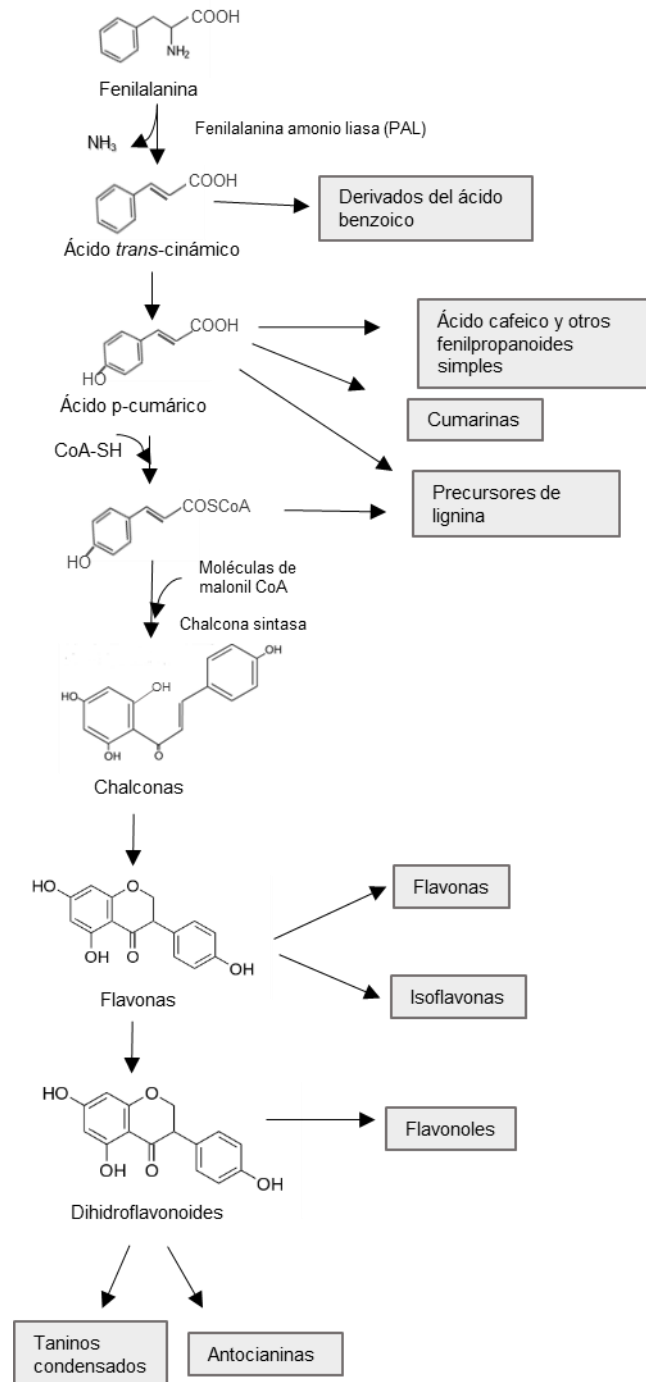
común la ruta del ácido malónico y del ácido siquímico (Robards *et al.*, 1999). La ruta del ácido malónico es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores. Mientras que, la segunda vía es la más frecuente, es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas. A partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido siquímico y, derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) (Fig. 13).



Fuente: modificada desde Ávalos García & Pérez Urria Carril (2009).

**Figura 13:** Rutas de síntesis de compuestos fenólicos.

La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina, la cual se convierte en ácido cinámico, mediante la eliminación de un amonio, por la acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). La PAL es inducida por una situación de estrés (deshidratación, infecciones, radiación UV, frío, microorganismos, etc.). Luego que la PAL cataliza la primera reacción, la síntesis de fenoles se inicia, diversos grupos hidroxilo y otros sustituyentes empiezan a adicionarse a la molécula, promoviendo la formación de diversos compuestos fenólicos (Fig. 14).



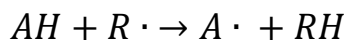
Fuente: modificado desde Ávalos García & Pérez-Urria Carril (2009).

**Figura 14:** Ruta del ácido siquímico: desaminación de fenilalanina y formación de ácidos cinámico y cumárico, flaonas, isoflavonas y flavonoides.

Este grupo de vegetales se caracteriza por presentar una elevada capacidad antioxidante (Ninfali & Bacchiocca, 2003) debido a la presencia de taninos, ácido fenólico, antocianinas, flavonolas, cumarinas y flavonas (Heimler *et al.*, 2006).

Por lo tanto, uno de los principales atributos que confieren los compuestos fenólicos es que tienen la capacidad de actuar como antioxidantes debido a su estructura. Un

antioxidante (AH) es definido como cualquier sustancia que a bajas concentraciones, con respecto al sustrato oxidable, retrasa o inhibe la oxidación de ese sustrato, es decir, la oxidación de radicales libres ( $R\cdot$ ), generando radicales estables ( $A\cdot$ ) (Apak *et al.*, 2007).



La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se atribuye a su facilidad para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático o un radical libre y a la posibilidad de deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático. Además, presentan una estructura química ideal para captar iones metálicos (principalmente hierro y cobre), logrando inhibir la formación de radicales libres (Duthie, Gardner, & Kyle, 2003).

-Los *flavonoides* son uno de los grupos fenólicos más comunes y ampliamente distribuidos en los vegetales, su principal característica se les atribuye a sus dos anillos aromáticos bencénicos que se unen por un puente de tres átomos de carbono (C6-C3-C6). Estos compuestos se pueden clasificar en distintos grupos dependiendo el nivel de oxidación del anillo central (C3), los principales son: flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonoles y antocianinas (Berlin, 1997). Estos tipos de compuestos presentan interesantes actividades biológicas, las cuales son utilizadas en numerosos tratamientos médicos (Caporale, 1995) relacionados con la prevención del cáncer (Herr & Büchler, 2010) y protección al sistema cardiovascular, incluyendo la inhibición del daño oxidativo (Williams *et al.*, 2004). Sin embargo, elevadas dosis de flavonoides pueden actuar como mutágenos, pro-oxidativos generando radicales libres, y como inhibidores de enzimas claves involucradas en el metabolismo hormonal (Siqueira *et al.*, 1991).

Las propiedades farmacológicas y beneficiosas de los flavonoides son aportados por su actividad antioxidante, exhibida por diversas rutas: i) actividad de secuestro de radicales libres, por medio de transferencia de átomos de hidrógeno o por donación de electrones, de diversas especies reactivas al oxígeno (ROS) ( $\cdot OH$  radical hidroxilo,  $O_2^{\cdot -}$  radical superóxido y  $^1O_2$  oxígeno singlete) o aquellas provenientes de la peroxidación de los lipídicos ( $RO\cdot$  alcoxilo y  $ROO\cdot$  peróxilo); ii) actividad quelante de metales (reacciones de tipo Fenton); iii) interacción con otros compuestos antioxidantes, favoreciendo su disponibilidad en microambiente (Apak *et al.*, 2007).

-Las *antocianinas* son compuestos fenólicos que pertenecen a la familia de los flavonoides y forman parte del metabolismo secundario. Su nombre deriva del griego anthos = flor y kianos = azul, son responsables de la gama de colores que abarcan

desde el rojo hasta el azul en varias frutas, vegetales y cereales. Estos pigmentos son los más importantes de las plantas vasculares, se caracterizan por ser hidrosolubles y estar ampliamente distribuidos en la naturaleza (Pazmiño-Durán *et al.*, 2001). Se conocen alrededor de 500 antocianinas diferentes y 23 antocianidinas (Andersen & Jordheim, 2006). Cumplen importantes funciones biológicas en las plantas, como protección frente al estrés biótico y abiótico, atraen a insectos para la polinización y dispersión de semillas.

Estos compuestos están presentes en diferentes órganos de las plantas, tales como frutas, flores, tallos, hojas y raíces. Estos pigmentos se encuentran disueltos uniformemente en la solución vacuolar de células epidérmicas. Sin embargo, en otras especies, se encuentran distribuidas en regiones discretas, llamadas antocianoplastos. Dependiendo el tipo de planta, las antocianinas pueden constituir una gran parte del contenido total de fenoles. Los vegetales *Brassica* presentan una gran variedad de antocianinas, un ejemplo es el repollo morado con más de 15 tipos diferentes (Dyrby *et al.*, 2001). Las antocianidinas son la estructura básica de las antocianinas. Consiste en un anillo aromático, unido a un anillo heterocíclico que contiene oxígeno, el cual está unido por un enlace carbono-carbono a un tercer anillo aromático. Cuando las antocianidinas se encuentran en su forma glucosilada, es decir, están unidas a una fracción de un carbohidrato a través de un enlace  $\beta$ -glucosídico, son llamadas antocianinas (Konczac & Zhang, 2004). Las diferencias entre las antocianinas son producidas tanto por el número de grupos hidroxilo en la molécula, el grado de metilación de estos grupos hidroxilo, la naturaleza y el número de azúcares unidas a la molécula, como por los grupos alifáticos y ácidos aromáticos.

Las antocianinas pueden llegar a ser potentes antioxidantes debido a su alto poder reductor, al capturar radicales libres por donación de átomos de hidrógeno fenólicos, previniendo la muerte celular, por lo que están consideradas como protectoras en las plantas de los daños producidos por especies reactivas de oxígeno (Bell & Gochenaur, 2006). No obstante, la actividad antioxidante disminuye cuando la molécula de la antocianidina posee sustituyentes glucosilados, específicamente en el carbono tres (De Lima *et al.*, 2007).

En la actualidad el interés en los pigmentos antociánicos se ha intensificado debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. Anteriormente se pensaba que las antocianinas no eran absorbidas en humanos en su forma glucosilada. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que estos compuestos son absorbidos en el estómago y en el intestino delgado (He & Giusti, 2010), cumpliendo un papel importante

en la salud, ya que actúan como antiinflamatorios, anticancerígenos, antitumorales y antidiabéticos, previniendo enfermedades como cardiovasculares y neurológicas (Garzón, 2008).

-Los ácidos fenólicos corresponden a las moléculas más sencillas de los compuestos fenólicos, están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Los ácidos fenólicos más predominantes incluyen los ácidos hidroxibenzoicos (ej. ácido gálico, ácido *p*-hidrobenzoico, ácido valínico, ácido siríngico y ácido protocatecuico) y los ácidos hidroxicinámicos (ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido *p*-cumárico y ácido sinápico) (Cai *et al.*, 2006). Los derivados del ácido sinápico son los principales ácidos fenólicos presentes en los vegetales *Brassica*, como repollo, akusai y brócoli (Mattila & Kumpulainen, 2002), además se ha identificado el ácido cafeico, el ácido *p*-cumárico y ácidos ferúlicos (Huang *et al.*, 1986). El repollo morado tiene aproximadamente seis veces más de ácidos fenólicos que el repollo blanco (S. Park *et al.*, 2014); y ambos presentan un mayor incremento en las hojas externas por causa de la incidencia de la luz y rayos UV (estrés) (Huang *et al.*, 1986).

-Los taninos son compuestos polifenólicos naturales y solubles en agua. Los taninos hidrolizables se pueden degradar en azúcares y ácidos fenólicos a través de cambios de pH, hidrólisis enzimática o no enzimática. Mientras que los taninos condensados son estructuralmente más complejos y se extienden más ampliamente entre las plantas que los taninos hidrolizables (Huang *et al.*, 2009). En los vegetales de la familia Brassicaceae, se han reportado diferentes cantidades y variedades de taninos (Heimler *et al.*, 2006). Estos compuestos condensados pueden disminuir la disponibilidad de aminoácidos esenciales, y pueden formar complejos con minerales esenciales, proteínas y carbohidratos (Shahidi, 1997), generando efectos negativos tanto en la digestión como la nutrición (McSweeney *et al.*, 2005). Sin embargo, actualmente se conocen los beneficios para la salud de los taninos hidrolizables, al poseer un núcleo glucídico (generalmente glucosa), son más susceptibles a hidrólisis en condiciones fisiológicas permitiendo la liberación gradual de sus componentes primarios (Larrosa *et al.*, 2012). Esta clase de taninos presenta una significativa capacidad antioxidante que confiere protección frente a radicales libres. Los elagitaninos, se caracterizan por su capacidad funcional frente al riesgo cardiovascular, su capacidad vasodilatadora, antiinflamatoria, bactericida, hipolipidémica e hipoglicémica (Funatogawa *et al.*, 2004). Los galitaninos presentan efectos benéficos en la prevención y tratamientos de distintas formas de cáncer (Urueña *et al.*, 2013). Las diversas funciones biológicas asociadas a los tánicos hidrolizables dependen en gran medida de su diversidad estructural, ya que

de esto depende las interacciones que ocurran, su absorción, metabolismo y potencial bioactivo (Olivas-Aguirre *et al.*, 2015).

-Las cumarinas son una amplia familia de lactonas, más de 1.500 identificadas en más de 800 especies de plantas; se pueden encontrar en los distintos órganos de los vegetales (Keating & O'Kennedy, 1997). Estos tipos de metabolitos secundarios son sintetizados a partir de la fenilalanina a través del ácido siquímico; actúan como agentes antimicrobianos e inhibidores de la germinación (Dewick, 2001). La cumarina puede ser moderadamente tóxica para el hígado y los riñones, el nivel máximo permitido para alimentos y bebidas es de 2 mg/kg. Sin embargo, se estima que la exposición humana a la dieta de las cumarinas es de aproximadamente 0,02 mg/kg/día (Lake, 1999). A pesar de sus efectos negativos, estos compuestos han mostrado ejercer diversas actividades biológicas: antioxidante, antituberculoso, antipalúdico, anti-VIH-1, antimutagénico, antiinflamatorio, inductor de diferenciación celular, inhibidor de la xantina oxidasa y citotoxicidad contra líneas celulares de cáncer humano (Huang *et al.*, 2009).

### 1.3 *Undaria pinnatifida*

#### 1.3.1 Taxonomía del alga *U. pinnatifida*

Las algas son un grupo diverso de organismos fotosintéticos que habitan el mar, el agua dulce y salobre. Cada especie se agrupa de acuerdo con su tamaño, estructura celular, morfología, pigmentos, polisacáridos, ecología y hábitat en el que se desarrollan. Actualmente se han clasificado aproximadamente 36.000 especies conocidas de algas, pero sólo representa aproximadamente el 17% del total (Chopin & Sawhney, 2009). Esto destaca la falta de conocimiento que existe sobre las algas, a pesar del importante papel que juegan en el mundo.

La especie *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar pertenece a la clase Phaeophyceae por su pigmentación. Es un alga de color pardo debido a la presencia de una xantófila, la fucoxantina pigmento que la protege de la luz del sol, y que enmascara el color de las clorofilas a y c, de los  $\beta$ -carotenos y de otras xantófilas (Epstein & Smale, 2017). Presenta polisacáridos como sustancia de reserva, siendo el principal la laminarina, careciendo por completo de almidón. Las paredes están constituidas por celulosa, sales sulfatadas y ácido algínico; estos compuestos le dan resistencia y flexibilidad al alga, ayudándole a resistir las tensiones provocadas por las olas y las corrientes marinas (Casas, 2005; Casas & Schwindt, 2008). *Undaria* se integra como especie acompañante en los bosques de las diversas laminariales (también denominadas kelps) que se desarrollan en profundidad, así como también sobre sustratos más arenosos junto a otras especies de algas (Chopin & Sawhney, 2009).

Su clasificación taxonómica es la siguiente (Guiry & Guiry, 2022):

Reino: Chromista

Filo: Ochrophyta

Clase: Phaeophyceae

Orden: Laminariales

Familia: Alariaceae

Género: *Undaria*

Especie: *U. pinnatifida* (Harvey) Suringar 1873

#### 1.3.2 Características generales del alga

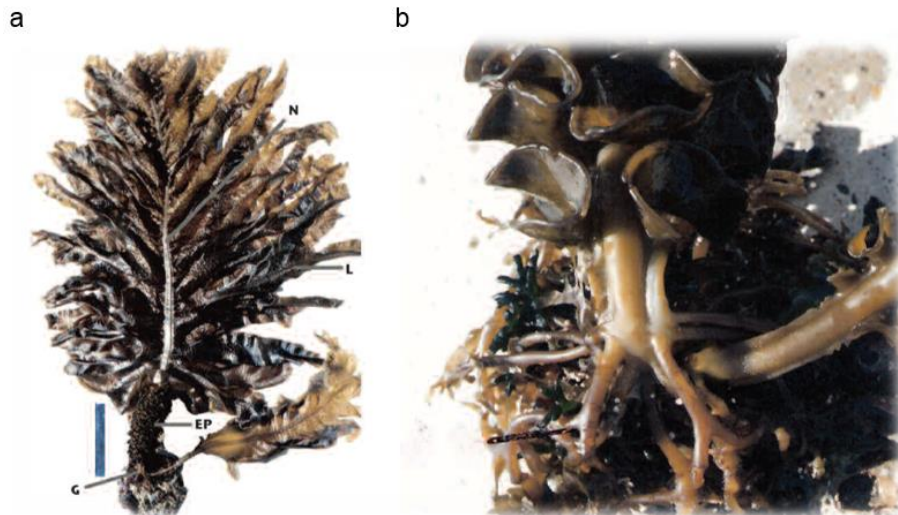
*U. pinnatifida* es un alga laminaria de color pardo oliváceo, autóctona de las regiones templadas de Japón, China y Corea (Saito, 1975). Es utilizada hace mucho tiempo por

la cultura oriental para consumo humano, uno de los platos típicos es el wakame pero también se usa en sopas de miso, sushi y ensaladas (Casas & Schwindt, 2008). Esta alga se considera una fuente de calcio, hierro, proteínas, yodo, magnesio y zinc. Además, muestra actividad antioxidante, propiedades antivirales, propiedades anti-obesidad y actividad anticancerígena (Bocanegra *et al.*, 2009).

*U. pinnatifida* es un alga oportunista con la capacidad colonizar sustratos naturales y artificiales, desde arrecifes rocosos hasta botellas de plástico y cuerdas (Forrest *et al.*, 2000). Puede tolerar desde cantidades muy bajas hasta cantidades extremadamente altas de luz solar, pero enfrenta dificultades para crecer en áreas con una gran entrada de agua dulce (Casas & Schwindt, 2008). Esta especie invasora, ha sido introducida tanto accidental como intencionalmente en las distintas regiones del mundo, colonizando 12 países de 4 continentes (Epstein & Smale, 2017). La facilidad de dispersión de *Undaria* por el mundo podría deberse a la capacidad de latencia que poseen sus estructuras reproductivas microscópicas, las cuales pueden permanecer en ese estado por varios meses (Casas & Schwindt, 2008).

### 1.3.3 Morfología

*U. pinnatifida* puede alcanzar 1 o 2, inclusive 3 m al ser un ejemplar maduro, se adhiere al fondo marino mediante una firme estructura de fijación que se denomina grampón, de la que parte un eje aplanado (estipe) que se proyecta como una gruesa nervadura en la zona central de la lámina. La longitud del estipe, en algunas áreas introducidas, es aproximadamente del 10% al 50% de la longitud total (Castric-Fey *et al.*, 1999; Stuart *et al.*, 1999). La lámina es pinnada, puede alcanzar un ancho de 50-80 cm, con una nervadura central evidente en todo su recorrido de 1-3 cm de grosor. Sin embargo, las algas jóvenes (<5-10 cm de largo) carecen de esta última estructura (Okamura, 1926). Cuando los individuos están reproductivamente maduros, desarrollan una estructura muy ondulada, entre el grampón y la base de la lámina llamada esporofilo que es característica de esta especie, donde se encuentran los soros zoosporangiales (Saito, 1975) (Fig. 15). Esta estructura puede alcanzar los 12 cm de ancho, es de color marrón amarillento a marrón, membranosa a coriácea, que se vuelve verde oliva al secarse (Castric-Fey *et al.*, 1999). Estas algas presentan su mayor tamaño al finalizar el invierno y al comienzo de la primavera. En la próxima estación, verano, la lámina es deteriorada y decolorada debido a las altas temperaturas del agua de mar, lo que, sumado al fuerte oleaje producido por los vientos y las corrientes marinas, hace que sean arrancadas y arrojadas sobre la playa (Casas & Piriz, 1996; Oh & Koh, 1996).

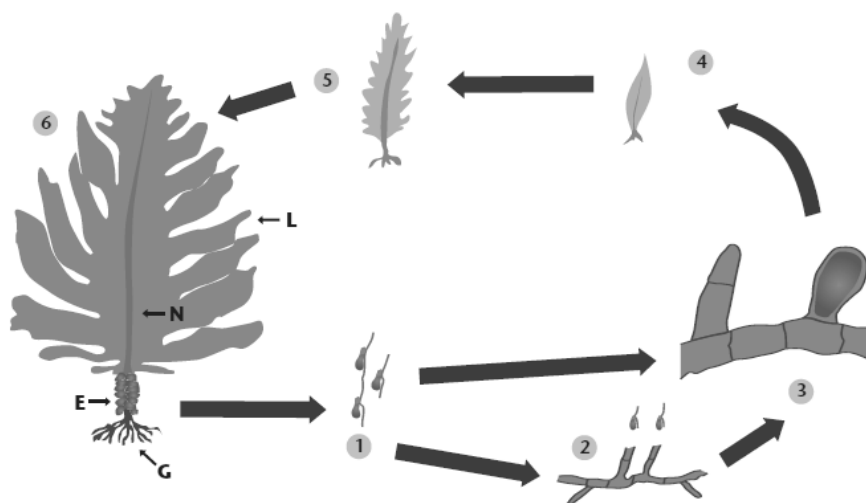


Fuente: Casas & Schwindt (2008).

**Figura 15:** Ejemplar de *U. pinnatifida*, hallado en el Golfo Nuevo (Chubut), en diciembre de 1992. Escala 20 cm. N: nervadura, L: lámina, EP, esporofilo, G: grampón. b) Detalle de esporofilo y grampón.

#### 1.3.4 Ciclo de vida

*U. pinnatifida* presenta un ciclo de vida anual con dos fases, una macroscópica con ejemplares visibles a simple vista (esporofito) y una fase microscópica constituida por filamentos (gametofito) (Stuart, 2004). Una vez maduro el esporofito, genera millones de esporas, que luego de ser liberadas se asientan en el fondo del mar. Las esporas sedimentadas luego germinan en gametofitos masculinos y femeninos; se produce un nuevo esporofito a través de la reproducción sexual cuando se fertiliza un óvulo, y el ciclo de vida se repite nuevamente cuando las algas maduran (Fig. 16). Los gametofitos de *U. pinnatifida* pueden sobrevivir estando inactivos durante al menos tres años, un problema real para los lugares donde esta especie se considera una plaga (MOF, 2001). Se desconoce si la especie se reproduce vegetativamente por fragmentación (Wallentinus, 2007). Sin embargo, la reproducción asexual a través de óvulos no fertilizados, que pueden convertirse en esporofitos partenogénéticos, se ha registrado *in vitro* (Wu *et al.*, 2004).



Fuente: Casas & Schwindt (2008).

**Figura 16:** Ciclo de vida de *U. pinnatifida*. 1: Esporas móviles (zoosporas), 2: fase microscópica masculina liberando gametas, 3: fase microscópica femenina con una célula huevo, 4 y 5: desarrollo de la fase macroscópica, 6: ejemplar maduro.

### 1.3.5 Propiedades nutritivas

*U. pinnatifida* es una excelente fuente de compuestos nutricionales tales como polisacáridos, ácidos grasos, fibra alimentaria, proteínas, minerales, vitaminas y esteroides. Aparte de sus componentes nutritivos, las algas contienen compuestos bioactivos de alta capacidad antioxidante, como carotenoides y polifenoles (Chandini *et al.*, 2008). Las macroalgas se destacan por presentar bajo contenido de lípidos y proveen baja cantidad de energía (Urbano & Goni, 2002), ideal para incorporarse en dietas hipocalóricas. Las propiedades nutritivas presentes en el wakame (*U. pinnatifida*) permite asignarles numerosos beneficios para la salud y una aparente ausencia de efectos secundarios, transformándolo en un alimento terapéutico (Zhang *et al.*, 2014). La concentración de los compuestos bioactivos varía según la temporada, la edad, ubicación geográfica y factores ambientales (Balboa *et al.*, 2013).

**Polisacáridos.** La pared celular de las algas pardas se compone principalmente de fucoidanos, alginatos y laminarinas (3:1:1) y sus derivados. Estos polisacáridos de reserva proporcionan resistencia y flexibilidad, mantienen el equilibrio iónico y evitan la desecación (Balboa *et al.*, 2013). Los fucoidanos son compuestos sulfatados complejos que se encuentran en las paredes celulares de las algas pardas, representan del 10 al 20% del peso (Usov & Bilan, 2009). En la actualidad, las investigaciones se han centrado en los fucoidanos por sus propiedades anticancerígenas (Gamal-Eldeen *et al.*, 2009), antitumorales (Ye *et al.*, 2005), antivirales (Chen *et al.*, 2009), antioxidantes (Hu *et al.*, 2010) y antiinflamatorias (Abad *et al.*, 2008). El ácido algínico, un polisacárido aniónico

lineal que se usa comercialmente como agente gelificante (Balboa *et al.*, 2013), ejerce efecto mucoprotector, antiinflamatorio e incluso cicatrizante (Rupérez *et al.*, 2011). La laminarina está compuesta de residuos de glucopiranosas (Deville *et al.*, 2007), tiene la función de regular el metabolismo intestinal y activar del sistema inmune (Choi *et al.*, 2011).

**Polifenoles.** Los polifenoles de algas, también llamados florotaninos, difieren de los polifenoles de las plantas terrestres, ya que derivan de unidades de floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenzina) mientras que, los segundos provienen del ácido gálico y eláxico. Los florotaninos constituyen un grupo extremadamente heterogéneo de moléculas que proporcionan un amplio rango de actividad biológica (Burtin, 2003). Los fenoles aislados de *U. pinnatifida* son un grupo importante de productos naturales que presentan propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antivirales y anticancerígenas (Athukorala *et al.*, 2006).

**Lípidos.** Los lípidos de las algas consisten en fosfolípidos, glicolípidos (glicosilglicéridos) y glicerolípidos no polares (lípidos neutros) análogos a los de las plantas superiores junto con betaína y algunos lípidos inusuales que pueden ser característicos de un género o especie en particular (Kumari *et al.*, 2013). El contenido de lípidos en algas pardas es bajo, entre 0,57-3,5% del peso seco (PS), observando amplias variaciones entre las especies (Dawczynski *et al.*, 2007). La importancia que presentan los lípidos de las macroalgas marinas, en relación con aspectos de la salud humana, se asocia a los ácidos grasos poli-insaturados como el omega 3 y omega 6. El consumo de estos ácidos grasos se relaciona con la disminución del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, particularmente enfermedad coronaria (Sánchez-Machado *et al.*, 2004). *Undaria* es particularmente rica en ácidos grasos con 20 átomos de carbono como el ácido eicosapentaenoico (EPA,  $\omega$ 3 C20:5) y ácido araquidónico (AA,  $\omega$ 6 C20:4) (Banaimoon, 1992); los cuales presentan propiedades antiinflamatorias y post-inflamatorias. En cuanto a los esteroides, las algas pardas contienen colesterol, brasicasterol y fucosterol, este último esteroide se encuentra en mayor proporción en *Undaria* (83-97% del total de esteroides) (Kumari *et al.*, 2013).

**Fibra alimentaria.** El total de fibras contenidas en las algas comestibles es 33-62% del PS, siendo este porcentaje mayor que el encontrado en plantas superiores (Dawczynski *et al.*, 2007; Lahaye, 1991). Las algas pardas son las que presentan mayor contenido de fibras, alrededor de 58% del PS en *U. pinnatifida* (Palasí Mascarós, 2015). La fracción insoluble de la fibra dietética permite disminuir el tiempo de tránsito intestinal, reduciendo el nivel de estreñimiento y produciendo un efecto regulador. Mientras que la proporción soluble sufre un proceso de fermentación en el intestino grueso, lo que

genera una reducción del colesterol y una disminución de glucosa en sangre (Burtin, 2003). En consecuencia, el consumo de alimentos que contienen fibra está directamente relacionado con una disminución de los desórdenes y enfermedades cardiovasculares, cáncer de colon y diabetes.

**Proteínas.** En general, el contenido de proteínas de las algas pardas es generalmente pequeño, entre 5-15% del PS. No obstante, *Undaria* es la que posee mayor concentración de proteínas entre las algas pardas (11-24% del PS) (Burtin, 2003), presentando un nivel más elevado en la lámina, seguido por el esporofilo y luego la nervadura (Torres *et al.*, 2011). Por otro lado, estudios han permitido concluir que la calidad de la proteína de *Undaria* es buena por comparación con el contenido de aminoácidos esenciales en proteínas de referencia (FAO, 2005; JECFA, 1996).

**Vitaminas.** Desde el punto de vista nutricional, las algas marinas son excelentes fuentes de vitaminas y sus concentraciones varían según la estructura (Torres *et al.*, 2011; Urbano & Goni, 2002). La vitamina B2 y los carotenos se encuentran en mayor proporción en la lámina, mientras que la vitamina E y B6 predominan en el esporofilo (Torres *et al.*, 2011). La vitamina E presenta propiedades antioxidantes y las algas pardas contienen una mayor cantidad en comparación con las algas verdes y rojas. Por otro lado, la vitamina B12 es recomendada en tratamientos para combatir el envejecimiento, el síndrome de fatiga crónica y la anemia, aunque es discutida su biodisponibilidad a partir de las macroalgas (Burtin, 2003). Las algas presentan 10 a 20 veces más de vitaminas que las plantas terrestres (Kolb *et al.*, 2004).

**Minerales.** Las algas marinas son una excelente fuente de minerales, ya que tienen la capacidad de absorber sustancias inorgánicas del océano; los valores oscilan entre un 8-40% expresado en PS (Kolb *et al.*, 2004). En el caso de *Undaria* se ha reportado un 30-40% expresado en PS (Rupérez & Saura-Calixto, 2001). Las algas son uno de los alimentos más completos en cuanto a tipo de minerales, si se comparan con plantas terrestres y con productos de origen animal, colocándose éstas por delante (Rupérez, 2002). En la composición mineral que presentan las algas destaca el Na, K, Ca y Mg como macroelementos esenciales y dentro de los elementos traza el P, Fe, Zn, Mn, Cu (Gómez-Ordóñez *et al.*, 2010). Si bien, el contenido de minerales suelen ser elevados en las algas pardas; uno de los aspectos más destacados, en comparación con las plantas en general, son sus bajas proporciones de Na/K (Nuno *et al.*, 2019). La OMS recomienda consumir productos con valores de Na/K próximos a uno para disminuir problemas cardiovasculares, las algas pardas oscilan entre 0,3 y 1,5; estos datos reportados son relativamente bajos al compararlo con otros alimentos (Na/K: aceitunas 43,6, salchichas 4,9) (Nuno *et al.*, 2019). Las algas pardas, por su composición rica en alginatos y polisacáridos sulfatados junto con la presencia de haloperoxidasas en las

paredes celulares, permiten lograr una importante acumulación de yodo, incluso más alta que cualquier planta comestible; *U. pinnatifida* contiene aproximadamente 3,9 mg/100 g PF (Nuno *et al.*, 2019). El yodo es fundamental que esté presente en nuestra dieta, ya que la falta de este oligoelemento provoca diversos trastornos de la tiroides, siendo el bocio el signo más notable. Si bien, la composición y el contenido mineral en las algas está en función de los factores geográficos, fisiológicos y ambientales, la concentración es superior a las plantas terrestres comestibles y los productos de origen animal; por lo que las algas son efectivas en cantidades suplementarias relativamente bajas, proporcionando a nuestra dieta muchos de los elementos faltantes (Wells *et al.*, 2017).

**Pigmentos.** Los carotenos y las xantófilas forman parte de los carotenoides, que juntos con las clorofilas y las ficobiliproteínas constituyen los principales pigmentos directamente involucrados en la fotosíntesis de las macroalgas (Burtin, 2003). Las algas pardas contienen  $\beta$ -caroteno, violaxantina y fucoxantina, estos pigmentos presentan actividades biológicas beneficiosas para la salud humana (Torres *et al.*, 2011). Las fucoxantinas y sus metabolitos poseen propiedades antioxidantes, anticancerosas y antiinflamatorias (Piovan *et al.*, 2013); mientras que los carotenos son importantes en el hombre como fuente de retinol (vitamina A), un terpenoide obtenido por oxidación del caroteno (Torres *et al.*, 2011).

### 1.3.6 Origen del alga y aparición en nuestro mar

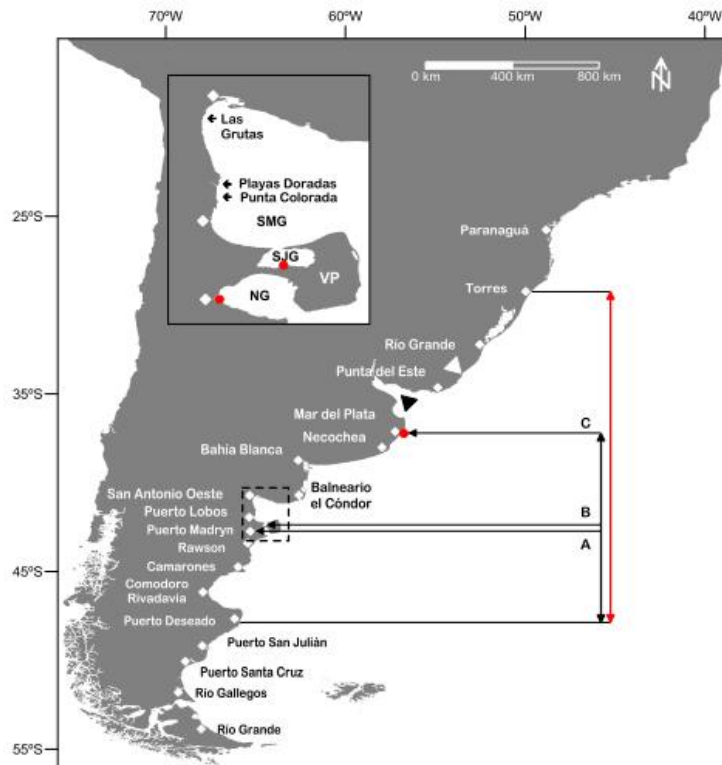
*U. pinnatifida* es originaria del noreste de Asia (Corea, China y Japón), donde es cultivada para consumo humano (Saito, 1975). Esta especie se considera altamente invasora, ya que ha sido introducida en distintas áreas costeras del mundo tanto de forma accidental como intencional, con fines de cultivo (Fig. 17). *Undaria* no se propaga naturalmente largas distancias a través de la dispersión de esporas, no más de 100 m desde los esporofitos originales (Forrest *et al.*, 2000). Su propagación ocurre principalmente a través de material reproductivo a la deriva (adheridos a rocas, almejas, vieiras, etc.) y vectores mediados por humanos (Forrest *et al.*, 2000; Hay & Luckens, 1987). El tráfico naviero se considera el vector más importante de dispersión accidental de la especie; se puede trasladar en forma de esporas en el agua de lastre o también puede estar fijado al casco de las embarcaciones (Martin & Bastida, 2008). *U. pinnatifida* se reportó en Francia en 1971, desde entonces se ha extendido por el Mediterráneo registrándose en las costas del Atlántico de España e Inglaterra (Aguilar-Rosas *et al.*, 2004). Esta especie también logró colonizar las costas de Nueva Zelanda, Tasmania, Australia (Aguilar-Rosas *et al.*, 2004; Sanderson, 1990) y más recientemente en las costas del Pacífico del sur de EE.UU. y México (Aguilar-Rosas *et al.*, 2004). En

Argentina se detectó por primera vez en 1992 en el Golfo Nuevo (Patagonia norte), donde su introducción fue atribuida al transporte por medio del agua de lastre de buques internacionales (Casas & Piriz, 1996). Su extensión colonizó las costas de la Península de Valdés, invadiendo el Golfo San José, alcanzando el Golfo San Matías, a una tasa promedio ~50 km/año (Dellatorre *et al.*, 2014). Esta especie invasora, en la primavera de 2005, se registró en el interior de la Ría Deseado (Santa Cruz, Patagonia), expandiendo su límite de distribución austral (Martin & Bastida, 2008) (Fig. 17). Existen diversos factores abióticos que pueden afectar el crecimiento y la distribución de *Undaria*, incluida la salinidad, la luz, la temperatura, la duración del día, los nutrientes y la exposición a las olas (Epstein & Smale, 2017). Entre estos, la temperatura del agua es un factor ambiental clave que determina la dinámica poblacional anual. Este género se caracteriza por presentar una amplia tolerancia térmica, entre -0,6 a 16,8 °C y 13 a 28 °C para el mes más frío y más cálido, respectivamente (Dellatorre *et al.*, 2014). La capacidad de tolerar este amplio rango anual se debe a la supervivencia de los estadios microscópicos, lo cuales pueden persistir a temperaturas entre -1 y 30 °C (Saito, 1975). En consecuencia, se espera que *Undaria* podría continuar invadiendo aún más las costas del Atlántico sureste, desde Puerto Deseado (Argentina) a Cape Torres (Brasil) (Dellatorre *et al.*, 2014) (Fig. 18).



Fuente: Epstein & Smale (2017).

**Figura 17:** Distribución aproximada de *U. pinnatifida* en el mundo. Verde: rango nativo, rojo: rango no nativo.



Fuente: Dellatorre *et al.* (2014).

**Figura 18:** Distribución costera de *U. pinnatifida* a lo largo del Atlántico sureste. Las flechas verticales negras y rojas indican el rango real y potencial, respectivamente, de la distribución de *Undaria* en función de la tolerancia térmica. Las flechas horizontales y los puntos rojos indican los lugares de inoculación humana de *Undaria* (A: Puerto Madryn, 1992; B: Punta Tehuelche, 2007; C: Mar del Plata, 2011). Recuadro: golfos patagónicos del norte: San Matías (SMG), San José (SJG) y Nuevo (NG); Península Valdés (VP) y balnearios en SMG donde está presente *Undaria* (Punta Colorada), y donde aún no ha sido observada (Playas Doradas y Las Grutas).

### 1.3.6.1 Impacto ambiental

Las invasiones biológicas son la segunda causa de los cambios de la biodiversidad; la mayoría de las especies introducidas alteran procesos ecológicos y pueden ocasionar las extinciones de las especies nativas. En el caso de las algas, sus comunidades compiten intensamente por el sustrato y/o la luz, ocasionando la exclusión parcial o total de especies nativas (Epstein & Smale, 2017).

Estudios previos han demostrado que *Undaria* impacta negativamente sobre la diversidad de algas marinas. Las poblaciones conformadas por esta especie invasora presentan un gran desarrollo en altura y una abundancia relativa elevada, produciendo un significativo sombreado en el fondo marino (James, 2016). Además, los grampones pueden superponerse entre sí cubriendo el fondo y reduciendo el espacio disponible para el desarrollo de otras especies, modificando el paisaje submarino drásticamente

(Epstein & Smale, 2017). Habitualmente la mayoría de las algas son desprendidas en verano y arrojadas por las mareas a las playas. En el caso de *Undaria*, las grandes plantas son removidas de la estructura de fijación y al soltarse arrastran con ellas fauna y flora marina, produciendo una remoción y alteración en los fondos rocosos (Casas & Piriz, 1996).

La Convención de Biodiversidad recomendó en 1992 la erradicación y/o el control de especies introducidas, pero justificar los costosos intentos de erradicación de *Undaria* puede ser un desafío (Casas & Schwindt, 2008). Sin embargo, a medida que esta especie invasora se propaga a nuevas regiones, se tendrán que tomar decisiones sobre posibles respuestas rápidas antes de que se puedan llevar a cabo estudios de impacto específicos del sitio (Epstein & Smale, 2017).

#### 1.3.6.2 Aplicaciones de *U. pinnatifida*

Actualmente es imposible pensar en la erradicación del alga *U. pinnatifida* y su expansión parece inevitable. Frente a este escenario, las investigaciones apuntan al aprovechamiento del recurso mediante diferentes aplicaciones biotecnológicas. Estudios recientes demostraron que el alga puede utilizarse como materia prima para realizar compost, mejorando el crecimiento de las plantas halófitas (Gibilisco *et al.*, 2020). Además, se implementó el alga en ensayos de biorremediación y los resultados fueron favorables, el compost elaborado con *Undaria* actúa como un adsorbente biológico para la eliminación de contaminantes, específicamente metales pesados (Gibilisco *et al.*, 2021; Yagnentkovsky *et al.*, 2011). Se ha investigado el uso de extracto líquido algal de *U. pinnatifida* como biofertilizante para sustituir el uso de fertilizantes químicos (Marchiaro *et al.*, 2013). Uchida y Murata (2011) elaboraron ensilado a base de desechos de *Undaria* para ser utilizado como alimento para peces. Por otro lado, estudios previos han demostrado que las algas pueden ser incorporadas como suplementos en diferentes alimentos para mejorar las propiedades funcionales de los mismos (Nuno *et al.*, 2019; Well *et al.*, 2017). El wakame (lámina de *Undaria* seca) utilizado ampliamente por la cultura oriental, es incorporado en la preparación de fideos, sopas, ensaladas, encurtidos, entre otros (Well *et al.*, 2017). Sin embargo, en Argentina se comenzó a investigar las aplicaciones del alga *U. pinnatifida* en la industria alimentaria recientemente. En el 2012, se comenzó un emprendimiento denominado “Jono” en Puerto Madryn-Chubut, en el cual se produce escamas de wakame para consumirlas en diferentes preparaciones (ensaladas, masas, sopas, arroz), la comercialización apunta al mercado interno nacional representado por tres componentes principales: los consumidores naturistas, los inmigrantes orientales y la

elaboración gourmet. Nagai *et al.* (2018) demostraron un incremento en la calidad nutricional de hamburguesas de carne suplementadas con harina de *Undaria* sp. Campos *et al.* (2019) determinaron que los extractos etanólicos de *U. pinnatifida* empleados durante el almacenamiento refrigerado de pescado exhibieron un efecto inhibitorio sobre la hidrólisis de lípidos y una parcial inhibición de la oxidación de lípidos y la actividad microbiana. Se puede apreciar que las aplicaciones biotecnológicas de *U. pinnatifida* son amplias con resultados prometedores en las diferentes áreas.

## 1.4 Análisis sensorial

El análisis sensorial es una disciplina científica que evalúa los productos de consumo (alimentos, bebidas, cosméticos, etc.) mediante la utilización de los sistemas sensoriales humanos (gusto, olfato, tacto, vista y oído). Los alimentos presentados en la prueba de evaluación sensorial deben ser seguros para su consumo. En el caso que los alimentos presenten contaminación microbiológica sólo se evaluarán los atributos de olor y apariencia (Rochmawati, 2019). Algunos alimentos no se evalúan fácilmente por sí solos, por ejemplo, mantecas para untar, cereal, mermelada, salsas, etc. Estos alimentos requieren un producto adicional para ser presentado como portador, entre los cuales se utilizan las galletas sin sal, el pan, la leche y la pasta (Watts *et al.*, 1989).

Existen tres tipos de métodos organolépticos para llevar a cabo el análisis sensorial: discriminativo, descriptivo y afectivo (Rochmawati, 2019). El método discriminativo incluye las pruebas de triángulo, de dúo trío y de comparación pareada; y se utiliza para averiguar si existen diferencias entre las muestras presentadas. Mientras que, el método descriptivo es muy útil para describir la intensidad de las diferencias de productos (Rochmawati, 2019). Por último, el método afectivo se divide en tres pruebas principales: de preferencia, de aceptación y hedónica; se implementa para evaluar las preferencias y/o aceptación de los productos (Carpenter *et al.*, 2000).

Esta disciplina requiere el uso de personas como instrumentos de medición, quienes evalúan los productos conformando “paneles de evaluadores” (Choi, 2013). El principal desafío del análisis sensorial es transformar una respuesta humana en un dato objetivo susceptible de tratamiento estadístico. Sin embargo, la variabilidad inherente a la respuesta humana (diversidad entre individuos en una misma sesión, variación en un mismo individuo en distintas sesiones) lleva a la necesidad de contar con un grupo de evaluadores en lugar de un único individuo y al desarrollo de una metodología y procedimientos específicos (Choi, 2013).

En general, dos tipos de paneles son utilizados para la evaluación sensorial:

**Panel entrenado**, la inversión para conformar este tipo de panel es grande en término de tiempo y recursos humanos, se aconseja realizar un proceso exhaustivo en lugar de capacitar a panelistas no calificados (Choi, 2013). Por ejemplo, si la capacidad de detectar diferencias sutiles es esencial, es posible que el analista sensorial deba evaluar la agudeza sensorial de los potenciales panelistas sobre las propiedades clave del producto/s de interés. Estos panelistas se pueden seleccionar a través de pruebas que pueden incluir un conjunto de cuestionarios de preselección, ensayos de agudeza, test de clasificación/calificación y una entrevista personal (Choi, 2013). La cantidad de

entrenamiento requerido depende del nivel de sensibilidad sensorial deseado en el análisis. La mayoría de los paneles entrenados requieren una capacitación costosa y profunda. No obstante, el desempeño de los panelistas entrenados utilizados durante largos periodos puede fluctuar debido a una pérdida de enfoque y falta de motivación durante las sesiones de evaluación. Los panelistas entrenados se utilizan generalmente para desarrollar metodologías descriptivas y discriminativas (Rochmawati, 2019).

**Panel de consumidores**, a diferencia de los paneles entrenados, estos requieren una mayor cantidad de panelistas, ya que los resultados pueden exhibir gran variabilidad (Choi, 2013). Se recomienda examinar dicho panel según un criterio de prueba: por ejemplo, datos demográficos o consumo del producto. Las consignas utilizadas en los formularios deben ser sencillas, ya que tienen que ser resueltas por un panel no entrenado (Choi, 2013). En general, el método afectivo está en manos de personas no entrenadas (Rochmawati, 2019).



## 2. *OBJETIVOS*

## 2.1 Objetivos generales

La utilización de cultivos iniciadores es, en muchos casos, una buena alternativa a la fermentación espontánea, no sólo porque disminuye la probabilidad de que se produzcan fermentaciones anómalas sino también, porque los productos obtenidos garantizan características relativamente uniformes. Por lo expuesto, se establece como objetivo general la selección de BAL sobre la base de sus capacidades biotecnológicas para fermentar material de origen vegetal y el alga *U. pinnatifida*, que den origen a productos de calidad estable, inocuos y con alto valor nutritivo y funcional.

### 2.1.2 Objetivos específicos

- a) Aislar BAL a partir de fermentaciones espontáneas de brasicáceas.
- b) Seleccionar BAL que exhiban características funcionales y tecnológicas aplicables a la fermentación de brasicáceas y alga *U. pinnatifida*.
- c) Determinar mediante pruebas fenotípicas y genotípicas la ausencia de factores de virulencia en las cepas seleccionadas.
- d) Identificar a nivel de especie mediante pruebas genotípicas las BAL seleccionadas y conformar un cepario disponible en forma permanente.
- e) Conformar cultivos iniciadores y establecer protocolos de fermentación controlada para garantizar la conservación, inocuidad y propiedades funcionales en los productos.
- f) Monitorear la población de BAL y el pH durante el proceso de fermentación. Estudiar la evolución de la capacidad antioxidante y el contenido total de fenoles durante las fermentaciones.
- g) Realizar una comparación entre los tipos de fermentación (espontánea y controlada) sobre los distintos modelos estudiados: brasicáceas, brasicáceas y *U. pinnatifida*.
- h) Evaluar la calidad microbiológica y las propiedades fisicoquímicas de los productos fermentados.
- i) Analizar sensorialmente los productos fermentados para determinar su aceptabilidad por parte de los consumidores.
- j) Determinar la viabilidad de posibles contaminantes microbianos durante y post-elaboración.

## 2.2 Hipótesis

- ✓ Las matrices vegetales son una excelente fuente para aislar BAL con potencial interés biotecnológico.
- ✓ El estudio de las propiedades biotecnológicas y de los factores de virulencias/rasgos negativos de las BAL permiten realizar una selección adecuada de cultivos iniciadores.
- ✓ La inoculación en dos etapas de las matrices vegetales, primero con BAL heterofermentativas estrictas y segundo con BAL heterofermentativas facultativas/ homofermentativas, favorece al descenso inicial de pH y prolonga la metabolización de azúcares fermentables en condiciones de estrés elevado.
- ✓ La actividad enzimática de las BAL involucradas en la fermentación de las matrices vegetales producen un incremento de la capacidad antioxidante durante el proceso.
- ✓ La inclusión de un 20% de *U. pinnatifida* a la matriz vegetal no afecta el desarrollo de la fermentación.
- ✓ El modelo combinado de *U. pinnatifida* y brasicáceas fermentado de forma controlada garantiza un alimento con mayor valor agregado desde el punto de vista nutricional y/o funcional.
- ✓ La fermentación controlada de matrices vegetales con cultivos de BAL mixtos, en dos etapas, disminuye la contaminación microbiana durante y post elaboración.



### 3. *METODOLOGÍA*

### 3.1 Material vegetal

Akusai (*Brassica rapa* L. var. *glabra* Regel), pak choi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis* L. Hanelt), repollo colorado/morado y blanco (*B. oleracea* ssp. *capitata* (L.) Metzg) se obtuvieron en un mercado local de la ciudad de Trelew, Chubut. Los vegetales se colocaron en bolsas estériles y se transportaron al laboratorio para realizar los ensayos correspondientes. Las brasicáceas utilizadas se cultivaron y recolectaron durante el periodo verano-invierno (2018) en el Valle Inferior del Río Chubut (VIRCH).

#### 3.1.1 Diseño experimental en matrices vegetales-fermentación espontánea

Los vegetales se procesaron de manera individual para el experimento. Se eliminaron las partes externas dañadas y/o secas de los bulbos, el resto de las hojas se lavaron y se cortaron en tiras 2 mm aproximadamente de espesor. El material procesado se mezcló con 3,0% de NaCl (m/m) y seguidamente se prensó en frascos de vidrio (300 cc) para extraer el jugo hasta cubrir las tiras de col, sin dejar espacio de cabeza. Los frascos se completaron con 300 g de material procesado y se taparon ligeramente para permitir la liberación de gases durante la fermentación (Wiczowski *et al.*, 2016). El ensayo se llevó a cabo durante 30 días a 18 °C y se realizó por duplicado.

Los matrices vegetales realizadas con akusai, pak choi, repollo blanco y colorado, se denominaron AK, PC, RB y RC, respectivamente.

#### 3.1.2 Parámetros de fermentación

Las BAL y el pH se monitorearon durante la fermentación espontánea los días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 y 30. La viabilidad de las BAL se evaluó en agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Biokar, Beauvais, Francia) utilizando diluciones seriadas de las muestras sólidas de los fermentos, las placas se incubaron durante 48 h a 30 °C. Las placas que presentaban entre 30 a 300 colonias se utilizaron para los recuentos. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) del producto fermentado. El pH de los fermentos se determinó utilizando un pH-metro calibrado (modelo Orion 410A, Cole-Palmer, St. Neots, Reino Unido).

#### 3.1.3 Aislamiento de BAL

El aislamiento se realizó mediante diluciones seriadas utilizando la siembra en placa. Las muestras sólidas se obtuvieron los días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 durante la fermentación espontánea. Las muestras sólidas se suspendieron en una solución de NaCl (0,85%, m/v) (Anedra, Buenos Aires, Argentina) en una proporción 1:1 m/v y se homogenizaron en un vortex durante 1 min. Distintos medios de cultivo se utilizaron para

el aislamiento: MRS, MRS suplementado con 15 µg/ml de vancomicina (Fada Pharma S. A., Buenos Aires, Argentina) (MRSV), MRS con 8% de NaCl (MRSNaCl) y bilis esculina (BE) (Becton, Dickinson and Company, Maryland, EE. UU.), según las recomendaciones de trabajos previos (Jung *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2013). El medio MRS se utilizó para aislar BAL en general; el MRSV para obtener principalmente especies pertenecientes a los géneros *Leuconostoc*, *Lactiplantibacillus*, *Pediococcus* y algunas de *Lactobacillus*, ya que exhiben resistencia intrínseca; el MRSNaCl se implementó como un factor de estrés adicional durante aislamiento; y el BE principalmente para el aislamiento e identificación presuntiva de estreptococos del grupo D. Las placas se incubaron durante 48 h a 30 °C. Luego, se seleccionaron las colonias que presentaban diferente morfología.

Todos los medios de cultivo se suplementaron con nistatina (10 µg/ml) (Sigma, San Luis, EE. UU.) y ácido nalidíxico (20 µg/ml) (Sigma, San Luis, EE. UU.) como agentes inhibidores de hongos y de bacterias Gram negativas, respectivamente.

### 3.1.3.1 Purificación y conservación de las cepas

Se realizaron repiques con el objetivo de obtener aislamientos puros mediante sucesivas resiembras por agotamiento en placas utilizando el medio de procedencia (MRS, MRSV, MRSNaCl y BE). Las placas se incubaron durante 24 h a 30 °C. Todas las cepas aisladas se conservaron a -30 °C en viales de caldo tripticasa soya (TS) (Britania, Buenos Aires, Argentina) suplementado con glicerol al 10% (v/v) como parte de la colección del Cepario del Laboratorio de Biotecnología Bacteriana FCNyCS (Sede Trelew), UNPSJB.

### 3.1.3.2 Identificación presuntiva de los aislamientos

Las cepas conservadas se sometieron a diferentes pruebas bioquímicas para su identificación preliminar:

- Coloración de Gram: se utilizó para determinar la purificación de los cultivos e identificar el tipo de bacteria y la morfología de las células (Sanz Cervera, 2011).
- Prueba de la catalasa: se evaluó la presencia de esta enzima en las cepas aisladas según el procedimiento descrito por Sanz Cervera (2011). La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica un resultado positivo.
- Prueba de la oxidasa: se determinó la presencia de la enzima citocromo-oxidasa mediante discos comerciales de oxidasa (Britania, Buenos Aires, Argentina). El

resultado se interpretó como positivo cuando el disco exhibía un color rosado, debido a la oxidación del sustrato.

- Producción de CO<sub>2</sub> por fermentación de la glucosa: se inocularon tubos con caldo MRS suplementados con glucosa (20 g/l) (Merck, Darmstadt, Alemania) y campana de Durham, siguiendo el procedimiento descrito por Müller (1990). Los tubos se incubaron durante 48 h a 30 °C. Los resultados se interpretaron como positivo cuando se observó la presencia de gas en la campana de Durham.

#### 3.1.4 Preselección de las cepas obtenidas durante la fermentación

Se seleccionó de manera aleatoria y manual un porcentaje representativo del total de las cepas aisladas. Se incluyeron BAL de diferentes etapas de fermentación, de distintas matrices (PC, AK, RB y RC) y medios de selección (MRS, MRSV, MRSNaCl y BE). Se seleccionó un mayor porcentaje de cepas en el periodo inicial comparado con el final de la fermentación espontánea de cada vegetal, ya que en esta etapa se alcanzó una mayor población de BAL (excepto para PC).

#### 3.1.5 Estudio de las propiedades tecnológicas

##### 3.1.5.1 *Evaluación de la viabilidad*

Los microorganismos seleccionados se sometieron a condiciones de estrés para evaluar la tolerancia a la salinidad y pH, escenarios imperantes durante la fermentación. Se sembró una alícuota de un cultivo *overnight* (dilución 1/10) en 2 ml de caldo MRS suplementado con NaCl (3% m/v) y ajustado a pH 3,5. Los tubos se incubaron durante 48 h a 30 °C. Luego, se procedió a determinar la viabilidad de las cepas de forma cualitativa. Se sembraron alícuotas de 5 µl de los cultivos sobre placas de MRS agar (1,5% m/v) y se incubaron durante 72 h a 30 °C. El desarrollo de colonias se interpretó como un resultado positivo.

##### 3.1.5.2 *Producción de EPS*

La producción de EPS se evaluó de manera cualitativa siguiendo las instrucciones de Freeman, Falkiner & Keane (1989). Las cepas seleccionadas se sembraron, utilizando la técnica de estría, en agar cerebro-corazón (BHI, por sus siglas en inglés) (Biokar, Beauvais, Francia) suplementado con 50 g/l de sacarosa (Merck, Darmstadt, Alemania) y 0,8 g/l de rojo Congo (Biopack, Buenos Aires, Argentina). Las placas se incubaron durante 24 h a 30 °C. El resultado se interpretó como positivo cuando se observaron colonias con coloración negra. Esta coloración surge de las uniones no covalentes que se forman entre el rojo Congo y los enlaces  $\beta(1\rightarrow3)$  y  $\beta(1\rightarrow4)$  de los polisacáridos.

### 3.1.5.3 Tolerancia al ácido gálico, ácido tánico y fenol

Se evaluó de manera cualitativa la influencia del ácido tánico, ácido gálico y fenol sobre el crecimiento de las cepas seleccionadas, utilizando el método propuesto por Ajaz *et al.* (2004) con algunas modificaciones. Los cultivos *overnight* en caldo MRS (2 ml) se centrifugaron y las células se lavaron dos veces y resuspendieron en agua destilada (AD) estéril (2 ml). Se sembraron 5 µl de cada cultivo sobre placas de MRS agar (1,5% m/v) suplementadas individualmente con ácido gálico (0,3% m/v) (Biopack, Buenos Aires, Argentina), ácido tánico (0,1% m/v) (Biopack, Buenos Aires, Argentina) o fenol (0,5% v/v) (Biopack, Buenos Aires, Argentina). Las placas se incubaron durante 72 h a 30 °C. El crecimiento de colonias se interpretó como resultado positivo para la tolerancia de polifenoles.

### 3.1.5.4 Actividad pectinasa

Se determinó la actividad pectinasa extracelular mediante un ensayo en placa descrito previamente por Karthik *et al.* (2011). Las cepas seleccionadas se sembraron en placas conteniendo extracto de levadura (5,0 g/l) (Britania, Buenos Aires, Argentina) y pectina (2,5 g/l) (Sigma Aldrich, San Luis, EE. UU.), suplementadas con agar al 2% (m/v) (Britania, Buenos Aires, Argentina). Las placas se incubaron durante 48 h a 30 °C. Luego, los resultados se revelaron siguiendo las instrucciones de Vidhyasagar *et al.* (2013). Las placas se colorearon con una solución de rojo Congo al 0,1% (m/v) durante 10 min y se lavaron con una solución de NaCl 1 M. El aclaramiento de la zona alrededor de la colonia después de la tinción se consideró como actividad enzimática positiva.

### 3.1.5.5 Actividad tanasa

Se evaluó la habilidad de las cepas para hidrolizar el ácido tánico de manera cualitativa. Previamente, las cepas se repicaron en placas de MRS agar (1,5% m/v) sin carbohidratos suplementado con purpura bromo cresol (Sigma Aldrich, San Luis, EE. UU.) (0,006%, m/v) y ácido tánico (1 g/l). Las placas se incubaron durante 48 h a 30 °C. Las cepas con actividad tanasa hidrolizan el ácido tánico, liberando glucosa y ácido gálico al medio. Los resultados se interpretaron como positivos cuando se observó cambios en el color del medio, de púrpura a amarillo, como consecuencia del descenso de pH ocurrido por la fermentación de la glucosa.

### 3.1.6 Estudio de los factores de virulencia y/o rasgos negativos

Si bien las BAL están reconocidas con estatus GRAS, para uso humano, se realizaron distintas pruebas fenotípicas con el objetivo de eliminar potenciales cepas con factores de virulencia. De esta forma, se realizó la segunda selección de las BAL evaluando no

solo los resultados de las propiedades tecnológicas, sino también la ausencia de factores de virulencia y/o rasgos negativos.

#### 3.1.6.1 *Actividad gelatinasa*

La actividad gelatinasa se evaluó siguiendo el protocolo propuesto por Kanemitsu *et al.* (2001) con pequeñas modificaciones. Las cepas seleccionadas se repicaron en MRS agar (1,5% m/v) suplementado con 0,8% (m/v) de gelatina (Becton, Dickinson and Company, Maryland, EE. UU.). Las placas se incubaron durante 48 h a 30 °C y se revelaron con una solución de ácido tricloroacético (Sigma Aldrich, San Luis, EE. UU.) al 20% (v/v). La aparición de zonas claras alrededor de las colonias se consideró un resultado positivo y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 se utilizó como control positivo.

#### 3.1.6.2 *Actividad hemolítica*

La producción de hemolisinas de las cepas seleccionadas se evaluó en agar BHI suplementado con sangre desfibrinada de conejo al 5% (v/v) (Semedo *et al.*, 2003). Luego de una incubación durante 48 h a 30 °C, los resultados se interpretaron como positivos cuando se observó un halo de hemólisis completa alrededor de las colonias ( $\beta$ -hemólisis). Se utilizó la cepa *Staphylococcus aureus* ssp. *aureus* ATCC 25923 como control positivo.

#### 3.1.6.3 *Producción de aminas biógenas*

La capacidad de producción de histamina, tiramina y cadaverina se evaluó empleando la metodología propuesta por Joosten & Northolt (1989). Las cepas se sembraron en MRS agar (1,5% m/v) ajustado a pH 5,3 con ácido láctico, suplementado con 1% (m/v) del aminoácido específico (histidina (Sigma Aldrich, San Luis, EE. UU.), tirosina (Sigma Aldrich, San Luis, EE. UU.) y lisina (Sigma Aldrich, San Luis, EE. UU.)) y 0,006% (m/v) de purpura de bromo cresol (indicador del pH). Luego, las placas se incubaron durante 48 h a 30 °C. Los resultados se interpretaron como positivos cuando se observó que el medio circundante a la colonia cambió de color, de amarillo a púrpura, como consecuencia del incremento del pH producido por la descarboxilación de los aminoácidos.

### 3.1.7 Identificación molecular de las BAL seleccionadas

#### 3.1.7.1 *Extracción del ADN*

Las cepas seleccionadas se sembraron en tubos de ensayo con 2 ml de caldo MRS y se incubaron durante 24 h a 30 °C. El ADN se extrajo utilizando un equipo comercial de

purificación Wizard Genomics Promega DNA purification (Madison, Wisconsin, EE. UU.), según el protocolo detallado a continuación:

1. Los tubos de ensayo se centrifugaron a 4.000 rpm durante 15 min, posteriormente se eliminó el sobrenadante.
2. Cada pellet obtenido se resuspendió en una solución de EDTA y lisozima (1 mg/ml), se homogenizó utilizando un vortex y luego se incubó durante 30 min a 37 °C.
3. Los tubos de ensayo se centrifugaron a 4.000 rpm durante 15 min y se eliminó el sobrenadante.
4. Se agregó a cada tubo buffer TE (600 µl) y una solución de SDS al 20% (30 µl), los homogenatos obtenidos se sometieron a un baño térmico durante 5-10 min a 80 °C, donde se mezclaron manualmente.
5. Los tubos de ensayo se dejaron enfriar y luego se agregó la solución de ARNasa. Se incubaron durante 30 min a 37 °C.
6. Las muestras se pasaron a tubos eppendorf previamente rotulados. Posteriormente se les agregó la solución de precipitación de proteínas, se agitaron mediante vortex y se incubaron en hielo durante 5 min.
7. Las muestras se centrifugaron durante 5 min a 12.000 g. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios que contenían isopropanol a temperatura ambiente.
8. Luego se centrifugaron igual que en el paso anterior, se descartaron los sobrenadantes, se les agregó etanol (70%) a temperatura ambiente y se realizó una mezcla manual.
9. Las muestras se centrifugaron ídem al paso 7, se eliminó el sobrenadante y el resto de alcohol se dejó evaporar durante 24 h a 4 °C. Luego, para su posterior utilización se hidrató con una solución de hidratación de ADN.

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa para observar y cuantificar las muestras de ADN extraídas. Para tal fin, se preparó un gel de agarosa al 1% (m/v) en buffer TAE (Tris, ácido acético, EDTA a pH 8), la electroforesis se realizó en una cuba horizontal a 70 V. En los pocillos del gel se sembraron 4 µl de cada muestra, previamente mezclados con 1 µl de buffer de carga (Inbio Highway, Tandil, Argentina).

Luego de finalizada la corrida, el gel se colocó durante 20 min en una solución de buffer TAE y bromuro de etidio (0,5 µg/ml); posteriormente se observó el gel con luz UV en un transiluminador (Labnet, Nueva Jersey, EE. UU.).

### 3.1.7.2 Amplificación por PCR del gen ADNr 16S

El ADN extraído anteriormente se utilizó como molde para la amplificación del gen que codifica el ARNr 16S. La amplificación se realizó mediante PCR usando los cebadores universales para procariontes 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTG TTACGACTT-3').

La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 50  $\mu$ l (Tabla 6). La PCR se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), el protocolo utilizado se especifica en la Tabla 7. Los productos de amplificación se examinaron en un gel de agarosa al 1,5% (m/v), siguiendo las mismas indicaciones de la técnica mencionadas en el punto anterior.

**Tabla 6:** Concentración de los reactivos para la amplificación del gen ADNr 16S.

Mezcla de reacción para 50 $\mu$ L	Volumen ( $\mu$ L)
Mezcla madre (5x)	10
Primer R (10 $\mu$ M)	2
Primer F (10 $\mu$ M)	2
Taq (5 $\mu$ / $\mu$ L)	0,5
Cl <sub>2</sub> Mg (25 mM)	2
ADN	1
AD (CSP)	32,5

**Tabla 7:** Protocolo para la amplificación del gen ADNr 16S.

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo
1-Desnaturalización inicial	94	5'
2-Desnaturalización	94	1'
3-Alineamiento	55	20''
4-Extensión	72	5'
5-Volver al paso 2 por 35 veces		
6-Enfriamiento de las muestras	22	

Posteriormente los productos de la amplificación del gen ADNr 16S se enviaron para su secuenciamiento a MacroGen Inc, Corea, donde se utilizó un secuenciador automático.

### 3.1.7.3 Análisis de las secuencias del ADNr 16S

Luego de recibir los cromatogramas, estos se analizaron y editaron utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor. Se corrigieron los errores en la asignación de bases debido a ruido de fondo en el cromatograma, se eliminaron los segmentos

inicial y final de cada secuencia parcial debido a que presentaron una baja fiabilidad. Las secuencias del ADNr 16S se ensamblaron manualmente, a partir de la combinación de fragmentos generados con los iniciadores 27F y 1492R que amplifican el segmento en sentidos opuestos. Las secuencias parcialmente alineadas se unieron para generar una secuencia completa del gen que codifica para ARNr 16S.

La identificación de las secuencias se determinó mediante la herramienta SeqMatch de la base de datos Ribosomal Database Project (RDP) (Cole *et al.*, 2009), específica para el ARN ribosomal, que contrasta las secuencias de interés con las depositadas en la base y permite obtener su clasificación taxonómica. El porcentaje de similitud se obtuvo a través del parámetro S\_ab score (Izquierdo Altarejos, 2015). Además, las secuencias del gen ADNr 16S de las cepas se compararon con las de las especies más estrechamente relacionadas obtenidas de la base de datos GenBank, utilizando el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide) (Madden, 2019).

### 3.1.8 Caracterización tecnológica de las BAL seleccionadas

#### 3.1.8.1 Producción de bacteriocinas

Las BAL seleccionadas se cultivaron en caldo MRS a 30 °C hasta alcanzar la fase logarítmica (12-16 h). Luego del periodo de incubación los cultivos se centrifugaron a 4.000 g durante 15 min. Los sobrenadantes libres de células (SLC) se neutralizaron (pH 6,5) con NaOH 0,5 M (Anedra, CABA, Argentina) y se calentaron durante 10 min a 100 °C para inactivar las proteasas endógenas; también se trataron con 2 mg/ml de catalasa (Sigma, San Luis, EE. UU.) durante 2 h a 37 °C para descartar la presencia de peróxido de hidrógeno. Posteriormente, el ensayo antimicrobiano se realizó por el método de difusión en placa (Floriano *et al.*, 1998). Se colocó 50 µl de los SLC en pocillos (6 mm de diámetro) realizados en placas de TS agar sembrados previamente con 50 µl de un cultivo *overnight* de las cepas indicadoras ( $\approx 10^5$  UFC). Las placas se mantuvieron a 4 °C durante 2 h, para permitir la difusión de los metabolitos en el medio, y luego se incubaron a 30 °C durante 24 h. Se utilizaron las siguientes cepas indicadoras: *Listeria innocua* ATCC 33090, *L. monocytogenes* Scott A, *L. monocytogenes* 1908, *L. monocytogenes* ATCC 4760, *L. monocytogenes* 1915, *L. innocua* 6a, *L. innocua* Tw67, *St. aureus* ssp. *aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *Micrococcus luteus* ATCC 15307, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 35218. Las placas incubaron durante 72 h a 37 °C. Los resultados se determinaron midiendo los diámetros de las zonas de inhibición del crecimiento de la cepa indicadora mediante un calibre.

### 3.1.8.2 Detección molecular de las bacteriocinas

Se determinó la presencia de seis plantaricinas (A, C, N, EF, J y K) mediante PCR sobre las cepas que presentaron actividad antimicrobiana, utilizando los cebadores y condiciones detalladas en la Tabla 8. Para las plantaricinas A, C y N, se realizó una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min y una elongación a 72 °C por 30 s. La elongación final se realizó a 72 °C por 5 min (Omar *et al.*, 2008). Para las plantaricinas EF, J y K se realizó una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s y una elongación a 72 °C por 2 min. La elongación final se realizó a 72 °C por 7 min (Chaalet *et al.*, 2015; Lauková *et al.*, 2022).

Los productos de amplificación se examinaron en un gel de agarosa al 1,5% (m/v), siguiendo las mismas indicaciones de la técnica mencionadas en la sección “3.1.7.1 Extracción del ADN”. Se utilizó un marcador de peso molecular (qLadder 100 pb) para determinar el tamaño de los productos amplificados. Los resultados se interpretaron como positivo/negativo según la presencia/ausencia del amplicón del tamaño específico, respectivamente.

**Tabla 8:** Cebadores utilizados para la detección de genes de plantaricinas.

Plantaricina	Cebadores	Tamaño (pb)	Alineamiento	Referencia
A	F: GTACAGTACTAATGGGAG R: CTTACGCCAATCTATACG	450	53 °C 1 min	Omar <i>et al.</i> (2008)
C	F: AGCAGATGAAATTCGGCAG R: ATAATCCAACGGTGCAATCC	108	49,5°C 1 min	
N	F: ATTGCCGGGTTAGGTATCG R: CCTAAACCATGCCATGCAC	146	51,9 °C 1 min	
EF	F: GGCATAGTTAAAATCCCCC R: CAGGTTGCCGCAAAAAAG	428	53 °C 30 s	Chaalet <i>et al.</i> (2015)
J	F: TAACGACGGATTGCTCTG R: AATCAAGGAATTATCACATTAGTC	475	51 °C 30 s	
K	F: CTGTAAGCATTGCTAACCAATC R: ACTGCTGACGCTGAAAAG	246	53 °C 30 s	Lauková <i>et al.</i> (2022)

### 3.1.8.3 Prueba de antagonismo

Se testeó la incompatibilidad entre las cepas de BAL seleccionadas utilizando los SLC en el ensayo antimicrobiano que se realizó por el método de difusión en placa previamente descrito. Las placas se incubaron durante 24 h a 30 °C y el efecto antimicrobiano se expresó en mm.

### 3.1.8.4 Capacidad de acidificación

Se registró la evolución del pH durante la fermentación controlada de RB. Los frascos con el vegetal procesado y NaCl al 3% (m/m) se esterilizaron durante 5 min a 120 °C,

con el objetivo de disminuir la carga bacteriana epífita. Las BAL seleccionadas se sembraron en caldo MRS y se incubaron durante 18 h a 30 °C. Luego de centrifugar y descartar el sobrenadante, las células se lavaron dos veces y resuspendieron con AD estéril. Posteriormente, los frascos se inocularon de forma individual con las cepas de interés ( $\approx 3 \times 10^5$  CFU/g), y se controló el pH durante los primeros 5 días (18 °C).

#### 3.1.8.5 EPS con el método de la gota

Se utilizó la misma metodología descrita anteriormente (Freeman *et al.*, 1989) con algunas modificaciones. Se sembró una alícuota de 10  $\mu$ l de los cultivos *overnight* de las cepas seleccionadas sobre agar BHI suplementado con sacarosa (50 g/l) y rojo Congo (0,8 g/l). Las placas se incubaron durante 24 h a 18 °C, temperatura utilizada durante el proceso de fermentación de brasicáceas. El resultado se consideró positivo al observarse crecimiento de colonias con pigmentación negra.

#### 3.1.8.6 Efecto de la sacarosa en la solidificación de leche fermentada

Los EPS contribuyen en las propiedades texturales de los alimentos. En los productos lácteos se pueden observar estos cambios, atribuidos a las interacciones entre proteínas y polisacáridos. Se evaluó los efectos de los EPS, producidos por las cepas de *Leuconostoc spp.*, en la leche, siguiendo el protocolo propuesto por Wang *et al.* (2019) con algunas modificaciones. La leche deslactosada estéril se suplementó con distintas concentraciones de sacarosa: 3, 6, 9, 12% (m/v). Luego, se sembró 5% de un cultivo *overnight* y se incubó durante 48 h a 30 °C. La leche deslactosada se utilizó como control negativo. El resultado se consideró positivo al observar una solidificación completa y/o parcial de la leche suplementada con sacarosa.

#### 3.1.8.7 Actividad dextransacarasa

La actividad dextransacarasa se determinó de manera cualitativa e indirecta, a través de la detección de azúcares reductores. Se sembró 10  $\mu$ l de un cultivo *overnight*, de las BAL pertenecientes al género *Leuconostoc spp.*, en caldo MRS base sin azúcar suplementado con 3% (m/v) de sacarosa (única fuente de carbono). Luego de incubar los tubos durante 5, 9 y 12 h a 18 °C, se determinó la actividad enzimática estimando la concentración de azúcares reductores con el método de la neocuproina.

Para realizar la determinación se prepararon dos mezclas de reacción (1): Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4% (m/v), glicina 1,6% (m/v) y CuSO<sub>4</sub> 0,045% (m/v) en 100 ml AD; (2): 30 mg de neocuproina (disuelta previamente en etanol) en 100 ml de buffer acetato (0,05 M, pH 6,0). Posteriormente, 100  $\mu$ l del cultivo se adicionó en 1,0 ml del reactivo 1 y se llevó a baño María durante 3 min. Luego, se tomaron 100  $\mu$ l y se agregó a 1,0 ml de reactivo 2. Los

resultados se determinaron de forma cualitativa, mediante la intensidad del color amarillo de la reacción.

#### 3.1.8.8 *Tolerancia a las condiciones imperantes durante la fermentación.*

Se realizaron cultivos *overnight* de las cepas pertenecientes al género *Lactiplantibacillus* spp. seleccionadas; se descartó el sobrenadante, el pellet se lavó dos veces y se resuspendió en AD estéril obteniendo una dilución final de  $10^5$  UFC/ml. Se realizó el método de la gota, sembrando 10  $\mu$ l de la dilución sobre una placa de agar MRS base sin azúcar a pH 4,0 (ajustado con ácido láctico) suplementado con fructosa (20 g/l) (como única fuente de carbono) y fenol (5 g/l). Las placas se incubaron durante 48 h a 30 °C y el crecimiento de las colonias se interpretó como resultado positivo.

### 3.2 Fermentación controlada: diseños experimentales.

Las cepas seleccionadas de acuerdo con su calidad biotecnológica y ausencia de factores de virulencia se ensayaron en modelos diferentes de brasicáceas: AK, RB y RC y; combinación de los vegetales *Brassica* y *U. pinnatifida*: AK/*Undaria* (AKU), RB/*Undaria* (RBU), y RC/*Undaria* (RCU).

#### 3.2.1 *Material vegetal y alga*

Los vegetales akusai, repollo colorado y blanco se obtuvieron en un mercado local de la ciudad de Trelew, Chubut. Los vegetales se colocaron en bolsas estériles y se transportaron al laboratorio para realizar los ensayos correspondientes. Las brasicáceas utilizadas en los diferentes modelos simples (brasicáceas) y combinados (brasicáceas/*U. pinnatifida*), se cultivaron y cosecharon durante el periodo verano-invierno en el Valle Inferior del Río Chubut (VIRCH), en el año 2020 y 2021, respectivamente.

Por otro lado, en el periodo invierno-primavera del 2020, el alga *U. pinnatifida* se recolectó de las praderas naturales ubicadas en las zonas costeras del Golfo Nuevo (Puerto Madryn, Chubut), sobre sustratos duros y en profundidades entre 3 m y 15 m. Las muestras se recolectaron al azar, mediante buceo autónomo y en forma manual desde su base (por encima del grampón). El alga recolectada se colocó en bolsas estériles y se trasladó hasta el laboratorio, en donde se conservó a -20 °C hasta su utilización.

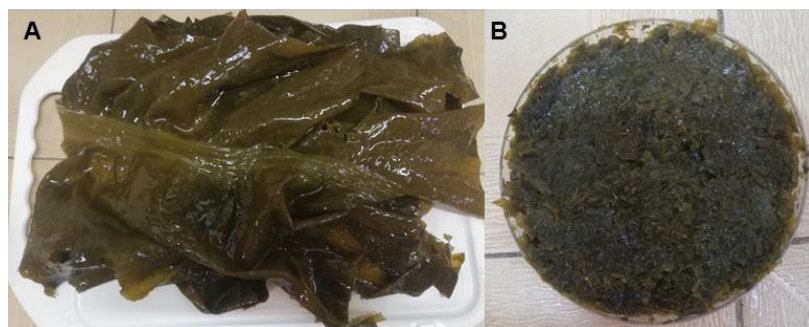
#### 3.2.2 *Modelos de brasicáceas*

Las matrices vegetales (AK, RB y RC) se fermentaron individualmente, previamente el material se procesó de la misma forma que se describió en “3.1.1 Diseño experimental

de matrices vegetales-fermentación espontánea”. Se colocó el vegetal procesado y el NaCl (3% m/m) de forma alternada dentro de los frascos. Se utilizó un pilón para compactar y estrujar el vegetal, con el objeto de liberar los azúcares procedentes del tejido. Luego, los frascos se sometieron a 120 °C durante 5 min con el objetivo de disminuir la carga bacteriana epífita del vegetal. Los frascos se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

### 3.2.3 Modelos combinados, *brasicáceas* y *U. pinnatifida*

Se realizaron tres matrices combinadas con cada vegetal y el alga *U. pinnatifida* (AKU; RBU y RCU). Los vegetales se procesaron como se describió previamente y se reservaron para su utilización. Por otro lado, las láminas de *U. pinnatifida* se lavaron con agua corriente y se les eliminó la nervadura. Luego, se sumergieron en una solución con 100 ppm de lavandina (apta para frutas y verduras) durante 5 min para su sanitización. Finalmente, las láminas se enjuagaron nuevamente con agua corriente y se procesaron con un mixer de 400 W (Atma LM 852, Kunshan, China) durante 5 min para su posterior uso (Fig. 19). Los frascos se llenaron con una mezcla realizada de *U. pinnatifida* (lámina) (20% m/m) y el vegetal (80% m/m) procesado, el NaCl (3% m/m) se incorporó en capas alternadas. Se utilizó un pilón para compactar y el estrujar el material. Luego los frascos se sometieron a 120 °C durante 3 min para eliminar la carga bacteriana epífita y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.



**Figura 19:** *U. pinnatifida*: a) estructura de la lámina y nervadura, b) lámina procesada.

### 3.2.4 Preparación de los inóculos mixtos.

Las BAL seleccionadas para conformar los inóculos se sembraron en 2 ml de caldo MRS y se dejaron incubar durante 18 h a 30 °C. Los cultivos se centrifugaron durante 15 min a 4.000 g y se eliminó el sobrenadante, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 2 ml AD estéril. Posteriormente, se prepararon dos inóculos con cultivos definidos mixtos. El primer inóculo se conformó por dos cepas del género *Leuconostoc* y el segundo por tres cepas del género *Lactiplantibacillus*. Por cada frasco

a fermentar, se tomó una alícuota de cada cepa ( $3 \times 10^5$  UFC/g) y se homogenizó en la matriz vegetal.

### 3.2.5 Inoculación en dos etapas

Los dos modelos experimentales (brasicáceas y combinación brasicáceas y *U. pinnatifida*) se inocularon en dos etapas con los cultivos definidos mixtos, siguiendo las recomendaciones de Jagannath, Raju & Bawa (2012). En la primera etapa se adicionó el primer inóculo mixto (cepas de *Leuconostoc*) al comienzo del proceso (tiempo 0) y los frascos se incubaron durante 3 días a 18 °C. En la segunda etapa, cuando el pH se encontraba próximo a 4,0, se agregó el segundo inóculo mixto (cepas de *Lactiplantibacillus*) y los fermentos se continuaron incubando durante 27 días restantes a 18 °C.

### 3.2.6 Fermentación espontánea como parámetro de comparación

En paralelo, a cada modelo experimental descrito previamente, se realizó una fermentación espontánea con el objetivo de comparar la evolución de los procesos. Se realizaron fermentaciones espontáneas de los diferentes modelos de brasicáceas: AK, RB y RC y; combinación de los vegetales *Brassica* y *U. pinnatifida*: AKU, RBU, y RCU. El vegetal y el alga se procesaron como se mencionó anteriormente y se adicionó NaCl al 3% (m/v), pero a diferencia de los ensayos controlados, estos no se calentaron ni inocularon. Los frascos se incubaron a la misma temperatura y por el mismo periodo (30 días, 18 °C).

### 3.2.7 Parámetros de fermentación

El contenido total de BAL y el pH se monitorearon en los diferentes procesos de fermentación los días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 y 30. Utilizando la misma metodología descrita previamente (3.1.2 "Parámetros de fermentación").

### 3.2.8 Preparación de los extractos

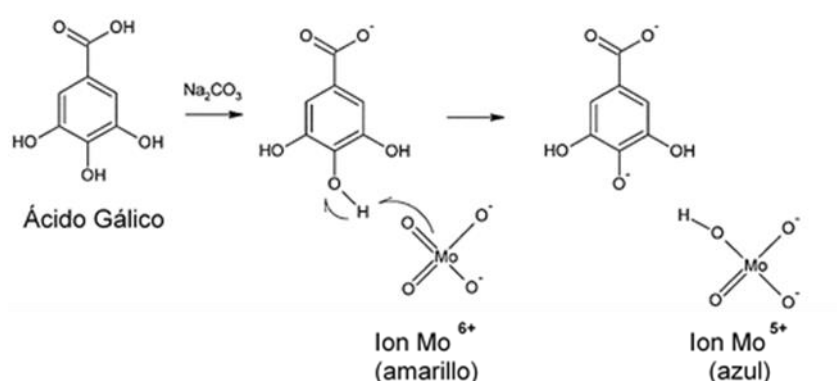
Se recolectaron muestras sólidas (10-15 g por cada frasco) los días 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 para determinar la capacidad antioxidante durante el proceso de fermentación. Las muestras se secaron en estufa a 37 °C hasta alcanzar un PS constante. Luego de procesar las muestras secas, se prepararon dos tipos de extractos:

Extractos acuosos: se utilizó AD estéril, en una relación de 1 parte de material sólido:10 partes de disolvente (m/v). Las mezclas se homogenizaron y se colocaron en autoclave durante 15 min a 105 °C. Luego, los extractos se centrifugaron, los sobrenadantes se filtraron utilizando papel Albet 400 y se conservaron a -20 °C hasta su análisis.

Extractos metanólicos: se utilizó metanol (Biopack, Buenos Aires, Argentina), respetando la misma relación descrita para los extractos acuosos. Las mezclas luego de ser homogenizadas se colocaron a 37 °C durante 3 h y cada 15 min se agitaron. Los extractos se centrifugaron, los sobrenadantes se filtraron utilizando papel Albet 400 y se conservaron a -20 °C hasta su estudio.

### 3.2.9 Contenido total de fenoles (CTF)

La actividad antioxidante generalmente está relacionada con metabolitos que contienen grupos fenólicos, por ello se determinó el CTF de los extractos utilizando el método de Folin-Ciocalteu. El reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) contiene ácido fosfomolibdico y fosfotúngstico que son reducidos para producir un cromóforo de color azul con el máximo de absorción en 750 nm (Agbor *et al.*, 2014). El centro de molibdeno en los complejos es generalmente aceptado como el sitio de reducción, donde el ion  $\text{Mo}^{6+}$  se reduce a  $\text{Mo}^{5+}$  al aceptar un electrón donado por el antioxidante fenólico (Fig. 20). Por lo tanto, el ensayo de Folin-Ciocalteu está basado en la transferencia simple de electrones (TE) asociado al poder reductor de los antioxidantes fenólicos (Shahidi & Zhong, 2015).



Fuente: Muñoz-Bernal *et al.* (2017).

**Figura 20:** Reacción entre el ácido gálico y el reactivo de Folin-Ciocalteu.

El CTF se determinó según la metodología propuesta por Agbor *et al.* (2014) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción se realizó agregando 50  $\mu\text{l}$  del extracto a 100  $\mu\text{l}$  de reactivo Folin-Ciocalteu y se incubó durante 10 min. A la mezcla se agregó 900  $\mu\text{l}$  de carbonato de sodio al 1%, se homogenizó y luego de 30 min se midió la absorbancia a 750 nm. Se utilizó ácido gálico como estándar en una curva de calibración

(50-800  $\mu\text{g/ml}$ ), los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico en 100 g de PS (mg EAG/100 g PS).

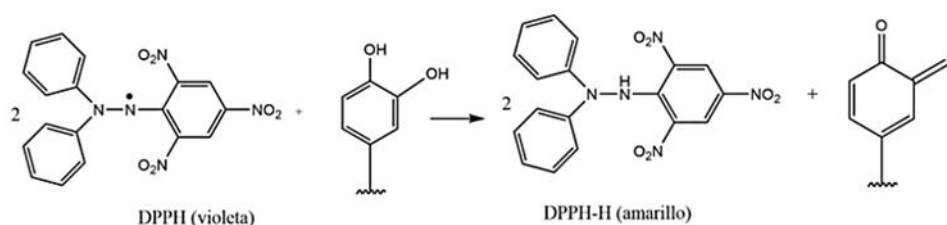
### 3.2.10 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante es una medida de la cantidad de radicales libres captados por una solución de prueba específica, independiente de la actividad de cualquier antioxidante presente en la muestra (Apak *et al.*, 2016). Entre las principales metodologías propuestas para determinar capacidad antioxidante, se encuentran: el ensayo de reducción del radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y capacidad antioxidante sobre el cobre (CUPRAC):

-Capacidad antioxidante según el método de reducción de DPPH

El ensayo DPPH es uno de los métodos más utilizados para evaluar la capacidad antioxidante, basado en la TE. Si bien es un método de TE, presenta a la vez un mecanismo de transferencia del átomo de hidrógeno, pero como una reacción secundaria. El DPPH es un radical cromógeno estable de color púrpura. El ensayo de captación de DPPH se basa en la donación de electrones por parte del antioxidante para neutralizar el radical DPPH (Fig. 21). La reacción es acompañada con una decoloración del DPPH indicando la eficacia del antioxidante (Shahidi & Zhong, 2015).

La capacidad antioxidante según el método de reducción de DPPH se determinó siguiendo las recomendaciones sugeridas por Chen *et al.* (2005). Se realizó una disolución del DPPH utilizando etanol 96° (0,1 mM). Se adicionó 100  $\mu\text{l}$  de la muestra a 900  $\mu\text{l}$  de la solución de DPPH, se incubó en la oscuridad durante 30 min y se midió la absorbancia a 515 nm. La curva estándar se realizó con ácido ascórbico (0,06-1 mM) y los resultados se expresaron en mg equivalentes a ácido ascórbico por 100 g de PS (mg EAA/100 g PS).



Fuente: Ocampo *et al.* (2015).

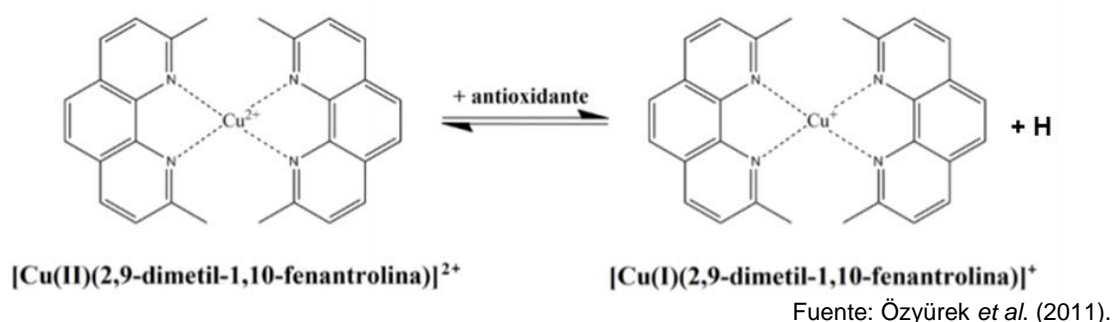
**Figura 21:** Mecanismo de la capacidad captadora de radicales de los compuestos fenólicos.

## -Capacidad antioxidante según el método CUPRAC

El ensayo CUPRAC se basa en una reacción de TE (Shahidi & Zhong, 2015). El método mide el poder reductor de los antioxidantes para convertir los iones cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) en cuproso ( $\text{Cu}^+$ ). La neocuproina (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) es el ligando empleado en este ensayo, utilizado para facilitar la medición de la absorbancia. El complejo de  $\text{Cu}^{2+}$ /neocuproina se puede reducir con antioxidantes a  $\text{Cu}^+$ /neocuproina, este cromóforo exhibe un máximo de absorción a 450 nm (Fig. 22) (Apak *et al.*, 2008).

El CUPRAC es un ensayo que determina la reducción del cobre como una variante del ensayo FRAP, el cual utiliza hierro (Shahidi & Zhong, 2015). La ventaja es que el cobre, ya sea en los complejos fenantrolina o libre, tiene un potencial redox menor que el hierro, esto hace que sus reacciones sean más selectivas. Logrando que los azúcares y ácidos cítricos, que actúan como interferentes en el ensayo FRAP, no se oxidan con el reactivo utilizado para CUPRAC (Prior *et al.*, 2005).

Se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos siguiendo las recomendaciones de Gouda & Amin (2010) con algunas modificaciones. Se preparó una mezcla de reacción con 400  $\mu\text{l}$  de neocuproina (5 mM en etanol), 600  $\mu\text{l}$  de buffer acetato de sodio (50 mM; pH 6) y 200  $\mu\text{l}$  de solución de cloruro cúprico (10 mM). Se adicionó 100  $\mu\text{l}$  de muestra a 900  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción, se incubó en la oscuridad durante 1 h y se midió la absorbancia a 450 nm. Se realizaron curvas estándares con ácido ascórbico como agente reductor (0,06-1 mM). Los resultados se expresaron como mg EAA/100 g PS.



**Figura 22:** Reacción del método CUPRAC.

### 3.3 Análisis microbiológico de los productos fermentados

Se realizó un análisis microbiológico de los productos obtenidos al final del proceso de fermentación. Se efectuó una dilución 1/10 de las muestras con agua peptonada (0,1% m/v) (Biokar, Beauvais, Francia) en bolsas estériles (Whirl-Pak®, Madison, EE. UU.) y

luego, se homogenizaron en un homogeneizador de paletas (Serviref, Argentina) durante 1 min. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas con agua peptona estéril (0,1% m/v) mediante el método de dilución en gota. El recuento de BAL se realizó en agar MRS suplementado con ácido nalidíxico (20 µg/ml) y nistatina (10 µg/ml), como inhibidores de bacterias Gram negativas y hongos/levaduras, respectivamente. La siembra se realizó en profundidad y las placas se incubaron durante 48 h a 30 °C. El recuento de aerobios totales se realizó en medio PCA (por su sigla en inglés Plate Count Agar) (Biokar, Beauvais, Francia) mediante siembra en profundidad y las placas se incubaron durante 48 h a 30 °C. Se utilizó agar Sabouraud con cloranfenicol (Biokar, Beauvais, Francia) para el recuento de hongos y levaduras; se realizó la siembra en superficie y las placas se incubaron durante 5 días a 25 °C. Por último, la determinación de coliformes totales se realizó en agar violeta rojo bilis lactosa (VRBL) (Biokar, Beauvais, Francia) mediante la siembra en doble capa, las placas se incubaron durante 24 h a 30 °C. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como log UFC/g.

### 3.4 Análisis sensorial de los productos fermentados

Se realizaron pruebas de aceptación de los productos fermentados siguiendo la metodología propuesta por Roberts & Kidd (2005) con algunas modificaciones. El análisis se efectuó en el Departamento de Industrias de la Universidad de Buenos Aires. Previamente al análisis sensorial, los productos fermentados se conservaron durante 7 días a 5 °C, periodo en el que se realizó el análisis microbiológico anteriormente descrito para establecer la seguridad de estos. El panel de evaluadores se conformó por 70 personas, los mismos eran estudiantes, profesores, investigadores y personal, todos mayores de 18 años de edad. Los panelistas recibieron tres muestras, identificadas con un código de dos dígitos, que presentaban 5 g de cada producto fermentado (AKU, RBU y RCU). Las muestras se exhibieron en pequeños recipientes plásticos transparentes con tapa y se sirvieron a temperatura ambiente (22 °C aprox.). Entre cada degustación, los jurados debieron limpiarse el paladar consumiendo un trozo de galletita sin sal y bebiendo un sorbo de agua. Se les solicitó a los jurados que calificaran la aceptabilidad general (olor y sabor) utilizando una escala hedónica de 7 puntos:

*1.Me disgusta mucho*

*2.Me disgusta*

*3.Me disgusta levemente*

*4.Ni me gusta ni me disgusta*

5. *Me gusta leve*

6. *Me gusta*

7. *Me gusta mucho*

Además, el panel calificó los atributos “salado” y “acidez” de los productos mediante la utilización de escala de punto ideal o Just-About-Right (JAR) de 5 puntos:

1. *Muy débil*

2. *Débil*

3. *Justo*

4. *Fuerte*

5. *Muy fuerte*

A continuación, se encuentra el enlace del formulario que completaron los panelistas [https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSdr9nuN7w8rcPKcnxpsroe6odLv3aMn1dkiYFBhxOrzCW2-8g/viewform?usp=sf\\_link](https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSdr9nuN7w8rcPKcnxpsroe6odLv3aMn1dkiYFBhxOrzCW2-8g/viewform?usp=sf_link)

### 3.5 Análisis de textura de los productos fermentados

El análisis de la textura de los productos fermentados se determinó en dos periodos, al finalizar la fermentación y luego de dos meses de almacenamiento a 5 °C. Se realizó un ensayo de retroextrusión mediante el uso de una máquina Universal de Testeo INSTRON (Modelo 3345, Instron Corp., Canton, MA, EE. UU.), utilizando una carga de 5.000 Newton (N) y equipado con vástago que en su extremo presentaba un cabezal circular de 35,70 mm de diámetro (Fig. 23). Las determinaciones se realizaron, al menos por quintuplicado. Se colocó 25 g de muestra en un vaso de acrílico de 40,05 mm de diámetro, el material se empaquetó con una varilla metálica a medida que se colocaba en el recipiente, resultando en una altura inicial ( $h_0$ ) de 30,0 mm. El espacio libre (gap) entre las paredes del vaso y el cabezal circular fue de 2,17 mm. El cabezal comprimió la muestra a una velocidad de 0,5 mm/s y se detuvo al alcanzar el 55% de compresión. Se registró la fuerza de deformación (N) en función de la extensión del cabezal (mm). Esta última, se convirtió a deformación utilizando el valor de  $h_0$  según:

$$\text{Deformación: } \frac{\text{Extensión (mm)}}{h_0(\text{mm})}$$

Mediante los valores de fuerza en función de la deformación, se determinó la fuerza de extrusión máxima. A partir de esta última, se calculó la firmeza como:

$$\text{Firmeza} = \frac{\text{Fuerza de extrusión máx (N)}}{\text{Deformación}}$$



**Figura 23:** Análisis de la textura de los productos fermentados mediante un texturómetro Universal de Testeo INSTRON equipado con un vástago de cabezal circular.

Por último, se obtuvo el porcentaje de ablandamiento durante el tiempo de almacenamiento de los productos a partir de la ecuación propuesta de Nugraedi *et al.* (2016):

$$\text{Ablandamiento (\%)} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{Fuerza máxima } T_n}{\text{Fuerza máxima } T_0} \right) \right] \times 100$$

### 3.6 Propiedades fisicoquímicas de los productos fermentados

Las siguientes determinaciones se realizaron durante dos periodos: al finalizar la fermentación  $T_0$  (tiempo de almacenamiento inicial) y luego de 2 meses de almacenamiento a 5 °C ( $T_1$ ).

#### 3.6.1 Acidez titulable

La acidez se determinó mediante el método de titulación potenciométrico (Neilsen, 1998). Se homogenizó 10 g del producto fermentado con una procesadora (300 rpm)

durante 2 min y se completó el volumen a 100 ml con AD. Posteriormente, se agregaron 3 gotas del indicador correspondiente y se realizó una titulación con NaOH (0,1N) hasta alcanzar un pH de 8,10-8,20 en cada muestra. Las soluciones indicadoras utilizadas dependieron del alimento a evaluar: fenolftaleína (1% m/v) (Biopack, Buenos Aires, Argentina) para RBU y AKU y azul de bromotimol (1% m/v en etanol) (Biopack, Buenos Aires, Argentina) para RCU. Si bien, la acidez se determinó por medición potenciométrica, se adicionaron las soluciones indicadoras para identificar el cambio de color preciso en cada alimento. El porcentaje de acidez titulable (expresada en gramos de ácido láctico en 100 g de muestra) se calculó mediante la siguiente fórmula (Khanna, 2019):

$$\% \text{ Acidez } \left( \frac{g_{\text{ác.láctico}}}{100 g_{\text{muestra}}} \right) = \frac{ml \text{ NaOH} \times 0,1 \text{ N NaOH} \times \text{factor mEq ác.láctico}}{\text{muestra (g)}} \times 100$$

### 3.6.2 Determinación pH, °Brix y actividad de agua

El pH de los alimentos fermentados se determinó directamente utilizando un pH-metro (Adwa Ad 1030, Szeged, Hungría). Los sólidos solubles totales, expresados en °Brix, se determinaron tomando una lectura directa de una gota de la muestra homogeneizada en un refractómetro óptico portable (Westover RHB-32ATC, Washington, EE. UU.) con un error de 0,2 °Brix. Por último, la actividad de agua ( $a_w$ ) se determinó en 1 g de muestra homogeneizada, utilizando un sensor higrométrico de punto de rocío (AQUA LAB S3, Pullman, EE. UU.). Se realizó una curva de calibración con tres soluciones saturadas de  $K_2SO_4$ ,  $KNO_3$  y KCl.

## 3.7 Reto microbiano

### 3.7.1 *Zygosaccharomyces bailii* NRRL-7256

Se determinó la viabilidad de la cepa *Zygosaccharomyces bailii* (NRRL-7256) en los productos RCU, luego de finalizar el periodo de fermentación. Para la preparación del inóculo de *Z. bailii* se sembró una alícuota en 10 ml de caldo Sabouraud (Biokar, Beauvais, Francia) y se incubó a 25 °C durante 24 h. Luego, se centrifugó a 7.000 rpm a 25 °C durante 15 min y se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió con agua peptona (0,1% m/v) (Biokar, Beauvais, Francia) y se ajustó a 0,50 unidades McFarland, utilizando un turbidímetro McFarland (Densichek®, Carolina del Norte, EE. UU.). Esta turbidez es equivalente a aproximadamente a  $10^6$  UFC/ml.

Posteriormente, se prepararon soluciones concentradas de natamicina (112,5 ppm y 225 ppm) (Handary, Bélgica) utilizando AD estéril con el pH ajustado a 3,70 con ácido láctico. Estas soluciones se esterilizaron a 100 °C durante 10 min (baño María) y luego, se dejaron en agitación durante 18 h a temperatura ambiente.

El material fermentado se dividió en cuatro bolsas estériles (Whirl-Pak®, Wisconsin, EE. UU.): muestra de control (C) y tres sistemas diferentes (S1, S2 y S3) inoculados con la cepa *Z. bailii*:

-C: 75 g del alimento fermentado, 2 ml de agua peptonada (0,1% m/v) y 5 ml de AD estéril (pH = 3,70).

-S1: 75 g del material fermentado suplementado con 2 ml de inóculo de *Z. bailii* (0,50 unidades McFarland) y 5 ml de AD estéril (pH = 3,70).

-S2: 75 g del producto fermentado suplementado con 2 ml de inóculo de *Z. bailii* (0,50 unidades McFarland) y 5 ml de la solución de natamicina 112,5 ppm (concentración final 7 ppm) (Natap®, Bruselas, Bélgica).

-S3: 75 g del material fermentado suplementado con 2 ml de inóculo de *Z. bailii* (0,50 unidades McFarland) y 5 ml de la solución de natamicina 225 ppm (concentración final 15 ppm).

Luego, las bolsas se colocaron en un homogeneizador de paletas (Serviref, Buenos Aires, Argentina) durante 1 min. El contenido de cada bolsa se dividió en 15 frascos (5 g c/u), los mismos se incubaron a 5 °C durante 50 días. A los días 0, 7, 14, 21, 28 y 50 se realizaron recuentos de levaduras y de BAL, siguiendo la metodología mencionada en “3.3 Análisis microbiológico de los productos fermentados”. El ensayo se realizó por triplicado.

### 3.7.2 *Listeria monocytogenes* Scott A y *Escherichia coli* ATCC 35218

Se evaluó la viabilidad de *L. monocytogenes* Scott A y *E. coli* ATCC 35218 como subrogante de las cepas patógenas durante el proceso de fermentación del RCU, de forma individual. Una alícuota de cada una cepa se adicionó a 2 ml caldo TS y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Luego, los cultivos se centrifugaron a 7.000 rpm a 25 °C durante 15 min y se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en igual volumen de agua peptonada (0,1% m/v) y se reservó para la inoculación de la matriz.

Luego se preparó una matriz de RCU siguiendo el mismo procedimiento descrito en “3.2.3 Modelos combinados, brasicáceas y *U. pinnatifida*”. Al inicio de la fermentación, la matriz se inoculó con el cultivo inicial mixto de *Leuconostoc* spp. ( $10^5$  UFC/g). Luego,

se realizaron dos sistemas y un control: S1 y S2, los cuales se inocularon con *E. coli* ATCC 35218 ( $10^4$  UFC/g) y *L. monocytogenes* Scott A ( $10^4$  UFC/g), respectivamente. Se fermentó durante 20 días a 18 °C; sin embargo, al tercer día todos los sistemas (S1 y S2) y el control se inocularon con el segundo cultivo iniciador de *Lactiplantibacillus* spp. ( $10^5$  UFC/g), siguiendo las mismas instrucciones descritas anteriormente para la fermentación controlada de RCU. El ensayo se realizó por triplicado.

Durante el proceso de fermentación se monitoreó el pH y la acidez titulable en el control, siguiendo la misma metodología mencionada en “3.6 Propiedades fisicoquímicas de los productos fermentados”. Por otro lado, se realizó el recuento de levaduras, coliformes totales, aerobios totales, BAL en el control siguiendo la metodología mencionada en “3.3 Análisis microbiológico de los productos fermentados”. Mientras que, se determinó el recuento *E. coli* y *L. monocytogenes* Scott A, en los sistemas S1 y S2, respectivamente; además del monitoreo de BAL. La determinación de *E. coli* se realizó en agar Levine E.M.B (con Eosina y Azul de Metileno) (Britania, Buenos Aires, Argentina) mediante la siembra en superficie, las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C. La determinación de *Listeria* se determinó en agar Palcam (Biokar, Beauvais, Francia) realizando una siembra en superficie, las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C.

### 3.8 Contenido total de fenoles y capacidad antioxidante del RCU almacenado

El alimento fermentado se envasó en frascos de vidrio de 250 ml con tapa metálica, previo a su almacenamiento. Se determinó el CTF y la capacidad antioxidante del RCU al finalizar el periodo de almacenamiento, 50 días a 5 °C. Los extractos acuoso y metanólico se realizaron según lo mencionado en “3.2.8 Preparación de los extractos”. Luego, el CTF y la capacidad antioxidante de los extractos se determinaron según lo descrito en “3.2.9 Contenido total de fenoles (CTF)” y “3.2.10 capacidad antioxidante”.

### 3.9 Análisis estadístico

Las determinaciones cualitativas se realizaron por duplicado, mientras que, los ensayos cuantitativos se llevaron a cabo por triplicado, salvo que se mencione lo contrario. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de uno y dos factores con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0,05. El ANOVA de un factor se realizó para evaluar el efecto del tiempo y tipo de vegetal sobre las BAL, pH, CTF, DPPH y CUPRAC. El ANOVA de dos factores se utilizó sobre las variables CTF, DPPH y CUPRAC para evaluar la existencia de efectos del tipo de fermentación, el tiempo y su interacción, particionando por el tipo de extracto y vegetal. Las diferencias significativas entre las medias se

determinaron mediante la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). El software estadístico InfoStat se utilizó para el análisis estadístico.

En el caso del análisis sensorial se realizó un análisis estadístico específico:

En primer lugar, se determinó el promedio de las puntuaciones de aceptabilidad de cada atributo (acidez y salado), en forma independiente para cada producto fermentado (AKU, RBU, RCU). Se estimó el índice de aceptación de cada producto, mediante el porcentaje de panelistas que evaluaron con una puntuación  $\geq 5$  en la escala hedónica cada atributo. Luego, a partir de los datos obtenidos de la escala JAR, se calculó el porcentaje de panelistas que seleccionaron los diferentes niveles en dicha escala para cada atributo (salado y acidez), reduciendo la escala de 5 a 3 puntos: “demasiado débil” (puntuación=1 y 2) “JAR” (puntuación=3), y “demasiado fuerte” (puntuación= 4 y 5) siguiendo las recomendaciones de (Li *et al.*, 2014). Se realizó un ANOVA para determinar diferencias significativas y una prueba de Tukey para evaluar las diferencias entre las medias ( $\alpha \leq 0,05$ ).

Por otro lado, se realizó un análisis de penalización para identificar disminuciones en la aceptabilidad global del producto asociadas con los atributos sensoriales que no se encuentran en niveles óptimos (Iserliyska *et al.*, 2017). Este análisis se realizó para cada producto (AKU, RBU y RCU) y atributo (salado y acidez), de forma independiente. Los consumidores se dividieron en tres grupos según la respuesta dada a cada atributo JAR (es decir, “demasiado débil/ débil” (puntuación 1 y 2), “justo” (puntuación 3) y “fuerte/ demasiado fuerte” (puntuación 4 y 5)). Se calculó el porcentaje de consumidores en cada una de las 3 categorías y se estimaron las puntuaciones medias correspondientes de aceptación global en cada grupo: “demasiado débil” ( $M_{dd}$ ), JAR ( $M_{JAR}$ ), “demasiado fuerte”  $M_{df}$ . Luego, las penalizaciones se calcularon de la siguiente manera:

$$\text{Penalización } dd = M_{JAR} - M_{dd}$$

$$\text{Penalización } df = M_{JAR} - M_{df}$$

Por último, se determinó la desviación de cada observación de JAR para los dos atributos valorados (salado y acidez) siguiendo la metodología propuesta por (Gacula *et al.* (2007). Durante este análisis se generaron dos conjuntos de datos, un grupo de valores que se encuentran por debajo de la categoría JAR y otro que comprende las

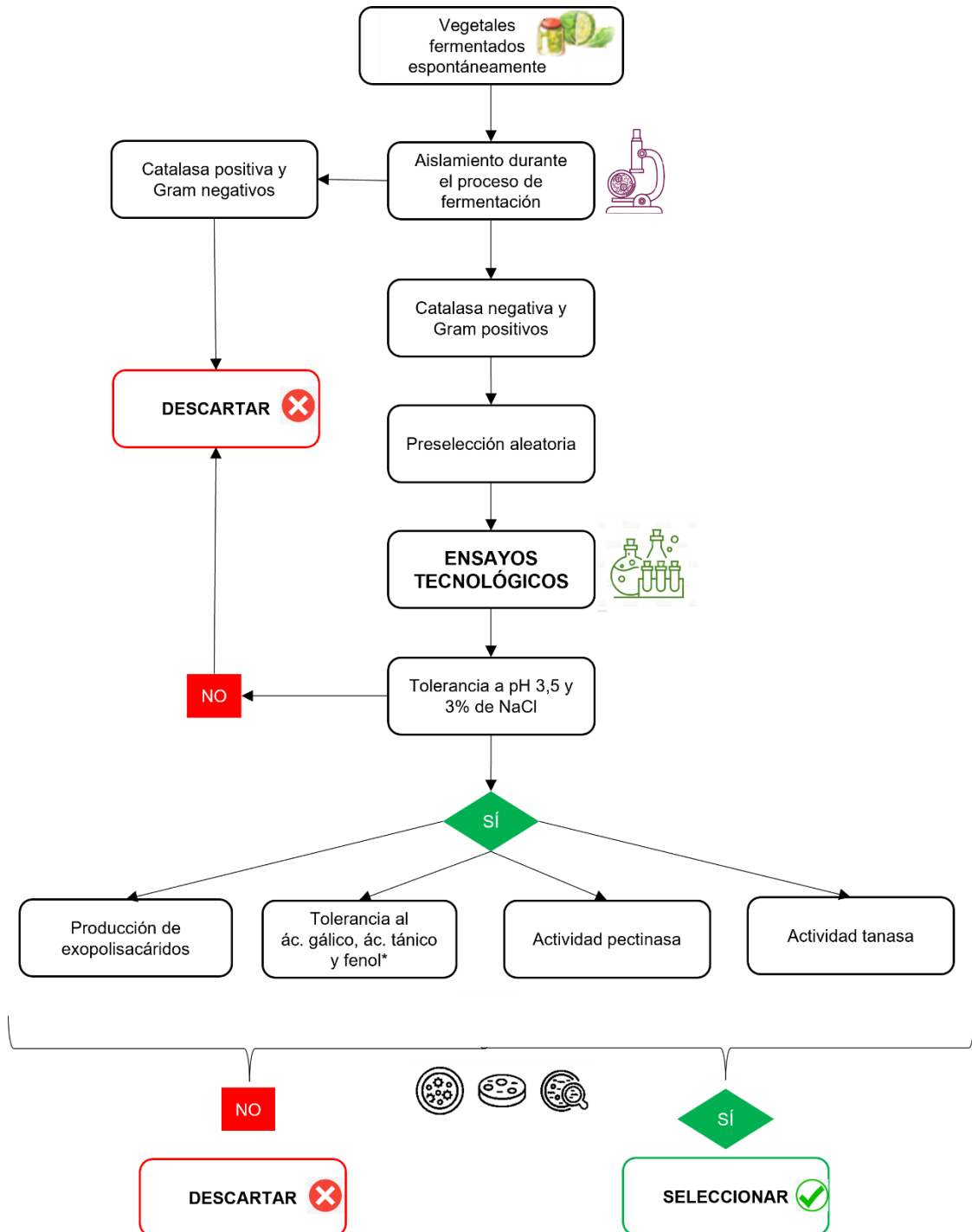
puntuaciones por encima de la misma. Se realizó un ANOVA bidireccional en cada conjunto de datos para separar los productos en grupos significativos ( $\alpha \leq 0,05$ ).



## 4. *RESULTADOS Y DISCUSIÓN*

#### 4.1 Protocolo de aislamiento y selección de BAL

Se realizó el aislamiento y selección de BAL autóctonas a partir de fermentaciones espontáneas de *Brassica*, respetando el siguiente protocolo (Fig. 24):



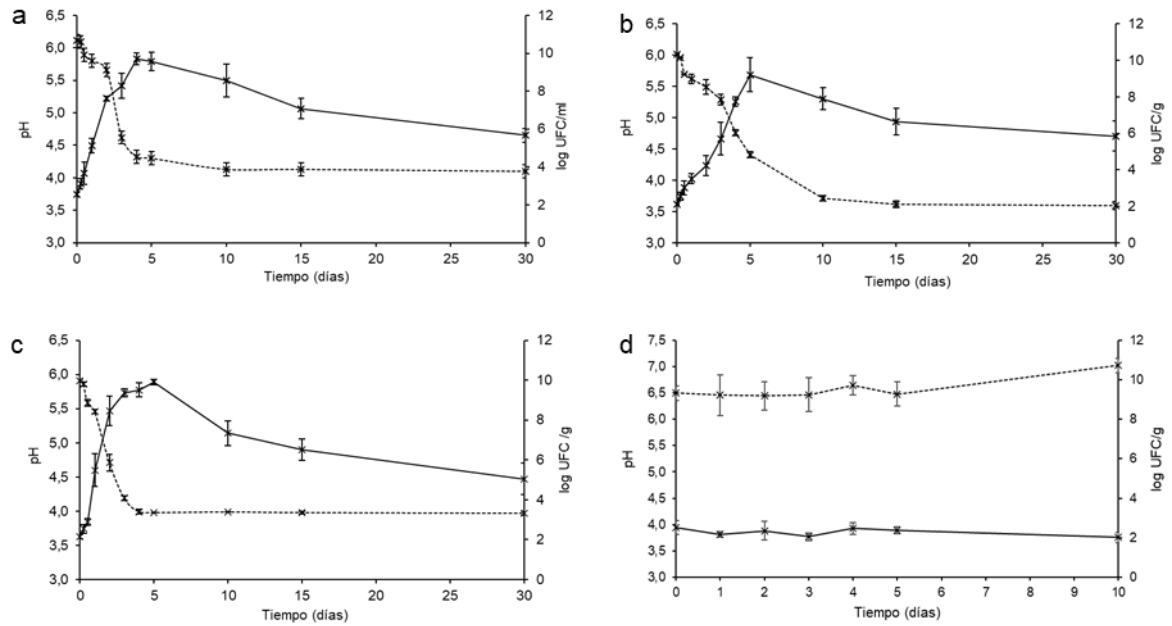
**Figura 24:** Esquema general del aislamiento y estudio de las propiedades tecnológicas de las cepas. \*La tolerancia a fenol no fue una condición *sine qua non* para el grupo de BAL heterofermentativas estrictas debido a su elevada sensibilidad.

## 4.2 Parámetro de fermentación

El recuento de BAL y el pH se utilizaron para monitorear la evolución del proceso de fermentación. En la fermentación espontánea de AK, RB y RC se observó la misma tendencia, un incremento de la población de BAL acompañado de un descenso de pH durante la etapa inicial del proceso (Fig. 25a-c). Mientras que, en la matriz de PC las BAL no se desarrollaron favorablemente y como consecuencia el pH no descendió; este ensayo se finalizó con anterioridad (10 días) por la presencia de microorganismos deteriorantes (mohos y levaduras) (Fig. 25d). El PC contiene una menor proporción de carbohidratos (2,18 g/100 g) que los otros vegetales *Brassica* utilizados (AK: 3,23 g/100 g; RB: 5,8 g/100 g; RC: 7,37 g/100 g) (USDA, 2019), razón por la cual pudo afectar el desarrollo de las BAL.

En la matriz inicial de los cuatro vegetales se observó un pH similar, entre 6,0 a 6,5. Las fermentaciones espontáneas de AK y RC exhibieron una disminución similar en el pH. En ambos, los valores más bajos se observaron en el día 4 y se mantuvieron estables durante 30 días (Figs. 25a y 25c). El RB no exhibió una disminución brusca del pH durante el inicio de la fermentación, sin embargo, a los 10 días alcanzó valores de  $3,71 \pm 0,04$ , inferiores que los obtenidos en AK ( $4,13 \pm 0,08$ ) y RC ( $3,99 \pm 0,01$ ) (Figs. 25b vs 25a y 25c).

Se determinó una población de BAL inicial similar entre los cuatro vegetales (2,1-2,5 log UFC/g). Estos valores son similares a los reportados previamente (Beganović *et al.*, 2014; Di Cagno *et al.*, 2013). A excepción del PC, las demás brasicáceas exhibieron su máximo recuento de BAL entre los días 4 y 5 del proceso espontáneo. Luego, la población de BAL comenzó a descender paulatinamente hasta el día 30, alcanzando valores comprendidos entre 5-6 log UFC/g en todos los vegetales, a excepción del PC donde se mantuvo al nivel inoculado (Fig. 25). Es escasa la bibliografía científica encontrada sobre el procesamiento de esta especie; Harbaum *et al.* (2008) recomiendan realizar un secado de las hojas al sol durante 2 días para reducir el contenido de agua un 50% previo a la fermentación. Mediante este tratamiento se incrementaría la concentración de carbohidratos y nutrientes disponibles en matriz y modificaría posiblemente la evolución de la fermentación.



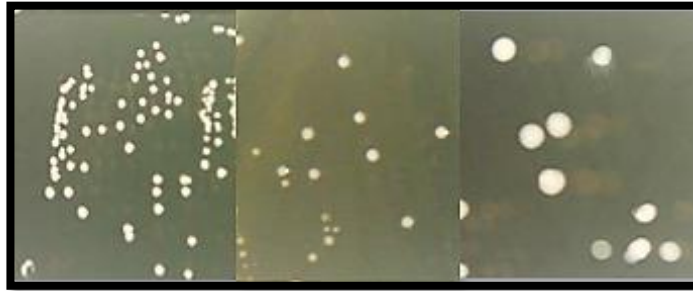
**Figura 25:** Recuento total de BAL (-) y monitoreo de pH (---) en los vegetales *Brassica*, durante la fermentación espontánea de AK (a), RB (b), RC (c) y pak choi (d). Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de dos mediciones.

### 4.3 Obtención de cepas de BAL

Se aislaron 435 cepas durante el proceso de fermentación espontánea a partir de los cuatro vegetales utilizados. Los mayores porcentajes de los aislamientos se obtuvieron con MRSV (41,4%) y MRS (40,3%), este es uno de los medios más utilizados para el aislamiento de BAL, principalmente del género *Lactiplantibacillus* (DeMan *et al.*, 1972). El MRSV exhibió un porcentaje similar de aislamiento que el MRS, la “insensibilidad” de algunos géneros y especies de BAL a la vancomicina es considerada una resistencia intrínseca (natural). Muchas especies pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* (antigua clasificación) y *Leuconostoc* exhiben esta resistencia como consecuencia de la ausencia del dipéptido D-alanina-D-alanina, que en estos microorganismos se sustituye de forma natural por D-alanina-D-lactato (Elisha & Courvalin, 1995). Mientras que, los menores porcentajes de aislamientos se obtuvieron con BE (14,19%) y MRSNaCl (4,12%). En general, la gran mayoría de las BAL logran tolerar las variaciones de la presión osmótica y se adaptan a los cambios de la concentración de solutos en el medio, sin embargo, el menor porcentaje de BAL se aisló con MRSNaCl (8% NaCl). Balatsouras (1985) determinó que una concentración de NaCl al 6% produce una inhibición del 33,3% de las cepas mientras que, al 8% (NaCl) sólo sobreviven un 10% de las mismas, considerándose esta concentración el límite superior para el crecimiento de BAL. Por otro lado, el medio BE es recomendado para el aislamiento e identificación presuntiva de estreptococos del grupo D (Lindell & Quinn, 1975); los cuales, no se encuentran

dentro de los principales géneros aislados a partir de frutas y vegetales fermentados espontáneamente (Di Cagno *et al.*, 2013).

El aspecto de las colonias en los medios de cultivos se observó muy diverso, algunas de color blanco intenso, convexas y opacas, otras de color crema, planas y muy brillantes (Fig. 26).



**Figura 26:** Morfología de las colonias de BAL en agar MRS.

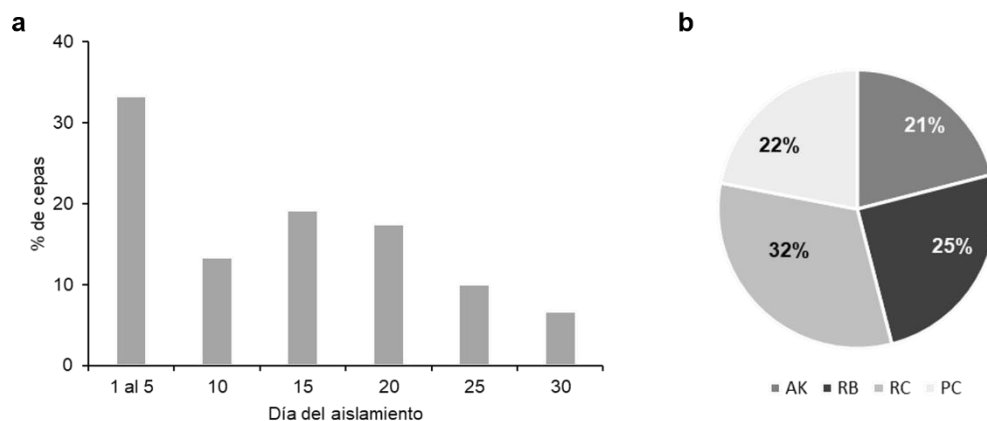
#### 4.3.1 Identificación presuntiva de los aislamientos

Las 435 cepas obtenidas de diferentes medios se purificaron mediante sucesivos repiques y se sometieron a una identificación presuntiva. Se conservaron 407 cepas por duplicado y se descartaron 28 microorganismos que resultaron Gram negativos/catalasa positiva/oxidasa positiva. Del total de cepas conservadas (407), 130, 110, 98 y 69 se aislaron de AK, RC, RB y PC, respectivamente. Se observó un menor número de BAL aisladas desde PC, ya que este finalizó con anterioridad por la presencia de microorganismos deteriorantes (mohos y levaduras).

La tinción de Gram permitió determinar la morfología celular de las cepas aisladas. En mayor proporción se observó bacilos rectos, en parejas y/o en cadenas cortas o largas, algunos mostraron morfología de coco-bacilos, otros bacilos largos de pequeño grosor; y en el menor porcentaje, bacilos con una ligera curvatura. Simultáneamente, se determinó que la morfología de los microorganismos acompañó las etapas de fermentación, observando los primeros días bacterias con forma de coco y/o coco-bacilos mientras que, en las etapas intermedias y finales presentaban estructuras de bacilos característicos.

Se realizó una preselección aleatoria y manual de 120 cepas, provenientes de los cuatro vegetales fermentados abarcando todas las etapas de fermentación (Fig. 27). Se obtuvo un mayor porcentaje de cepas seleccionadas entre el día 1 y 5 (Fig. 27a), ya que durante este periodo se alcanzó una mayor población de BAL en todos los vegetales estudiados, excepto en PC (Fig. 25). Las BAL seleccionadas abarcaron todos los días de muestreos

(1-5; 10, 15, 20, 25, 30) discriminado por cada vegetal fermentado, excepto para PC donde el ensayo finalizó con anterioridad.



**Figura 27:** Porcentaje de cepas seleccionadas aleatoriamente, a) en los distintos periodos de fermentación y b) por cada matriz vegetal fermentada espontáneamente (AK, RB, RC, PC).

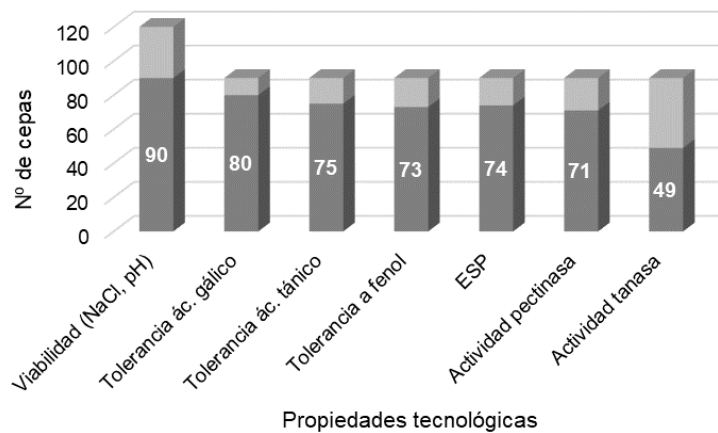
Los resultados de producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa permitieron establecer dos grandes grupos, discriminando el tipo de metabolismo como homofermentativo y heterofermentativo, con 70 y 50 cepas respectivamente. Generalmente, la producción de chucrut se basa en un proceso microbiano secuencial que involucra BAL hetero y homofermentativas, como *Leuconostoc* spp. y *Wissella* spp. en la etapa temprana y *Lactobacillus* spp. (antigua clasificación), *Lactococcus lactis* y *Pediococcus* spp. en las fases posteriores (Di Cagno *et al.*, 2016).

#### 4.4 Estudio de las propiedades tecnológicas.

##### 4.4.1 Evaluación de la viabilidad

La concentración de sal y pH son factores críticos en el desarrollo de la fermentación de vegetales. El NaCl induce la plasmólisis en las células vegetales, liberando sales minerales y nutrientes de la vacuola al medio externo, creando condiciones anaeróbicas para el desarrollo adecuado de las BAL. Luego, el pH influye en la conservación y desarrollo del aroma y sabor de muchas frutas y verduras fermentadas como repollo, aceitunas, etc. (Muyanja *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2004). En este trabajo, se evaluó la tolerancia de las cepas frente a las condiciones imperantes durante la fermentación: pH 3,5 y 3,0% de NaCl. Los resultados cualitativos mostraron que el 75% de las cepas (90/120) presentaron tolerancia al NaCl (3,0%, m/v) y pH 3,5 de forma conjunta (Fig. 28). Las BAL presentan ventajas sobre otras especies menos tolerantes, permitiéndole su proliferación y la producción de ácido láctico durante las primeras etapas de la fermentación, y consecuentemente la inhibición del crecimiento de organismos no

deseables. Entre las cepas tolerantes (90), 58 y 32 presentaron un metabolismo homofermentativos y heterofermentativas, respectivamente. Las condiciones impuestas en este ensayo inhibieron en mayor proporción el grupo de cepas heterofermentativas (32/50) que a las homofermentativas (58/70). Entre las BAL heterofermentativas estrictas, se encuentra el género *Leuconostoc* sp., el cual se caracteriza por su sensibilidad a los ácidos y su crecimiento se ve inhibido notablemente por un pH inferior a 5,0 (Endo *et al.*, 2020). No obstante, para compensar esta deficiencia, se sugiere seleccionar cepas con resistencia a la acidez, mejorando de esta forma la utilidad de la cepa como iniciador (Peñas *et al.*, 2010).

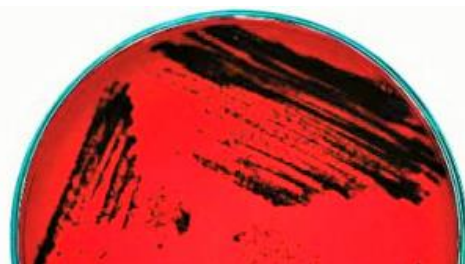


**Figura 28:** Propiedades tecnológicas evaluadas a la preselección de BAL: números de cepas que presentaron resultados positivos para cada ensayo realizado.

Los siguientes ensayos se realizaron con la preselección de 90 cepas de BAL.

#### 4.4.2 Producción de EPS

Actualmente, existe un mayor interés en la producción de EPS por medio de las BAL involucradas en la fermentación de frutas y vegetales, ya que generan efectos positivos sobre las características sensoriales del alimento y la salud del consumidor. Los EPS provocan cambios reológicos en las matrices vegetales, modificando tanto la viscosidad como la textura, mejorando la palatabilidad del alimento (Guérin *et al.*, 2020). Además, los EPS tienen una variedad de efectos que promueven la salud, como la reducción del colesterol, antitumorales, inmunomoduladores, propiedades antioxidantes, etc. (Chen & Hang, 2019). Por lo tanto, la elección de cultivos iniciadores productores de EPS ofrece varias ventajas sobre los que no producen. En este estudio, se detectó la producción de EPS en forma cualitativa en 74/90 cepas (Fig. 28), las cuales exhibieron una coloración negra en el medio suplementado con rojo Congo (Fig. 29). En la producción de EPS, los géneros de BAL más representativos son *Streptococcus*, *Lactiplantibacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Patel & Prajapati, 2013).



**Figura 29:** Cepas de BAL productoras de EPS en agar BHI suplementado con rojo Congo.

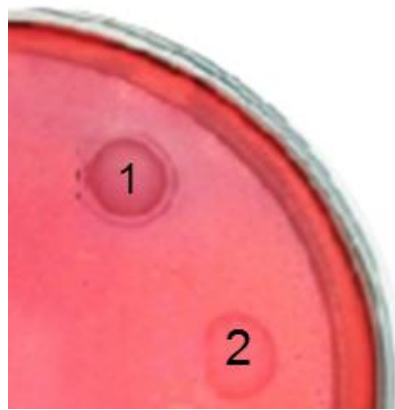
#### 4.4.3 Tolerancia a distintos compuestos fenólicos

Se determinó el efecto del ácido tánico, ácido gálico y fenol, de forma individual, sobre el crecimiento de las cepas (90). La tolerancia de las BAL se observó variable frente a los distintos compuestos, 80, 75 y 73 cepas presentaron tolerancia al ácido gálico, ácido tánico y fenol, respectivamente (Fig. 28). Se observó que las cepas heterofermentativas presentaron mayor sensibilidad al fenol (17/73) que las homofermentativas (56/73). Las especies heterofermentativas estrictas como los *Leuconostoc* sp. son predominantes en las primeras etapas del proceso, luego la población disminuye a medida que avanza la fermentación y los *Lactiplantibacillus* sp. aumentan notablemente en las siguientes etapas (Di Cagno *et al.*, 2013). Este comportamiento se puede atribuir a la baja resistencia que exhiben las especies heterofermentativas (ej. *Leuconostoc*) frente a los compuestos fenólicos, ya que estos valores de pH bajos incrementan su actividad antimicrobiana. Algunas especies de BAL, tales como *L. brevis*, *L. fermentum* y *L. plantarum* metabolizan los ácidos fenólicos por descarboxilación y/o reducción; siendo este el principal mecanismo utilizado para la desintoxicación de compuestos nocivos encontrados en sustratos de plantas (Rodríguez *et al.*, 2009). Sin embargo, la tolerancia de las BAL a los ácidos fenólicos y su capacidad para metabolizarlos no solo es dependiente de la especie, sino también de la cepa (Cuevas *et al.*, 2010). La biotransformación de los compuestos fenólicos es uno de los metabolismos más relevantes de las BAL durante la fermentación de vegetales. Bajas concentraciones de polifenoles estimulan el crecimiento de las BAL mientras que, concentraciones elevadas afectan la viabilidad y retardan el metabolismo de los carbohidratos (Rodríguez *et al.*, 2009). Por este motivo, es recomendable que las cepas de BAL seleccionadas para conformar los inóculos iniciales en matrices vegetales toleren altas concentraciones de fenoles, para poder alcanzar un desarrollo y actividad óptima durante el proceso de fermentación. Diferentes especies prevalentes en matrices vegetales han desarrollado el metabolismo de los polifenoles como un mecanismo de detoxificación y mantenimiento del balance energético, alcanzando una alta tolerancia a estos compuestos (Rodríguez *et al.*, 2009). El metabolismo de los polifenoles cumple una

función biológica para las BAL, pero sus efectos en el consumidor dependen de los productos obtenidos mediante el metabolismo microbiano. La biodisponibilidad de polifenoles producen efectos beneficios sobre la salud del consumidor, ya que exhiben actividad antioxidante e inmunomodulante (Shahidi & JuDong, 2018), propiedades esperadas de un alimento funcional.

#### 4.4.4 Actividad pectinasa

La actividad pectinasa se exhibió en 71/90 cepas usando el ensayo en placa con una tinción posterior de rojo Congo (Figs. 28 y 30). La hidrólisis de la pectina se identificó por la presencia de zonas claras alrededor de las colonias, como consecuencia de la interacción del rojo Congo con las unidades (1→4)-β-D-glucanos, (1→4)-β-D-xilano y (1→4)-α D-poligalactopironosil ácido urónico (Vidhyasagar *et al.*, 2013).

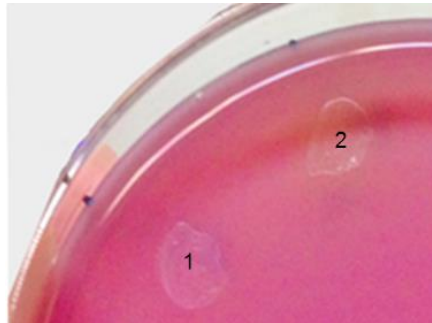


**Figura 30:** Actividad pectinasa de las BAL. 1: cepa con actividad positiva, 2: cepa con actividad pectinasa negativa.

La principal fuente de pectinasas industriales son los microorganismos, de los cuales, el 50% son originadas por hongos y levaduras y el 35% por bacterias; mientras que sólo el 15% es de origen vegetal y animal (Anisa & Girish, 2014). Estas enzimas contribuyen al ablandamiento de los tejidos vegetales y permiten la liberación de compuestos nutritivos. Las pectinasas microbianas descomponen las pectinas presentes en los tejidos vegetales en ácido galacturónico, provocando un aumento de las fuentes de carbono (Chatterjee *et al.*, 2016). Las enzimas extracelulares microbianas se caracterizan por ser estables en un amplio rango de temperatura y pH (Garg *et al.*, 2016), generando como consecuencia una ventaja energética de estos microorganismos para su desarrollo durante el proceso de fermentación de los alimentos.

#### 4.4.5 Actividad tanasa

Los taninos son polifenoles solubles en agua y pueden estar presentes en una variedad de alimentos de origen vegetal. Estos compuestos tienen la capacidad de unirse a las proteínas formando complejos no digeribles (Jiménez *et al.*, 2014). Aunque los taninos tienen efectos tóxicos sobre varios organismos, algunas BAL son resistentes y tienen la capacidad de degradarlos en compuestos más sencillos, como el ácido gálico (Olivas-Aguirre *et al.*, 2015). En este estudio, 49 cepas exhibieron actividad tanasa mediante el ensayo realizado en placa (Fig. 28). Estos microorganismos lograron fermentar la glucosa, obtenida mediante la hidrólisis del ácido tánico, provocando un cambio de color en el medio circundante a la colonia debido al descenso de pH (de violeta a amarillo) (Fig. 31).



**Figura 31:** Método cualitativo de actividad tanasa de BAL. 1: cepa sin actividad; 2: cepa con actividad positiva, el medio vira a amarillo por la fermentación de la glucosa obtenida de la hidrólisis del ácido tánico.

Se han reportado distintas especies de BAL con actividad tanasa pertenecientes a los géneros: *Leuconostoc*, *Lactiplantibacillus*, *Pediococcus* y *Oenococcus* (Aguilar, Rodríguez, Gutiérrez-Sánchez, Augur, *et al.*, 2007). *L. plantarum* es una de las especies más frecuentemente aislada en productos vegetales fermentados y es productora de tanasa, esta enzima se caracteriza por presentar el 50% de actividad entre 4 y 60 °C y es estable en un rango de pH 4,5-8,0 (Jiménez *et al.*, 2014); estos valores concuerdan con las condiciones imperantes durante la fermentación vegetal.

Si bien, la producción de tanasa se aplica mayormente en la producción de bebidas (te, café, vinos) como agente clarificante, también se recomienda que esté presente en la elaboración de vegetales fermentados como el chucrut, kimchi, etc. (Aguilar *et al.*, 2007). La actividad tanasa bacteriana presente en la matriz vegetal consigue disminuir la formación de compuestos antinutricionales e incrementar la disponibilidad de carbohidratos, favoreciendo el desarrollo de BAL durante el proceso de fermentación.

Sobre la base del estudio de las propiedades tecnológicas se obtuvieron 45 cepas que exhibieron resultados positivos para el ensayo de viabilidad (NaCl 3%; pH 3,5),

tolerancia a los polifenoles estudiados, producción EPS, actividad pectinasa y tanasa. Sin embargo, la tolerancia a fenol no fue una condición *sine qua non* para el grupo de BAL heterofermentativas debido a su sensibilidad ya mencionada.

#### 4.5 Determinación de factores de virulencia y/o rasgos negativos

Las BAL históricamente se han utilizado en la elaboración de distintos productos y por ese motivo son consideradas inocuas para su incorporación a alimentos y han recibido el estatus de GRAS y QPS otorgado por la FDA y EFSA, respectivamente. Las BAL, a excepción de los enterococos, rara vez producen infecciones y ocurre cuando, la inmunidad está disminuida por alguna causa subyacente (Franz *et al.*, 2010). Actualmente, nuevas cepas destinadas a la biotecnología de alimentos, tanto para consumo humano como para el uso en animales, deben superar las pruebas de seguridad propuestas por la FDA. Incluso cuando la uniformidad en los procedimientos de prueba y los criterios clave de seguridad no se han establecido en todo el mundo, la caracterización de seguridad de nuevas cepas generalmente se enfoca en las características tales como resistencia antibiótica (transferible), hemólisis, actividad gelatinasa y producción de aminas biogénicas (Ji *et al.*, 2013).

##### 4.5.1 Actividad gelatinasa y hemolítica

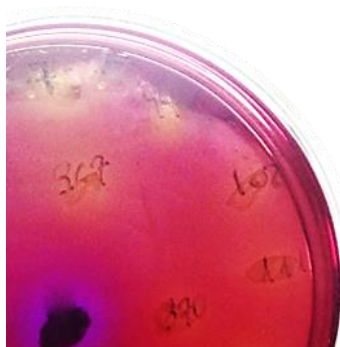
Las 45 cepas de BAL no mostraron actividad gelatinasa ni hemolítica; condición *sine qua non* para su utilización como starter en la industria alimentaria.

##### 4.5.2 Producción de aminas biógenas

Las AB exógenas derivan de la descarboxilación bacteriana de los aminoácidos correspondientes, a través de enzimas descarboxilasas, y pueden generar diferentes reacciones en los consumidores. La histamina y la cadaverina se forman a partir de la histidina y la lisina, mediante la actividad de la histidina descarboxilasa y la lisina descarboxilasa, respectivamente; mientras que, la tirosina se convierte en tiramina por la tirosina descarboxilasa (Silla Santos, 1996). En este estudio, se evaluó de forma cualitativa la producción de histamina, cadaverina y tiramina por parte de las BAL seleccionadas (Fig. 32). Se determinó que las cepas no exhibieron producción de tiramina ni cadaverina, sin embargo, todas resultaron positivas para histamina.

Por lo general, las BAL producen AB para sobrevivir durante la fermentación de alimentos como queso, salchichas y vegetales fermentados (Barbieri *et al.*, 2019). No obstante, los resultados positivos para histamina no necesariamente implican que las cepas de BAL exhiban este comportamiento en la matriz a fermentar, ya que existen diferentes factores (NaCl, glucosa, temperatura, etc.) que condicionan la producción de

AB (Bover-Cid *et al.*, 2014). Estudios previos han examinado el contenido de AB en chucrut comercial y los resultados varían ampliamente, dependiendo de las condiciones de fermentación y el tratamiento posterior al proceso (pasteurización y esterilización). En el futuro, se debería evaluar la concentración de histamina en los productos fermentados para determinar su nivel de toxicidad. Recientemente, la EFSA (2011) realizó una evaluación cualitativa del riesgo de AB en alimentos fermentados en la Unión Europea, indicando las concentraciones que podrían inducir efectos adversos en los consumidores.



**Figura 32:** Prueba de producción de AB de las cepas seleccionadas. Colonias amarillas: producción negativa; colonia violeta: producción positiva.

#### 4.6 Segunda selección de las cepas

Se realizó una segunda selección de 15 cepas de BAL sobre la base de los resultados obtenidos de las propiedades tecnológicas y la ausencia de factores de virulencia (a excepción de la producción de histamina).

#### 4.7 Identificación molecular de las BAL seleccionadas

La identificación genotípica de las cepas seleccionadas se realizó mediante la amplificación del gen que codifica para ARNr 16S y su posterior secuenciación. La identificación de las secuencias se determinó mediante las herramientas BLAST y SeqMach de la base de datos GenBank y RDP, respectivamente. Se obtuvo que, de las 15 BAL, cuatro pertenecieron al género *Leuconostoc*: las cepas RCTw1.1 y AKTw35 se identificaron como *Ln. mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii*; mientras que, RCTw13 y RBTw100 mostraron similitud con *Ln. mesenteroides* ssp. *dextranicum* (Tabla 8). Es necesario señalar que *Ln. mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* ha sido aceptada como nueva subespecie desde 2017, después del análisis de su secuencia genómica completa, y actualmente la cepa DRC-1506 se encuentra comercializada a través de Daesang Company, el propietario de la patente (Jeon *et al.*, 2017). La cepa *Ln. mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* DRC-1506 se recomienda como starter en la elaboración de kimchi debido al desarrollo de propiedades sensoriales

significativamente excelentes en comparación con a la fermentación espontánea. Por otro lado, las 11 BAL restantes pertenecieron al género *Lactiplantibacillus* donde, una (AKTw332), cuatro (RCTw106, AKTw180, RBTw256, AKTw335) y seis cepas (RBTw102, AKTw111, RCTw112, RBTw249, PCTw261 y PCTw270) se identificaron como *L. pentosus*, *L. plantarum* y *L. argentoratensis*, respectivamente (Tabla 9). Entre los principales géneros involucrados en la producción de chucrut, se encuentra *Leuconostoc* spp. en la fase temprana y *Lactiplantibacillus* spp. en las fases posteriores (Di Cagno *et al.*, 2016). Todas las secuencias se cargaron en la base de datos, en la Tabla 9 se observan los números de acceso a GenBank asignado a cada una.

**Tabla 9:** Identificación molecular de las 15 cepas de BAL seleccionadas.

Cepa ID	Nº pb (gen ADNr 16S)	Taxones estrechamente relacionados	Identidad (%)	Nº acceso-GenBank
RCTw1.1	1219	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>jonggajibkimchii</i> DRC-1506	100	MT702992
RCTw13	1293	<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i> NCFB-529	100	MT178433
AKTw35	1314	<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>jonggajibkimchii</i> DRC-1506	100	MT178434
RBTw100	1254	<i>Ln mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i> NCFB-529	100	MT178435
RBTw102	1367	<i>Lactiplantibacillus argentoratensis</i> DSM-16365	99,06	MT178436
RCTw106	1248	<i>L. plantarum</i> NRRL-B-14768	98,45	MT178437
RCTw111	1247	<i>L. argentoratensis</i> DSM-16365	97,11	MT178438
AKTw112	1266	<i>L. argentoratensis</i> DSM-16365	97,78	MT178439
AKTw180	1322	<i>L. plantarum</i> NRRL-B-14768	100	MT178440
RBTw249	1308	<i>L. argentoratensis</i> DSM-16365	97,70	MT178441
RBTw256	1341	<i>L. plantarum</i> NRRL-B-14768	99,85	MT178442
PCTw261	1366	<i>L. argentoratensis</i> DSM-16365	99,49	MT178443
PCTw270	1325	<i>L. argentoratensis</i> DSM-16365	98,19	MT178444
AKTw332	1319	<i>L. pentosus</i> JCM-1558	98,63	MT178445
AKTw335	1345	<i>L. plantarum</i> NRRL-B-14768	99,18	MT178446

## 4.8 Caracterización tecnológica de las BAL seleccionadas

### 4.8.1 Prueba de antagonismo

Las cepas de BAL seleccionadas exhibieron compatibilidad entre sí, ya que ninguna logró inhibir el crecimiento de la otra. Esta condición se debe cumplir entre las cepas que van a conformar los cultivos iniciadores, para garantizar su desarrollo durante el proceso de fermentación.

### 4.8.2 Producción de bacteriocinas

En los últimos años, se ha explorado el potencial de las BAL como bioconservadoras naturales en matrices vegetales, debido a la producción de diversos metabolitos, entre los cuales se encuentran las bacteriocinas. Éstas se definen como péptidos antimicrobianos de origen ribosomal que son secretados al medio extracelular y tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos (Mokoena, 2017). Una de las propiedades tecnológicas esperadas en un cultivo iniciador es la producción de este tipo de compuestos antimicrobianos (Blajman & Zárate, 2020). Se evaluó la actividad de los SLC de las cepas seleccionadas frente a diferentes microorganismos blancos, tanto bacterias patógenas Gram positivas como negativas. Las cepas pertenecientes al género *Leuconostoc* no exhibieron actividad frente a ninguna cepa blanco evaluada. Mientras que, algunas de las cepas de *Lactiplantibacillus* solo mostraron actividad frente a patógenos Gram positivos (Tabla 10). Las cepas *L. argentoratensis* RBTw102, AKTw112 y RBTw249 exhibieron actividad frente a diferentes cepas de *L. monocytogenes* y *L. innocua*. Mientras que, las cepas *L. plantarum* RCTw106 y *L. pentosus* AKTw332 solo mostraron actividad frente a cepas de *L. monocytogenes*. Luego, las cepas *L. argentoratensis* RBTw111, PCTw261 y PCTw270, y *L. plantarum* RBTw256 y AKTw335 exhibieron solo actividad inhibitoria frente a cepas de *L. innocua*. Por otro lado, ninguna de las BAL exhibió actividad frente a las cepas *St. aureus* ssp. *aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *Micrococcus luteus* ATCC 15307, *Ps. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 35218.

Los patógenos, tales como *Listeria* sp. y *E. coli*, pueden estar presentes en el vegetal fresco o introducirse a la matriz a fermentar por transferencia cruzada, por ejemplo, mediante la manipulación del operario. Entre los patógenos mencionados, la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos es un tema que preocupa a la industria alimentaria, ya que estos microorganismos se caracterizan por desarrollarse en ambientes hostiles, donde valores de temperatura y pH bajos no afectan su desarrollo (Sangeetha Mahadevaiah & Gopal, 2014). Por lo tanto, la selección de cepas con actividad antilisteria incrementaría la inocuidad y/o seguridad del alimento fermentado.

**Tabla 10:** Actividad de las BAL frente a cepas de *L. monocytogenes* y *L. innocua*.

Cepas		<i>L. monocytogenes</i> Scott A	<i>L. monocytogenes</i> 1908*	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 4760	<i>L. monocytogenes</i> 1915*	<i>L. innocua</i> 6a	<i>L. innocua</i> Tw67**	<i>L. innocua</i> ATCC 33090
<i>Leuconostoc</i> spp.	RCTw1.1	-	-	-	-	-	-	-
	RCTw13	-	-	-	-	-	-	-
	AKTw35	-	-	-	-	-	-	-
	RBTw100	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactiplantibacillus</i> spp.	RBTw102	<b>+</b>	<b>d+</b>	-	-	-	<b>d+</b>	-
	RCTw106	<b>+</b>	-	-	-	-	-	-
	RCTw111	-	-	-	-	<b>d+</b>	-	-
	AKTw112	<b>d+</b>	-	-	-	<b>+</b>	-	-
	AKTw180	-	-	-	-	-	-	-
	RBTw249	-	-	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-
	RBTw256	-	-	-	-	<b>+</b>	<b>+</b>	-
	PCTw261	-	-	-	-	<b>d+</b>	<b>d+</b>	<b>+</b>
	PCTw270	-	-	<b>+</b>	-	<b>d+</b>	<b>d+</b>	<b>+</b>
	AKTw332	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-	-	-
	AKTw335	-	-	-	-	<b>+</b>	<b>+</b>	-

+: halo ≤ 15 mm, d: difuso.

\*Las cepas fueron donadas por el Lic. Pablo Ledesma (Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco).

\*\*Proviene del Laboratorio de Biotecnología Bacteria-Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

#### 4.8.3 Detección molecular de las bacteriocinas

Se realizó la detección de genes de bacteriocinas a las cepas que exhibieron actividad antimicrobiana contra alguna bacteria blanco. Se realizó un análisis de PCR utilizando seis pares de cebadores específicos para genes de plantarinas individuales, más frecuentemente encontrados en el género *Lactiplantibacillus*. Se determinó que seis cepas exhibieron todos los genes estudiados, *plnA*, *plnC*, *plnN*, *plnJ*, *plnK* y *plnEF* (Tabla 11). Luego, las cepas PCTw261, AKTw332 y AKTw335 amplificaron todos los genes *pln*, excepto *plnJ*. Mientras que, en la cepa RCTw106 no se detectó ninguno de los genes evaluados, esto sugiere que puede producir alguna otra plantarina diferente.

**Tabla 11:** Detección de genes de plantaricina en cepas de *Lactiplantibacillus* spp. con actividad antimicrobiana.

Cepas	<i>plnA</i>	<i>plnC</i>	<i>plnN</i>	<i>plnJ</i>	<i>plnK</i>	<i>plnEF</i>
RBTw102	+	+	+	+	+	+
RCTw106	-	-	-	-	-	-
RCTw111	+	+	+	+	+	+
AKTw112	+	+	+	+	+	+
RBTw249	+	+	+	+	+	+
RBTw256	+	+	+	+	+	+
PCTw261	+	+	+	-	+	+
PCTw270	+	+	+	+	+	+
AKTw332	+	+	+	-	+	+
AKTw335	+	+	+	-	+	+

+: presencia; -: ausencia

Las plantaricinas A y C pertenecen al operón *plnABCD*, involucrado en la producción de bacteriocinas en *L. plantarum* (Omar *et al.*, 2008). La plantaricina C pertenece a la gran familia de péptidos antimicrobianos o lantibióticos (clase I); su modo de acción se debe a la interacción con el lípido II, precursor de la biosíntesis de la pared celular (Wiedemann *et al.*, 2006), reconociendo diferentes sitios de la molécula y produciendo la formación de poros en la membrana. Mientras que, la plantaricina A es considerada un intermedio evolutivo entre una ferormona y bacteriocina, ya que actúa como un péptido inductor y presenta actividad antimicrobiana mediada por la formación de una estructura  $\alpha$ -hélice fuertemente anfifílica (Pintos *et al.*, 2011). En este trabajo se detectó en nueve cepas la presencia de los genes *plnA* y *plnC* (Tabla 11). Omar *et al.* (2008) evaluaron la presencia de *plnA*, *plnB*, *plnC* y *plnD* en cepas de *L. plantarum* aisladas de diversos orígenes y obtuvieron variabilidad en las detecciones, sin embargo, solo 1/28 cepas estudiadas amplificaron los cuatro genes. Mientras que, Portilla *et al.* (2016) determinaron la presencia del gen *plnA* en 2/6 cepas de *L. plantarum* aisladas de una matriz láctea.

El gen *plnN*, localizado en el operon *plnMNOP*, se detectó en 9/10 cepas estudiadas (Tabla 11). Trabajos previos han reportado la presencia de este gen en cepas de *L. plantarum* aislados de diversos orígenes (Omar *et al.*, 2008; Portilla *et al.*, 2016). Esta plantaricina se puede clasificar en la subclase IIa, ya que se sintetizan como precursores con una secuencia líder N-terminal, conocida como secuencia líder del tipo “doble glicina”, la cual es escindida por un transportador ABC y una proteína accesoria, durante el proceso de secreción al medio extracelular del péptido activo (Dridger *et al.*, 2006). La

secuencia líder desempeña un doble papel, ya que actúa como una señal de reconocimiento para su exportación y protege a la célula productora, al mantener inactiva a la bacteriocina recientemente sintetizada (Drider *et al.*, 2006).

Las plataricinas J/K y EF se clasifican dentro de la subclase IIb, ya que son bacteriocinas formadas por dos péptidos (Portilla *et al.*, 2016). Se detectaron seis cepas que exhibieron los genes que codifican la plantaricina J/K; mientras que, nueve dieron positivo para *plnK* (Tabla 11). Se han informado variaciones en este operón, incluida la ausencia de *plnK* y la presencia de un gen *plnJ* y viceversa, en diferentes cepas de *L. plantarum* (Rojo-Bezares *et al.*, 2008; Omar *et al.*, 2008). Por otro lado, se determinó que nueve cepas de *Lactiplantibacillus* spp. amplificaron el gen *plnEF*. El operon *plnEF* incluye los genes *plnEF* y *plnI*, los cuales codifican para una bacteriocina de dos péptidos y una proteína de inmunidad, respectivamente (Tai *et al.*, 2015). Si bien, en este trabajo no se determinó la presencia del gen *plnI*, estudios previos sugieren también un alto grado de variabilidad en los resultados obtenidos a partir de cepas de *L. plantarum* (Omar *et al.*, 2008). Las plantaricinas J/K y EF exhiben un mecanismo de acción similar, ambas producen la formación de poros en la membrana citoplasmática de las células blanco. Sin embargo, los poros formados presentan diferente selectividad iónica, ya que la plantaricina EF permite el paso de cationes monovalentes en contraste con la plantaricina J/K que es selectiva para compuestos aniónicos (Moll *et al.*, 1999). Esta actividad complementaria combinada de EF y J/K garantizan una eficiente actividad bactericida.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la amplia presencia de varios genes de plantaricina en cepas de *Lactiplantibacillus* spp. aisladas de vegetales fermentados. La producción de varias bacteriocinas por la misma cepa juega un papel importante en la competencia de nicho, ya que cada bacteriocina puede diferir en su modo de acción, variando el espectro de inhibición.

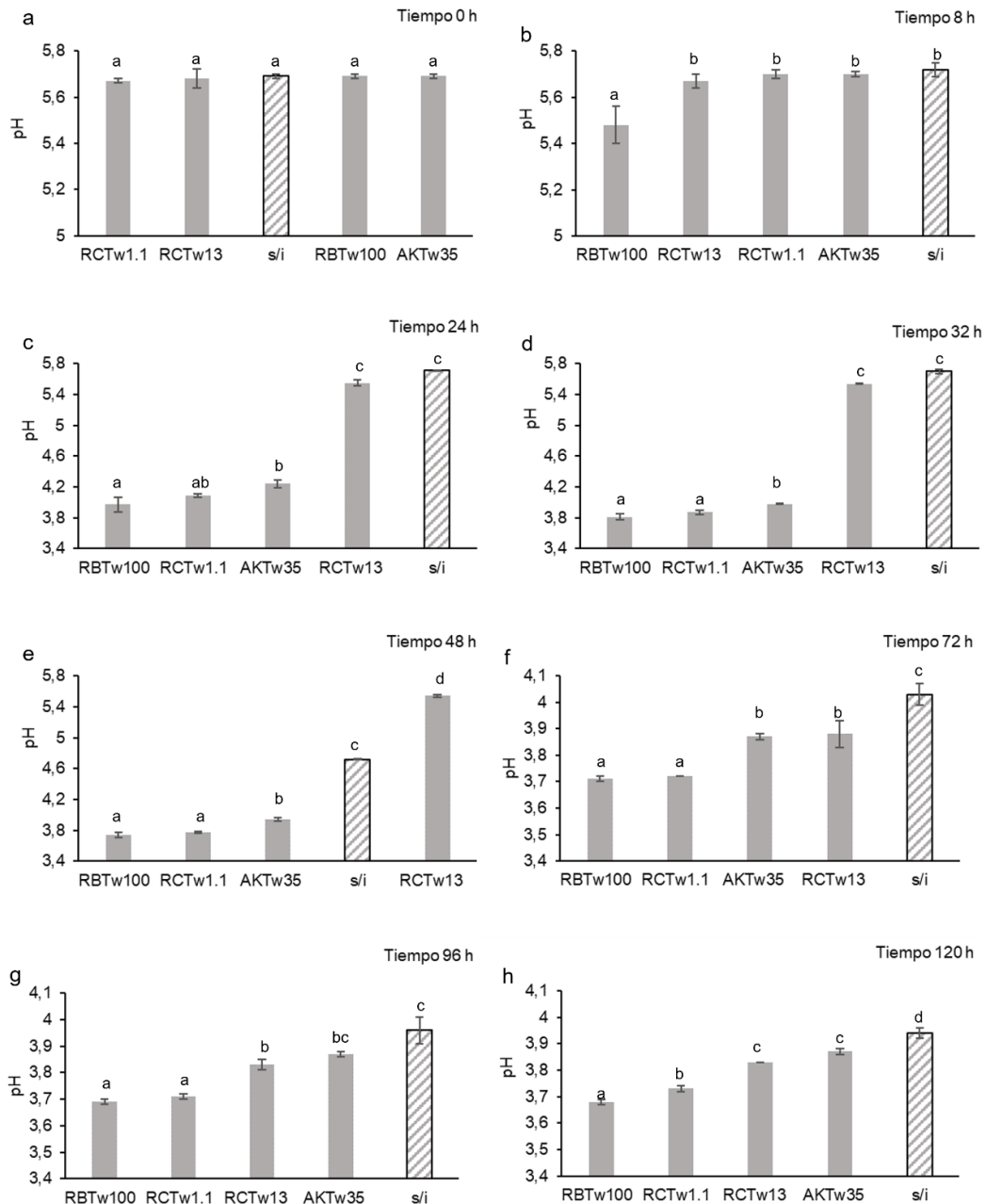
#### 4.8.4 Capacidad de acidificación

La primera y principal función de las BAL es la formación de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico a una velocidad conveniente para asegurar una fermentación exitosa (Di Cagno *et al.*, 2016). Por este motivo, se determinó la capacidad de acidificación de las BAL sobre una matriz de RB, ya que presentaba una concentración de carbohidratos intermedia entre los otros dos vegetales (AK y RC). Se realizaron dos ensayos, el primero con las cepas de *Leuconostoc* spp. y el segundo con los 11 *Lactiplantibacillus* spp. Se monitoreó el pH durante 5 días (120 h) y se compararon los valores obtenidos entre las cepas pertenecientes a un mismo género, en cada caso

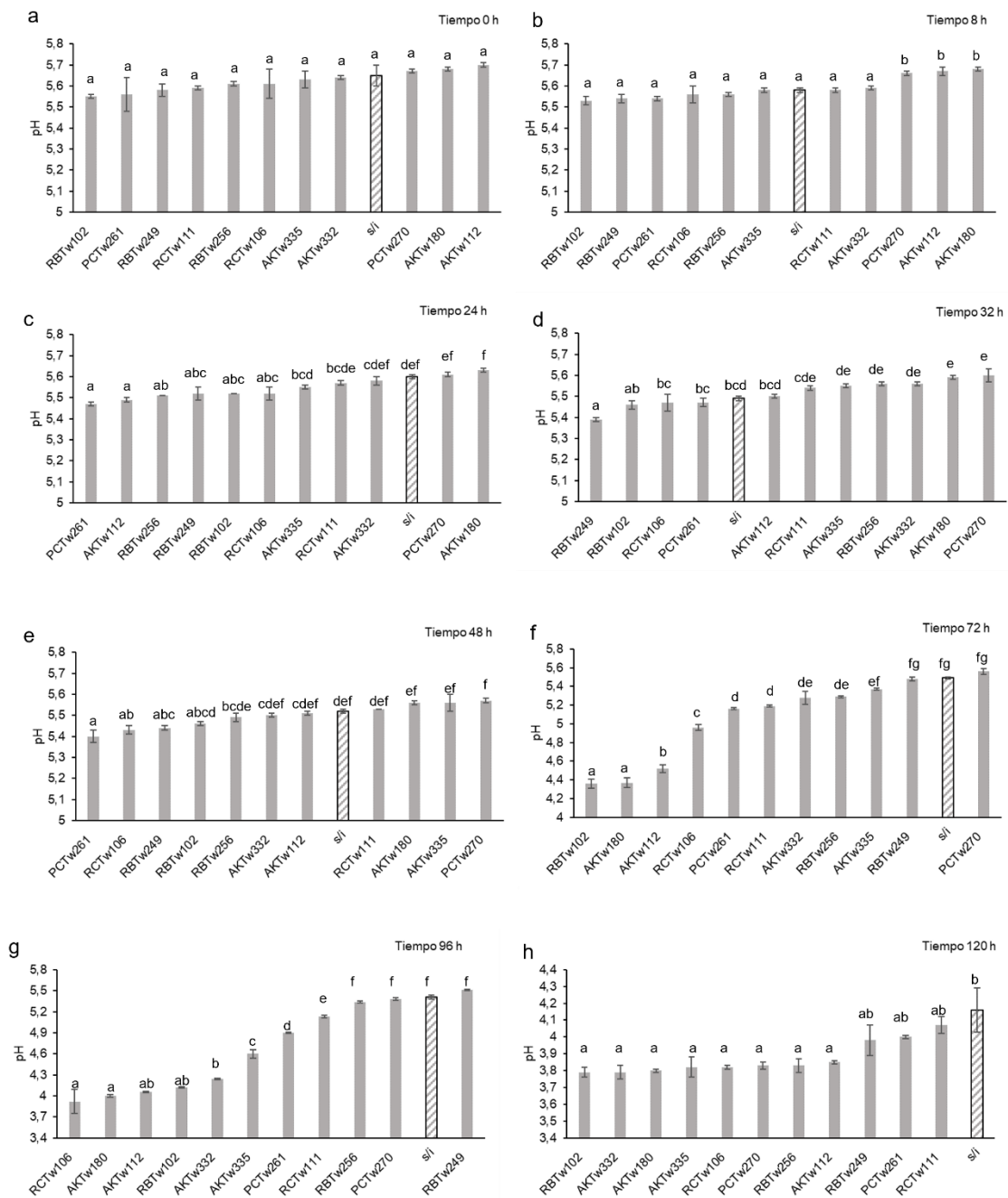
se utilizó una fermentación espontánea como control (s/inóculo) (Figs. 33 y 34). En el tiempo inicial de ambos ensayos (0 h), no se observaron diferencias significativas entre las cepas (Figs. 33a y 34a). En el caso de los *Leuconostoc* spp., la cepa *Ln. mesenteroides* ssp. *dextranicum* RBTw100 exhibió un descenso significativo de pH a las 8 h de haber iniciado el proceso, en comparación con las otras cepas y el control (Fig. 33b) ( $p \leq 0,05$ ). Mientras que, las cepas *Ln. mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* RCTw1.1 y AKTw35 exhibieron un descenso significativo del pH a las 24 h ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 33c). La cepa *Ln. mesenteroides* ssp. *dextranicum* RCTw13 mostró menos capacidad de acidificación de la matriz vegetal, exhibiendo valores de pH inferiores al control después de 72 h ( $p \leq 0,05$ ). Se determinó que los fermentos inoculados con las cepas *Ln. mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* RCTw1.1 y *Ln. mesenteroides* ssp. *dextranicum* RBTw100 exhibieron valores de pH inferiores al resto, a partir de las 32 h del proceso ( $p \leq 0,05$ ). Aunque las comparaciones con los datos reportados en la literatura se dificultan, ya que se usaron diferentes medios y concentración de inóculo, estudios previos determinaron un descenso de pH drástico al incorporar cepas de *Ln. mesenteroides* al iniciar el proceso de fermentación en matrices vegetales (Gardner *et al.*, 2001; Jagannath *et al.*, 2012).

Por otra parte, se observó que las cepas pertenecientes al género *Lactiplantibacillus* spp. mostraron un comportamiento más homogéneo, exhibiendo un menor poder de acidificación en comparación con las cepas de *Leuconostoc* estudiadas (Fig 33 vs 34). Se determinó una mayor diferenciación entre los *Lactiplantibacillus* luego de las 72 h del ensayo, las matrices inoculadas con las cepas *L. argentoratensis* RBTw102 y *L. plantarum* AKTw180 exhibieron un menor valor de pH ( $\approx 4,4$ ) ( $p \leq 0,05$ ). Posteriormente, estas cepas alcanzaron un valor de pH  $< 4,1$  a las 96 h del proceso y no mostraron diferencias significativas con *L. plantarum* RCTw106 y *L. argentoratensis* AKTw112. Al finalizar el ensayo, el pH alcanzado con las cepas *L. argentoratensis* RBTw249, RCTw111 y PCTw261 no exhibieron diferencias significativas con la fermentación espontánea ( $p > 0,05$ ) ( $pH \geq 4$ ). Mientras que, el resto de las BAL (*L. argentoratensis* RBTw102, AKTw112 y PCTw270; *L. plantarum* RCTw106, AKTw180, RBTw256 y AKTw335; *L. pentosus* AKTw332) alcanzaron valores de pH  $< 4$ , sin exhibir diferencias significativas entre ellas ( $p > 0,05$ ). Gardner *et al.* (2001), evaluaron la capacidad de acidificación de cuatro cepas de *Ln. mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *L. plantarum* y *Levilactobacillus brevis* en matrices vegetales; como se mencionó anteriormente se observó que *Ln. mesenteroides* exhibió una rápida acidificación (24 h) del medio en comparación con el resto y recién a las 72 h no se determinaron diferencias significativas en la tasa de acidificación alcanzada entre estas cepas. Esto demuestra

un comportamiento similar al obtenido en este estudio, las cepas de *Leuconostoc* spp. exhibieron mayor velocidad de acidificación de la matriz comparado con *Lactiplantibacillus* spp. Los microorganismos patógenos, generalmente, no pueden multiplicarse en ambientes con alto contenido de ácido. Un pH de 4,0 es un objetivo seguro, el cual debe alcanzarse lo más rápido posible durante la fermentación para evitar el crecimiento de bacterias que pueden producir toxinas o sabores desagradables en el alimento (Blajman & Zárata, 2020).



**Figura 33:** Capacidad de acidificación de las cepas perteneciente al género *Leuconostoc* spp. en la matriz vegetal, monitoreada en diferentes tiempos. Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de dos mediciones. Letras iguales, situadas sobre las barras de error, indican que no hay diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las medias. s/i: sin inóculo.

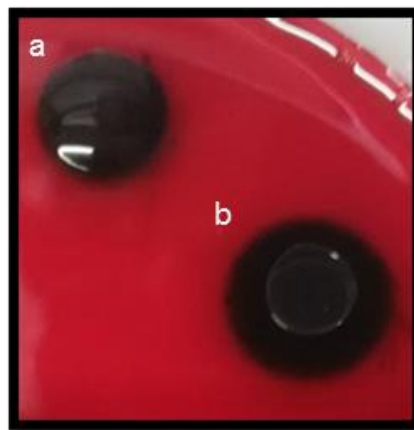


**Figura 34:** Capacidad de acidificación de las cepas perteneciente al género *Lactiplantibacillus* spp. en la matriz vegetal, monitoreada en diferentes tiempos. Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de dos mediciones. Letras iguales, situadas sobre las barras de error, indican que no hay diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las medias. s/i: sin inóculo.

#### 4.8.5 EPS con el método de la gota

Se evaluó nuevamente la producción de EPS, pero utilizando el método de la gota. Todas las cepas exhibieron producción de EPS, sin embargo, se observó un comportamiento diferente entre los géneros. Las cepas pertenecientes a *Leuconostoc* spp. exhibieron una textura viscosa (Fig. 35a), mientras que, los microorganismos correspondientes a *Lactiplantibacillus* spp. presentaron un aspecto más liviano (Fig. 35b) con una mayor difusión en el medio. Reportes previos describen el aislamiento de cepas productoras de EPS a partir de vegetales fermentados como, kimchi, chucrut y chinese pao cai; los cuales exhiben propiedades biológicas como respuestas antiinflamatorias, anti-virales (*in vitro*) y reducción la actividad de la  $\alpha$ -amilasa, entre otras (Angelin & Kavitha, 2020).

La producción de EPS por parte de las BAL seleccionadas para conformar el starter es imprescindible, ya que prolonga la vida útil, mejorando el sabor, la textura del producto final y pueden presentar potenciales efectos beneficiosos para la salud. El potencial biológico del EPS depende de su naturaleza química, la cual está influenciada por las condiciones de fermentación empleadas en el cultivo bacteriano (Angelin & Kavitha, 2020).



**Figura 35:** Producción de EPS con el método de la gota. a) cepa *Ln. mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* RCTw1.1; b) *L. pentosus* AKTw332.

#### 4.8.6 Efecto de la sacarosa en la solidificación de leche fermentada

Reportes previos han utilizado este ensayo como un estudio complementario para detectar la producción de EPS, tales como el dextrano, en cepas pertenecientes al género *Leuconostoc* spp. y *Weissella* spp. (Bejar *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2019); por consiguiente, solo se evaluaron las BAL seleccionadas pertenecientes a este grupo. La producción de este grupo de EPS se detectó en las cuatro cepas de *Leuconostoc* spp. cuando se realizó la prueba de solidificación de la leche (sin lactosa)

en todas las concentraciones de sacarosa analizadas. Las mismas exhibieron una solidificación total de la leche con el mayor porcentaje de sacarosa utilizado (12%). Mientras que, con el resto de las concentraciones de sacarosa (3%, 6% y 9%) se observó una solidificación parcial (Fig. 36, Tabla 12). Estos resultados son comparables con estudios previos, donde evaluaron la producción de EPS de las cepas *Weissella* spp. (Bejar *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2008) y *Ln. mesenteroides* (Wang *et al.*, 2019), y determinaron que el grado de solidificación de la leche dependió de la concentración de sacarosa agregada.

**Tabla 12:** Contribución de los EPS producidos por las cepas seleccionadas de *Leuconostoc* spp. en la solidificación de la leche suplementada con diferentes porcentajes de sacarosa.

Sacarosa (%)	Solidificación de la leche			
	RCTw1.1	RCTw13	AKTw35	RBTw100
3	++	++	++	++
6	++	++	++	++
9	++	++	++	++
12	+++	+++	+++	+++

parcial ++, total +++



**Figura 36:** Efecto de EPS producidos por la cepa *Ln. mesenteroides* ssp. *joggajibkimchii* RCTw1.1 en la solidificación de la leche sin lactosa. a: control negativo; b: 3%; c: 6%; d: 9% y e: 12% de sacarosa.

#### 4.8.7 Actividad dextransacarasa.

Se evaluó la actividad dextransacarasa en las cepas de *Leuconostoc* spp. de forma cualitativa e indirecta, a través de la detección de azúcares reductores. Este estudio se realizó solo con las cepas de *Leuconostoc* spp., ya que este género es el que despierta mayor interés en cuanto a su producción de dextrano de forma industrial (Kothari *et al.*, 2014). Las 4 cepas exhibieron actividad después de 12 h de incubación, no obstante,

se determinó diferencias entre las mismas. La cepa *Ln. mesenteroides* ssp. *dextranicum* RBTw100 presentó mayor actividad dextransacarasa exhibiendo un color más intenso en la reacción, luego continuó la cepa *Ln. mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* RCTw1.1, mientras que *Ln. mesenteroides* ssp. *dextranicum* RCTw13 y *Ln. mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* AKTw35 presentaron coloración más débil. Reportes previos han mencionado la presencia de dextrano en el jugo o salmuera del chucrut (Kothari *et al.*, 2014). La producción de dextrano por parte de las BAL que conformen el cultivo iniciador ejercería un efecto modulador sobre la composición de la microbiota del colón, proporcionando beneficios para la salud del huésped; exhibiendo de esta manera una actividad prebiótica (Das *et al.*, 2014; Kothari *et al.*, 2014; Olano-Martin *et al.*, 2000).

#### 4.8.8 Tolerancia a las condiciones imperantes durante la fermentación.

Se evaluó la tolerancia de las cepas de *Lactiplantibacillus* spp. a las condiciones imperantes durante la fermentación (0,5% fenol v/v, pH 4, fructosa 20 g/l), de manera cualitativa, como un indicador adicional de supervivencia durante la fermentación. En este ensayo se exceptuaron las cepas de BAL heterofermentativas estrictas; ya que este grupo no toleró previamente la concentración establecida de fenol, exhibiendo una mayor sensibilidad a las condiciones impuestas. La fructosa es el principal hidrato de carbono de los diferentes vegetales *Brassica*, seguido por la glucosa y en menor proporción se encuentra la sacarosa (Rosa *et al.*, 2001). Las especies de la familia *Brassicaceae* son generalmente ricas en polifenoles (Jahangir *et al.*, 2009), sin embargo, estos compuestos pueden exhibir efecto bacteriostático contra cepas de BAL. En este estudio, todas las cepas crecieron en placa bajo las condiciones impuestas, a excepción de *L. argentoratensis* RCTw106. Estos resultados reflejan el potencial de supervivencia de los lactobacilos durante el proceso de fermentación.

#### 4.9 Selección de cepas para conformar los cultivos iniciadores mixtos

Luego de realizar la caracterización tecnológica, se procedió a realizar la selección de BAL para conformar los cultivos iniciadores. Entre las cuatro cepas de *Leuconostoc*, se seleccionaron la cepa *Ln. mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* RCTw1.1 y *Ln. mesenteroides* ssp. *dextranicum* RBTw100, ya que exhibieron mayor capacidad acidificante y actividad dextransacarasa, a diferencia del resto. Por otro lado, se seleccionaron tres cepas de *Lactiplantibacillus*, las cepas *L. plantarum* AKTw180 y *L. argentoratensis* RBTw102 por su capacidad acidificante, y esta última también por su actividad inhibitoria frente a cepas de *L. innocua* y *L. monocytogenes* y exhibir diversos genes de plantaricinas. Además, se seleccionó la cepa *L. pentosus* AKTw332 por exhibir

actividad antibacteriana frente a las cuatro cepas *L. monocytogenes* y presentar diversos genes de plantarina (Tabla 9). Si bien, la cepa *L. argentoratensis* RBTw249 exhibió actividad inhibitoria frente a cuatro cepas blanco, esta presentó una capacidad de acidificación significativamente similar al fermento espontáneo, por este motivo no se seleccionó para conformar el starter. Por otro lado, los resultados cualitativos de EPS (solidificación de la leche suplementada con sacarosa) no lograron exhibir diferencias entre las cepas pertenecientes al género *Leuconostoc*.

#### 4.10 Fermentación controlada: diseños experimentales.

##### 4.10.1 Modelos brasicáceas.

En la fermentación controlada sólo se utilizó AK, RB y RC. Si bien, el PC también se utilizó para el aislamiento de BAL durante la fermentación espontánea, este vegetal se eliminó para los ensayos posteriores, ya que en todos los casos se observó alteraciones durante el proceso de fermentación. La matriz del PC exhibió un descenso de pH lento, donde contaminantes que de otra manera habrían sido inhibidos proliferaron, tales como levaduras y mohos, alterando el transcurso de la fermentación.

##### 4.10.1.1 Parámetros de fermentación

El AK, RB y RC se fermentaron individualmente mediante dos tipos de procesos: espontáneo y controlado, utilizando para este último dos cultivos iniciadores conformados con las BAL seleccionadas (Tabla 13).

**Tabla 13:** Cultivos iniciadores mixtos conformados por las BAL seleccionadas.

Cultivo iniciador	Cepas de BAL seleccionadas	log UFC/g
1°	<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>jonggajbkimchii</i> RCTw1.1	≈5
	<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i> RBTw100	≈5
	<i>L. argentoratensis</i> RBTw102	≈5
2°	<i>L. plantarum</i> AKTw180	≈5
	<i>L. pentosus</i> AKTW332	≈5

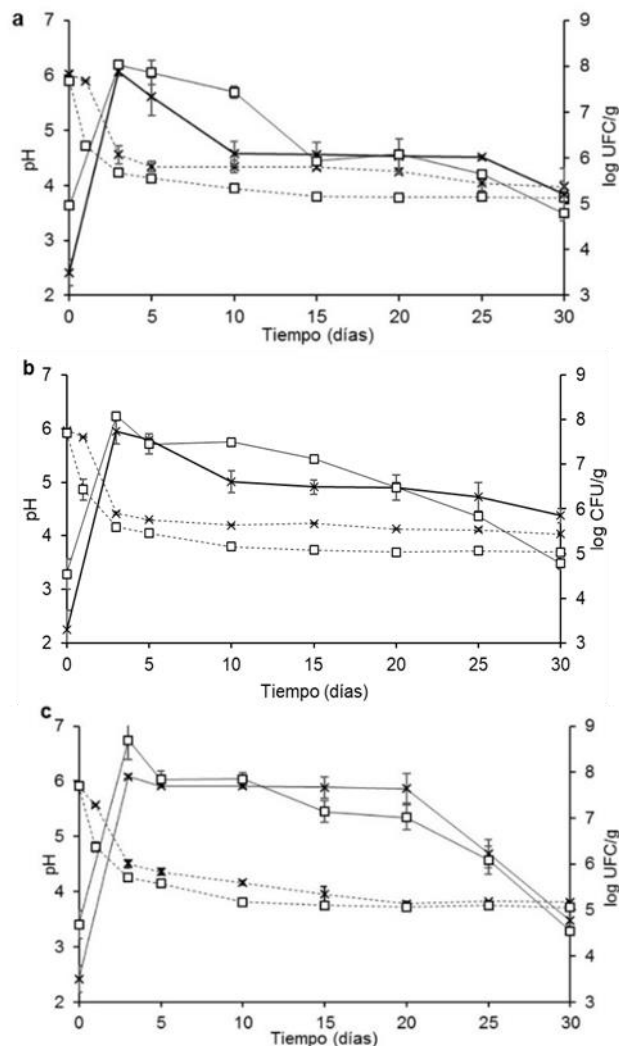
Se realizó el recuento de BAL y el control de pH para monitorear la evolución en ambos procesos. La fermentación espontánea y controlada exhibieron un comportamiento similar en los diferentes vegetales con algunas diferencias (Fig. 37). En la fermentación espontánea, se determinaron recuentos de BAL de ≈3,5 log UFC/g con un pH de ≈6 al inicio del proceso. Estos valores concuerdan con los mencionados por Di Cagno *et al.* (2013), los cuales describen que las BAL conforman una pequeña parte de la microbiota

autóctona de los vegetales y frutas, entre 2 a 4 log UFC/g. Posteriormente, el recuento de BAL se incrementó rápidamente y después de tres días alcanzó un nivel máximo de  $\approx 7,8$  log UFC/g, mientras que los valores de pH descendieron a  $\approx 4,5$  en los diferentes vegetales. Las BAL convierten los carbohidratos presentes en las verduras en ácido láctico, lo que disminuye el pH de los productos fermentados (Di Cagno *et al.*, 2016). Luego de 10 días de proceso, se observó que el recuento de BAL descendió rápidamente a  $\approx 6$  log UFC/g ( $p \leq 0,05$ ) y se mantuvo estable hasta el final del ensayo ( $p > 0,05$ ), tanto en AK (Fig. 37a) como RB (Fig. 37b). Mientras que, en RC el recuento de BAL disminuyó significativamente recién a los 20 días de fermentación, con valores finales de  $\approx 5$  log UFC/g (Fig. 37c). Di Cagno *et al.* (2013) reportaron que la rápida disminución de las BAL es el resultado de su sensibilidad a las condiciones ácidas. Se determinó un descenso similar de los valores de pH en AK y RB; los valores más bajos se observaron a los cinco días de fermentación ( $\text{pH} \approx 4,3$ ) y se mantuvieron estables durante 30 días ( $p > 0,05$ ) (Figs. 37a y 37b). Sin embargo, la fermentación de RC no mostró una disminución rápida del pH; el valor más bajo se alcanzó a los 15 días ( $\text{pH} \approx 3,9$ ) de incubación y se mantuvo estable al igual que en el caso del AK y RB (Fig. 37c). Estas variaciones observadas en las fermentaciones espontáneas de estos vegetales es consecuencia de los microorganismos autóctonos responsables de la evolución del proceso (Di Cagno *et al.*, 2013).

En la fermentación controlada, los microorganismos epífitos se redujeron previamente a través de un tratamiento térmico. Posteriormente, se añadió el primer cultivo iniciador mixto conformado por cepas seleccionadas pertenecientes al género *Leuconostoc* ( $\approx 5$  log UFC/g). Después de tres días de incubación a 18 °C, cuando los valores de pH disminuyeron a  $\approx 4,0$ , se adicionó el segundo inóculo compuesto por las cepas seleccionadas del género *Lactiplantibacillus* ( $\approx 5$  log UFC/g). Al igual que la fermentación espontánea, en el día 3 del proceso controlado se observó un incremento de BAL  $> 8,0$  log UFC/g. Luego, se observaron disminuciones graduales de las BAL en los tres vegetales a medida que avanzó el proceso, alcanzando un valor final de  $\approx 4,8$  log UFC/g ( $p \leq 0,05$ ).

El valor de pH inicial no exhibió diferencias significativas en los dos tipos de fermentación para cada vegetal ( $p > 0,05$ ). Mientras que, a las 24 h del proceso, el pH descendió significativamente en la fermentación controlada ( $p \leq 0,05$ ), alcanzando valores constantes a los 10 y 15 días para los dos tipos de repollos (RB y RC) y AK, respectivamente ( $p > 0,05$ ). Estas diferencias entre los procesos se podrían atribuir a la implementación de cultivos iniciadores en el proceso controlado, seleccionados por su capacidad de acidificación. Trabajos previos reportaron una caída significativa de los

valores de pH cuando *Ln. mesenteroides* se utilizó como iniciador en fermentaciones vegetales (Gardner *et al.*, 2001). Al final del proceso espontáneo y controlado, los valores de pH obtenidos en el AK y RC no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) (Figs. 37a y 37c); mientras que, en RB se determinaron diferencias entre los mismos ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 37b). Se debe considerar que el pH es uno de los factores más importantes que afecta la fermentación de los alimentos, una elevada tasa de acidificación se asocia con una mayor seguridad alimentaria, ya que influye directamente sobre el desarrollo de los microorganismos. A su vez, el pH también está relacionado con la degradación de los compuestos fitoquímicos y estabilidad en los mismos, consecuentemente vinculado a la capacidad antioxidante del alimento fermentado (Hur *et al.*, 2014).

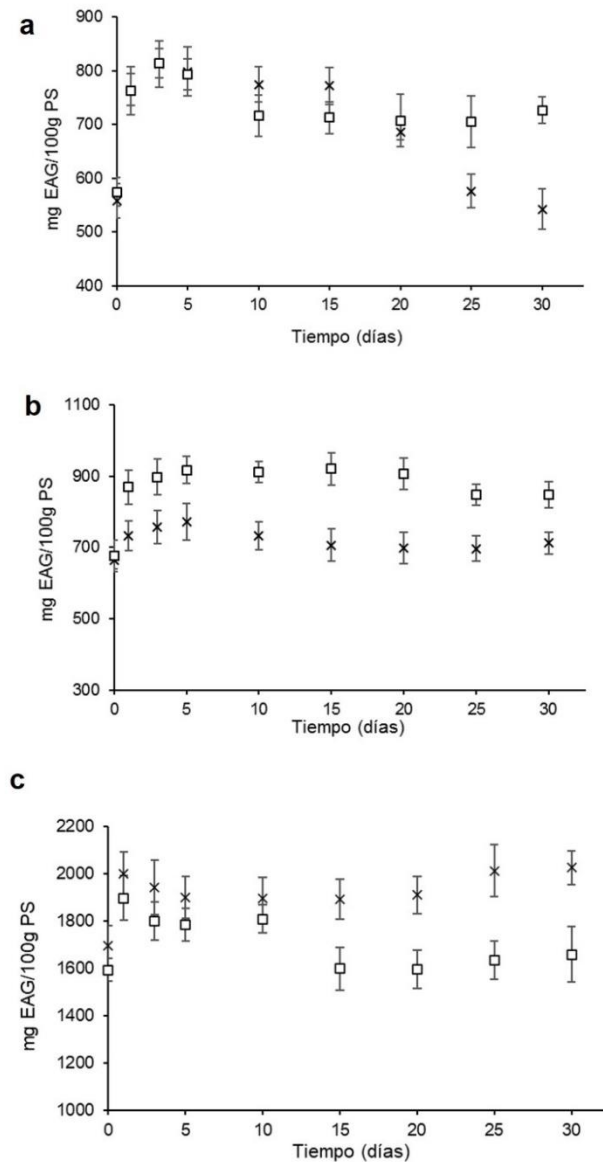


**Figura 37:** Recuento total de BAL (bacteria ácido lácticas) (-) y monitoreo de pH (---) en los vegetales Brassica, durante la fermentación espontánea (x) y controlada (□) de AK (a), RB (b) y RC (c). Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de dos mediciones.

#### 4.10.1.2 Contenido total de fenoles

Se estudió la variación del CTF presente en los extractos acuosos y metanólicos de AK, RB y RC durante las fermentaciones controladas y espontáneas. Los extractos acuosos mostraron valores más elevados de CTF que los metanólicos, independientemente del vegetal (Figs. 38 y 39) y tipo de fermentación realizada. Este comportamiento se puede explicar considerando que, en la extracción de los fenoles a partir de un material vegetal, el tipo de disolvente empleado determina la clase de compuestos a extraer y la capacidad de extracción de compuestos fenólicos depende principalmente de la polaridad del disolvente como de la temperatura utilizada (Hosseini *et al.*, 2016). Entre los disolventes utilizados, el agua resultó más eficaz que el metanol, ya que presenta mayor polaridad (el momento dipolar del agua y el metanol es de 1,95 y 1,65 D, respectivamente), además durante la extracción acuosa se utilizó una temperatura más elevada que en la metanólica (105 °C y 37 °C, extracto acuoso y metanólico, respectivamente). El aumento de la temperatura durante la extracción produce una disminución en la viscosidad del solvente que acelera el movimiento de las moléculas, lo que conduce a una mayor disolución de los polifenoles e incrementando del coeficiente de difusión (Yang *et al.*, 2009). Además, los extractos de RC exhibieron un mayor CTF que el AK y el RB ( $p < 0,05$ ). Estas diferencias observadas entre los vegetales estudiados concuerdan con los valores de CTF reportados en trabajos previos de Tabart *et al.* (2018), Vicas *et al.* (2013) y Seong *et al.* (2016), quienes determinaron 1851 mg GAE/100 g PS en RC, 980–1220 mg GAE/100 g PS en RB y 347,46 mg GAE/100 g PS en AK, respectivamente.

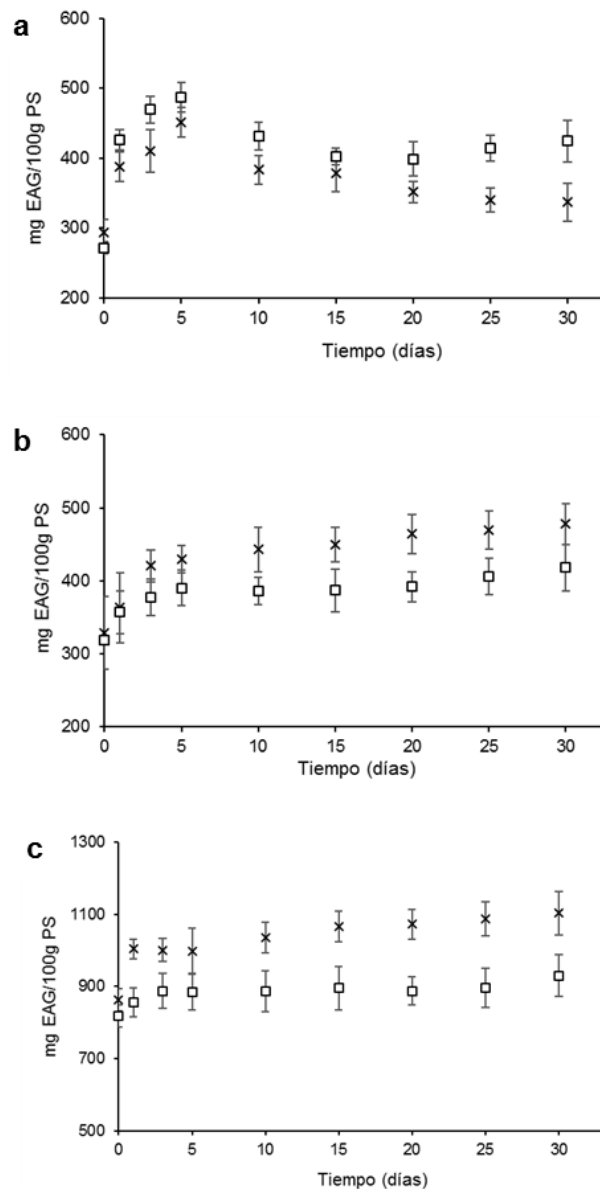
El AK y el RB exhibieron un comportamiento similar en ambos tipos de fermentación, el CTF de los extractos acuosos (Figs. 38a y 38b) y metanólicos (Figs. 39a y 39b) incrementaron significativamente hasta los cinco días de fermentación. Luego, los valores disminuyeron ligeramente ( $p < 0,05$ ) en AK, mientras que, permanecieron relativamente estables en el RB para ambos tipos de fermentación. Zubaidah *et al.* (2020) reportaron una tendencia similar, observaron un incremento del CTF en el día 5 de una fermentación controlada de RB inoculada con cepas de *Ln. mesenteroides* y *L. plantarum*. La fermentación controlada de AK exhibió un CTF mayor a la fermentación espontánea al final del proceso en ambos extractos ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 38a y 39a). En cambio, en el RB no se observaron diferencias significativas entre los valores finales de CTF en ambas fermentaciones para ambos extractos (Figs. 38b y 39b).



**Figura 38:** Contenido total de fenoles obtenidos en extractos acuosos de AK (a), RB (b) y RC (c) durante la fermentación espontánea (x) y controlada (□). Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres mediciones.

En cuanto al RC, los extractos metanólicos mostraron un leve incremento del CTF durante el primer día ( $p \leq 0,05$ ) y luego se mantuvieron relativamente estables hasta el final del proceso en la fermentación espontánea (Fig. 39c). Para la fermentación controlada los valores de CTF mostraron una tendencia ascendente pero no significativa ( $p > 0,05$ ). En los extractos acuosos de ambas fermentaciones, se determinó un leve aumento del valor del CTF en el primer día del proceso. Luego, en la fermentación espontánea los valores del CTF se mantuvieron relativamente estables hasta el final del ensayo (Fig. 38c); mientras que, en la fermentación controlada descendieron hasta el día 15 y luego se mantuvieron estables hasta finalizar el proceso. A diferencia de los

otros vegetales, en ambos tipos de extractos, la fermentación espontánea del RC presentó mayor CTF que la fermentación controlada al final de los ensayos ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 38c y 39c). La variación del CTF observadas entre ambos tipos de fermentaciones podría depender de la actividad enzimática de las BAL involucradas en cada proceso y de la capacidad de metabolizar los compuestos fenólicos de alto peso molecular, consecuentemente, obteniendo una reducción del CTF en la matriz fermentada de forma controlada (Hunaefi *et al.*, 2013).



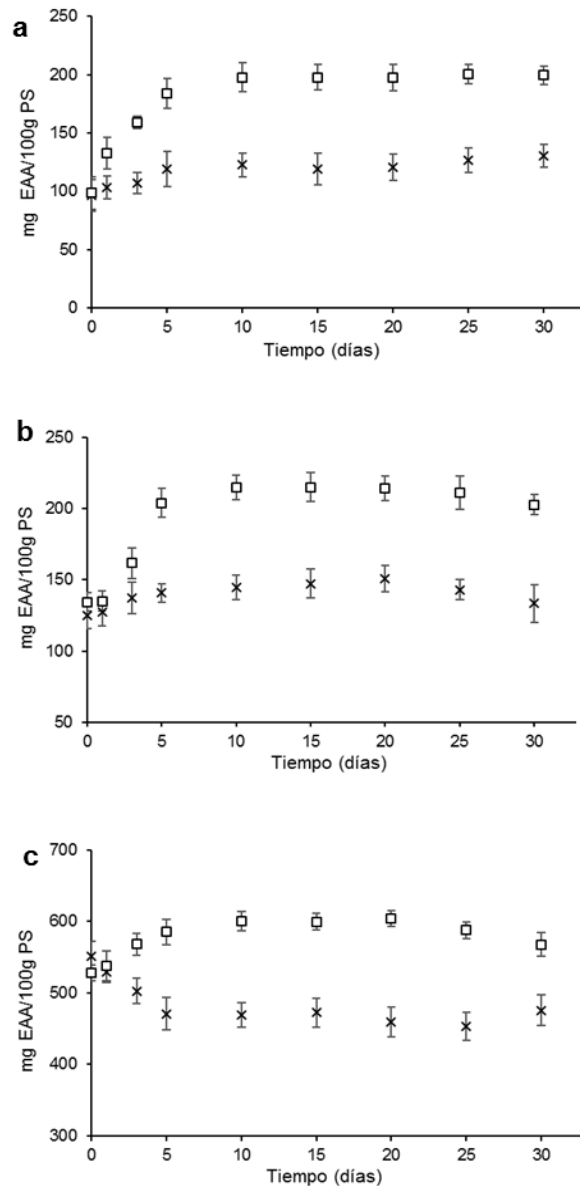
**Figura 39:** Contenido total de fenoles obtenidos en extractos metanólicos de AK (a), RB (b) y RC (c) durante la fermentación espontánea (x) y controlada (□). Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres mediciones.

Los resultados obtenidos sugieren que el incremento de los ácidos orgánicos y la hidrólisis enzimática de las BAL durante la fermentación podrían estar implicados en la degradación de los compuestos fenólicos, donde la extensión de esta actividad depende del tipo de fermentación y del vegetal utilizado. La mayoría de los polifenoles están presentes en los alimentos como ésteres, glucósidos o polímeros, compuestos que no se pueden absorber a través de las paredes del intestino delgado. No obstante, durante la fermentación, los polifenoles pueden transformarse en agliconas, por la acción de las enzimas de las BAL, siendo estas moléculas biológicamente más activas (Hur *et al.*, 2014). Además, las pectinasas pueden cambiar la textura del tejido vegetal durante la fermentación (Seong *et al.*, 2016), lo que permite una mayor liberación de compuestos fenólicos para su posterior transformación.

#### 4.10.1.3 Capacidad antioxidante según el método de reducción de DPPH

El ensayo de captación de radicales DPPH es un método basado en la transferencia de electrones y es el más utilizado para determinar la actividad antioxidante (Apak *et al.*, 2016; Shahidi & Zhong, 2015). Se evaluó la actividad antirradical de los extractos acuosos (Fig. 40) y metanólicos (Fig. 41) de los vegetales estudiados contra el radical DPPH, diferenciando el tipo de fermentación. En la fermentación controlada, los extractos metanólicos presentaron un poder reductor significativamente menor que los acuosos, en todos los vegetales ensayados ( $p \leq 0,05$ ). Mientras que, el proceso espontáneo no mostró diferencias significativas entre los extractos acuosos y metanólicos, durante el período de fermentación ( $p > 0,05$ ) (Fig. 40 vs Fig 41).

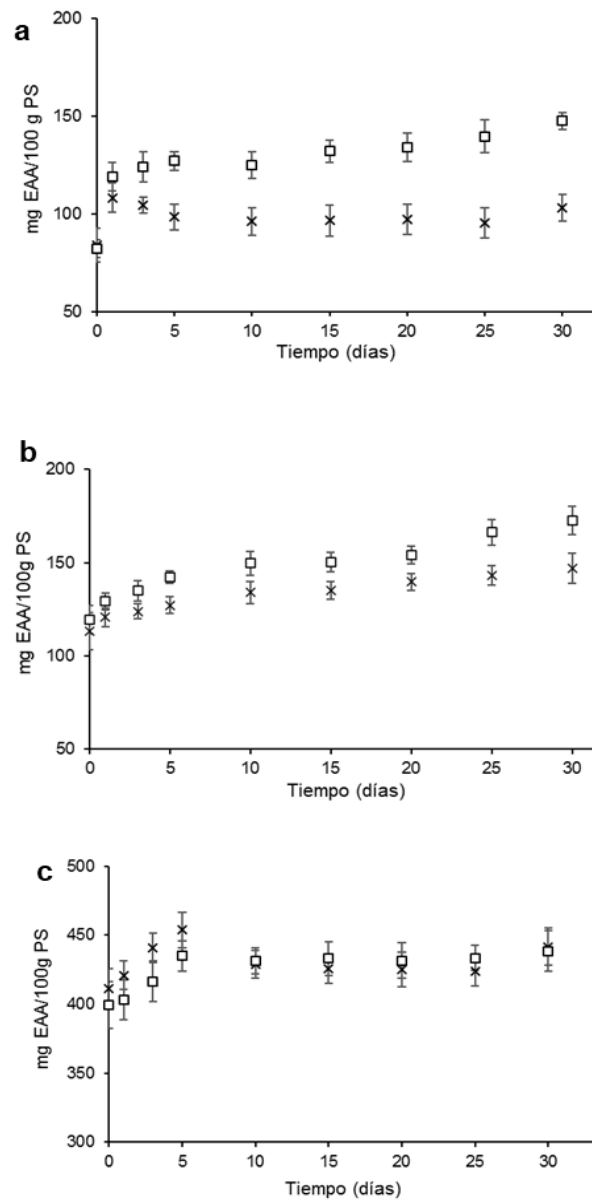
Al finalizar la fermentación controlada, el RC presentó una mayor capacidad antioxidante en comparación con los otros vegetales,  $567,53 \pm 16,80$  mg EAA/100 g PS y  $438,51 \pm 14,66$  mg EAA/100 g PS en los extractos acuosos (Fig. 40c) y metanólicos (Fig. 41c), respectivamente. Por otra parte, el AK alcanzó valores máximos de  $199,58 \pm 7,76$  mg EAA/100 g PS y  $147,59 \pm 4,35$  mg EAA/100 g PS en los extractos acuosos y metanólicos, respectivamente (Figs. 40a y 41a). Mientras que, el RB exhibió valores similares al AK,  $202,87 \pm 7,24$  mg EAA/100 g PS y  $172,60 \pm 7,64$  mg EAA/100 g PS en extractos acuosos y metanólicos, respectivamente (Figs. 40b y 41b). Upadhyay *et al.*, (2016) reportaron que el RC fresco exhibió una mayor actividad antioxidante comparado con otros vegetales *Brassica* estudiados, tales como el RB. Los valores obtenidos en este ensayo establecieron que esta diferencia entre los vegetales continúa después del proceso de fermentación.



**Figura 40:** Actividad antioxidante (ensayo DPPH) en extractos acuosos de AK (a), RB (b) y RC (c); durante la fermentación espontánea (x) y controlada (□). Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres mediciones.

Por otra parte, se determinó que independientemente del tipo de extracto, la fermentación controlada exhibió mayor capacidad antioxidante que la fermentación espontánea en AK (40a y 41a) y RB (40b y 41b) ( $p < 0,05$ ). Los extractos acuosos del RC también mostraron el mismo comportamiento (Fig. 40c); mientras que, los extractos metanólicos no mostraron diferencias significativas entre las fermentaciones ( $p > 0,05$ ) (Fig. 41c). En la fermentación controlada, la actividad antioxidante aumentó continuamente hasta el día 5 y luego se mantuvo estable en todos los vegetales. Zubaidah *et al.* (2020) reportaron una tendencia similar durante la fermentación controlada del RB, destacando el aumento de la actividad antioxidante en el día 5 del proceso de fermentación al utilizar diferentes combinaciones de cepas de *Ln*.

*mesenteroides* y *L. plantarum*. No obstante, en la fermentación espontánea se observaron variaciones según el tipo de extracto y vegetal. La actividad antioxidante de los extractos acuosos de las tres coles no mostró diferencias significativas durante el período de fermentación (Fig. 40); sin embargo, en los extractos metanólicos aumentó hasta el día cinco y luego se mantuvo estable en el RB, mientras que AK y RC no mostraron diferencias significativas durante el proceso espontáneo (Fig. 41). Kusznierewicz *et al.* (2008) informaron que, durante la fermentación espontánea del RB, la actividad antioxidante aumentó moderadamente y alcanzó una meseta después de 10 días.



**Figura 41:** Actividad antioxidante (ensayo DPPH) en extractos metanólicos de AK (a), RB (b) y RC (c); durante la fermentación espontánea (x) y controlada (□). Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres mediciones.

#### 4.10.1.4 Capacidad antioxidante según el método CUPRAC

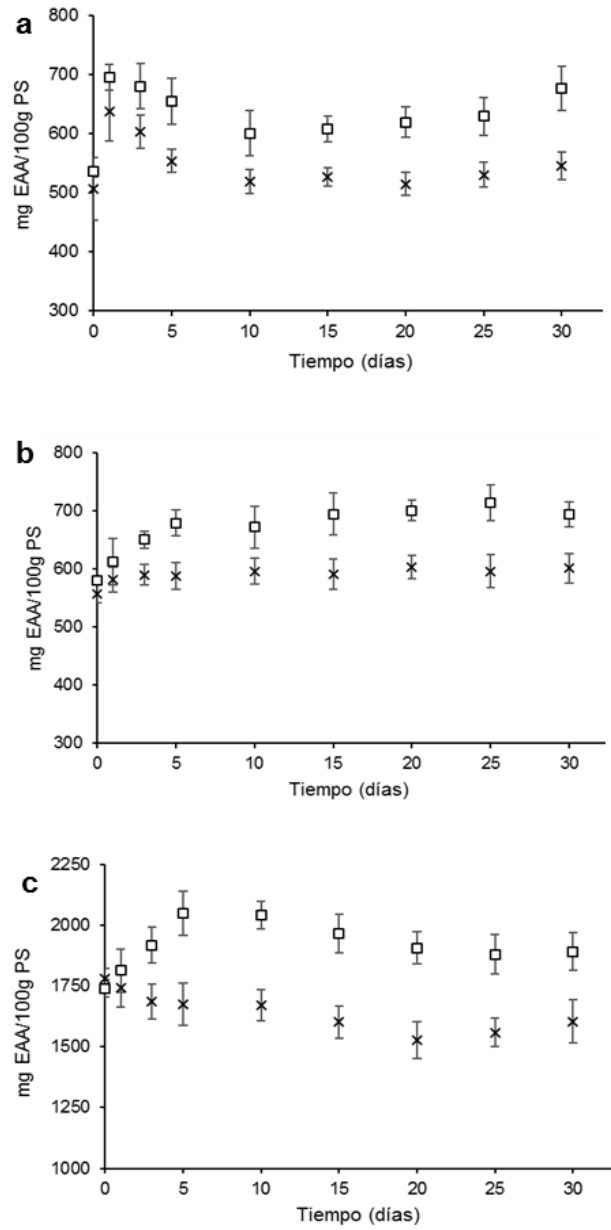
El ensayo CUPRAC es una variante del método FRAP, consiste en un método basado en la transferencia de electrones (Apak *et al.*, 2016). Mediante el ensayo CUPRAC se obtuvieron valores EAA superiores que con el método DPPH, en todos los casos (Figs. 40 y 41 vs. Figs. 42 y 43). Estas diferencias están relacionadas con la capacidad de cada método; el CUPRAC mide simultáneamente los antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos de las muestras, mientras que el ensayo DPPH solo detecta moléculas solubles en solventes orgánicos como los alcoholes (Apak *et al.*, 2016).

En ambas fermentaciones, los extractos acuosos de RB y RC exhibieron una capacidad antioxidante significativamente mayor que la obtenida con los extractos metanólicos (Figs. 42b vs. 43b, 42c vs. 43c) ( $p \leq 0,05$ ). Mientras que, el AK no mostró diferencias entre extractos (Figs. 42a vs 43a) ( $p > 0,05$ ). Boğa *et al.* (2011) utilizaron el método CUPRAC para evaluar la actividad antioxidante del RC, determinaron que los extractos acuosos exhibieron un mayor nivel de antioxidantes que los extractos etanólicos.

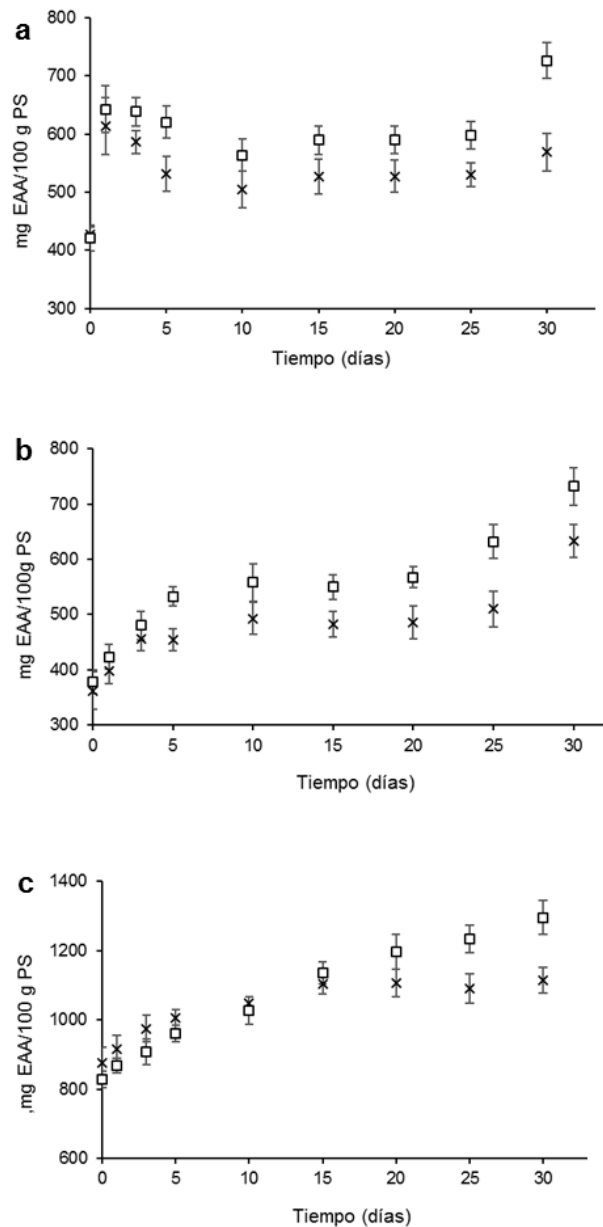
La capacidad antioxidante de los extractos acuosos y metanólicos del AK se incrementó significativamente durante el primer día y disminuyó hasta los 15 días; posteriormente, los valores se mantuvieron relativamente estables hasta el día 30, en ambos tipos de fermentaciones (Figs. 42a y 43a). Sin embargo, la fermentación controlada exhibió una mayor actividad antioxidante que la fermentación espontánea ( $p \leq 0,05$ ) para ambos tipos de extractos, al final del proceso.

En ambas fermentaciones, los extractos acuosos y metanólicos del RB mostraron un incremento de la actividad antioxidante hasta el día cinco; luego, los extractos acuosos se mantuvieron estables hasta los 30 días del proceso; mientras que los extractos metanólicos continuaron aumentando hasta el final del proceso (Figs. 42b y 43b). El RB no mostró diferencias significativas en las actividades antioxidantes entre los dos tipos de fermentación.

La capacidad antioxidante del RC exhibió un patrón diferente entre los extractos (Figs. 42c vs. 43c). En la fermentación espontánea, la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos aumentó significativamente hasta el día 10 y luego se mantuvo estable hasta el final de proceso. Mientras que, en la fermentación controlada los valores se incrementaron levemente hasta el final del proceso (Fig. 43c). De la misma manera, los extractos acuosos mostraron un patrón diferente entre ambos tipos de fermentaciones (Fig. 42c). En la fermentación controlada, la actividad antioxidante aumentó levemente hasta los 10 días y se mantuvo estable al final del proceso; mientras que, la fermentación espontánea no presentó diferencias significativas a lo largo del ensayo.



**Figura 42:** Actividad antioxidante (ensayo CUPRAC) en extractos acuosos de AK (a), RB (b) y RC (c); durante la fermentación espontánea (x) y controlada (□). Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres mediciones.



**Figura 43:** Actividad antioxidante (ensayo CUPRAC) en extractos metanólicos de AK (a), RB (b) y RC (c); durante la fermentación espontánea (x) y controlada (□). Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres mediciones.

#### 4.10.2 Modelos combinados, brasicáceas y *U. pinnatifida*

El alga *U. pinnatifida* es consumida desde tiempos ancestrales, se conoce como “wakame” en Japón, “qundai-cai” en China y “miyeuk” en Corea del Sur. La principal forma de conservarla es deshidratada, utilizando diferentes procesamientos según la cultura de cada región (Nisizawa *et al.*, 1987). La posibilidad de fermentar algas es un concepto relativamente nuevo, ya que la mayoría de los productos fermentados consisten en alimentos terrestres, tales como vegetales, frutas y lácteos. Actualmente, en internet se puede encontrar una gran variedad de recetas de chucrut con agregados

de algas; no obstante, estos productos consisten principalmente en repollo y contienen cantidades extremadamente pequeñas de algas, alrededor de una cuchara por cabeza de col, probablemente incorporada para generar notas de sabor. Investigadores pertenecientes a nuestro grupo de trabajo intentaron fermentar lámina de *U. pinnatifida* con inóculos iniciales mixto, utilizando cepas de BAL pertenecientes al cepario de LBB-Facultad de Cs. Naturales y Cs. Salud-UNPSJB (Sede Trelew), sin embargo, no obtuvieron una evolución favorable del proceso (datos no publicados). Por otro lado, en la literatura científica son escasos los reportes sobre productos fermentados, tal como chucrut, que contenga niveles significativos de algas. El principal motivo, es que las algas marinas contienen polisacáridos, principalmente alginato y fucoidano, que no se consideran sustratos ideales para fermentar (Brochu, 2018). Sin embargo, las algas pardas se caracterizan por presentar una mayor diversidad y cantidad de minerales y vitaminas que los vegetales (Nuno *et al.*, 2019). En este trabajo, se desarrollaron tres modelos de chucrut y *U. pinnatifida* lacto-fermentado para abordar esta tendencia.

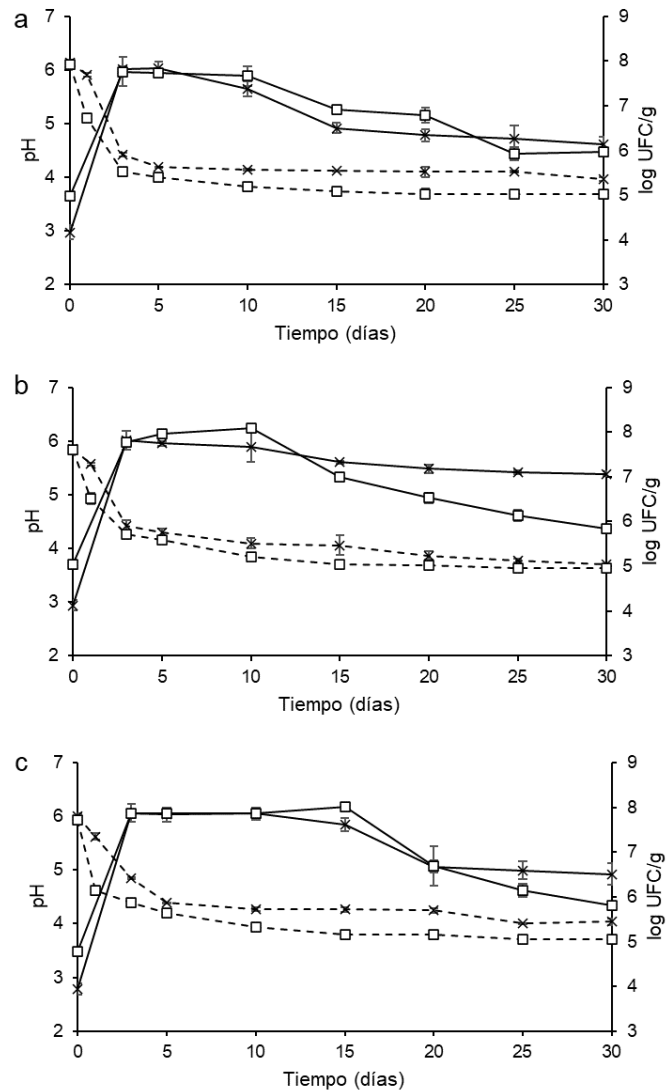
#### 4.10.2.1 Parámetros de fermentación

El recuento de BAL y pH se monitoreó durante la fermentación controlada y espontánea de los diferentes modelos combinados de *U. pinnatifida* y *Brassica*: AKU, RBU y RCU (Fig. 44). En la fermentación espontánea, los distintos modelos exhibieron un recuento de BAL de  $\approx 4$  log UFC/g al inicio del proceso. Mientras que en las fermentaciones controladas se comenzó con un recuento de BAL de  $\approx 5$  log UFC/g ( $p \leq 0,05$ ), ya que se adicionó el primer inóculo mixto con cepas seleccionadas de *Leuconostoc* spp. ( $\approx 5$  log UFC/g). Luego, cuando los valores de pH se encontraron próximos a 4,0 (día 3), se añadió el segundo inóculo con cepas de *Lactiplantibacillus* spp. ( $\approx 5$  log UFC/g), siguiendo con las recomendaciones de (Jagannath *et al.*, 2012).

La fermentación controlada y espontánea de AKU exhibieron un incremento significativo del recuento de BAL  $\approx 7,8$  log UFC/g en el día tres; este valor se mantuvo constante hasta el día 5 y 10, respectivamente en cada proceso. Luego, en la fermentación espontánea la población de BAL continuó descendiendo hasta el día 15 y se mantuvo estable hasta finalizar el ensayo; mientras que, en el proceso controlado, los recuentos de BAL descendieron significativamente en dos etapas, a los 15 y 25 días, y luego se mantuvieron sin cambios hasta los 30 días (Fig. 44a). La población de BAL a los 30 días no mostró diferencias significativas entre los dos tipos de fermentación ( $\approx 6$  log UFC/g) ( $p > 0,05$ ).

Los dos tipos de fermentaciones de RBU exhibieron un incremento de la población de BAL en el día 3 del proceso. Luego, en la fermentación controlada, el recuento de BAL

continuó incrementando hasta el día 10, alcanzando valores de 8,10 log UFC/g y posteriormente comenzó a descender gradualmente hasta el final del proceso. Mientras que, en la fermentación espontánea, se observó una caída significativa de la población de BAL a partir del día 20 y los valores se mantuvieron estables hasta completar el proceso. Al finalizar el ensayo, se determinó que la fermentación espontánea de RBU mostró un valor de recuento de BAL mayor que el proceso controlado, 7,1 y 5,9 log UFC/g, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 44b).



**Figura 44:** Recuento total de BAL (-) y monitoreo de pH (---) en chucrut, durante la fermentación espontánea (x) y controlada (□) de AKU (a); RBU (b) y RCU (c). Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de dos mediciones.

Por último, en el modelo RCU se observó una tendencia similar entre las fermentaciones (Fig. 44c). Los valores de recuentos de BAL se incrementaron significativamente el día 3 ( $\approx 7,9$  log UFC/g) y se mantuvieron estables hasta la mitad del ensayo. Luego, se

determinó una disminución significativa de la población de BAL el día 20 ( $p \leq 0,05$ ) y se mantuvo estable hasta finalizar el ensayo. La población de BAL a los 30 días mostró diferencias significativas entre los dos tipos de procesos, 6,5 y 5,8 log UFC/g para el espontáneo y controlado, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ).

Reportes previos exhiben recuentos máximos de BAL hasta el día 7 de la fermentación y después la población comienza a disminuir lentamente (Brochu, 2018; Kim *et al.*, 2019); una tendencia similar a la que se observó en este trabajo en los modelos combinados con *U. pinnatifida*. Brochu (2018) fermentó RB con diferentes concentraciones de algas marinas y NaCl al 2,5% durante 60 días a 20 °C, la matriz se inoculó con *Lactiplantibacillus plantarum* ( $10^6$  UFC/g) y *Leuconostoc mesenteroides* ( $\sim 10^1$  UFC/g); en el tratamiento con 25% de algas marinas obtuvieron un recuento de BAL de  $\approx 2$  log UFC/g luego de 28 días de fermentación. Además, Brochu (2018) menciona que las especies de algas marinas tienen un efecto significativo en los recuentos de BAL en el chucrut, a mayor concentración de algas menor es el desarrollo de este tipo de microorganismos. No obstante, se determinó que bajo las condiciones impuestas para la fermentación realizada en este trabajo (3,0% NaCl, 18 °C, 80% *Brassica*, 20% *U. pinnatifida*, cultivos iniciadores mixtos seleccionados), no afectó significativamente el crecimiento de las BAL, ya que muestra valores similares a los obtenidos en la fermentación de *Brassica* (sin alga), descrito previamente.

El pH, como se mencionó anteriormente, es un indicador clave utilizado para controlar la fermentación, ya que el ácido es el producto principal en una fermentación láctica. En cuanto a los valores de pH monitoreados en ambas fermentaciones, se observó que no hay diferencias significativas al inicio de los procesos para los modelos estudiados ( $\text{pH} \approx 6$ ) ( $p > 0,05$ ). En ambos procesos, el pH disminuyó rápidamente durante los primeros 3 días de fermentación, lo que probablemente corresponda a una mayor concentración de azúcares presentes en las matrices vegetales. No obstante, luego de 24 h, se determinó un descenso significativo del pH solo en la fermentación controlada de AKU, RBU y RCU, con valores de  $5,11 \pm 0,18$ ,  $4,94 \pm 0,11$  y  $4,62 \pm 0,04$ , respectivamente ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 44). Se determinó que, en la etapa inicial de la fermentación, el proceso controlado exhibió un descenso de pH superior al espontáneo, en todos los casos ( $p \leq 0,05$ ). Este rápido descenso inicial es fundamental, ya que garantiza la inocuidad del alimento fermentado (Di Cagno *et al.*, 2016). En la fermentación controlada de AKU, el pH continuó descendiendo significativamente hasta el día 10 y luego los valores se mantuvieron estables hasta el día 30 ( $3,68 \pm 0,06$ ), mientras que, en el proceso espontáneo la estabilidad se logró el día 15 ( $3,98 \pm 0,04$ ) (Fig. 44a). En RCU, el descenso de pH se presentó en forma gradual en ambas fermentaciones, alcanzando valores de

pH de  $3,72 \pm 0,01$  y  $4,04 \pm 0,06$  en el proceso controlado y espontáneo, respectivamente (Fig. 44c). En la fermentación controlada de AKU y RCU se obtuvieron valores de pH menores en comparación con el proceso espontáneo, durante todo el periodo evaluado ( $p \leq 0,05$ ). En el caso del RBU, la estabilidad del pH se logró el día 15 y 20 en la fermentación controlada y espontánea, respectivamente (Fig. 44b). No obstante, luego del día tres, los valores de pH no mostraron diferencias significativas entre los procesos, alcanzando valores de  $3,63 \pm 0,04$  y  $3,70 \pm 0,01$  para la fermentación controlada y espontánea, respectivamente ( $p > 0,05$ ).

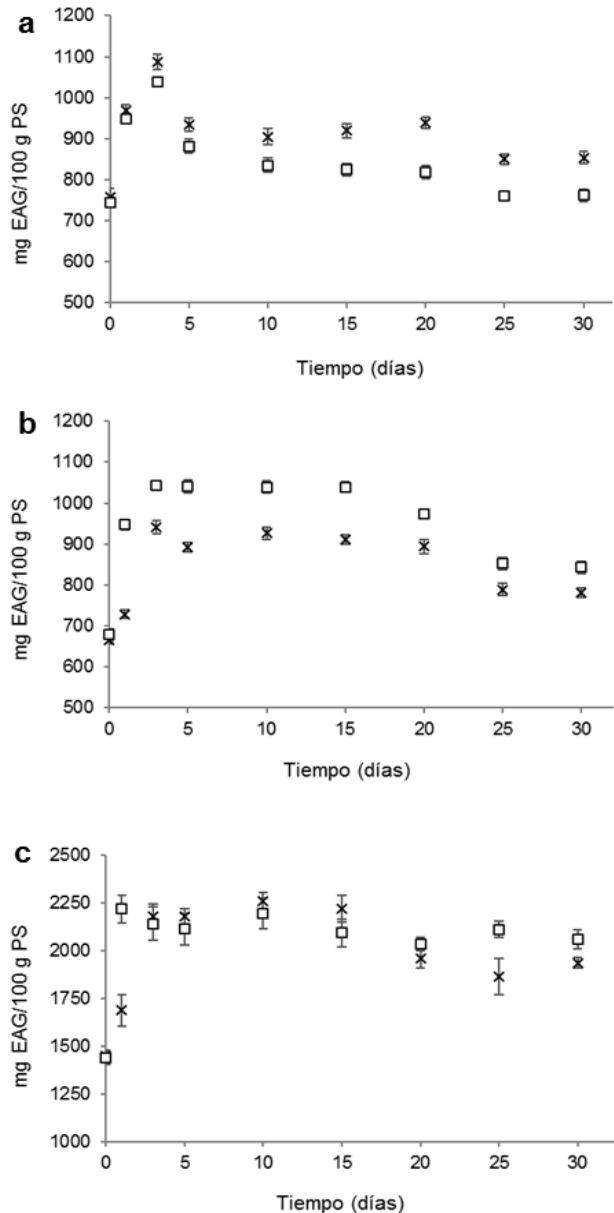
Trabajos previos demostraron que a mayor concentración de alga en el chucrut, menor es el descenso del pH durante el proceso de fermentación (Brochu, 2018). En las fermentaciones controladas de AKU, RBU y RCU, se observó que a partir del día 10 todos los productos lograron alcanzar un  $\text{pH} < 4,0$ , valor que exige el CAA (Art. 976) para los productos denominados “chucrut”.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio indican que las condiciones impuestas para la fermentación y los cultivos iniciadores autóctonos seleccionados garantizan un proceso de fermentación óptimo, tanto para los vegetales *Brassica* (AK, RB y RC) como para los modelos combinados con *U. pinnatifida* (AKU, RBU y RCU).

#### 4.10.2.2 Contenido total de fenoles

Se determinó la evolución del CTF de los extractos acuosos y metanólicos de AKU, RBU y RCU durante la fermentación controlada y espontánea. Se observó que, a pesar de incorporar un 20% de alga en el chucrut, se mantuvieron las mismas tendencias exhibidas para los modelos de brasicáceas (sin alga). El modelo RCU exhibió un valor de CTF mayor que el RBU y AKU, independientemente del tipo de fermentación y extracto ( $p \leq 0,05$ ) (Figs. 45c y 46c). Luego, los extractos acuosos de los diferentes modelos mostraron un valor de CTF mayor que los extractos metanólicos, independiente del tipo de fermentación ( $p \leq 0,05$ ) (Figs. 45 vs 46).

La fermentación espontánea y controlada de AKU exhibieron un patrón similar a lo largo del proceso evaluado. Los valores de CTF de los extractos acuosos se incrementaron hasta el día tres, alcanzando valores de  $1087,63 \pm 18,39$  y  $1038,56 \pm 10,87$  mg EAG/100g PS en la fermentación espontánea y controlada, respectivamente. Luego, estos valores descendieron gradualmente en ambas fermentaciones; no obstante, el proceso espontáneo exhibió un valor de CTF mayor que el controlado,  $853,51 \pm 15,05$  y  $761,87 \pm 14,21$  mg EAG/100 g PS, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 45a).



**Figura 45:** Contenido total de fenoles obtenidos en extractos acuosos de AKU (a), RBU (b) y RCU (c) durante la fermentación espontánea (x) y controlada (□). Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres mediciones.

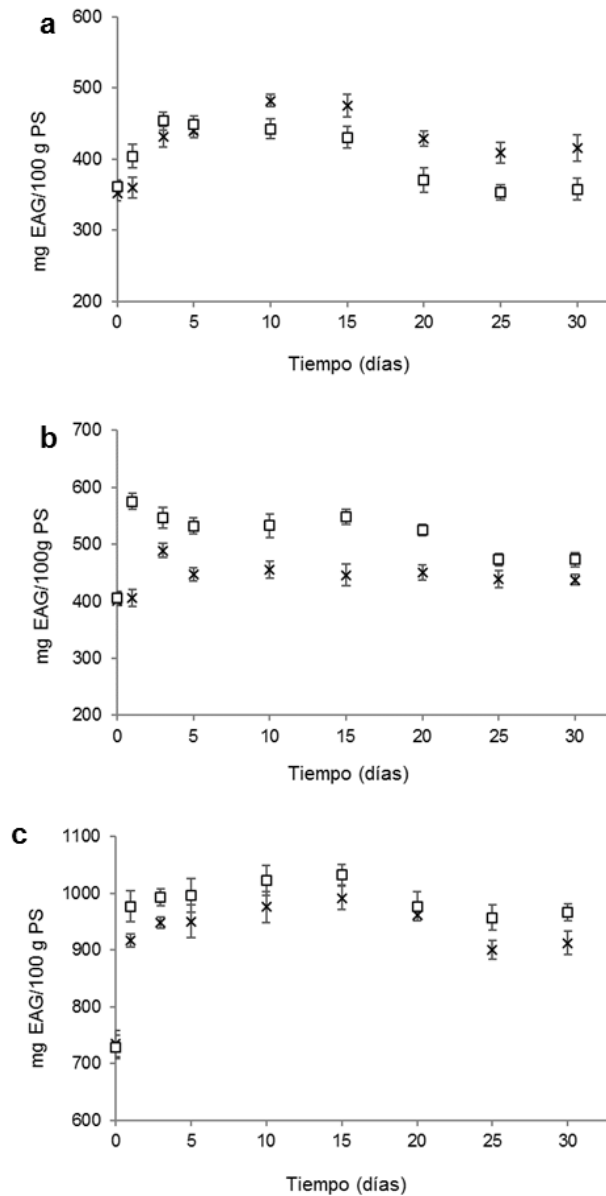
En el modelo RBU, la fermentación controlada y espontánea mostraron un comportamiento similar (Fig. 45b), los valores de CTF de los extractos acuosos incrementaron significativamente hasta el día tres ( $1042,10 \pm 10,87$  y  $940,42 \pm 15,89$  mg EAG/100 g PS, respectivamente) y se mantuvieron estable hasta el día 15 y 20, respectivamente. Luego, el CTF descendió gradualmente hasta finalizar el ensayo, alcanzando valores de  $842,87 \pm 15,05$  y  $781,38 \pm 11,71$  mg EAG/100 g PS en la fermentación controlada y espontánea, respectivamente. Los extractos acuosos de RBU obtenidos durante a fermentación controlada exhibieron un mayor CTF que el espontáneo, en todo el periodo evaluado ( $p \leq 0,05$ ).

Por otro lado, la fermentación controlada y espontánea del RCU exhibieron diferentes comportamientos (Fig. 45c). En la fermentación controlada, los extractos acuosos de RCU incrementaron significativamente el CTF, alcanzando valores de  $2216,63 \pm 71,90$  mg EAG/100 g PS, en el día uno; posteriormente no se observaron cambios significativos en todo el proceso. Mientras que, en la fermentación espontánea, los extractos acuosos mostraron un incremento significativo hasta el día tres, exhibiendo valores de  $2179,98 \pm 63,54$  mg EAG/100 g PS. Luego, el CTF se mantuvo estable hasta el día 15 y posteriormente comenzó a descender significativamente, alcanzando un valor final de  $1934,04 \pm 26,75$  mg EAC/100g PS. Sin embargo, las diferencias obtenidas en el CTF entre los fermentos no son significativas ( $p > 0,05$ ) durante todo el período, con excepción del día uno.

Como se mencionó anteriormente, se analizó la evolución del CTF de los extractos metanólicos de AKU, RBU y RCU durante los distintos procesos de fermentación (Fig. 46).

Los extractos metanólicos de AKU no mostraron diferencias significativas entre la fermentación espontánea y controlada durante el ensayo (Fig. 46a). No obstante, al inicio de ambos procesos, se observó un incremento significativo del CTF hasta el día tres, exhibiendo valores de  $431,80 \pm 14,55$  y  $453,66 \pm 12,73$  mg EAG/100 g PS en la fermentación espontánea y controlada, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ). Luego, el CTF comenzó a descender paulatinamente a partir del día 20, alcanzando valores de  $416,04 \pm 18,65$  y  $357,83 \pm 15,46$  mg EAG/100 g PS en el proceso espontáneo y controlado, respectivamente.

Los extractos metanólicos de RBU mostraron valores de CTF similares a los de AKU; sin embargo, entre las fermentaciones no se presentó el mismo comportamiento (Fig. 46b). En la fermentación controlada, los extractos metanólicos de RBU exhibieron un incremento significativo del valor de CTF ( $575,23 \pm 14,55$  mg EAG/100 g PS) en el primer día del proceso ( $p \leq 0,05$ ). Posteriormente, el CTF se mantuvo estable hasta el día 20 y luego comenzó a descender significativamente, alcanzando valores de  $473,28 \pm 12,28$  mg EAG/100 g PS ( $p \leq 0,05$ ). En el caso de la fermentación espontánea, los extractos metanólicos de RBU no mostraron diferencias significativas durante todo el proceso ( $p > 0,05$ ), exhibiendo un valor de  $437,91 \pm 8,64$  mg EAG/100 g PS.



**Figura 46:** Contenido total de fenoles obtenidos en extractos metanólicos de AKU (a), RBU (b) y RCU (c) durante la fermentación espontánea (x) y controlada (□). Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres mediciones.

Por último, los extractos metanólicos de RCU no mostraron diferencias significativas entre el proceso espontáneo y controlado durante todo el periodo estudiado ( $p > 0,05$ ) (Fig. 46c). En ambas fermentaciones se observó un incremento significativo del CTF durante el día uno, exhibiendo valores de  $916,98 \pm 11,82$  y  $976,79 \pm 27,29$  mg EAG/100 g PS en el proceso espontáneo y controlado, respectivamente. Luego, el CTF se mantuvo constante durante todo el proceso, alcanzando valores finales de  $912,47 \pm 20,01$  y  $966,50 \pm 14,55$  mg EAG/100 g en el proceso espontáneo y controlado, respectivamente ( $p > 0,05$ ).

Se observó que independientemente del extracto, los CTF muestran un patrón similar en la fermentación controlada, incrementó los primeros días y, en muchos casos, comenzó a descender significativamente en la etapa intermedia del proceso, donde se monitoreó un elevado recuento de BAL. Hunaefi *et al.* (2013) reportaron la misma tendencia durante la fermentación controlada de RC con una cepa de *L. plantarum*. Reportes previos mencionaron la capacidad de la cepa *L. plantarum* CECT 748T para metabolizar diferentes compuestos fenólicos, tales como p-cumárico, cafeico, ferúlico m-cumárico, gálico y protocatequiico (Rodríguez *et al.*, 2008). En este caso, las cepas utilizadas en el segundo inóculo *L. plantarum* AKTw180, *L. argentoratensis* RBTw102 y *L. pentosus* AKTw332 exhibieron tolerancia al fenol, ácido gálico y tánico. Estas cepas seleccionadas podrían tener implicancia en la degradación de los polifenoles de la matriz alimentaria (*U. pinnatifida* y *Brassica*), provocando consecuentemente una disminución del CTF e incremento de otros compuestos biológicamente más activos, tales como los aromáticos, dependiendo de la ruta metabólica implicada (Hunaefi *et al.*, 2013).

#### 4.10.2.3 Capacidad antioxidante según el método de reducción de DPPH

Los vegetales y las frutas contienen una gran variedad de antioxidantes, incluyendo los compuestos fenólicos, carotenoides, antocianinas y tocoferoles (Hur *et al.*, 2014). Sin embargo, la mayoría de los compuestos antioxidantes son los polifenoles, que actúan como agentes reductores, quelantes de metales e inhibidores de oxígeno singlete (Pisoschi & Negulescu, 2011). En este trabajo, se utilizó el método de secuestro de radicales libres DPPH para determinar la capacidad antioxidante de los extractos acuosos y metanólicos de los modelos AKU, RBU y RCU (Figs. 47 y 48, respectivamente), durante la fermentación espontánea y controlada.

En la fermentación controlada, los extractos acuosos y metanólicos de AKU exhibieron un poder reductor significativamente mayor que en el proceso espontáneo ( $p \leq 0,05$ ) (Figs. 47a y 48a). Se observó un incremento significativo de la capacidad antioxidante de los extractos acuosos y metanólicos AKU hasta el día 10 ( $p \leq 0,05$ ); luego se mantuvo constante hasta finalizar la fermentación controlada ( $p > 0,05$ ), alcanzando valores de  $219,08 \pm 6,72$  y  $204,32 \pm 5,13$  mg EAA/100 g PS, respectivamente. Mientras que, en la fermentación espontánea los extractos acuosos y metanólicos de AKU no mostraron cambios significativos durante todo el proceso, con valores de  $110,65 \pm 8,79$  y  $95,97 \pm 3,54$  mg EAA/100 g PS, respectivamente ( $p > 0,05$ ).

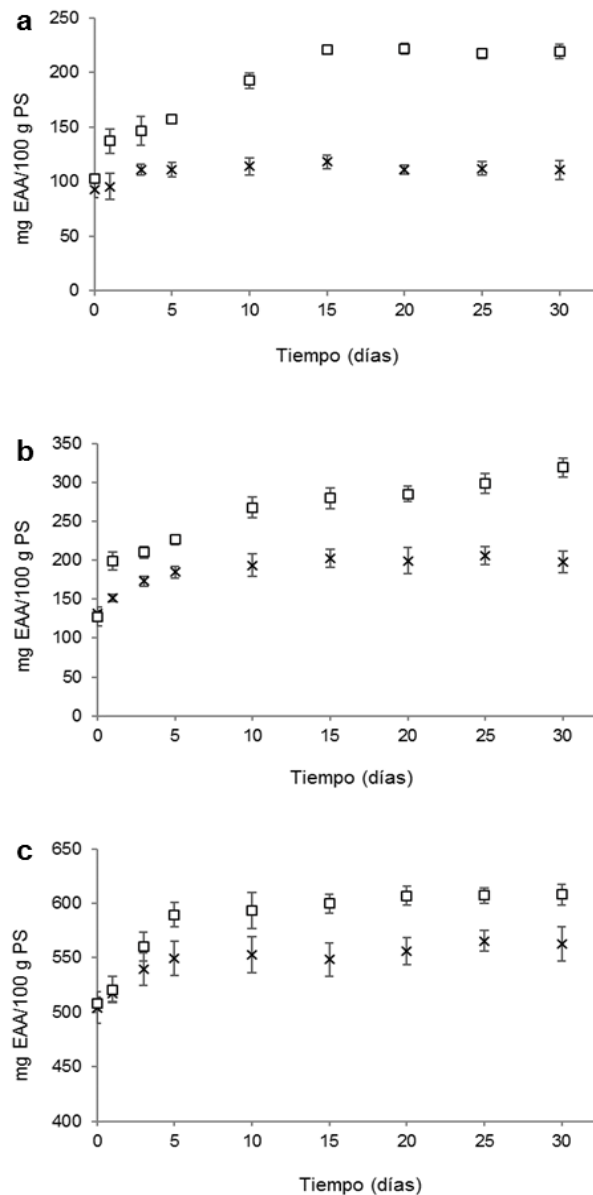
Los extractos acuosos RBU exhibieron un incremento significativo de la capacidad antioxidante en ambas fermentaciones; no obstante, el proceso controlado mostró un mayor poder reductor que el espontáneo ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 47b). En la fermentación

controlada y espontánea, los extractos acuosos exhibieron un incremento significativo del poder reductor hasta el día 10 y tres, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ). Luego, la capacidad antioxidante se mantuvo sin cambios hasta completar el ensayo, alcanzando valores de  $319,33 \pm 12,31$  y  $197,70 \pm 13,59$  mg EAA/100 g PS en el proceso controlado y espontáneo, respectivamente ( $p > 0,05$ ). Por otro lado, los extractos metanólicos de RBU exhibieron un comportamiento similar durante el proceso controlado y espontáneo (Fig. 48b). Se determinó un aumento significativo del poder reductor en los extractos metanólicos hasta el día 15, luego no se observaron cambios hasta finalizar el ensayo, alcanzando valores de  $296,76 \pm 10,32$  y  $211,27 \pm 13,27$  mg EAA/100 g PS, respectivamente. Al igual que en el extracto acuoso, la fermentación espontánea exhibió un menor poder reductor que el proceso controlado ( $p \leq 0,05$ ).

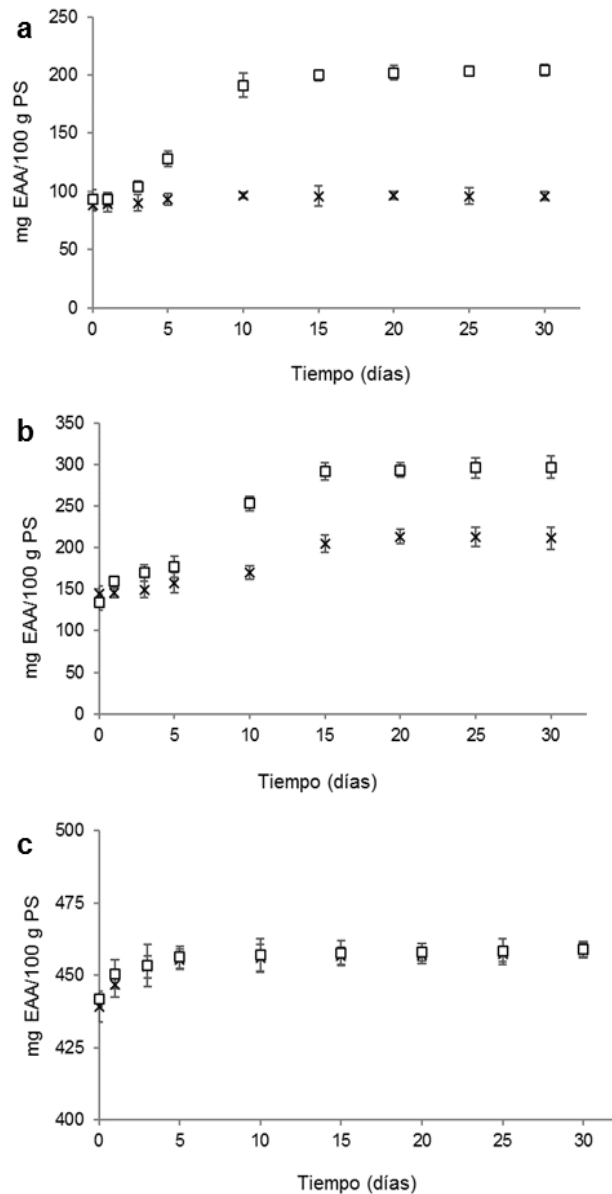
Por último, los extractos acuosos y metanólicos de RCU exhibieron un mayor poder reductor que los modelos combinados de AKU y RBU ( $p \leq 0,05$ ) (Figs. 47c y 48c). No obstante, se observó un comportamiento diferente en la evolución de la capacidad antioxidante entre los extractos acuosos y metanólicos de RCU. En la fermentación controlada, los extractos acuosos de RCU mostraron un incremento significativo del poder reductor hasta el día 5 y posteriormente no se observaron variaciones; mientras que, en el proceso espontáneo se determinó un leve incremento significativo recién en el último periodo del ensayo (día 25). Se determinó que, a partir del día 20, los extractos acuosos de RCU exhibieron diferencia significativa entre los dos tipos de fermentaciones, alcanzando valores finales de  $608,04 \pm 9,26$  y  $562,57 \pm 15,80$  mg EAA/100 g PS en el proceso controlado y espontáneo, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ). Por otro lado, los extractos metanólicos de RCU no presentaron diferencias significativas durante el periodo de fermentación ni entre los procesos realizados, exhibiendo valores de  $458,55 \pm 2,51$  y  $458,97 \pm 2,80$  mg EAA/100 g PS en la fermentación espontánea y controlada, respectivamente ( $p > 0,05$ ).

Se observó un comportamiento similar en los distintos modelos, la capacidad de secuestro del radical DPPH se incrementó a medida que avanzó la fermentación natural e inoculada, excepto para los extractos metanólicos de RCU. Los resultados obtenidos en este estudio durante la fermentación de AKU, RBU y RCU concuerdan con lo reportados por otros autores (Hur *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2008; Brochu, 2018; Sun *et al.*, 2009). Además, en todos los casos, los procesos controlados exhibieron mayores valores EAA que los espontáneos ( $p \leq 0,05$ ), excepto para los extractos metanólicos de RCU. Hunaefi *et al.* (2013), reportaron que la inoculación con *L. plantarum* exhibió un efecto significativo en la actividad antioxidante al comparar estos valores con la fermentación natural de RC. Estas diferencias observadas entre ambas fermentaciones

podrían corresponder a los cultivos iniciadores utilizados, ya que los polifenoles pueden transformarse a formas aglicónicas por la acción de las enzimas de las BAL, produciendo moléculas con mayor actividad antioxidante (Hur *et al.*, 2014). Las cepas de *L. plantarum* poseen actividad tanasa capaz de hidrolizar los enlaces éster presentes en los taninos hidrolizables, liberando poderosos compuestos antioxidantes como el ácido gálico y el pirogalol (Hur *et al.*, 2014). Además, las pectinasas pueden modificar la textura de la col durante la fermentación (Seong *et al.*, 2016), lo que permite la liberación de compuestos fenólicos.



**Figura 47:** Actividad antioxidante (ensayo DPPH) en extractos acuosos de AKU (a), RBU (b) y RCU (c); durante la fermentación espontánea (x) y controlada (□). Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres mediciones.



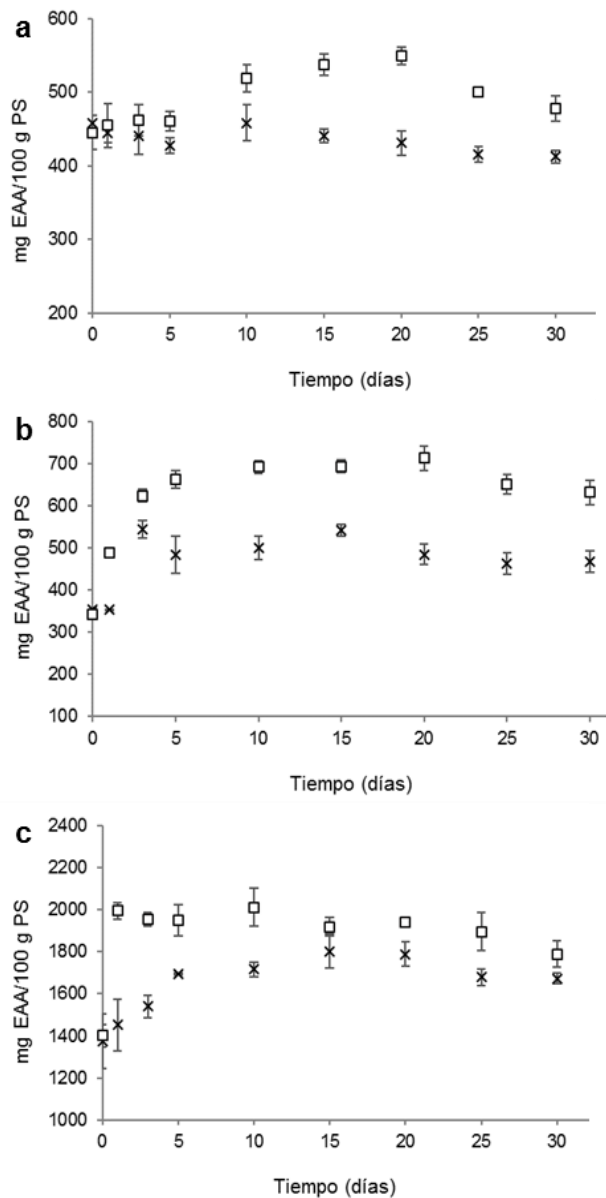
**Figura 48:** Actividad antioxidante (ensayo DPPH) en extractos metanólicos de AKU (a), RBU (b) y RCU (c); durante la fermentación espontánea (x) y controlada (□). Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres mediciones.

#### 4.10.2.4 Capacidad antioxidante según el método CUPRAC

Se analizaron los cambios de la capacidad antioxidante de los extractos acuosos y metanólicos de AKU, RBU y RCU según el método CUPRAC durante la fermentación espontánea y controlada (Figs. 49 y 50, respectivamente). Al igual que se observó en los modelos de brasicáceas, se obtuvieron valores de EAA mayores mediante el método CUPRAC que los exhibidos por DPPH, en todos los casos ( $p \leq 0,05$ ).

Los extractos acuosos y metanólicos de AKU mostraron un comportamiento diferente entre los dos tipos de fermentaciones (Figs. 49a y 50a). En el proceso controlado, los

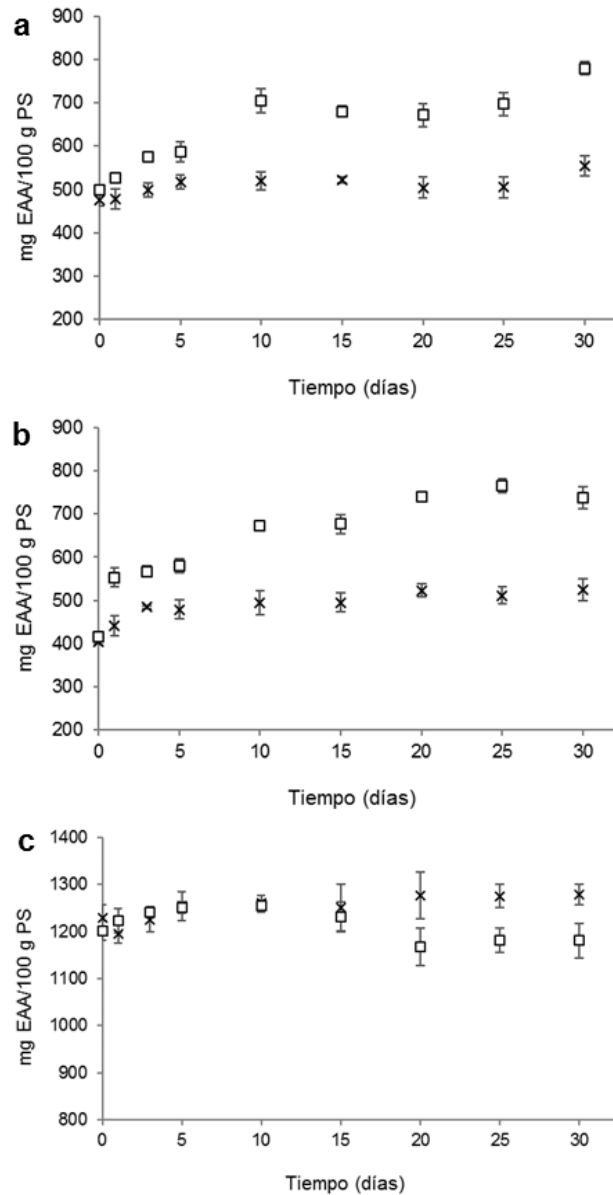
extractos acuosos exhibieron un incremento significativo hasta el día 20 y luego descendieron en la etapa final del ensayo, alcanzando valores de  $477,56 \pm 16,86$  mg EAA/100 g PS; mientras que, los extractos metanólicos mostraron un aumento significativo hasta finalizar la fermentación, con valores de  $779,94 \pm 14,64$  mg EAA/100 g PS. No obstante, en la fermentación espontánea no se observaron diferencias significativas durante el proceso ( $p > 0,05$ ), exhibiendo los extractos acuosos y metanólicos valores de  $412,35 \pm 8,96$  y  $554,72 \pm 24,00$  mg EAA/100 g PS, respectivamente. Se determinó que, la fermentación controlada de AKU exhibió un mayor poder reductor que la fermentación espontánea para ambos extractos ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 49:** Actividad antioxidante (ensayo CUPRAC) en extractos acuosos de AKU (a), RBU (b) y RCU (c); durante la fermentación espontánea (x) y controlada (□). Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres mediciones.

En la fermentación espontánea y controlada, los extractos acuosos de RBU incrementaron la capacidad antioxidante hasta el día tres ( $543,15 \pm 21,08$  mg EAA/100 g PS) y cinco ( $662,78 \pm 20,55$  mg EAA/100 g PS), respectivamente ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 49b). Luego, en el proceso espontáneo, la capacidad antioxidante se mantuvo constante hasta los 30 días, exhibiendo valores de  $467,87 \pm 25,30$  mg EAA/100 g PS ( $p > 0,05$ ). Mientras que, en la fermentación controlada, se observó un descenso leve en el último periodo, alcanzando valores finales de  $631,10 \pm 28,46$  mg EAA/100 g PS ( $p \leq 0,05$ ). Por otra parte, los extractos metanólicos RBU también exhibieron un comportamiento diferente entre las fermentaciones (Fig. 50b). En el proceso espontáneo, los extractos metanólicos mostraron un incremento significativo de la capacidad antioxidante hasta el día tres ( $484,34 \pm 2,93$  mg EAA/100 g PS) ( $p \leq 0,05$ ); luego, no se detectaron variaciones significativas hasta finalizar el ensayo, alcanzando valores de  $524,91 \pm 26,35$  mg EAA/100 g PS ( $p > 0,05$ ). Mientras que, en la fermentación controlada, los extractos metanólicos de RBU exhibieron un incremento gradual hasta finalizar el ensayo, obteniéndose valores de  $737,54 \pm 24,93$  mg EAA/100 g PS ( $p \leq 0,05$ ). Se observó que, la fermentación controlada mostró un mayor poder reductor con respecto al proceso espontáneo durante todo el ensayo ( $p \leq 0,05$ ), tanto en los extractos acuosos como metanólicos de RBU.

Por último, en el proceso controlado y espontáneo, los extractos acuosos de RCU exhibieron un patrón similar durante el periodo de fermentación (Fig. 49c); se determinó un incremento significativo de la capacidad antioxidante en el día uno ( $1993,93 \pm 37,95$  mg EAA/100 g PS) y día cinco ( $1695,42 \pm 4,74$  mg EAA/100 g PS) del ensayo, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ). Luego, los valores se mantuvieron estables hasta el día 30, alcanzando valores de  $1673,06 \pm 26,88$  y  $1788,22 \pm 63,24$  mg EAA/100 g PS en la fermentación espontánea y controlada, respectivamente. En la fermentación controlada, los extractos acuosos exhibieron valores de EAA mayores que en la espontánea, pero sólo en las etapas iniciales del proceso ( $p \leq 0,05$ ); luego, en los periodos intermedios y finales, las diferencias exhibidas dejan de ser significativas ( $p > 0,05$ ). En el caso de los extractos metanólicos de RCU, tanto en la fermentación espontánea como la controlada no se observaron diferencias significativas de la capacidad antioxidante durante el proceso, exhibiendo valores finales de  $1277,96 \pm 21,96$  y  $1180,46 \pm 36,89$  mg EAA/100 g PS, respectivamente (Fig. 50c). Por otro lado, los extractos metanólicos no mostraron diferencias significativas de los valores de EAA entre las fermentaciones realizadas ( $p > 0,05$ ).



**Figura 50:** Actividad antioxidante (ensayo CUPRAC) en extractos metanólicos de AKU (a), RBU (b) y RCU (c); durante la fermentación espontánea (x) y controlada (□). Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres mediciones.

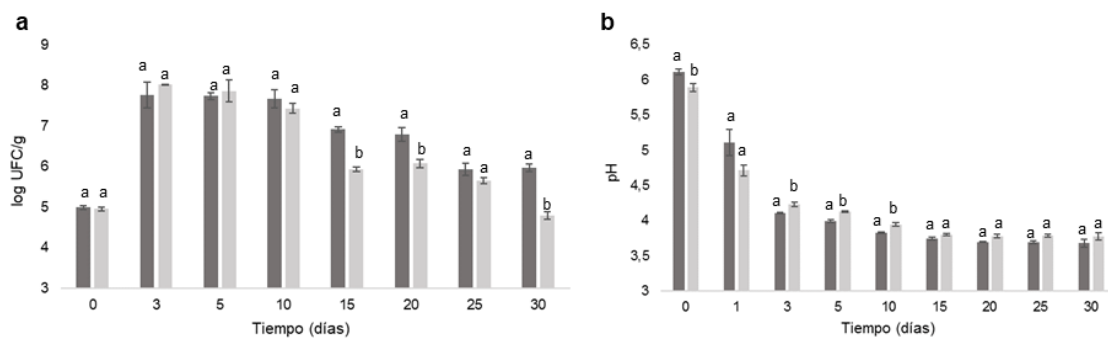
Se determinó que, el modelo RCU exhibió una mayor capacidad antioxidante que el RBU y AKU, independientemente del tipo de fermentación, extracto y método utilizado (DPPH/CUPRAC) ( $p \leq 0,05$ ). Este comportamiento también se observó previamente en los modelos de *Brassica* (sin *U. pinnatifida*). Estas diferencias corresponden a que, como se mencionó anteriormente, el RC fresco presenta una mayor cantidad de compuestos antioxidantes en comparación con otros vegetales *Brassica* ( $p \leq 0,05$ ) (Upadhyay *et al.*, 2016).

#### 4.10.3 Comparación entre los modelos: brasicáceas y brasicáceas/*U. pinnatifida*

Se realizó una comparación entre las fermentaciones controladas de los modelos brasicáceas (AK, RB y RC) y *Brassica* suplementado con *U. pinnatifida* (AKU, RBU y RCU) con el objetivo de evaluar tanto la evolución de los procesos como, las variaciones de la capacidad antioxidante y CTF de los mismos.

##### 4.10.3.1 Modelo AK vs AKU

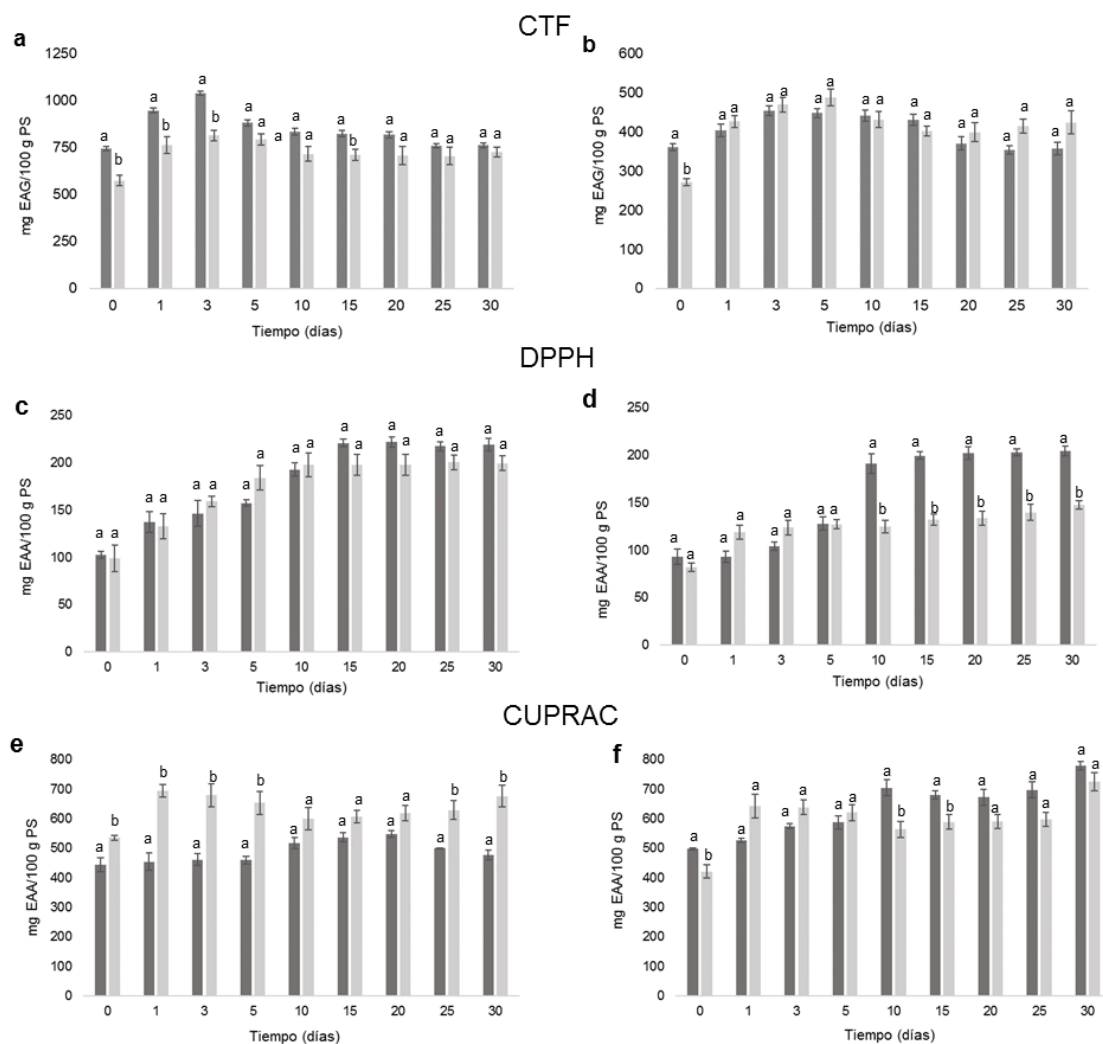
Se comparó la evolución de la población de BAL y el pH de modelos AK y AKU durante la fermentación controlada (Fig. 51). Se determinó que el agregado de un 20% de *U. pinnatifida* a la matriz vegetal no afectó significativamente el desarrollo de las BAL; por el contrario, al finalizar el ensayo, en el modelo AKU se obtuvo  $6,0 \pm 0,1$  log UFC/g, mientras que en el AK fue de  $4,8 \pm 0,1$  log UFC/g ( $p \leq 0,05$ ). Por otro lado, se observaron pequeñas variaciones del pH entre AK y AKU en las etapas iniciales ( $p \leq 0,05$ ). Sin embargo, ambos modelos alcanzaron valores de  $\text{pH} < 4,0$  en el día 10 y luego, no se observaron diferencias significativas entre los mismos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 51:** Comparación entre los modelos AK (●) y AKU (◐): (a) recuento total de BAL y (b) monitoreo de pH durante la fermentación controlada. Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de dos mediciones. Letras iguales, situadas sobre las barras de error, indican que no hay diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las medias de los modelos comparados para cada tiempo.

Luego, se comparó el CTF y la actividad antioxidante de los extractos acuosos y metanólicos entre los modelos AK y AKU (Fig. 52). Se determinó que, los extractos acuosos obtenidos del modelo AKU exhibieron mayores valores de polifenoles que el AK durante los primeros días del proceso ( $p \leq 0,05$ ); no obstante, a partir del día cinco no se observaron diferencias significativas entre los mismos, alcanzando valores finales de  $761,87 \pm 14,21$  y  $726,46 \pm 25,05$  mg EAG/100 g PS, respectivamente ( $p > 0,05$ ) (Fig. 52a). Luego, se determinó que, a excepción del día inicial, los extractos metanólicos no exhibieron una diferencia significativa entre los modelos AK y AKU exhibiendo valores finales de  $424,63 \pm 30,06$  y  $357,83 \pm 15,46$  mg EAG/100 g PS, respectivamente ( $p > 0,05$ ) (Fig. 52b).

Se comparó la capacidad antioxidante mediante los resultados obtenidos con los métodos DPPH y CUPRAC, entre los modelos AK y AKU. En el caso de los resultados obtenidos con el ensayo DPPH, se determinó que los extractos acuosos no mostraron diferencias significativas entre AK y AKU en los distintos tiempos de la fermentación ( $p > 0,05$ ), exhibiendo valores finales de  $199,58 \pm 7,76$  y  $219,08 \pm 6,72$  mg EAA/100 g PS, respectivamente (52c). Mientras que, los extractos metanólicos del AKU mostraron un mayor poder reductor que el modelo AK, a partir del día 10 hasta finalizar el proceso, alcanzando valores de  $204,32 \pm 5,13$  y  $147,59 \pm 4,35$  mg EAA/100 g PS, respectivamente (52d).

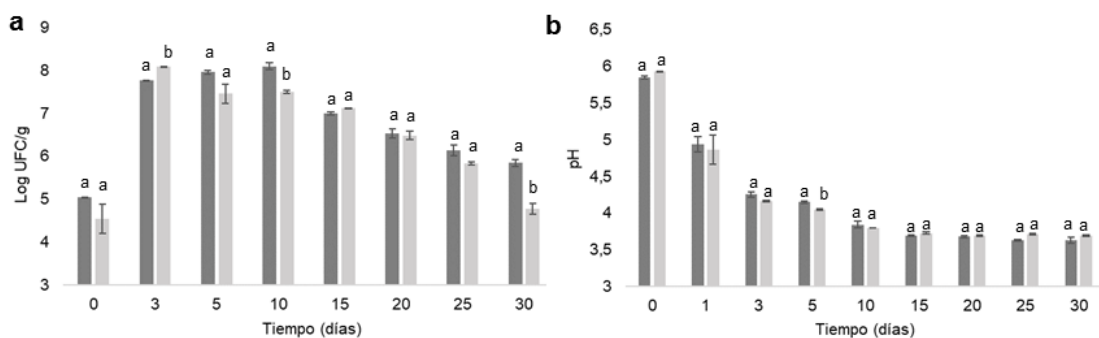


**Figura 52:** Comparación entre los modelos AK (●) y AKU (●): (a y b) CTF, (c y d) capacidad antioxidante mediante el método DPPH y (e y f) CUPRAC obtenidos durante la fermentación controlada, en los extractos (a, c, e) acuosos y (b, d, f) metanólicos. Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres mediciones. Letras iguales, situadas sobre las barras de error, indican que no hay diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las medias de los modelos comparados para cada tiempo.

Por último, al analizar los resultados de CUPRAC, se observó que los extractos acuosos del modelo AK mostraron mayor capacidad antioxidante que el AKU, alcanzando valores finales de  $676,43 \pm 37,19$  y  $477,56 \pm 16,86$  mg EAA/100 g PS, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 52e). Mientras que, los extractos metanólicos no mostraron diferencia significativa entre los modelos en los distintos periodos estudiados (con excepción del día inicial), exhibiendo valores de  $726,36 \pm 30,98$  y  $779,94 \pm 14,64$  mg EAA/100g g PS en AK y AKU, respectivamente (Fig. 52f).

#### 4.10.3.2 Modelo RB vs RBU

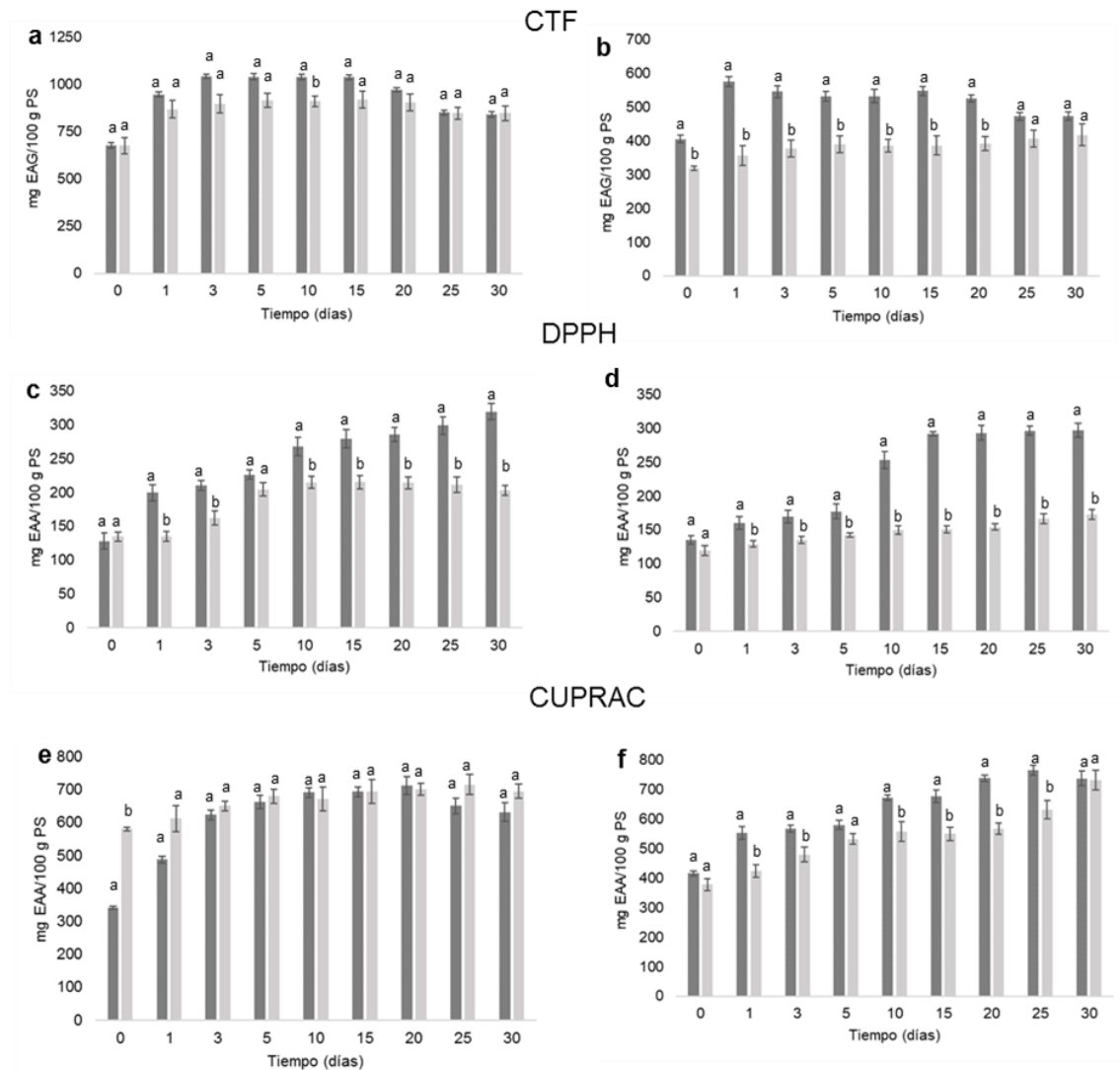
Se comparó la población de BAL y los valores pH en los modelos RB y RBU, durante el periodo de fermentación (Fig. 53). En la etapa inicial de las fermentaciones, la población de BAL no mostró diferencias significativas entre los modelos estudiados ( $p > 0,05$ ); no obstante, en las etapas intermedias se puede observar ciertas variaciones ( $p \leq 0,05$ ), repercutiendo en el día 30, donde el modelo RBU exhibió un mayor número de BAL que el RB,  $5,8 \pm 0,1$  y  $4,8 \pm 0,1$  log UFC/g, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 53a). Sin embargo, a pesar de las variaciones observadas en la población de BAL, no se observaron diferencias significativas con respecto a la evolución del pH entre los modelos ( $p > 0,05$ ) (Fig. 53b). Ambos modelos alcanzaron valores de pH  $< 4,0$  en el día 10 del proceso y luego se mantuvieron constante hasta finalizar el ensayo ( $p > 0,05$ ). Por lo tanto, se puede decir que, la fermentación controlada del RBU no exhibió variaciones significativas con el agregado del 20% de lámina de *U. pinnatifida* al compararlo con el modelo RB.



**Figura 53:** Comparación entre los modelos RB (●) y RBU (●): (a) recuento total de BAL y (b) monitoreo de pH durante la fermentación controlada. Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de dos mediciones. Letras iguales, situadas sobre las barras de error, indican que no hay diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las medias de los modelos comparados para cada tiempo.

La evolución del CTF de los modelos RB y RBU durante el periodo de fermentación controlada se muestran en las Figs. 54a y 54b. Se determinó que, los extractos acuosos no mostraron diferencias significativas entre RB y RBU, exhibiendo valores finales de  $847,67 \pm 37,51$  y  $842,87 \pm 15,05$  mg EAG/100 g PS, respectivamente ( $p > 0,05$ ). Los

extractos metanólicos de RBU exhibieron mayores CTF que el RB hasta el día 20 ( $p \leq 0,05$ ); mientras que, al finalizar el proceso no se determinaron diferencias significativas entre los mismos, exhibiendo valores de  $473,28 \pm 12,28$  y  $418,14 \pm 31,64$  mg EAG/100 g PS, respectivamente ( $p > 0,05$ ).



**Figura 54:** Comparación entre los modelos RB (●) y RBU (●): (a y b) CTF, (c y d) capacidad antioxidante mediante el método DPPH y (e y f) CUPRAC obtenidos durante la fermentación controlada, en los extractos (a, c, e) acuosos y (b, d, f) metanólicos. Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres mediciones. Letras iguales, situadas sobre las barras de error, indican que no hay diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las medias de los modelos comparados para cada tiempo.

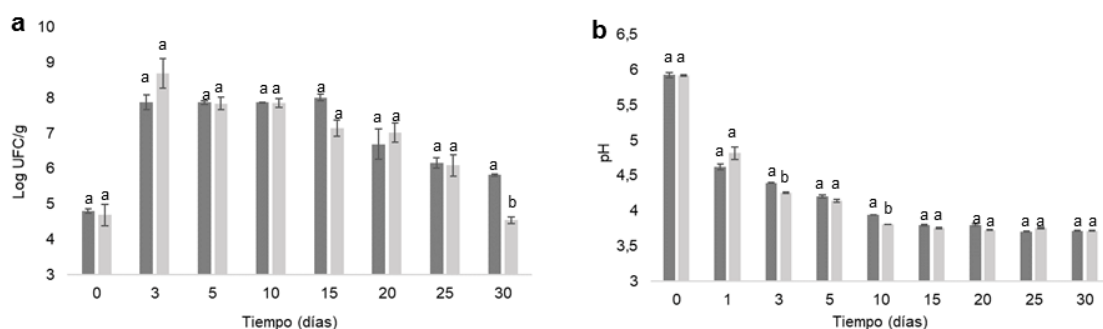
Por otro lado, se compararon los resultados obtenidos con el método DPPH entre los modelos, durante el proceso de fermentación controlada (Figs. 54c y 54d). Los extractos acuosos del modelo RBU exhibieron mayor poder reductor que el RB durante todo el proceso (a excepción del día inicial), alcanzando valores finales de  $319,33 \pm 12,31$  y  $202,87 \pm 7,24$  mg EAA/100 g PS, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ). El mismo comportamiento

se observó en los extractos metanólicos de RBU, los cuales presentaron una mayor capacidad antioxidante que el RB, mostrando valores finales de  $296,76 \pm 10,32$  y  $175,30 \pm 3,82$  mg EAA/100 g PS, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ).

Por último, se compararon los valores obtenidos con el método CUPRAC entre los modelos durante el periodo de fermentación controlada (Figs. 54e y 54f). Los extractos acuosos de RB mostraron inicialmente una mayor capacidad antioxidante que el modelo RBU ( $p \leq 0,05$ ). No obstante, al continuar el proceso de fermentación no se observaron diferencias significativas entre los modelos RB y RBU, exhibiendo valores finales de  $694,48 \pm 21,87$  y  $631,10 \pm 28,46$ , respectivamente ( $p > 0,05$ ) (Fig. 54e). Mientras que, los extractos metanólicos de RBU mostraron una mayor capacidad antioxidante que el RB, luego de haber iniciado la fermentación controlada ( $p \leq 0,05$ ). Sin embargo, al finalizar el proceso no se determinaron diferencias significativas entre los modelos RB y RBU, alcanzando valores finales de  $732,33 \pm 33,80$  y  $737,54 \pm 24,93$  mg EAA/100 g PS, respectivamente (Fig. 54f).

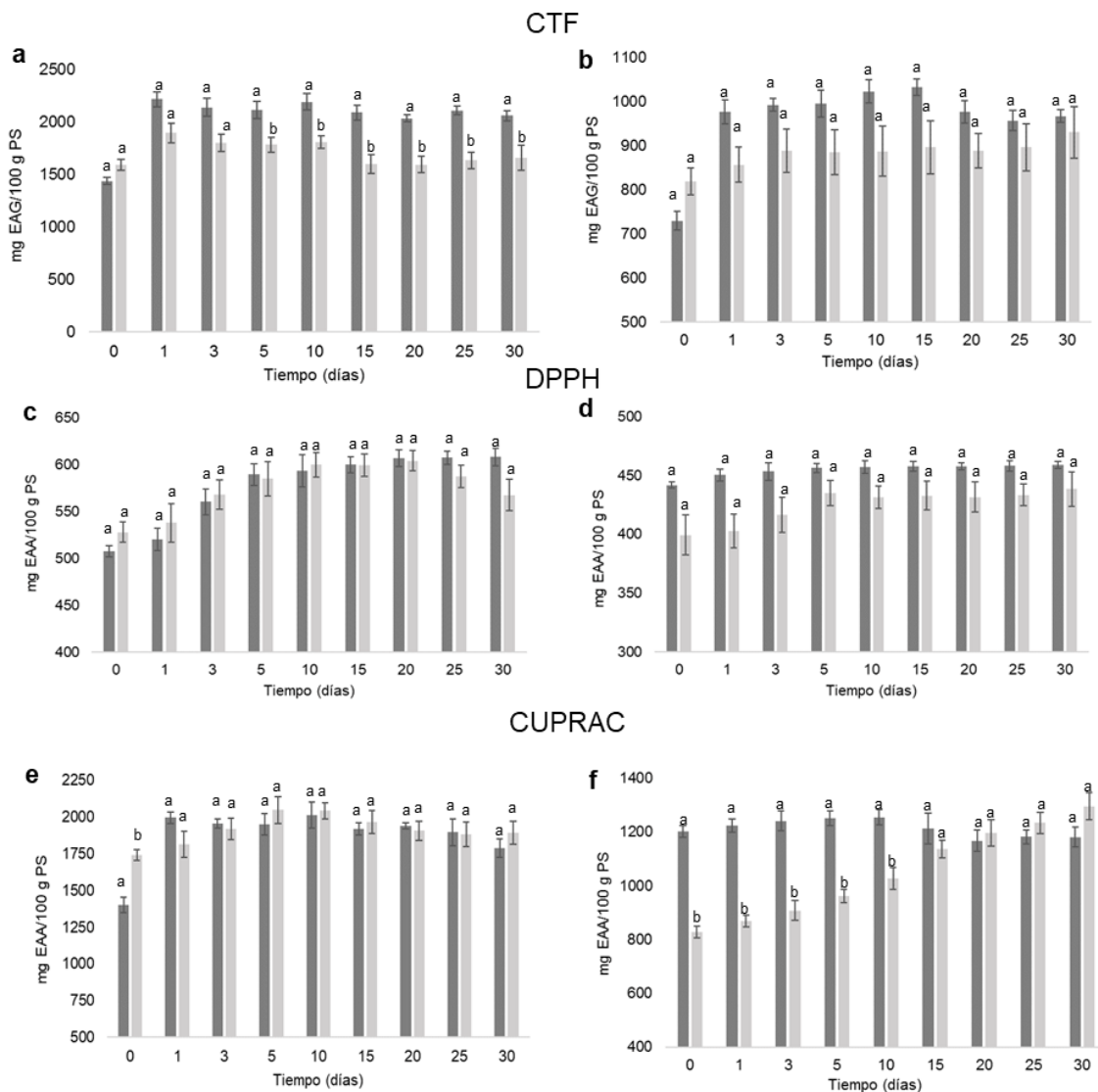
#### 4.10.3.3 Modelo RC vs RCU

Se comenzó comparando la evolución de la población de BAL y pH entre los modelos RC y RCU, durante la fermentación controlada (Fig. 55). Los modelos comparados no mostraron diferencias significativas en el número de BAL durante el periodo de fermentación ( $p > 0,05$ ); sin embargo, en el día 30, el RCU mostró una población significativamente mayor que el RC,  $5,8 \pm 0,1$  y  $4,5 \pm 0,1$  log UFC/g ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 55a). Luego, se determinaron algunas diferencias en los valores de pH al comparar los modelos en las etapas intermedias del proceso. No obstante, ambos alcanzaron un  $pH < 4,0$  a los 10 días del proceso y posteriormente no mostraron diferencias significativas hasta finalizar la fermentación controlada ( $p > 0,05$ ) (Fig. 55b).



**Figura 55:** Comparación entre los modelos RC (●) y RCU (●): recuento total de BAL (a) y monitoreo de pH (b) durante la fermentación controlada. Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de dos mediciones. Letras iguales, situadas sobre las barras de error, indican que no hay diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las medias de los modelos comparados para cada tiempo del proceso.

Por otra parte, se comparó el CTF entre los modelos RC y RCU durante el periodo de fermentación controlada (Figs. 56a y 56b). Se observó que los extractos acuosos de RCU exhibieron un mayor contenido de polifenoles que el RC, a partir del día cinco hasta finalizar el ensayo, exhibiendo valores de 2059,4±50,1 y 1657,7±118,2 mg EAG/100 g PS, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 56a). Mientras que, el CTF de los extractos metanólicos no mostraron diferencias significativas entre los modelos RC y RCU a lo largo del proceso de fermentación, presentando valores finales de 930,6±58,5 y 966,5±14,5 mg EAG/100 g PS, respectivamente ( $p > 0,05$ ) (Fig. 56b).



**Figura 56:** Comparación entre los modelos RC (●) y RCU (●): (a y b) CTF, (c y d) capacidad antioxidante mediante el método DPPH y (e y f) CUPRAC obtenidos durante la fermentación controlada, en los extractos (a, c, e) acuosos y (b, d, f) metanólicos. Cada valor es la media ± desviación estándar de tres mediciones. Letras iguales, situadas sobre las barras de error, indican que no hay diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las medias de los modelos comparados para cada tiempo del proceso.

Posteriormente, se compararon los valores de capacidad antioxidante entre los modelos RC y RCU durante el periodo de fermentación controlada. Mediante el método DPPH, se observó que los extractos acuosos de RC y RCU no exhibieron diferencias significativas en la capacidad antioxidante a lo largo de la fermentación, alcanzando valores finales de  $567,5 \pm 16,8$  y  $608,0 \pm 9,3$  mg EAA/100 g PS ( $p > 0,05$ ) (Fig. 56c). La capacidad antioxidante de los extractos metanólicos exhibieron el mismo comportamiento entre los modelos ( $p > 0,05$ ), expresando valores finales de  $438,5 \pm 14,7$  y  $459,0 \pm 5,6$  mg EAA/100 g PS en el RC y RCU, respectivamente (Fig. 56d). En el caso de CUPRAC, se observó que los extractos acuosos de RC presentaron una mayor capacidad antioxidante que el RCU al inicio de la fermentación ( $p \leq 0,05$ ); sin embargo, posteriormente no se determinaron diferencias significativas durante el proceso entre ambos modelos, exhibiendo valores finales de  $1890,7 \pm 77,4$  y  $1788,2 \pm 63,2$  mg EAA/100 g PS, respectivamente ( $p > 0,05$ ) (Fig. 56e). Por el contrario, se determinó una mayor capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de RCU en comparación con los de RC en las etapas iniciales de la fermentación ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 56f). No obstante, al avanzar el proceso de fermentación no se observaron diferencias significativas entre los modelos RC y RCU, con valores finales de  $1295,8 \pm 49,6$  y  $1180,5 \pm 36,9$  mg EAA/100 g PS, respectivamente ( $p > 0,05$ ).

Actualmente, las investigaciones apuntan a mejorar las propiedades nutricionales de los alimentos, así como desarrollar alimentos funcionales a través de la suplementación con algas marinas con el fin de incrementar los beneficios para la salud (Nuno *et al.*, 2019). Luego de analizar las comparaciones entre los modelos, se determinó que el agregado de *U. pinnatifida* (20%) no afectó el desarrollo de la fermentación en ninguno de los casos, ya que no se observaron grandes diferencias en la evolución de la población de BAL y del pH. Por el contrario, al finalizar las fermentaciones, los modelos combinados exhibieron una mayor población de BAL que los modelo de brasicáceas ( $p \leq 0,05$ ). Las BAL tienen requerimientos nutricionales complejos y requieren varios nutrientes, incluidos hidratos de carbono como fuente de energía, sales minerales, vitaminas, aminoácidos y nucleótidos para su crecimiento (Wegkamp *et al.*, 2010). Si bien, los tejidos de las algas no aportan sustratos favorables para la fermentación de la matriz vegetal (Brochu, 2018), si contribuirían con una mayor contenido y diversidad de mineras y vitaminas (A, D, E, complejo B y B12) (Kolb *et al.*, 2004; Nuno *et al.*, 2019) en los modelos combinados con brasicáceas, esta variación de nutrientes disponibles entre los modelos podría explicar la variabilidad del recuento de BAL durante la fermentación. Cabe destacar que, todos los modelos fermentados de manera controlada alcanzaron un  $pH < 4,0$  a los 10 días del proceso, independientemente del vegetal utilizado y si

estaban suplementados, o no, con *Undaria*; valor que exige el CAA (Art. 976) para los productos denominados chucrut.

En estudios previos se analizó la variación de la capacidad antioxidante y el CTF de las diferentes estructuras del alga *Undaria*, recolectadas en el Golfo Nuevo, a lo largo del año. Los extractos metanólicos de la lámina exhibieron la mayor concentración de CTF y actividad antioxidante (método DPPH) en los meses de julio y agosto, alcanzando valores de 223 mg EAG/100 g PS y 247,51 mg EAA/100 g PS, respectivamente (Solana, V., comunicación personal, septiembre 2019).

En este trabajo, los extractos metanólicos de AK y RB sin fermentar (tiempo 0) exhibieron un CTF similar que los reportados en la lámina de *Undaria*,  $272,03 \pm 8,54$  y  $318,80 \pm 6,33$  mg EAG/100 g PS, respectivamente; mientras que el RC presentó un valor mayor,  $818,69 \pm 30,06$  mg EAG/100 g PS. Sin embargo, al comparar los resultados de capacidad antioxidante (método DPPH) de los extractos metanólicos del alga con los vegetales sin fermentar (tiempo 0), se determinó que la lámina de *Undaria* presentó mayor poder reductor que el AK ( $82,25 \pm 4,50$  mg EAA/100 g PS) y RB ( $119,25 \pm 7,64$  mg EAA/100 g PS); mientras que el RC superó los valores de capacidad antioxidante reportados de la lámina,  $399,42 \pm 16,80$  mg EAA/100 g PS. Se puede observar que, los polifenoles no son los únicos compuestos que influyen sobre la capacidad antioxidante de un alimento; los carotenoides (fucoxantina en algas pardas), los polisacáridos sulfatados (fucoidano y alginato en *Undaria*), vitaminas y las antocianinas (presentes en RC), son algunos de los compuestos que intervienen en el poder reductor del mismo (Hur *et al.*, 2014; Nuno *et al.*, 2019).

Mediante el análisis comparativo realizando entre los modelos correspondientes (AK-AKU, RB-RBU, RC-RCU), se determinó que los mismos no exhibieron diferencias significativas en el CTF al inicio del proceso (tiempo 0) ( $p > 0,05$ ). En el caso de RCU, ambos extractos, exhibieron un menor valor de CTF al compararlo con los de RC en el tiempo 0, lo cual es esperable por los datos mencionados en el párrafo anterior; sin embargo, estas diferencias obtenidas no fueron significativas entre los mismos ( $p > 0,05$ ). Al finalizar el proceso, los modelos combinados con *Undaria* (AKU, RBU, RCU) exhibieron una concentración del CTF mayor o similar que los modelos de brasicáceas correspondiente (AK, RB, RC), el resultado dependió del tipo de extracto y vegetal estudiado; sin embargo, en ningún caso se observaron valores significativamente inferiores. El mismo comportamiento se determinó para la capacidad antioxidante, al finalizar la fermentación los modelos combinados con el alga (AKU, RBU, RCU) mostraron igual o mayor poder reductor que los modelos de *Brassica* correspondientes

(AK, RB, RC); a excepción del extracto acuoso del modelo AKU, el cual exhibió un menor poder reductor que el modelo AK mediante el método CUPRAC.

La tendencia a consumir alimentos escasos de nutrientes junto con hábitos dietéticos irracionales (consumo de alimentos ultraprocesados, bebidas con altos niveles de azúcares y/o de alcohol, etc.) son las principales razones de los trastornos fisiológicos establecidos en la sociedad. La malnutrición abarca los desequilibrios de vitaminas o minerales, acumulación de grasa visceral, obesidad, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, enfermedades inflamatorias, tumorales y otras relacionadas (OMS, 2021). Si bien, los vegetales *Brassica* tienen un elevado aporte nutricional y una gran diversidad de compuestos bioactivos que exhiben influencia sobre la salud, específicamente en la prevención enfermedades cardiovasculares y metabólicas como la diabetes y la obesidad, en tratamientos de diferentes tipos de cáncer, entre otras (Cartea *et al.*, 2011; Fusari *et al.*, 2020; Kapusta-Duch *et al.*, 2012; Manchali *et al.*, 2011; Podsedek, 2007); el alga *U. pinnatifida* también se presenta como una excelente candidata para ser utilizada como alimento funcional, ya que regula muchos de los desórdenes fisiológicos mencionados anteriormente (Nuno *et al.*, 2019; Wells *et al.*, 2017). Esta alga se caracteriza por acumular metabolitos específicos, tales como polisacáridos (alginatos y fucoidanos) y carotenoides, que le confieren una amplia actividad biológica. Los alginatos se consideran excelentes prebióticos, ya que promueven significativamente el crecimiento de la microbiota intestinal (Cherry *et al.*, 2019), además presentan propiedades antihipertensivas y antidiabéticas (Nuno *et al.*, 2019). Mientras que, los fucoidanos presentes son considerados galactofucanos sulfatados, por su composición, y se caracterizan por presentar actividad anticancerígena, antiinflamatoria, antioxidante, anticoagulante, antitumoral, inmunoestimulante y antiviral (Chen *et al.*, 2009; Usov & Bilan, 2009; Zhang *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2018). Reportes previos, especifican que los extractos de *U. pinnatifida* exhibieron actividad inhibitoria de la  $\alpha$ -amilasa; la cual podría explicarse por la composición de alginatos y ácidos fenólicos presentes en la misma (Zaharudin *et al.*, 2018). Por otra parte, dipéptidos extraídos a partir de extractos de *Undaria* y suplementados en ratones, exhibieron actividad inhibitoria de la angiotensina 1, ejerciendo un efecto antihipertensivo en los mismos (Zhang *et al.*, 2014). Las fucoxantinas, pigmento característico de las algas pardas, mostraron un efecto contra la obesidad; además de presentar propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antidiabéticas y antifotoenvejecimiento (Nuno *et al.*, 2019; Wells *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2014). Trabajos previos, describen la actividad antiinflamatoria de los fucoesteroles obtenidos de *Undaria*; además de otros compuestos de interés como los fenoles, ya que

se ha demostrado su propiedad antioxidante, antimicrobianas, antiviral entre otras (Nuno *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2014).

En cuanto a su composición en minerales, las algas pardas se caracterizan por su capacidad superior de acumular sustancias inorgánicas del medio, a causa de la composición de polisacáridos presente en su superficie (Nuno *et al.*, 2019). Las algas pardas contienen concentraciones de minerales mayores que las presentes en alimentos vegetales y carnes (Kolb *et al.*, 2004); por esta razón su utilización en pequeñas cantidades pueden proporcionar a nuestros alimentos mucho de los elementos de los que carecen naturalmente.

Por estas razones, es que se seleccionaron los productos fermentados a base de vegetales *Brassica* suplementado con *Undaria* (AKU, RBU y RCU), ya que le proporcionaría al consumidor una mayor diversidad de compuestos bioactivos (fucoidanos, alginatos, polifenoles, fucoesteroles, carotenoides, entre otros) con propiedades nutricionales, funcionales y biológicas beneficiosas para la salud. A su vez, el consumo de alga también compensaría el contenido de minerales, proporcionando de esta forma muchos de los elementos faltantes. Además, estos fermentos serían una nueva alternativa para potenciar el consumo local del alga, aprovechando el recurso escasamente explotado en nuestras costas.

#### 4.11 Análisis microbiológico de los productos fermentados

Luego de finalizar la fermentación, se realizó un análisis microbiológico a los productos AKU, RBU y RCU, los valores obtenidos de levaduras, BAL, aerobios y coliformes totales están exhibidos en la Tabla 14.

**Tabla 14:** Recuentos microbiológicos obtenidos en los productos fermentados.

Recuentos microbianos (log UFC/g)	Productos fermentados		
	AKU	RBU	RCU
<i>Levaduras</i>	<1	2,5±0,31	<1
<i>BAL</i>	5,97±0,09	5,84±0,08	5,82±0,03
<i>Aerobios totales</i>	4,70±0,16	4,81±0,37	4,85±0,02
<i>Coliformes totales</i>	<1	<1	<1

Los recuentos de BAL y aerobios totales no exhibieron diferencias significativas entre los productos fermentados  $\approx 6$  log UFC/g ( $p > 0,05$ ). Estudios previos exhibieron valores más elevados de BAL ( $\approx 8$  log UFC/g) realizando una fermentación durante 14 días (Jagannath *et al.*, 2012; Zubaidah *et al.*, 2020). Estas diferencias corresponden

principalmente a los periodos de fermentación utilizados, al efectuarse el proceso en un tiempo más corto, la concentración de hidratos de carbono en la matriz es más alta promoviendo una mayor tasa de crecimiento de estos microorganismos. No obstante, se estima que los recuentos de BAL del chucrut pueden oscilar entre 3 log UFC/g y 8 log UFC/g (Rezac *et al.*, 2018). En cuanto a los recuentos de aerobios totales, los productos fermentados obtuvieron valores próximos a los datos exhibidos de BAL ( $\approx 5$  log UFC/g). Seseña Prieto (2007) obtuvo una evolución paralela de los aerobios totales y de BAL durante la fermentación controlada de berenjenas. Estas determinaciones, “a priori” nos permitiría afirmar que prácticamente toda la microbiota que crece en el medio PCA también lo hace en MRS.

El recuento de levaduras se estimó en menos de  $<1$  log UFC/g en AKU y RCU, mientras que, en RBU exhibió valores  $\approx 2,5$  log UFC/g. En estos tipos de alimentos, el crecimiento de levaduras puede ocasionar defectos en el producto, formación de burbujas por el  $\text{CO}_2$  y el  $\text{H}_2$  producidos. Las levaduras actúan principalmente durante la fermentación secundaria y son capaces de utilizar el ácido láctico formado en las etapas anteriores, lo que ocasiona un aumento del pH de la matriz, favoreciéndose el desarrollo de otros microorganismos también indeseables (Di Cagno *et al.*, 2016). Liu *et al.* (2021) mencionan que la concentración de levaduras en comparación con las BAL tiene que encontrarse en una relación 1:100-1:1000. Sin embargo, en el RBU al comparar las UFC de levaduras y BAL se obtuvo una relación 1:10000, por lo cual no afectaría la calidad del alimento. Prachyakij *et al.* (2008) determinaron que era menos probable que se produjera un deterioro por hongos y levaduras en vegetales fermentados inoculados con la especie *L. plantarum*. Sin embargo, aun sería necesario realizar más investigaciones para determinar por qué este inóculo tuvo un mayor efecto inhibitorio. En los vegetales fermentados los principales géneros de levaduras deteriorantes son *Candida* spp., *Saccharomyces* spp., *Pichia* spp., *Issatchenkia* spp. y *Zygosaccharomyces* spp., produciendo principalmente aromas atípicos, salmueras turbias y la degradación de los polisacáridos estructurales (Ballester *et al.*, 2022). En el caso del chucrut, si la fermentación no se completa el producto resultante es amargo y es más susceptible al deterioro por las levaduras (Di Cagno *et al.*, 2016). Por lo tanto, se deben tener en cuenta diferentes estrategias para inhibir el desarrollo de levaduras durante el proceso y almacenamiento, para asegurar la calidad microbiológica y las características sensoriales en este tipo de productos.

Los recuentos de coliformes en los alimentos se utilizan como indicador de una higiene inadecuada, condiciones insalubres o contaminación posterior a las etapas del proceso (Ghosh, 2021). La presencia de estos microorganismos se determinó al finalizar el

proceso de fermentación y se obtuvieron recuentos  $<1$  log UFC/g en los productos (AKU, RBU y RCU). Estudios previos han demostrado que la fermentación realizada con un starter seleccionado autóctono exhibe un rápido descenso de pH, un elevado consumo de carbohidratos fermentables, favoreciendo la inhibición de estos microorganismos (Di Cagno *et al.*, 2013).

Luego de realizar la evaluación de la calidad microbiológica de los productos fermentados (AKU, RBU y RCU), los mismos se consideraron inocuos y aptos para el consumo humano.

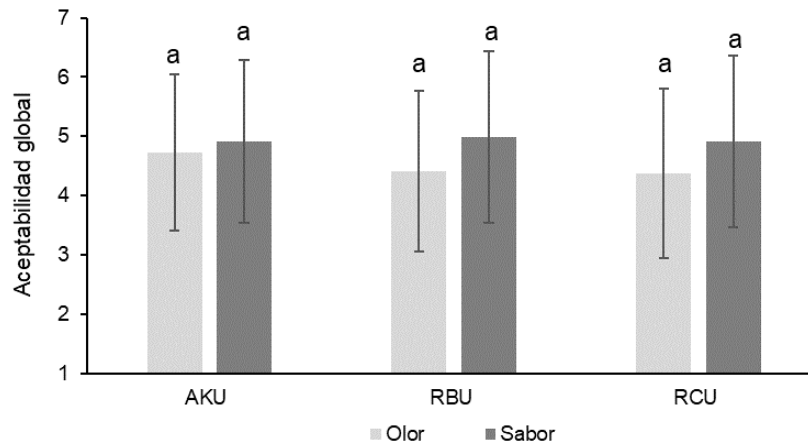
#### 4.12 Análisis sensorial

La evaluación sensorial comenzó durante la segunda guerra mundial cuando la industria alimentaria elaboró raciones de comida para los soldados y era necesario conocer su aceptabilidad. No obstante, el análisis sensorial se impulsó como ciencia dura en el siglo pasado, incrementándose rápidamente junto con el desarrollo de los alimentos procesados (Ruiz-Capillas *et al.*, 2021). Posteriormente, se convirtió en una disciplina científica utilizada para evocar, medir, analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de los alimentos, que son percibidas por todos los sentidos (IFT, 2005). Se realizó una evaluación sensorial de los productos fermentados (AKU, RBU y RCU), obtenidos a partir de una fermentación controlada, para conocer su aceptabilidad por parte de los consumidores. En este estudio, participaron 70 panelistas no entrenados, todos mayores de 18 años. Se comprobó que los panelistas exhibieron una mayor preferencia por el sabor de los productos que por el olor de estos ( $p \leq 0,05$ ) (Tabla 15). Se determinó que más de la mitad de los panelistas puntuaron con un valor mayor igual a cinco ( $\geq 5$ ) el sabor de todos los fermentos (AKU, RBU y RCU). El mismo porcentaje de aceptación ( $>50\%$ ) se observó para el olor de AKU y RBU; mientras que, el RCU obtuvo una menor puntuación (42,86%) (Tabla 15).

**Tabla 15:** Porcentaje de panelistas que calificaron los distintos productos con una puntuación  $\geq 5$  (me gusta levemente) en la escala hedónica.

Aceptabilidad global	Productos	Panelistas (%) puntuación $\geq 5$
Olor	AKU	59,15
	RBU	52,86
	RCU	42,86
Sabor	AKU	66,20
	RBU	68,57
	RCU	68,57

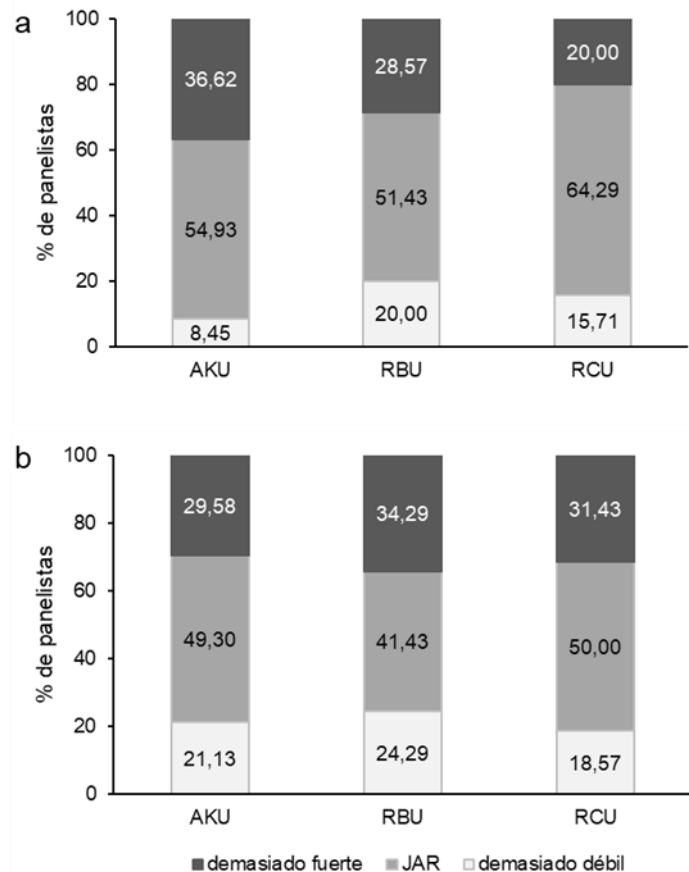
En cuanto a la aceptabilidad global, las muestras obtuvieron una calificación promedio ubicada entre cuatro y cinco en la escala hedónica; esto demostró que, a los panelistas les gustó levemente el olor y sabor de los productos, sin mostrar preferencias entre ellos ( $p>0,05$ ) (Fig. 57). Se puede apreciar una importante variabilidad en los valores recopilados de los panelistas para cada muestra, esto es consecuente a las apreciaciones completamente personales de los consumidores (culturales, educativas, ambientales, hábitos, debilidades, variabilidad en las capacidades sensoriales y predilección, etc.) (Ruiz-Capillas *et al.*, 2021)



**Figura 57:** Representación de la aceptación global (olor y sabor) promedio de cada producto (AKU, RBU, RCU), empleando la escala hedónica de siete puntos. Letras iguales, situadas sobre las barras de error, indican que no hay diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre las medias de los grupos comparados (olor y sabor).

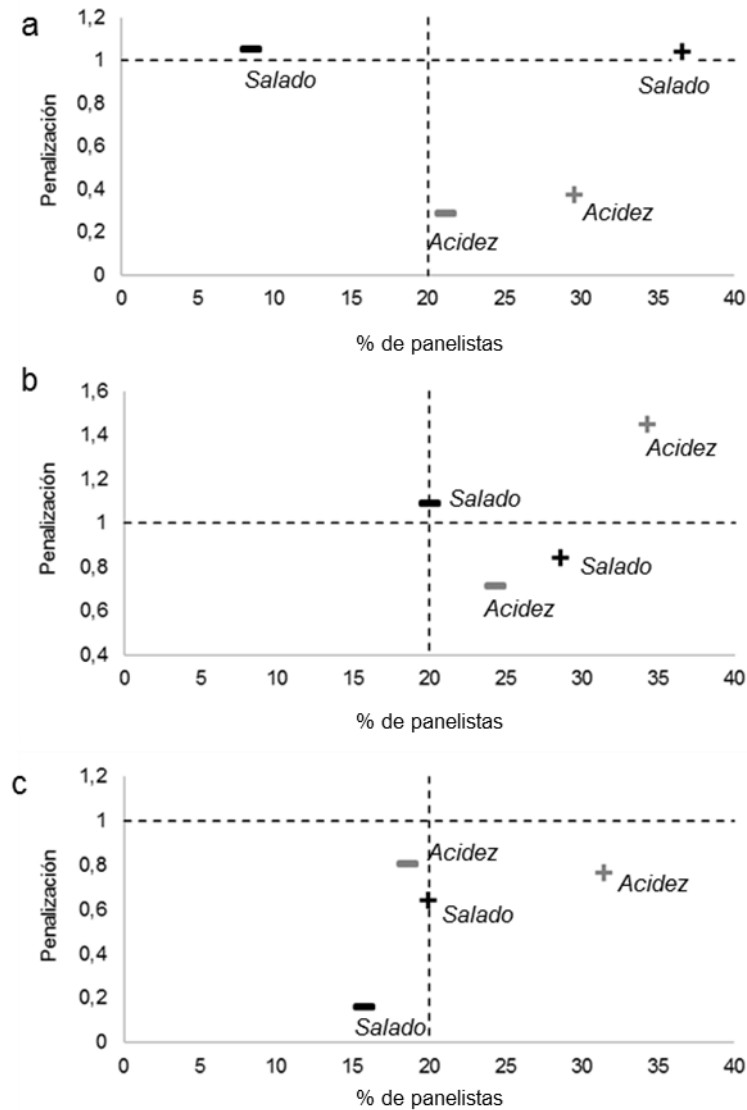
Las escalas JAR son muy utilizadas en el desarrollo de nuevos productos, ya que permiten evaluar las preferencias de los consumidores. Se utilizan principalmente para identificar si los atributos presentes en el alimento están bien optimizados o si, por el contrario, necesitan modificar su intensidad (Li *et al.*, 2014). En este análisis, se les permitió a los panelistas calificar las intensidades de cada atributo libremente en una escala de JAR de cinco puntos. En la Fig. 58 se observa la distribución de porcentajes de panelistas que seleccionaron los diferentes niveles en la escala JAR para cada atributo, se redujo la escala de cinco a tres puntos (1 y 2: “demasiado débil”, 3: “JAR”, 4 y 5: “demasiado fuerte”) con el objetivo de contrastar las preferencias de los panelistas siguiendo las recomendaciones de Li *et al.* (2014). El RCU exhibió el mayor porcentaje de panelistas que calificaron los atributos *acidez* y *salado* con una intensidad ideal, 50% y 64,29% respectivamente, en comparación con los otros productos. Si bien, todos los productos presentaron la misma concentración de NaCl (3%), se comprobó que el atributo *salado* se percibió mejor aceptado en RCU, ya que además de presentar el mayor porcentaje de JAR, los valores extremos se fragmentaron uniformemente entre los que afirman que es “demasiado débil” y “demasiado fuerte” (15,71% y 20%,

respectivamente) (Fig. 58a). Sin embargo, la intensidad de este atributo debería ser revisado en los otros dos productos (AKU y RBU), ya que un importante porcentaje de panelistas (>20%) percibió el sabor *salado* “demasiado fuerte”, principalmente en AKU. Por otro lado, la intensidad de *acidez* en los tres productos tendió a calificarse como “demasiado fuerte”, considerando que el porcentaje de jurados del extremo superior superó el 20% (Fig. 58b).



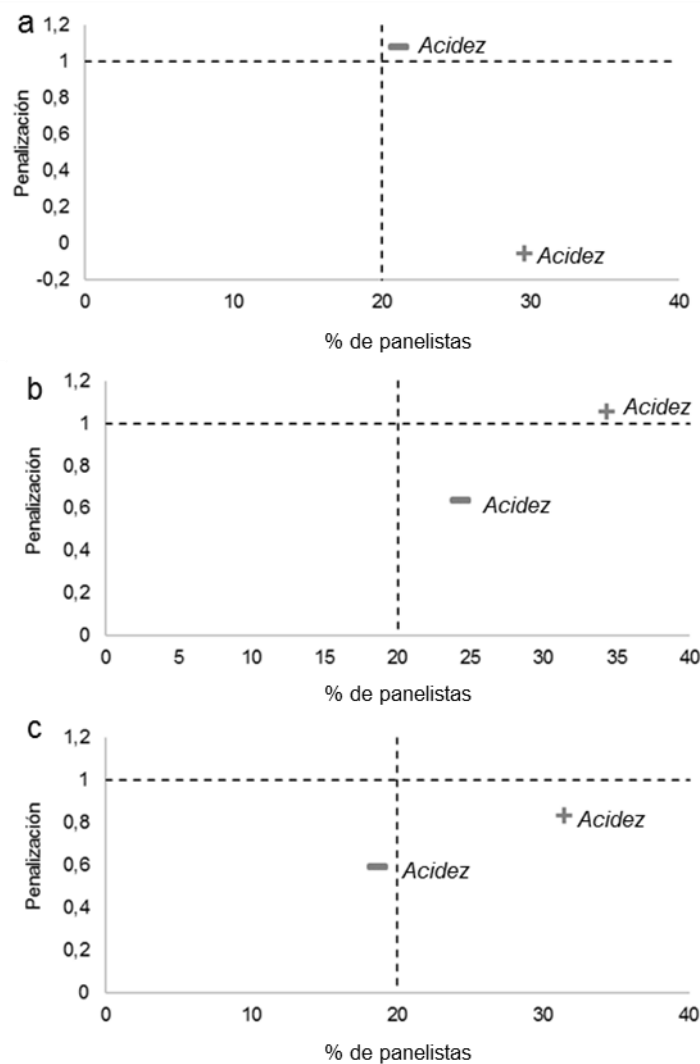
**Figura 58:** Representación del porcentaje de panelistas que seleccionaron los diferentes niveles en la escala JAR para cada atributo (a: salado, b: acidez), reduciendo la escala de cinco a tres puntos.

Posteriormente, se realizó el análisis de penalización para determinar si un atributo que presentó un elevado porcentaje por debajo o por encima de JAR, condicionó en la puntuación de la aceptación global. En las Figs. 59 y 60 se observa la penalización de los atributos evaluados en la aceptación global *sabor* y *olor*, respectivamente, para cada producto fermentado. Los paneles de las Figs. 59 y 60 se dividieron en cuatro subpaneles con una línea punteada vertical y horizontal que representa el 20% de los panelistas y una penalización (mean drops) de 1, respectivamente. En el subpanel superior derecho de cada panel, se encuentran los atributos con mayor efecto o “penalización” (>20% de las calificaciones de los panelistas y con penalizaciones >1) en la aceptación global del producto correspondiente (Iserliyska *et al.*, 2017).



**Figura 59:** Penalización de los atributos *acidez* y *salado* en la aceptación global (sabor) de los productos evaluados: AKU (akusai/Undaria) (a), RBU (repollo blanco/Undaria) (b) y RCU (repollo colorado/Undaria) (c). +: “demasiado fuerte”; -: “demasiado débil”.

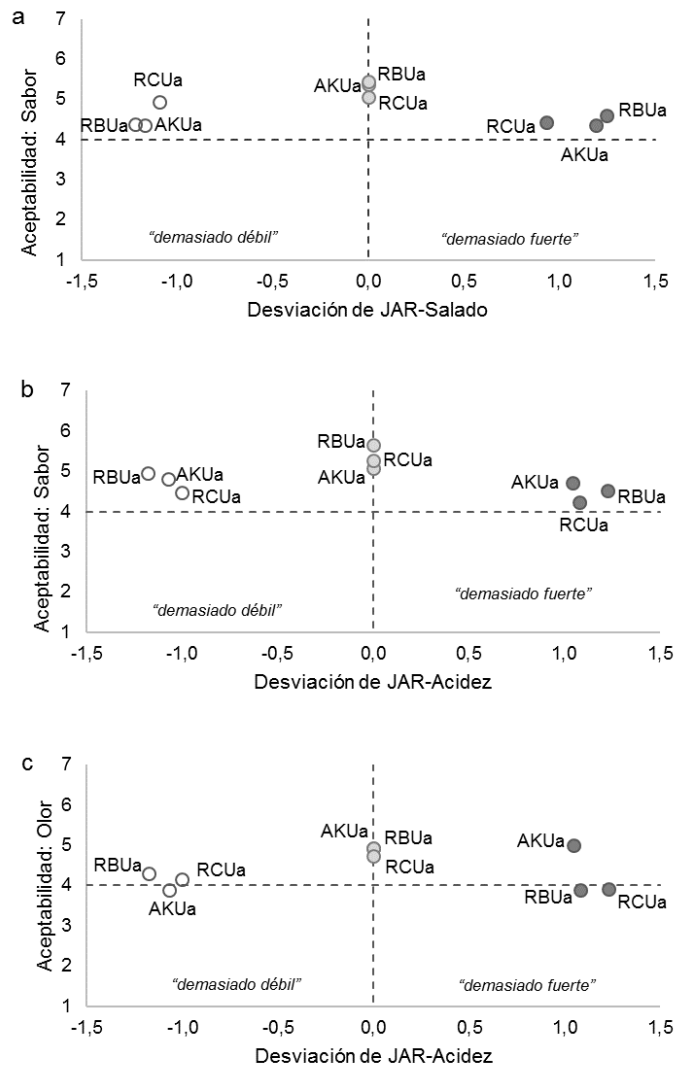
El sabor *salado* seleccionado como “demasiado fuerte” afectó la aceptación global del producto fermentado AKU, ya que exhibió un valor de penalización  $>1$  y un porcentaje de panelistas  $>20\%$  (Fig. 59a). Mientras que, el olor *ácido* “demasiado débil” mostró un efecto leve en la aceptación global de este producto (Fig. 60a), ya que el valor de panelistas se ubicó muy próximo a  $20\%$  y la penalización a  $1$ . Por otro lado, el sabor y el olor *ácido* “demasiado fuerte” condicionó la aceptación global del RBU, exhibiendo un elevado porcentaje de panelistas ( $>20\%$ ) y un valor de penalización  $>1$  (Figs. 59b y 60b, respectivamente). Se comprobó que el RCU es el único de los productos, en el cual la intensidad de los atributos *acidez* y *salado* seleccionada por los panelistas no penalizó a la aceptación global del mismo. Aunque el sabor y el olor *ácido* se calificó como “demasiado fuerte” por un gran porcentaje de panelistas ( $>20\%$ ), esto no penalizó a la hora de valorar la aceptación global ( $<1$ ) (Figs. 59c y 60c).



**Figura 60:** Penalización del atributo *acidez* en la aceptación global (olor) de los productos evaluados: AKU (a), RBU (b) y RCU (c). +: “demasiado fuerte”; -: “demasiado débil”.

Posteriormente, se calculó la desviación de JAR de los atributos *acidez* y *salado* en función a la aceptación global, individualmente para el sabor y el olor, para cada producto fermentado. Los datos obtenidos a partir del desvío de JAR se observaron igualmente divididos para cada producto estudiado (Fig. 61). Por lo tanto, se determinó que la mitad de los panelistas calificaron el atributo *salado* como “demasiado fuerte” y la otra mitad lo señalaron como “demasiado débil”, en función de la aceptación global (sabor) de los productos (Fig. 61a). La misma distribución de los resultados se observa para el atributo *acidez* en función de la aceptación con respecto al sabor (Fig. 61b) y el olor (Fig. 61c). En todos los casos, el problema subyacente no es un inconveniente del método para proporcionar dirección sino más bien, la existencia de segmentación (Gacula *et al.*, 2007), como consecuencia de las diferentes preferencias sensoriales que

exhibieron los panelistas frente a los mismos productos evaluados. En un futuro, se debería plantear un análisis sensorial más exhaustivo, con un mayor número de panelistas no entrenados o realizarlo con un jurado entrenado para lograr reducir la variabilidad de los datos obtenidos. Sin embargo, hay que destacar que los valores correspondientes a JAR se encuentran por encima de 4 “ni me gusta, ni me disgusta” en la escala hedónica de aceptación, para todos los casos.



**Figura 61:** Ubicación de los desvíos de JAR (●) para los grupos “demasiado débil” (○) y “demasiado fuerte” (●) para cada atributo: salado (a) y acidez (a y b) en función de la aceptabilidad (sabor: a y b; olor: c) para cada producto. Dentro de cada grupo de datos, las medias con una letra en común no difieren significativamente entre sí ( $p > 0,05$ ).

## 4.13 Propiedades fisicoquímicas

Se monitoreó el pH, los °Brix, la acidez titulable y la actividad de agua ( $a_w$ ) de los productos fermentados antes ( $T_0$ ) y después del almacenamiento por 50 días a 5 °C ( $T_1$ ) (Tabla 16).

**Tabla 16:** Determinación de las propiedades fisicoquímicas de los productos fermentados al iniciar y finalizar la etapa de almacenamiento a 5°C.

Propiedades fisicoquímicas	AKU		RBU		RCU	
	$T_0$	$T_1$	$T_0$	$T_1$	$T_0$	$T_1$
<b>pH</b>	3,76±0,01 <sup>a</sup>	3,40±0,02 <sup>b</sup>	3,33±0,05 <sup>a</sup>	3,34±0,08 <sup>a</sup>	3,36±0,03 <sup>a</sup>	3,35±0,05 <sup>a</sup>
<b>°Brix</b>	6,7±0,14 <sup>a</sup>	6,8±0,00 <sup>a</sup>	8,9±0,14 <sup>a</sup>	8,6±0,28 <sup>a</sup>	8,9±0,14 <sup>a</sup>	8,9±0,14 <sup>a</sup>
<b>Acidez titulable (%)</b>	0,93±0,08 <sup>a</sup>	0,95±0,00 <sup>a</sup>	1,18±0,02 <sup>a</sup>	1,41±0,00 <sup>b</sup>	1,65±0,01 <sup>a</sup>	1,63±0,01 <sup>a</sup>
<b><math>a_w</math></b>	0,985	0,984	0,983	0,982	0,983	0,983

$T_0$ : antes del almacenamiento;  $T_1$ : 50 días de almacenamiento a 5 °C. Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres mediciones. Letras distintas, situadas sobre las barras de error, indican que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre las medias obtenidas antes y después del almacenamiento.

Como se mencionó anteriormente, el pH es un indicador clave utilizado para monitorear la calidad de un producto fermentado. Luego del proceso de fermentación los productos AKU, RBU y RCU exhibieron valores de pH <4,1, condición requerida por el CAA-Art. 976. Se puede observar que el pH del AKU se estabilizó a 3,40 durante el periodo de almacenamiento; mientras que el RBU y RCU no exhibieron cambios significativos ( $pH \approx 3,3$ ) ( $p \leq 0,05$ ). Jagannath *et al.* (2012) describieron un leve descenso del pH durante el almacenamiento de chucrut durante 90 días. Mientras que, Thakur *et al.* (2020) obtuvieron un incremento significativo de pH durante el almacenamiento a baja temperatura por 63 días en los dos tratamientos implementados: 3,10 a 4,13 con metabisulfito de potasio y de 3,15 a 4,36 utilizando una pasteurización previa. Reportes previos han detectado características indeseables durante la fermentación por la presencia de cepas de levaduras, las cuales se asociaron con la utilización de ácidos orgánicos y el consiguiente incremento del pH (Hernández *et al.*, 2018). Además, luego de incrementar el  $pH > 4,0$  y reducir el ambiente utilizando el oxígeno disuelto, algunas especies de BAL, como *L. buchneri* y *P. etanolidurans* produjeron ácido propiónico y butírico, lo que condujo a malos olores e incluso olores fétidos en vegetales fermentados (Hernández *et al.*, 2018). Por lo tanto, mantener el pH estable y con un valor <4,0 durante el almacenamiento es imprescindible para garantizar la calidad de los alimentos fermentados a base de vegetales.

En paralelo, se evaluó el porcentaje de acidez titulable de los productos fermentados. Estudios previos, determinaron que el akusai y repollo fresco presentan un bajo porcentaje de acidez titulable, 0,11 y 0,23%, respectivamente (Park, 2004; Thakur *et al.*, 2020). Sin embargo, al finalizar el proceso de fermentación, el porcentaje de acidez titulable se incrementó en todos los productos; alcanzando un valor  $>1,0\%$  en RBU y RCU, condición requerida por el CAA-Art. 976. Durante la fermentación vegetal, el descenso de pH va acompañado a un incremento del porcentaje de acidez titulable como consecuencia principalmente del ácido láctico producido por las BAL a partir de la conversión de carbohidratos presentes en el vegetal (Vatansever *et al.*, 2017). Si bien, el AKU mostró un porcentaje de acidez  $<1,0\%$ , hay que considerar que el CAA-Art. 976 se refiere el chucrut a base de repollos duros (*B. oleracea*), siendo el AK una especie diferente. Además, los fermentos estudiados presentan una mezcla del vegetal correspondiente (AK, RB o RC) con un 20% *Undaria*, esto podría afectar al parámetro evaluado; ya que reportes previos describen que a mayor proporción de alga menor es el porcentaje de acidez alcanzada (Brochu, 2018). Se puede observar que el AKU exhibió el menor porcentaje de acidez titulable acompañado a un mayor valor de pH, en comparación con los otros vegetales. Luego del periodo de almacenamiento, el AKU y el RCU se mantuvieron estables, mientras que el RBU incrementó el porcentaje de acidez; es probable que las BAL continuaran con una mínima producción de ácido láctico hasta utilizar en su totalidad el sustrato fermentable (Vatansever *et al.*, 2017).

Los sólidos solubles totales expresados en  $^{\circ}\text{Brix}$  se determinaron en los productos fermentados. El RBU y RCU exhibieron 8,9  $^{\circ}\text{Brix}$ , mientras que el AKU alcanzó un valor menor de 6,7  $^{\circ}\text{Brix}$ , al finalizar el periodo de fermentación. Estos valores son mayores que los reportados en los vegetales frescos, alrededor de 3,80 y 5,65  $^{\circ}\text{Brix}$  en akusai y repollo, respectivamente (Lemtur *et al.*, 2019; Thakur *et al.*, 2020). Si bien, el AKU alcanzó un menor valor de  $^{\circ}\text{Brix}$  en comparación con los otros productos fermentados, este exhibió una relación mayor al comparar con los valores del vegetal fresco y fermentado  $6,7/3,80$   $^{\circ}\text{Brix}$  (AKU/akusai fresco)  $>8,9/5,65$   $^{\circ}\text{Brix}$  (RBU-RCU/repollo fresco). Thakur *et al.* (2017) realizaron una fermentación de repollos durante 28 días a 15-20  $^{\circ}\text{C}$  y obtuvieron valores similares de  $^{\circ}\text{Brix}$  (8,6). Los vegetales cortados en tiras con sal agregada, como resultado de su área superficial incrementada, facilita el crecimiento de BAL y la extracción de agua. Esto produce un incremento rápido los valores de  $^{\circ}\text{Brix}$  durante la fermentación, como consecuencia del NaCl y algunos materiales solubles que son lixiviados desde los vegetales (Lemtur *et al.*, 2019). Luego del periodo de almacenamiento a 5  $^{\circ}\text{C}$ , tanto AKU como RBU exhibieron pequeñas variaciones, mientras que el RCU se mantuvo estable (Tabla 17). Estas variaciones observadas sobre los sólidos solubles en el almacenamiento pueden ocurrir como

resultado de pequeñas reacciones que ocurren en la salmuera, posterior al periodo de fermentación (Vatansever *et al.*, 2017).

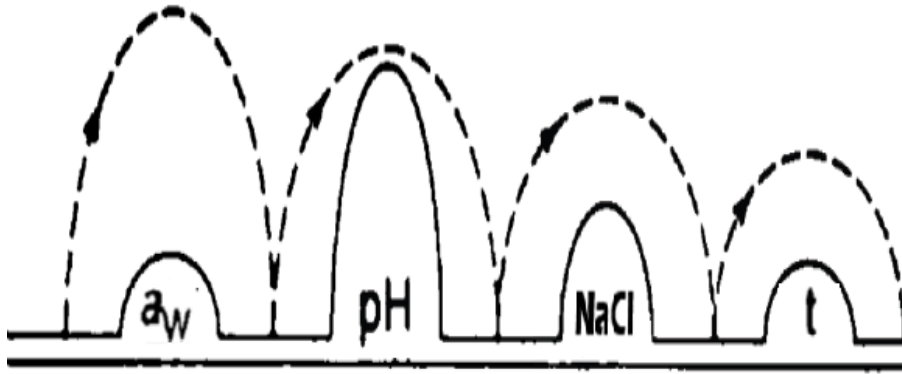
Además, se determinó la  $a_w$  al finalizar el proceso de fermentación y el periodo de almacenamiento de los productos fermentados. Este parámetro influye en la calidad y estabilidad de los alimentos, ya que permite medir la disponibilidad de agua en un producto, para que actúe como reactante, solvente, humectante, nutriente, etc. (Tapia, 2020). Los datos exhibidos en la Tabla 17 se calcularon a partir de la curva de calibración generada con diferentes soluciones sobresaturadas de  $K_2SO_4$ ,  $KNO_3$  y  $KCl$ , relacionando los valores teóricos con los valores obtenidos.

**Tabla 17:** Valores obtenidos y teóricos de  $a_w$  para las diferentes soluciones salinas sobresaturadas.

<b>Soluciones sobresaturadas</b>	<b><math>a_w</math> (datos obtenidos)</b>	<b><math>a_w</math> (datos teóricos)</b>
$K_2SO_4$	0,964 (17,1 °C)	0,980 (15 °C) (Tapia, 2020)
$KNO_3$	0,933 (17, 1 °C)	0,950 (15 °C) (Tapia, 2020)
$KCl$	0,849 (16,8 °C)	0,860 (15 °C) (Tapia, 2020)

$$\text{Curva de calibración } a_w = 1,06 * a_w \text{ del alimento} - 0,04 \quad R^2 = 0,99$$

La  $a_w$  se observó sin cambios significativos durante el periodo de almacenamiento de los productos fermentados ( $p < 0,05$ ) (Tabla 16). Vatansever *et al.* (2017) exhibieron valores similares al finalizar la fermentación de repollo colorado ( $a_w = 0,98$ ). En general, las bacterias requieren una actividad  $\geq 0,9$  para sobrevivir (Tapia, 2020). Si bien, los valores obtenidos son altos, se utilizaron otros factores de estrés en combinación con la  $a_w$ , lo que se conoce como enfoque de obstáculo o hurdles: pH ácido ( $pH \approx 3,5$ ), adición de  $NaCl$ , uso de temperaturas bajas de conservación (5 °C) (Fig. 62). Las interacciones que ocurren entre la  $a_w$  del alimento y otras propiedades intrínsecas de los mismos (pH, contenido de nutrientes, potencial de óxido reducción, presión osmótica, presencia de antimicrobianos naturales, etc.), además de los factores extrínsecos determinados por el procesamiento y el ambiente (temperatura, humedad, oxígeno, luz, empaque, etc.) controlan el crecimiento de microorganismos, el tipo de especies que se desarrollarán y la subsecuente actividad metabólica (producción de toxinas y de otros metabolitos) (Tapia, 2020).



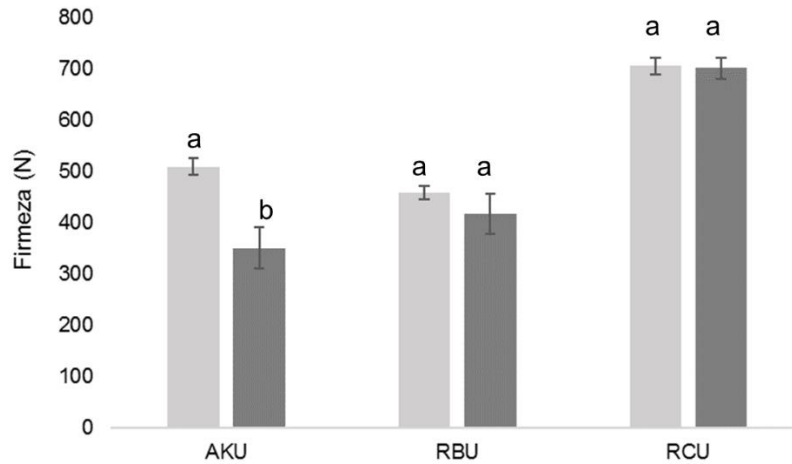
Fuente: adaptada desde Leistner (1995).

**Figura 62:** Representación gráfica del efecto de obstáculos o hurdles en alimentos.  $a_w$ ; pH, acidez; NaCl, adición de sal 3%; t: baja temperatura de almacenamiento 5 °C.

#### 4.14 Análisis de textura

La textura es una de las limitaciones de calidad más importantes, resultando esencial para asegurar la aceptabilidad de un producto (Jaiswal *et al.*, 2012). Bourne (1981) definió a las propiedades texturales de un alimento como el conjunto de características físicas que son consecuencias de los elementos estructurales del mismo. Estas propiedades están relacionadas con la deformación bajo la acción de una fuerza y pueden ser medidas objetivamente en función de la masa, el tiempo y distancia de deformación (Levine & Finley, 2018). Se debe considerar que la gran mayoría de los alimentos, incluido el chucrut, presentan un comportamiento viscoelástico, es decir tienen un componente elástico y otro viscoso. Al someterle una determinada tensión a estos tipos de alimentos, parte de la energía se almacena como energía potencial, similar a los sólidos ideales y otra parte se disipa como hacen los fluidos (Díaz Ocampo, 2018). Por esta razón, los materiales viscoelásticos tienen un comportamiento intermedio entre el de un sólido ideal y el de un fluido newtoniano. En este estudio, se evaluó la fuerza de deformación necesaria de los productos en dos tiempos, al finalizar la etapa de fermentación ( $T_0$ ) y después del periodo de almacenados a 5 °C ( $T_1$ ). El AKU exhibió una disminución significativa en la firmeza de 508,48 N a 350,34 N ( $p < 0,05$ ) (Fig. 63), con un porcentaje de ablandamiento del 31,10%. Mientras que, el RBU y RCU no exhibieron cambios significativos durante el almacenamiento ( $p > 0,05$ ) (Fig. 63) y presentaron un porcentaje de ablandamiento de 9,08% y 0,55%, respectivamente. El RCU exhibió valores de fuerza (N) superiores a los otros dos productos (AKU y RBU) exhibiendo una mayor resistencia a la deformación. La temperatura utilizada para el almacenamiento reduce la actividad microbiana; sin embargo, algunas reacciones continúan ocurriendo afectando en diferente medida los constituyentes de la pared celular y la lámina media, lo que provoca cambios en la firmeza del alimento (Jaiswal *et*

al., 2012). Si bien, los valores de  $a_w$  determinados resultaron similares en los tres modelos, el AKU se destacó por presentar mayor cantidad de líquido (liberado durante la fermentación) en comparación con los otros productos, esto pudo alterar en mayor medida las propiedades texturales del mismo.



**Figura 63:** Fuerza máxima de deformación obtenida para cada producto (AKU, RBU, RCU) en los dos periodos analizados: al finalizar el proceso de fermentación (●) y luego de dos meses almacenados a 5 °C (◐). Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de al menos 5 mediciones. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa entre las medias ( $p > 0,05$ ), para cada producto.

Luego de comparar los resultados obtenidos de los tres modelos combinados de brasicáceas y *Undaria* se seleccionó RCU, ya que:

-El RCU exhibió un valor de CTF significativamente mayor ( $p < 0,05$ ), en comparación a los otros dos productos.

-El RCU presentó un valor de capacidad antioxidante significativamente superior a RBU y AKU ( $p < 0,05$ ).

-El RCU exhibió el mayor porcentaje de que calificaron los atributos “acidez” y “salado” con una intensidad ideal, en comparación con los otros productos.

-Se determinó que la intensidad de los atributos “acidez” y “salado” seleccionada por los panelistas no penalizó a la aceptación global del RCU, a diferencia de los otros productos.

-Las propiedades fisicoquímicas del RCU no mostraron variaciones significativas durante el almacenamiento.

-La textura del RCU no exhibió diferencias significativas durante el periodo de almacenamiento, arrojando un porcentaje de ablandamiento despreciable.

#### 4.15 Reto microbiano

##### 4.15.1 *Zygosaccharomyces bailii* NRRL-7256

Las BAL son las principales responsables de prolongar la vida útil y la seguridad de los alimentos fermentados, ya que durante el proceso producen una elevada concentración de ácidos orgánicos y metabolitos (Blajman & Zárate, 2020). El chucrut se encuentra comercializado tanto pasteurizado como sin pasteurizar, este último permite conservar completamente su valor funcional, generando mayores beneficios sobre salud del consumidor (Thakur *et al.*, 2020). Sin embargo, un problema frecuente en los productos no pasteurizados es el deterioro causado por el crecimiento de levaduras y hongos durante su almacenamiento. Por este motivo, al chucrut y a otros vegetales fermentados comercializados sin pasteurizar se le suele adicionar algún conservante como sorbato de potasio, benzoato de sodio o metabisulfito de potasio para extender su vida útil (almacenamiento en refrigeración) (Thakur *et al.*, 2020). Entre las especies de *Zygosaccharomyces*, *Z. bailii* está frecuentemente implicada en el deterioro de alimentos con alto contenido de acidez y puede desarrollar resistencia a antifúngicos y crecer a bajas temperaturas (Rivera Carriles *et al.*, 2005). En este trabajo se evaluó la viabilidad de la cepa *Z. bailii* NRRL 7256 durante el almacenamiento de RCU a 5 °C y se incorporó natamicina, como una opción al empleo de un antifúngico sintético. En la Tabla 18 se observan los recuentos microbianos realizados durante el ensayo. Se puede observar que entre los sistemas utilizados no existieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Los sistemas se inocularon con 5,2 log UFC/g de *Z. bailii*, sin embargo, en el tiempo 0 exhibieron una menor concentración  $< 3,0$  log UFC/g y a los 7 días posteriores se obtuvieron valores inferiores ( $< 1,0$  log UFC/g) manteniéndose hasta finalizar el ensayo. Este comportamiento podría ser consecuencia de la elevada concentración de CTF que presenta el repollo colorado, sumado a la acidez del medio y las bajas concentraciones de azúcares que exhibe la matriz ya fermentada. Los fenoles bioactivos extraídos durante la fermentación, mediante la actividad de las BAL, se pueden comportar como conservantes naturales. En este contexto, existen reportes previos que han investigado las propiedades antimicrobianas y antibiofilm de los compuestos fenólicos, presentando principalmente datos sobre los efectos contra las bacterias (Sabel *et al.*, 2017). No obstante, también se han estudiado el efecto de diferentes compuestos sobre algunas levaduras de deterioro; como por ejemplo, la vainillina, el pterostilbeno, el resveratrol, la luteolina, el ácido p-cumárico y el ácido ferúlico contra el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, *Z. bailii*, *Z. rouxii* y otras cepas relacionadas con el vino (Kimmani *et al.*, 2021; Sabel *et al.*, 2017).

Mediante este estudio se comprobó que no sería necesario la suplementación de natamicina al RCU, producto obtenido a partir de la fermentación controlada, ya que el desarrollo de *Z. bailii* sobre esta matriz se ve afectado durante su almacenamiento a 5 °C.

**Tabla 18:** Contaminación post-elaboración con *Z. bailii*: recuento microbiano realizado en RCU durante el almacenamiento a 5 °C.

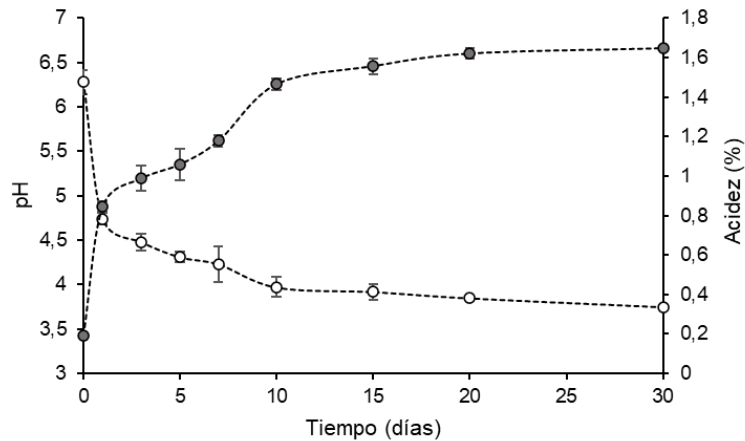
Sistema	Tiempo (días)	Levaduras	Coliformes totales
		(Log UFC/g)	
Control (C)	0	<1	<1
	7	<1	<1
	21	<1	<1
	28	<1	<1
S1 <i>Zygosaccharomyces bailii</i> (5,17 log UFC/g)	0	2,43±0,38	<1
	7	<1	<1
	21	<1	<1
	28	<1	<1
S2 <i>Z. bailii</i> (5,17 log UFC/g) + Natamicina 7,5 ppm	0	2,74±0,28	<1
	7	<1	<1
	21	<1	<1
	28	<1	<1
S3 <i>Z. bailii</i> (5,17 log UFC/g) + Natamicina 15 ppm	0	2,40±0,17	<1
	7	<1	<1
	21	<1	<1
	28	<1	<1

#### 4.15.2 *L. monocytogenes* Scott A y *E. coli* ATCC 35218

Las fuentes de contaminación de la materia prima para elaborar chucrut u otros vegetales fermentados son diversas e incluyen agua contaminada, polvo, animales domésticos, utensilios sucios y manipuladores de alimentos, entre otros (Edwards & Dunlop, 2019). Además, reportes previos mencionan que el alga también contribuye al incremento de bacterias contaminantes en la matriz a fermentar (Brochu, 2018), por lo que se recomienda una esterilización previa. Los principales patógenos evaluados durante la elaboración de los vegetales fermentados son *E. coli*, *Listeria* sp. y *Salmonella* sp. (Karagozlu & Ergnl, 2011; Niksic *et al.*, 2005), ya que es conocida la habilidad de estos microorganismos para crecer en un amplio rango de temperaturas, pH y salinidad (Edwards & Dunlop, 2019).

En este trabajo se determinó la viabilidad de *L. monocytogenes* Scott A y *E. coli* ATCC 35218 durante la fermentación de RCU. Se observó un descenso del pH y el incremento de acidez titulable durante la fermentación controlada de RCU (Fig. 64). En el periodo inicial de la fermentación se exhibió un descenso significativo de pH hasta el día 10 ( $p \leq 0,05$ ) alcanzando un valor <4,0; luego, éste se mantuvo estable hasta el día 30 del

proceso. En contraste, la acidez se incrementó significativamente durante los primeros 10 días de fermentación ( $p \leq 0,05$ ), alcanzando valores  $\approx 1,5\%$ ; y luego se mantuvo constante.



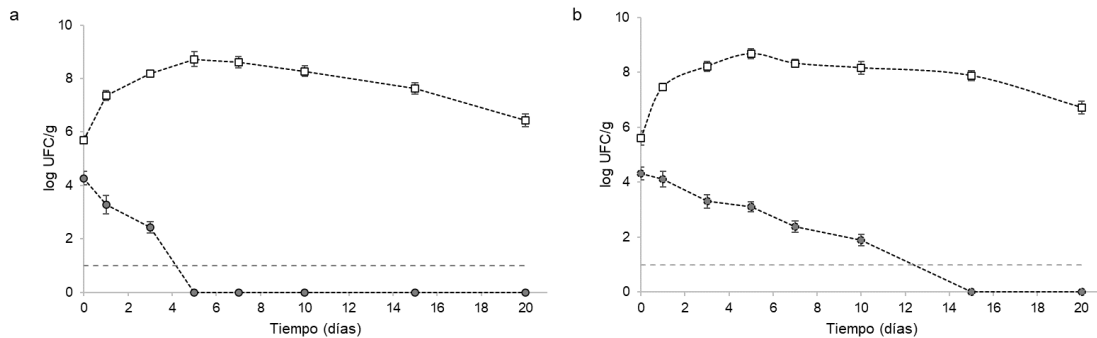
**Figura 64:** Evolución del pH (o) y la acidez titulable (%) (•) durante la fermentación controlada de RCU. Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres mediciones.

Se realizó el recuento de BAL, aerobios totales, coliformes y levaduras en el control (Tabla 19) para monitorear la calidad microbiológica durante el proceso de fermentación. En la fermentación controlada, se obtuvo una evolución paralela de los aerobios totales y de BAL durante la fermentación (Tabla 19), este comportamiento también se observó en estudios similares (Seseña Prieto, 2007). Los coliformes totales detectados en el control disminuyeron rápidamente (día 3) por consecuencia del incremento de acidez producido durante la etapa inicial de la fermentación (Fig. 64, Tabla 19). En el control, se observó un recuento relativamente bajo de levaduras en comparación con las BAL durante el ensayo (Tabla 19).

**Tabla 19:** Recuento microbiológico realizado en el ensayo control, durante la fermentación controlada de RCU. Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres mediciones.

Tiempo (días)	BAL (log UFC/g)	Aerobios totales (log UFC/g)	Levaduras (log UFC/g)	Coliformes totales (log UFC/g)
0	5,65 $\pm$ 0,03	5,72 $\pm$ 0,07	<1	<1
1	7,43 $\pm$ 0,04	7,48 $\pm$ 0,04	<1	2,49 $\pm$ 0,20
3	8,25 $\pm$ 0,06	8,47 $\pm$ 0,02	<1	<1
5	8,53 $\pm$ 0,24	8,20 $\pm$ 0,00	2,16 $\pm$ 0,28	<1
7	8,58 $\pm$ 0,28	8,77 $\pm$ 0,20	2,72 $\pm$ 0,22	<1
10	8,75 $\pm$ 0,08	8,79 $\pm$ 0,19	2,16 $\pm$ 0,28	<1
15	7,86 $\pm$ 0,15	8,19 $\pm$ 0,04	2,66 $\pm$ 0,22	<1
20	6,74 $\pm$ 0,22	7,39 $\pm$ 0,14	<1	<1

La población de BAL exhibió un valor de  $\approx 5$  log UFC/g en cada sistema (S1: inoculado con *E. coli*; S2: inoculado con *L. monocytogenes* Scott A) (Fig. 65) y el control (Tabla 19), al inicio de la fermentación (día 0). Mientras que, el S1 y S2 exhibieron una población de  $\approx 4$  log UFC/g de *E. coli* y *L. monocytogenes* Scott A, respectivamente (día 0) (Fig. 65). Estos valores son esperables en función de las inoculaciones realizadas sobre los sistemas y el control.



**Figura 65:** Monitoreo de BAL ( $\square$ ) y viabilidad de a) *E. coli* ATCC 35218 ( $\bullet$ ) (S1) y b) *L. monocytogenes* Scott A ( $\bullet$ ) (S2), durante la fermentación controlada de RCU. Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres mediciones.

Se determinó una disminución más acelerada de la población de *E. coli* que de *L. monocytogenes* Scott A, durante la fermentación controlada de RCU (Fig. 65). La población de *E. coli* ATCC 35218 descendió rápidamente durante los primeros días del ensayo; alcanzando una población  $< 1$  log UFC/g en el día 5 (Fig. 65a), donde la matriz alcanzó una acidez titulable  $> 1,0\%$  y un  $\text{pH} \approx 4,3$ . Además, se observó una competencia importante por parte de las BAL durante la etapa inicial, alcanzando el máximo de crecimiento el día 5 ( $\approx 8$  log UFC/g). Se determinó que el desarrollo de BAL en el S1 (RCU inoculado con *E. coli*) no mostró diferencias significativas con el control ( $p > 0,05$ ) (Tabla 19). Se puede decir que, la disminución de la población de *E. coli* ATCC 35218 está relacionada con el aumento de la acidez titulable durante el proceso de fermentación. Esto es consistente con los resultados reportados por otros autores, quienes demostraron que la población de *E. coli* O157:H7 disminuyó durante la fermentación del repollo y lo asociaron con el incremento del porcentaje de acidez titulable del fermento (Arias *et al.*, 2001; Niksic *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2001). Arias *et al.* (2001) compararon la viabilidad de *E. coli* O157:H7 a distintas temperaturas y determinaron que, a  $22$  °C se logró una disminución significativa de la población, sin embargo, no observaron el mismo efecto a  $0$ ,  $6$  y  $12$  °C; probablemente debido a competencia microbiana y el gradual descenso de pH. Niksic *et al.* (2005) reportaron la disminución de la población de *E. coli* ( $< 1$  log UFC/g) al tercer día de una fermentación

de repollo realizada a 18 °C (con un recuento inicial de  $\approx 4$  log UFC/g), indicando un pH $\approx 4,5$  en ese momento.

En cuanto a los sistemas inoculados con *L. monocytogenes* Scott A (S2), se observó que dicha bacteria exhibió mayor tolerancia al pH, ya que la población disminuyó gradualmente durante el periodo de fermentación (Fig. 65b). Reportes previos mencionaron la habilidad que presenta este género para adaptarse a medios ácidos (Edwards & Dunlop, 2019; Niksic *et al.*, 2005). Es importante recordar que dos cepas de *Lactiplantibacillus* spp. (RBTw102 y 332) presentes en el segundo inóculo, exhibieron actividad anti-*Listeria* y en ambas se detectaron diversos genes de plantaricinas. La presencia de metabolitos sintetizados por las BAL, la acidez, la concentración de sal y la temperatura son algunos de los obstáculos que debe afrontar este patógeno para su desarrollo en esta matriz de RCU (Leistner, 1995). Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con reportes previos, donde se observó un descenso progresivo de *L. monocytogenes* durante la fermentación de repollo a 18 °C, alcanzando una población  $< 1$  log UFC/g a los 10 días cuando se empleaba una concentración de 3% de NaCl (Niksic *et al.*, 2005). El S2 (RCU inoculado con *L. monocytogenes* Scott A) exhibió un desarrollo de BAL similar al control ( $p > 0,05$ ), donde la presencia de *L. monocytogenes* no afectó el proceso de fermentación.

El proceso de fermentación controlada de RCU garantiza la disminución de la población de *L. monocytogenes* Scott A y *E. coli* ATCC 35218, logrando un producto final inocuo. Si bien, las variaciones de concentración de sal y la temperatura pueden afectar la supervivencia de estos patógenos durante la fermentación, la combinación propuesta de factores bióticos y abióticos utilizados en esta fermentación controlada garantiza que las cepas estudiadas (*L. monocytogenes* Scott A y *E. coli* ATCC 35218) no sobrevivan en cantidades significativas previo a completar el proceso de fermentación.

#### 14.16 Contenido total de fenoles y capacidad antioxidante del RCU almacenado

Se determinó el CTF y la capacidad antioxidante del RCU luego del periodo de almacenamiento, 50 días a 5 °C, y se comparó con los valores obtenidos al finalizar su fermentación. Se observó que el CTF y la capacidad antioxidante del RCU, envasado en frasco de vidrio, descendieron significativamente durante el almacenamiento ( $p \leq 0,05$ ) (Tabla 20).

**Tabla 20:** Determinación del CTF y la capacidad antioxidante durante el almacenamiento de RCU.

Periodo de almacenamiento	CTF (mg EAG/100 g PS)	Capacidad Antioxidante	
		DPPH (mg EAA/100 g PS)	CUPRAC (mg EAA/100 g PS)
0 días*	2059,38±50,16 <sup>a</sup>	608,04±9,26 <sup>a</sup>	1788,22±63,24 <sup>a</sup>
50 días	1011,04±97,21 <sup>b</sup>	372,49±8,49 <sup>b</sup>	1034,74±85,40 <sup>b</sup>

Cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de tres mediciones. Letras distintas, situadas sobre las barras de error, indican que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre las medias obtenidas antes y después del almacenamiento.

Kapusta-Duch *et al.* (2017) investigaron las variaciones de las propiedades nutricionales del chucrut (repollo blanco) durante cuatro meses almacenados a 5 °C, implementando distintos sistemas de envases, bolsa de polietileno y de laminado (tereftalato de polietileno metalizado). Sin embargo, estos autores determinaron que el chucrut, almacenado durante cuatro meses, exhibió una reducción estadísticamente significativa en vitamina C (52,6%), en polifenoles totales (32,7%) y en la actividad antioxidante (24,4%), independientemente del tipo de embalaje. El almacenamiento a largo plazo intensifica los procesos de oxidación enzimática o química de los compuestos presentes en los alimentos, la magnitud depende de la combinación de los factores abióticos, tales como la temperatura, pH,  $a_w$ , el tiempo y el oxígeno disponible (Ninfali & Bacchiocca, 2003).

En el futuro, sería sumamente necesario abordar esta línea de investigación, abarcando diferentes aspectos (tiempo, material de embalaje, temperatura, tecnologías adicionales) para mejorar o mantener las características nutricionales de este producto durante el almacenamiento refrigerado. De todas formas, el producto desarrollado es un alimento saludable y fuente de gran diversidad de nutrientes.



## 5. *CONCLUSIONES*

En virtud de los resultados obtenidos se concluye que:

-Una sucesión de BAL hetero y homofermentativas son responsables de las fermentaciones espontáneas de los vegetales.

-El PC es inviable para fermentar, ya que no cuenta con la cantidad suficiente de carbohidratos para lograr un desarrollo favorable de las BAL.

-Las fermentaciones espontáneas de AK, RB y RC son favorables para el aislamiento y selección de BAL. Todas las cepas aisladas en esta tesis forman parte de la colección de microorganismos que dispone el Laboratorio de Biotecnología Bacteriana (Sede Trelew –UNPSJB) y se encuentran disponibles para futuros estudios complementarios.

-Las cepas de *Leuconostoc* spp. son más sensibles a las condiciones imperantes durante la fermentación de matrices vegetales (tolerancia a polifenoles, acidez y salinidad) que las pertenecientes al género *Lactiplantibacillus* spp.

-Diez de las 11 cepas seleccionadas de *Lactiplantibacillus* spp. exhibieron producción de bacteriocinas contra uno o más patógenos Gram positivos. Los genes *pln* evaluados se detectaron en nueve de las 10 cepas que exhibieron actividad.

-Las cepas del género *Leuconostoc* spp. exhibieron mayor capacidad de acidificación que las de *Lactiplantibacillus* spp.

-Las cepas seleccionadas para conformar los cultivos iniciadores exhibieron ausencia de factores de virulencia y/o rasgos negativos.

-La inoculación en dos etapas, primero con cepas del género *Leuconostoc* y después con *Lactiplantibacillus*, permitió alcanzar una sucesión natural de las BAL durante la fermentación controlada. La selección de BAL autóctonas para conformar los cultivos iniciadores, garantiza una mejor capacidad de adaptación a la matriz a fermentar. La incorporación de cepas pertenecientes al género *Leuconostoc* favoreció el descenso del pH luego de 24 h, alcanzando un pH<4,0 a los 10 días del proceso. La incorporación de cepas *Lactiplantibacillus* después de los tres días de proceso, permitió que estas continuaran metabolizando los azúcares fermentables en condiciones de elevado estrés, ya que demostraron ser más tolerantes a las condiciones imperantes durante la fermentación que el género *Leuconostoc*.

-El agregado de un 20% de *U. pinnatifida* a la matriz vegetal no afectó el desarrollo de la fermentación. Los modelos simples y combinados exhibieron una evolución comparable del pH y de las BAL durante el proceso de fermentación controlada.

-El CTF de las matrices vegetales no exhibió una tendencia única durante el periodo de fermentación, los valores obtenidos dependieron del tipo de vegetal, las condiciones de extracción y el tipo de fermentación realizada (espontánea o controlada).

-En las matrices vegetales, los extractos acuosos lograron extraer una mayor cantidad de compuesto fenólicos que los extractos metanólicos debido a la diferencia de polaridad de los disolventes y al empleo de alta temperatura en el medio acuoso.

-Mediante el método CUPRAC se obtuvieron valores más elevados de la capacidad antioxidante de los extractos comparado con el ensayo DPPH, ya que el primero mide simultáneamente los antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos de las muestras, mientras que el segundo solo detecta moléculas solubles en solventes orgánicos.

-En general, la capacidad antioxidante aumentó a medida que avanzó la fermentación. En los modelos simples de AK y RB, así como los modelos combinados AKU y RBU, la fermentación controlada alcanzó una mayor capacidad antioxidante que la espontánea, independientemente del tipo de extracto. Sin embargo, la fermentación controlada de RC y RCU alcanzó una capacidad antioxidante mayor o igual que la espontánea, dependiendo de las condiciones de extracción empleadas.

-Entre los modelos fermentados de forma controlada (simples y combinados), se seleccionaron los productos fermentados a base de vegetales *Brassica* suplementados con *Undaria* (AKU, RBU y RCU), ya que exhibieron una capacidad antioxidante similar o superior que los modelos simples respectivos (AK, RB, RC); proporcionando al consumidor una mayor diversidad de compuestos bioactivos (fucoidanos, alginatos, polifenoles, fucoesteroles, carotenoides, entre otros) con propiedades nutricionales, funcionales y biológicas beneficiosas para la salud.

-RCU exhibió un mayor valor de CTF y capacidad antioxidante que el resto de los modelos combinados seleccionados (AKU, RBU), independiente del tipo de fermentación y condiciones de extracción utilizadas.

-Si bien, el ensayo controlado se realizó por 30 días, el periodo de fermentación podría finalizar antes; ya que se alcanzó un  $\text{pH} < 4,0$  a los 10 días y se mantuvo constante en todos los modelos. Esto indicaría que la gran mayoría de azúcares disponibles para la fermentación láctica se metabolizaron en ese periodo, en consecuencia, el proceso se podría dar por finalizado.

-La fermentación controlada en dos etapas permitió obtener productos inocuos y seguros para el consumo.

- Entre los productos combinados, el RCU exhibió el mayor porcentaje de panelistas que calificaron los atributos *acidez* y *salado* con una intensidad ideal. Se determinó que la intensidad de los atributos *acidez* y *salado* seleccionada por los panelistas no penalizó a la aceptación global del RCU, a diferencia de los otros productos combinados.
- Entre los productos combinados, el RCU exhibió mayor estabilidad de las propiedades fisicoquímicas y de la textura durante la etapa de almacenamiento.
- El proceso de fermentación controlada de RCU garantizó la disminución de la población de *L. monocytogenes* Scott A y *E. coli* ATCC 35218, logrando un producto final inocuo. El RCU también exhibió un efecto fungistático reduciendo el crecimiento de *Z. bailli* durante el periodo de almacenamiento y no siendo necesaria la incorporación de un agente antifúngico.
- En nuestro conocimiento, en la Argentina no se había investigado la incorporación de *U. pinnatifida* a matrices vegetales fermentadas. En consecuencia, este trabajo se convierte en el punto de partida para el desarrollo de productos funcionales a base de *Brassica* suplementados con *Undaria*.
- Estos alimentos funcionales se convierten en una nueva alternativa para potenciar el consumo local del alga, aprovechando el recurso escasamente explotado en nuestras costas.



## 6. *BIBLIOGRAFÍA*

Abad MJ, Bedoya LM & Bermejo P (2008). Natural marine anti-inflammatory products. *Mini Rev Med Chem*, 8, 740–754. <https://doi.org/10.2174/138955708784912148>

Agbor G, Vinson JA & Donnelly PE (2014). Folin-Ciocalteu reagent for polyphenolic assay. *Int J Food Sci Nutr Diet.*, 3(8), 147–156. <https://doi.org/10.19070/2326-3350-1400028>

Aguilar-Rosas R, Aguilar-Rosas L, Ávila-Serrano, *et al.* (2004). First record of *Undaria pinnatifida* Suringar (Laminariales, Phaeophyta) on the Pacific coast of Mexico. *Bot Mar*, 47, 255–258. <http://dx.doi.org/10.1515/BOT.2004.028>

Aguilar CN, Rodríguez R, Gutiérrez-Sánchez G, *et al.* (2007). Microbial tannases: advances and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76, 47–59. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1000-2>

Ahmad A, Shameem M & Husain Q (2012). Relation of oxidant-antioxidant imbalance with disease progression in patients with asthma. *Ann Thorac Med*, 7(4). <https://doi.org/10.4103/1817-1737.102182>

Aires A, Fernandes C, Carvalho R, *et al.* (2011). Seasonal effects on bioactive compounds and antioxidant capacity of six economically important *Brassica* vegetables. *Molecules*, 16(8), 6816–6832. <https://doi.org/10.3390/molecules16086816>

Ajaz M, Noor N, Rasool S, *et al.* (2004). Phenol resistant bacteria from soil: Identification-characterization and genetical studies. *Pak J Bot*, 36(2), 415–424.

Álvarez-Cisneros YM & Ponce-Alquicira E (2018). Antibiotic resistance in lactic acid bacteria. In *Antimicrobial resistance-a global threat*. IntechOpen. pp. 53–73. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80624>

Alvarez MA & Moreno Arribas MV (2014). The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends Food Sci. Technol*, 39, 146–155.

Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, *et al.* (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551–562.

Andersen Ø & Jordheim M (2006). The anthocyanins. In: Markham Ø & Andersen K (Eds.), *Flavonoids- chemistry, biochemistry and applications* (2nd ed). FL:CRC Press. pp. 452–471.

Angelin J & Kavitha M (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *Int J Biol Macromol*, 162, 853–865. [10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190)

Anisa S & Girish K (2014). Pectinolytic activity of *Rhizopus* sp. and *Trichoderma*. *Int J Res Pure Appl Microbiol*, 4(2), 28–31.

Apak R, Güçlü K, Demirata B, *et al.* (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12, 1496–1547.

Apak R, Güçlü K, Özyürek M, *et al.* (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchim Acta*, 160(4), 413–419. <https://doi.org/10.1007/s00604-007-0777-0>

Apak R, Özyürek M, Güçlü K, *et al.* (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *J Agric Food Chem*, 64(5), 997–1027. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04739>

Argyri AA, Nisiotou AA, Pramateftaki P, *et al.* (2015). Preservation of green table

olives fermented with lactic acid bacteria with probiotic potential under modified atmosphere packaging. *LWT-Food Sci Technol*, 62(2), 783–790. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.046>

Arias M, Monge-Rojas R, Chaves C, *et al.* (2001). Effect of storage temperatures on growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated in foods from a neotropical environment. *Rev. Biol. Trop*, 49(2), 517-523.

Athukorala Y, Kim KN & Jeon YJ (2006). Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. *Food Chem Toxicol*, 44, 1065–1074.

Ávalos García A & Pérez-Urria Carril E (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2(3):119-145.

Balatsouras G (1985). Taxonomic and physiological characteristics of the facultative rod type lactic acid bacteria isolated from fermenting green and black olives. *Grasas y Aceites*, 36, 239–249.

Balboa EM, Conde E, Moure A, *et al.* (2013). *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chem*, 138, 1764–1785. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.026>

Balciunas E, Castillo FA, Todorov SD, *et al.* (2012). Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control*, 32, 134–142.

Ballester E, Ribes S, Barat JM, *et al.* (2022). Spoilage yeasts in fermented vegetables: conventional and novel control strategies. *Eur Food Res Technol*, 248, 315–328. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03888-7>

Banaimoon SA (1992). Fatty acids in marine macroalgae from southern Yemen (Hadramount) including occurrence of eicosatetraenoic (20:4) and eicosapentaenoic (20:5) acids. *Bot Mar*, 35, 165–168.

Barbieri F, Montanari C, Gardini F, *et al.* (2019). Biogenic amine production by lactic acid bacteria : a review. *Foods*, 8(17), 1–27. <https://doi.org/10.3390/foods8010017>

Bargossi E, Tabanelli G, Montanari C, *et al.* (2015). Tyrosine decarboxylase activity of enterococci grown in media with different nutritional potential: tyramine and 2-phenylethylamine accumulation and *tyrDC* gene expression. *Front Microbiol*, 6, 259. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00259>

Beganović J, Kos B, Leboš Pavunc A, *et al.* (2014). Traditionally produced sauerkraut as source of autochthonous functional starter cultures. *Microbiol Res*, 169(7–8), 623–632. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.015>

Bejar W, Gabriel V, Amari M, *et al.* (2013). Characterization of glucansucrase and dextran from *Weissella* sp. TN610 with potential as safe food additives. *Int J Biol Macromol*, 52, 125–132. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.09.014>

Bell D & Gochenaur K (2006). Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *J Appl Physiol*, 100, 1164–1170.

Benkerroum N (2016). Biogenic amines in dairy products: Origin, incidence, and control means. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*, 15, 801–826.

Berlin J (1997). Secondary products from plant cell cultures. In: Rehm H, Reed G, Puhler A, *et al.* (Eds.), *Biotechnology: a multivolume comprehensive treatise* (2nd ed). pp. 593–640.

Bhat T, Kannan A, Singh B, *et al.* (2013). Value addition of feed and fodder by alleviating the antinutritional effects of tannins. *Agric Res*, 2, 189–206.

Blajman J & Zárata G (2020). Hortalizas y legumbres fermentadas. In: Ferrari A,

Vinderola G & Weill R (Eds.), *Alimentos fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura* (1ra ed), pp. 231–271.

Bocanegra A, Nieto A, Bastida S, *et al.* (2009). Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *J Med Food*, 12, 236–258.

Boğa M, Hacıbekiroğlu I & Kolak U (2011). Antioxidant and anticholinesterase activities of eleven edible plants. *Pharm Biol*, 49(3), 290–295. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.517539>

Boivin D, Lamy S, Dufour SL, *et al.* (2009). Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: a comparative study. *Food Chem*, 112, 374–380.

Bourdichon F, Casaregola S, Farrokh C, *et al.* (2012). Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *Int J Food Microbiol*, 154, 87–97.

Bourne M (1981). Texture, viscosity, and food. In: Bourne M (Ed), *Food texture and viscosity: concept and measurement*. Academic Press. pp. 247-279.

Bover-Cid S, Latorre-Moratalla M, Veciana-Nogués M, *et al.* (2014). Biogenic amines. In: Motarjemi Y, Moy G & Todd E (Eds.), *Encyclopedia of food safety*. Academic Press. pp. 381–391

Brochu S (2018). Development and shelf life evaluation of a novel fermented seaweed sauerkraut utilizing commercially important maine seaweeds. [Thesis]. *University of Maine*. 117 pp.

Brown J & Morra M (2005). *Glucosinolate containing seed meal as a soil amendment to control plant pests*. (No. NREL/SR-510-35254). [Technical Report]. Golden, CO, US: National Renewable Energy Laboratory. <https://doi.org/10.2172/15016728>

Burtin P (2003). Nutritional value of seaweeds. *Elec J Env Agricult Food Chem*, 2(4), 498–503.

Butterfield D, Drake J, Pocernich C, *et al.* (2001). Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: Central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med*, 7, 548–554.

Cai Y, Sun M, Xing J, *et al.* (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci*, 78, 2872–2888.

Campos C, Miranda M, Trigo M, *et al.* (2019). Effect of alga *Undaria pinnatifida* (“wakame”) extract on the quality evolution of chilled megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*). *Bulgarian Chemical Communications*, 51(A), 137–143.

Caporale LH (1995). Chemical ecology: a view from the pharmaceutical industry. *Proc Natl Acad Sci*, 92, 75–82.

Carpenter RP, Lyon DH & Hasdell TA (2000). Guidelines for sensory analysis in food product development and quality control. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, 238 pp. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4447-0>

Cartea ME, Francisco M, Soengas P, *et al.*, (2011). Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. *Molecules*, 16, 251–280. <https://doi.org/10.3390/molecules16010251>

Casas G (2005). Biología y ecología de *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae) en el Golfo Nuevo, Argentina. [Tesis]. Universidad Nacional del Sur. 234 pp.

Casas G & Piriz M (1996). Surveys of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) in Golfo Nuevo, Argentina. *Hydrobiologia*, 326/327, 213–215. <https://doi.org/10.1007/BF00047809>

Casas G & Schwindt E (2008). Un alga japonesa en la costa patagónica. *Ciencia*

Hoy, 18(108), 1–5.

Castric-Fey A, Beaupoil C, Bochain J, *et al.* (1999). The introduced alga *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Alariaceae) in the rocky shore ecosystem of the St Malo area: Growth rate and longevity of the sporophyte. *Bot Mar*, 42, 83–96.

Chandini SK, Suresh PV & Bhaskar N (2008). Seaweeds as source of nutritionally beneficial compounds – A review. *J Food Sci Technol*, 45, 1–13.

Chatterjee E, Suba M & Hassan SS (2016). Effect of fruit pectin on growth of lactic acid bacteria. *J Probiotics Health*, 04(02), 1000147. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000147>

Chen JH, Lim JD, Sohn EH, *et al.* (2009). Growth-inhibitory effect of a fucoidan from brown seaweed *Undaria pinnatifida* on *Plasmodium* parasites. *Parasitol Res*, 104, 245–250.

Chen W & Hang F (2019). Lactic acid bacteria starter. In: Chen W (Ed.), *Lactic acid bacteria, bioengineering and industrial applications*. Springer Nature Singapore. pp. 93–143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-13-7283-4>

Chen YC, Sugiyama Y, Abe N, *et al.* (2005). DPPH radical scavenging compounds from Dou-Chi, a soybean fermented food. *Biosci Biotechnol Biochem*, 69, 999–1006. <https://doi.org/https://doi.org/10.1271/bbb.69.999>

Chaalel A, Riazi A, Dubois-Dauphin R, *et al.* (2015). Screening of plantaricin EF and JK in an Algerian *Lactobacillus plantarum* isolate. *Asian Pac J Trop Dis*, 5(6), 474–482. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60819-2](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60819-2)

Cherry P, Yadav S, Strain C, *et al.* (2019). Prebiotics from seaweeds: an ocean of opportunity? *Marine Drugs*, 17(6), 1–35. <https://doi.org/10.3390/md17060327>

Choi JI, Kim HJ & Lee JW (2011). Structural feature and antioxidant activity of low molecular weight laminarin degraded by gamma irradiation. *Food Chem*, 129, 520–523.

Choi SE (2013). Sensory Evaluation. In: Edelstein S (Ed.), *Food science: an ecological approach*. Sudbury, MA. pp. 84–111.

Chopin T & Sawhney M (2009). Seaweeds and their Mariculture. In: Steele JH, Thorpe SA & Turekian KK, *Encyclopedia of Ocean Sciences*. Elsevier. pp. 317–326. <https://doi.org/10.1016/B978-012374473-9.00757-8>

Chow JW, Thal LA, Perri MB, *et al.* (1993). Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*, 37, 2474–2477.

Cintas LM, Casaus MP, Fernandez MF, *et al.* (1998). Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol*, 15(3), 289–298.

Cintas LM, Casaus MP, Håvarstein LS, *et al.* (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl Environ Microbiol*, 63, 4321–4330.

Cintas LM, Casaus MP, Herranz C, *et al.* (2000). Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J Bacteriol*, 182, 6806–6814.

Cintas LM, Casaus MP, Herranz C, *et al.* (2001). Review : bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci Tech Int*, 7(4), 281–305. <https://doi.org/10.1106/R8DE-P6HU-CLXP-5RYT>

Cogan TM (1996). History and taxonomy of starter cultures. In: Cogan TM & Accolas

JP (Eds.), *Dairy Starter Cultures*. VCH Publishers. pp. 1–24.

Colautti A, Arnoldi M, Comi G, *et al.* (2022). Antibiotic resistance and virulence factors in lactobacilli: something to carefully consider. *Food Microbiol*, 103, 103934. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103934>

Cole J, Wang Q, Cardenas E, *et al.* (2009). The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 37, 141–145.

Cotter PD, Hill C, Ross RP, *et al.* (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol*, 3(10), 777–788.

Cuevas C, Moreno-Arribas VM, Martinez-Alvarez PJ, *et al.* (2010). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, 16, 372–382.

Das D, Baruah R & Goyal A (2014). A food additive with prebiotic properties of an a-D-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5. *Int J Biol Macromol*, 69, 20–16.

Dawczynski C, Schuber R & Jahreis G (2007). Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chem*, 103, 891–899.

De Lima A, Sussuchi E & de Giovanni W (2007). Electrochemical and antioxidant properties of anthocyanins and anthocyanidins. *Croat Chem*, 80(1), 29–34.

de Vuyst L (1995). Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. *J. Appl. Bacteriol*, 78, 28–33.

de Vuyst L & Vandamme EJ (1994). *Antimicrobial potencial of lactic acid bacteria* In: L de Vuyst *et al.* (Eds), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Chapman & Hall. pp 91–142.

Dellatorre F, Amoroso R, Saravia J *et al.* (2014). Rapid expansion and potential range of the invasive kelp *Undaria pinnatifida* in the Southwest Atlantic. *Aquatic Invasions*, 9(4), 467–478. <https://doi.org/10.3391/ai.2014.9.4.05>

DeMan J, Rogosa M & Scharpe M (1972). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol*, 23, 130–135.

Deville C, Gharbi M, Dandrifosse G, *et al.* (2007). Study on the effects of laminarin, a polysaccharide from seaweed, on gut characteristics. *J Sci Food Agric*, 87, 1717–1725.

Dewick P (2001). The Shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. In: *Medicinal natural products: a biosynthetic approach* (2nd ed.). John Wiley & Sons Ltd. pp 121–166. <https://doi.org/10.1002/0470846275>

Di Cagno R, Coda R, De Angelis M, *et al.* (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol*, 33, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.003>

Di Cagno R, Filannino P & Gobbetti M (2016). Fermented foods: fermented vegetables and other products. In: Caballero B, Finglas P & Toldrá F (Eds.), *Encyclopedia of food and health* (3rd ed.). Elsevier Ltd. pp. 668–674 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00284-1>

Díaz Ocampo R (2018). *Reología aplicada a sistemas alimentarios*. Universidad Técnica Estatal de Quevedo; Ediciones Grupo Compás. Ecuador. 102 pp.

Dixon GR (2007). *Vegetable Brassicas and related crucifers*. Crop production science in horticulture, CABI. Wallingford, Oxfordshire, 327 pp.

Drider D, Fimland G, He Y, *et al.* (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70(2), 564–582.

<https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-05>

Duthie G & Crozier A. (2000). Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr Opin Lipidol*, 11, 43–47.

Duthie G, Gardner P & Kyle J (2003). Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc Nutr Soc*, 62, 599–603.

Dyrby M, Westergaard N & Stapelfeldt H (2001). Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food Chem*, 72, 431–437.

Edwards D & Dunlop DJ (2019). *Food microbiology, Fundamentals and frontiers*. Doyle M, Diez-Gonzalez F & Hill C (Eds.); (5th ed.). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555819972>

EFSA-European Food Safety Authority (2008). Technical guidance-update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA J*, 732, 1–15.

EFSA-European Food Safety Authority (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA J*, 9, 2393–2486.

EFSA-European Food Safety Authority & FEEDAP Panel (2018). Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA J*, 16(3:5206). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5206>

Elish B & Courvalin P (1995). Analysis of genes encoding D-alanine:D-alanine ligase related enzymes in *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacilli* spp. *Gene*, 152, 79–83.

Endo A, Maeno S & Liu S (2020). Lactic Acid Bacteria: *Leuconostoc* spp. In *Food Science* Elsevier. pp. 1–6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00859-3>

Epstein G & Smale DA (2017). *Undaria pinnatifida*: A case study to highlight challenges in marine invasion ecology and management. *Ecology and Evolution*, 7, 8624–8642. <https://doi.org/10.1002/ece3.3430>

Fahey J, Zalcmann A & Talalay P (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56, 5–51.

Fan L & Truelstrup Hansen L (2012). Fermentation and biopreservation of plant-based foods with lactic acid bacteria. In: Hui Y (Ed.), *Handbook of Plantbased Fermented Food and Beverage Technology* (2nd ed.). CRC Press. pp. 35–48.

FAO-Food and Agriculture Organization (2005). *Global Forest Resources Assessment. Progress towards sustainable forest management*. 147. 350 pp. <https://www.fao.org/3/a0400e/a0400e00.htm>

Filannino P, Di Cagno R & Gobbetti M (2018). Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth. *Curr Opin Biotechnol*, 49, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.016>

Floriano B, Ruiz-Barba JL & Jiménez-Díaz R. (1998). Purification and genetic characterization of Enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol*, 64, 4883–4890.

Fornaris Rullán G. (2014). *Características de la planta*. In: Rivera Martínez LE, Fornaris Rullán GJ, Robles Vázquez W, et al. *Conjunto Tecnológico para la producción de Repollo*. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez Colegio de Ciencias Agrícolas [Technical Report]. [https://scholar.uprm.edu/bitstream/handle/20.500.11801/2591/EEA\\_ConjuntoRepollo\\_2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://scholar.uprm.edu/bitstream/handle/20.500.11801/2591/EEA_ConjuntoRepollo_2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- Forrest B, Brown SN, Taylor MD, *et al.* (2000). The role of dispersal mechanisms in the spread of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae). *Phycologia*, 39(6), 547–553.
- Franz C, Cho GS, Holzapfel WH, *et al.* (2010). Safety of Lactic Acid Bacteria. In: Mozzi F, Raya R & Vignolo G (Eds.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Blackwell Publishing. pp. 341–359. <https://doi.org/10.1002/9780813820866.ch19>
- Franz C, Stiles ME, Schleifer KH, *et al.* (2003). Enterococci in foods a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol*, 88, 105–122.
- Freeman DJ, Falkiner FR & Keane CT (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol*, 42(8), 872–874. <https://doi.org/10.1136/jcp.42.8.872>
- Funatogawa K, Hayashi S, Shimomura H, *et al.* (2004). Antibacterial activity of hidrolizable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol*, 48(4), 251–261.
- Fusari CM, Nazareno MA, Locatelli DA, *et al.* (2020). Phytochemical profile and functionality of Brassicaceae species. *Food Biosci*, 36, 100606. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100606>
- Gacula M, Rutenbeck S, Pollack L, *et al.* (2007). The just-about-right intensity scale: Functional analyses and relation to hedonics. *J Sens Stud*, 22(2), 194–211. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2007.00102.x>
- Gamal-Eldeen AM, Ahmed EF & Abo-Zeid MA (2009). In vitro cancer chemopreventive properties of polysaccharide extract from the brown alga, *Sargassum latifolium*. *Food Chem Toxicol*, 47, 1378–1384.
- Garbi, M. (2016). *Manual de producción de hortalizas asiáticas* (1ra ed.). Lujan, EdUNLu.REUN-LUA, 82 pp.
- García Ruiz, A. (2012). *Efecto de los polifenoles sobre el crecimiento y metabolismo de bacterias lácticas del vino. Potencial uso como alternativa al empleo de los sulfitos durante la vinificación*. [Tesis]. Universidad Autónoma de Madrid. 300 pp. [digitool-uam.greendata.es](http://digitool-uam.greendata.es)
- Gardner NJ, Savard T, Obermeier P, *et al.* (2001). Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *Int J Food Microbiol*, 64(3), 261–275. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00461-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00461-X)
- Garg G, Singh A, Kaur A, *et al.* (2016). Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *Biotech*, 6(47), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0371-4>
- Garsin D, Frank KL, Silanpää J, *et al.* (2014). Pathogenesis and models of enterococcal infection. In: Gilmore M, Clewell D, Ike Y, *et al.* (Eds.), *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary. pp. 185–258. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24649506>
- Garzón GA (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biol Colomb*, 13(3), 27–36.
- Gest H, (2004). The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. *Notes Rec R Soc Lond*, 58(2), 187–201.
- Ghosh D, (2021). Studies on the changes of biochemical, microbiological and sensory parameters of sauerkraut and fermented mix vegetables. *Food Res*, 5(1), 78–83. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.5\(1\).193](https://doi.org/10.26656/fr.2017.5(1).193)

Gibilisco PE, Lancelotti JL, Negrin VL, *et al.* (2020). Composting of seaweed waste: Evaluation on the growth of *Sarcocornia perennis*. *Journal of Environmental Management*, 274, 111193. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111193>

Gibilisco PE, Negrin VL, Idaszkin YL (2021). Efecto del compost de *Undaria pinnatifida* en la tolerancia y acumulación de cobre en dos especies halófitas. III Jornadas Internacionales y V Nacionales de Ambiente. Universidad Nacional de Hurlingham, Universidad Nacional de Moreno. Disponible en <https://jornadasambiente.ar/efecto-del-compost-de-undaria-pinnatifida-en-la-tolerancia-y-acumulacion-de-cobre-en-dos-especies-halofitas/>

Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC, *et al.* (1994). Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J Bacteriol*, 176, 7335–7344.

Gómez-Ordóñez E, Jiménez-Escrig A & Rupérez P (2010). Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. *Food Res Int*, 43, 2289–2294.

Gouda AA & Amin AS (2010). Copper(II)-neocuproine reagent for spectrophotometric determination of captopril in pure form and pharmaceutical formulations. *Arabian J Chem*, 3(3), 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.04.004>

Guérin M, Silva CRD, Garcia C, *et al.* (2020). Lactic acid bacterial production of exopolysaccharides from fruit and vegetables and associated benefits. *Fermentation*, 6(4), 6040115. <https://doi.org/10.3390/fermentation6040115>

Guiry MD & Guiry GM (2022). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>.

Hansen EB (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int J Food Microbiol*, 78(1–2), 119–131. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00238-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00238-6)

Harbaum B, Hubbermann ME & Zhu Z *et al.* (2008). Impact of fermentation on phenolic compounds in leaves of pak choi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) and chinese leaf mustard (*Brassica juncea* Coss). *J Agric Food Chem*, 56, 148-157.

Havarstein LS, Diep DB & Nes IF (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol Microbiol*, 16, 229–240.

Havarstein LS, Holo H & Nes IF (1994). The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Microbiology*, 140, 2383–2389.

Hay C & Luckens P (1987). The Asian kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta: Laminariales) found in a New Zealand harbour. *N Z J Bot*, 25, 329–332.

He J & Giusti M. (2010). Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annu Rev Food Sci Technol*, 1(1), 163–187.

Heaney R & Weaver C. (1990). Calcium absorption from kale. *Am J Clin Nutr*, 51, 656–657.

Heimler D, Vignolini P, Dini MG, *et al.* (2006). Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chem*, 99(3), 464–469. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.057>

Hernández A, Pérez-Nevado F, Ruiz-Moyano S, *et al.* (2018). Spoilage yeasts: What are the sources of contamination of foods and beverages? *Int J Food Microbiol*, 286(May),

98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.031>

Herr I & Büchler MW (2010). Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: Implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer Treat. Rev.*, 36, 377–383.

Holzapfel WH (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 75(3), 197–212. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00707-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00707-3)

Hosseini S, Gharachorloo M, Ghiassi-Tarzi B, *et al.* (2016). Evaluation of the organic acids ability for extraction of anthocyanins and phenolic compounds from different sources and their degradation kinetics during cold storage. *Polish J Food and Nutr Sci*, 66(4), 261–269. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2015-0057>

Hu S, Wang J, Kung H, *et al.* (2004). Antimicrobial effect of extracts of cruciferous vegetables. *Kaohsiung J Med Sci*, 20, 591–599.

Hu T, Liu D, Chen Y, *et al.* (2010). Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Undaria pinnatifida* *in vitro*. *Int J Biol Macromol*, 46, 193–198.

Huang H, Johanning G & O'Dell B (1986). Phenolic acid content of food plants and possible nutritional implications. *J Agric Food Chem*, 34, 48–51.

Huang W, Cai Y & Zhang Y (2009). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr Cancer*, 62(1), 1–20. <https://doi.org/10.1080/01635580903191585>

Hunaefi D, Akumo DN & Smetanska I (2013). Effect of fermentation on antioxidant properties of red cabbages. *Food Biotechnol*, 27(1), 66–85. <https://doi.org/10.1080/08905436.2012.755694>

Hunaefi D, Gruda N, Riedel H, *et al.* (2013). Improvement of antioxidant activities in red cabbage sprouts by lactic acid bacterial fermentation. *Food Biotechnol*, 27(4), 279–302. <https://doi.org/10.1080/08905436.2013.836709>

Hur SJ, Lee SY, Kim YC, *et al.* (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, 160, 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.112>

Hurtst A (1981). Nisin. In: D Perlman & A Laskin (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* Academic Press. pp. 85–123.

Hutkins, RW (2006). Fermented Vegetables. In: Bourne MC, Clydesdale FM, Knorr D, *et al.* (Eds.), *Microbiology and technology of fermented food*. IFT Press. pp. 233–259. <https://doi.org/10.1002/9780470277515.ch7>

Huycke MM & Gilmore MS (1995). Frequency of aggregation substance and cytotoxin gene among enterococcal endocarditis isolates. *Plasmid*, 34, 152–156.

Iserliyska D, Dzhivoderova M & Nikovska K (2017). Application of penalty analysis to interpret jar data—a case study on orange juices. *Current Trends in Natural Sciences*, 6(11), 6–12. <http://www.natsci.upit.ro>

Izquierdo Altarejos P (2015). *Comparación de estrategias metagenómicas en muestras ambientales de biofilms*. [Tesis]. Universidad Politécnica de Valencia 42 pp.

Jaafir S & Al-Shawi S (2021). Cucumber pickles and fermentations. In: Wang H (Ed.), *Cucumber Economic Values and Its Cultivation and Breeding*. IntechOpen. pp. 1–17. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.96052>

Jacob F, Lwoff A, Siminovitch A, *et al.* (1953). Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Ann. Inst. Pasteur*, 84, 222–224.

Jagannath A, Raju PS & Bawa AS (2012). A two-step controlled lactic fermentation of cabbage for improved chemical and microbiological qualities. *J Food Qual*, 35(1), 13–20. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2011.00427.x>

Jahangir M, Kim HK, Choi YH, et al. (2009). Health-affecting compounds in Brassicaceae. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 8(2), 31–43.

Jaiswal AK, Gupta S & Abu-Ghannam N (2012). Kinetic evaluation of colour, texture, polyphenols and antioxidant capacity of Irish York cabbage after blanching treatment. *Food Chem*, 131(1), 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.032>

James K. (2016). A review of the impacts from invasion by the introduced kelp *Undaria pinnatifida*. [Technical Report]. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.35162.75205>

JECFA-Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (1996). *Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. WHO food additive Series 35*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/37491>

Jeon HH, Kim KH, Chun BH, et al. (2017). A proposal of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *jonggajibkimchii* subsp. nov. and reclassification of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *suionicum* (Gu et al., 2012) as *Leuconostoc suionicum* sp. nov. based on complete genome. *Int J Syst Evol Microbiol*, 67, 2225–2230. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001930>

Ji Y, Kim H, Park H, et al. (2013). Functionality and safety of lactic bacterial strains from Korean kimchi. *Food Control*, 31(2), 467–473. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.034>

Jiménez N, Esteban-Torres M, Mancheño JM, et al. (2014). Tannin degradation by a novel tannase enzyme present in some *Lactobacillus plantarum* strains. *Appl Environ Microbiol*, 80(10), 2991–2997. <https://doi.org/10.1128/AEM.00324-14>

Joerger C & Klaenhammer TR (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J Bacteriol*, 167, 439–446.

Joosten H & Northolt M (1989). Detection, growth, and amine-producing capacity of lactobacilli in cheese. *Appl and Environ Microbiol*, 55(9), 2356–2359.

Jung SH, Park JW, Cho IJ, et al. (2012). Characterization of lactic acid bacteria isolated from sauce-type Kimchi. *Prev Nutr and Food Sci*, 17(3), 217–222. <https://doi.org/10.3746/pnf.2012.17.3.217>

Kandler O (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 209–224.

Kandler O & Weiss N (1986). Regular, nonsporing Gram-positive rods. In: Sneath ME, Mair PHA, Sharpe NS, et al. (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. pp. 1208–1234.

Kanemitsu K, Nishino T, Kunishim H, et al. (2001). Quantitative determination of gelatinase activity among Enterococci. *J Microbiol Methods*, 47, 11–16. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(01\)00283-4](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(01)00283-4)

Kapusta-Duch J, Kopeć A, Piatkowska E, et al. (2012). The beneficial effects of *Brassica* vegetables on human health. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 63(4), 389–395.

Kapusta-Duch J, Kusznierevicz B, Leszczyńska T, et al. (2017). Effect of package type on selected parameters of nutritional quality of chill-stored white sauerkraut. *Pol J Food Nutr Sci*, 67(2), 137–144.

Karagozlu N & Ergnl B (2011). Survival of *Salmonella typhimurium* NRRL E4463 in sauerkraut during fermentation. *Int J Food Eng*, 7(5). <https://doi.org/10.2202/1556-3758.2156>

- Karam N & Belarbi A (1995). Detection of polygalacturonase and pectinesterases in lactic acid bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*, 11, 559–563.
- Karthik JL, Kumar G & Rao KVB (2011). Screening of pectinase producing microorganisms from agricultural waste dump soil. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*, 1(2), 329–337.
- Kayser FH (2003). Safety aspects of enterococci from the medicinal point of view. *Int J Food Microbiol*, 88, 255–262.
- Keating G & O’Kennedy R (1997). Biology, Applications and Mode of Action. In: O’Kennedy R & Thornes RD (Eds.), *The chemistry and occurrence of coumarins*. John Wiley & Sons West Sussex, UK. pp. 23-66.
- Keck A & Finley J (2004). Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium. *Integr Cancer Ther*, 3, 5–12.
- Kestwal R, Lin JC, Bagal-Kestwal D, *et al.* (2011). Glucosinolates fortification of cruciferous sprouts by sulphur supplementation during cultivation to enhance anti-cancer activity. *Food Chem*, 126, 1164–1171.
- Khanna S (2019). Effects of salt concentration on the physicochemical properties and microbial safety of spontaneously fermented cabbage. [Thesis]. *Electronic Theses and Dissertations* (3013). 113 pp. <https://digitalcommons.library.umaine.edu/etd/3013>
- Kim MJ, Lee HW, Lee ME, *et al.* (2019). Mixed starter of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc citreum* for extending kimchi shelf-life. *J Microbiol*, 57(6), 479–484. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-9048-0>
- Kim MJ, Seo HN, Hwang TS, *et al.* (2008). Characterization of exopolysaccharide (EPS) produced by *Weissella hellenica* SKkimchi3 isolated from kimchi. *J Microbiol*, 46(5), 535–541. <https://doi.org/10.1007/s12275-008-0134-y>
- Kim M & Park J (2009). Cruciferous vegetable intake and the risk of human cancer: epidemiological evidence. Proceedings of the Nutrition Society. *Conference on "multidisciplinary Approaches to Nutritional Problems". Symposium on "nutrition and Health"*.pp 103–110.
- Kim YY, Oh SH, Pang W, *et al.* (2017). A review of the scientific names of chinese cabbage according to the international codes of nomenclature. *Hortic Sci Technol*, 35(2), 165–169. <https://doi.org/10.12972/kjhst.20170019>
- Kimmani BG, Kerekes EB, Szebenyi C, *et al.* (2021). In vitro activity of selected phenolic compounds against planktonic and biofilm cells of food-contaminating yeasts. *Foods*, 10, 1–14. <https://doi.org/10.3390/foods10071652>
- Knaggs A (2003). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat Prod Rep*, 20, 119–136.
- Kolb N, Vallorani L, Milanović N, *et al.* (2004). Evaluation of marine algae wakame (*Undaria pinnatifida*) and kombu (*Laminaria digitata japonica*) as food supplements. *Food Technol Biotechnol*, 42(1), 57–61.
- Konczac I & Zhang W (2004). Anthocyanins-more than nature’s colours. *J Biom Biotechnol*, 5, 239–240.
- Kothari D, Das D, Patel S, *et al.* (2014). Dextran and food application. In: Ramawat KG & Mérillon JM (Eds.), *Polysaccharides*. Springer International Publishing Switzerland. pp. 1–16. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-03751-6>
- Kumari P, Kumar M, Reddy CRK, *et al.* (2013). Algal lipids , fatty acids and sterols. In *Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals*. Woodhead Publishing Limited. pp. 87–134. <https://doi.org/10.1533/9780857098689.1.87>

Kusznierewicz B, Śmiechowska A, Bartosze A., *et al.* (2008). The effect of heating and fermenting on antioxidant properties of white cabbage. *Food Chem* 108(3), 853–861. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.049>

Lahaye M (1991). Marine-algae as sources of fibers—determination of soluble and insoluble dietary fiber contents in some sea vegetables. *J Sci Food Agric*, 54, 587–594. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2740540410>

Lake B (1999). Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food Chem Toxicol*, 37(4), 423–453. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00010-1](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00010-1)

Larrosa M, Tomás-Baberan F & Espin J (2012). The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J Nutr Biochem*, 17, 611–625.

Lauková A, Tomáška M, Fraqueza MJ, *et al.* (2022). Bacteriocin producing strain *Lactiplantibacillus plantarum* LP17L/1 isolated from traditional stored ewe's milk cheese and its beneficial potential. *Foods*, 11, 959. <https://doi.org/10.3390/foods11070959>

Laws Y, Gu Y & Marshall V (2001). Biosynthesis, characterization, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnol Adv*, 19, 597–625.

Leathers T (2002). Dextran, in biopolymers. In: Vandamme E, De Baets S & Steinbuchel A (Eds.), *Polysaccharides I: Polysaccharides from Prokaryotes*. Wiley-Blackwell, USA. pp. 299–321.

Lee J, Koo N & Min DB (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 3, 21–33.

Leemhuis H, Pijning T, Dobruchowska J, *et al.* (2013). Three-dimensional structures, reactions, mechanism,  $\alpha$ -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *J Biotechnol*, 163, 250–272.

Leistner L (1995). Principles and applications of hurdle technology. In: Gould G (Ed.), *New methods of food preservation*. Springer Netherlands. pp. 1–21.

Lekha PK & Lonsane BK (1997). Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv Appl Microbiol*, 44, 215–260.

Lemtur T, Prasad VM, Topno SE *et al.* (2019). Effect of photosynthetic bacteria and bio-char on the growth, development and quality of Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 8(08), 2102–2110. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.808.246>

Levine H & Finley JW (2018). Texture. In: *Principles of Food Chemistry*. Springer, Cham. pp 329–363. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-63607-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-63607-8_8)

Li B, Hayes JE & Ziegler GR (2014). Just-about-right and ideal scaling provide similar insights into the influence of sensory attributes on liking. *Food Qual Prefer*, 37, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2014.04.019>

Lindell S & Quinn P (1975). Use of bile-esculin agar for rapid differentiation of Enterobacteriaceae. *J. Clin Microbiol*, 1, 440–443.

Lindow SE & Brandl MT (2003). Minireview: microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol*, 69(4), 1875–1883. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1875>

Liu Z, Li J, Zhou X, *et al.* (2021). The lactic acid bacteria and yeast community of home-made sauerkraut from three provinces in Southwest China. *Arch Microbiol*, 203(6), 3171–3182. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02222-9>

Madden T (2019). The BLAST Sequence Analysis Tool. In: McEntyre J & Ostell J (Eds.), *The NCBI handbook* (2nd ed). National Center for Biotechnology Information. pp.

361–370.

Manchali S, Chidambara KN & Patil BS (2011). Crucial facts about health benefits of popular cruciferous vegetables. *J Funct Foods*, 4(1), 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.08.004>

Marchiaro AB, Pentreath V, Maldonadob F, *et al.* (2013). Biofertilizantes: estudios preliminares para el potencial uso del alga *Undaria pinnatifida*. VII Congreso Argentino de Ingeniería Química. 2das Jornadas Argentinas de Seguridad de Procesos. Rosario, Santa Fe Argentina. Disponible en [https://www.aaiq.org.ar/SCongresos/docs/04\\_025/papers/02a/02a\\_1539\\_271.pdf](https://www.aaiq.org.ar/SCongresos/docs/04_025/papers/02a/02a_1539_271.pdf)

Martin J & Bastida R (2008). El alga invasora *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar en la Ría Deseado (Patagonia austral, Argentina): ciclo del esporofito y factores ambientales determinantes de su distribución. *Rev Biol Mar Oceanogr* 43(2), 335–344.

Martínez J & Baquero F (2014). Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. *Ups J Med Sci*, 119, 68–77. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.901444>

Mathur S & Singh R (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *Int J Food Microbiol*, 105, 281–295.

Mattila P & Kumpulainen J (2002). Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode array detection. *J Agric Food Chem*, 50, 3660–3667.

McAuliffe O, Ross RP & Hill C (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev*, 25(3), 285–308.

McSweeney C, Gough J, Conlan L, *et al.* (2005). Nutritive value assessment of the tropical shrub legume *Acacia angustissima*: anti-nutritive compounds and *in vitro* digestibility. *Anim Feed Technol*, 121, 175–190.

Meijide R, Rubín G & Alvarado C (2016). Obtención de un concentrado de pectinasas utilizando fuentes vegetales de procedencia nacional. *Ingeniería y Sociedad UC*, 11(1), 46–54.

Mokoena MP (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, 22, 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>

Moll GN, van den Akker E, Hauge HH, *et al.* (1999). Complementary and overlapping selectivity of the two-peptide bacteriocins plantaricin EF and JK. *J Bacteriol*, 181(16), 4848–4852. <https://doi.org/10.1128/JB.181.16.4848-4852.1999>

Monroy DM, Castro BT, Fernández P, *et al.* (2009). Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Contactos*, 73, 63–72.

Monsalve C & Cano A (2003). La familia Brassicaceae en la provincia de Huaylas, Áncash. *Rev Peru Biol*, 10(1), 20–32.

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

Moreno D, Carvajal M, Lopez-Berenguer C, *et al.* (2006). Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *J Pharm Biomed Anal*, 41, 1508–1522.

Morris MC, Evans DA, Tangney CC, *et al.* (2006). Associations of vegetable and fruit consumption with age-related cognitive change. *Neurology*, 67, 1370–1376.

Müller T (1990). Comparison of methods for differentiation between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Centralbl Mikrobiol*, 145,

363–366.

Muñoz-Bernal O, Torres-Aguirre GA, Núñez-Gastélum JA, *et al.* (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 20(2), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.003>

Muyanja C, Narvhus J, Treimo J, *et al.* (2003). Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. *Int J Food Microbiol*, 80, 201–210.

Nagai NF, Ranalli N & Andrés SC (2019). Caracterización de *Undaria* sp. e incorporación en hamburguesas de cerdo. XXI Congreso Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos y XVII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos-CyTAL@-ALACCTA. Disponible en <https://alimentos.org.ar/wp-content/uploads/2020/09/CYTAL2019-Libro-de-trabajos-completos-I-ISBN.pdf>

Neilsen SS (1998). pH and titratable acidity. In: Sadler G & Murphy P (Eds.), *Food Analysis* (2nd ed). Aspen Publishers. pp. 101–116.

Nes I, Håvarstein L & Holo H (1995). Genetics of non-lantibiotics. In: Ferreti J, Gilmore M, Klaenhammer T, *et al.* (Eds.), *Genetics of Streptococci, Enterococci and Lactococci*. Karger. pp. 645–651.

Nes I, Yoon S & Diep D (2007). Ribosomally synthesized. *Food Sci Biotechnol*, 16, 675–690.

Niksic M, Niebuhr SE, Dickson JS, *et al.* (2005). Survival of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 during sauerkraut fermentation. *J Food Prot*, 68(7), 1367–1374. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.7.1367>

Nilsen T, Nes IF & Holo H (1998). An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC 492. *J Bacteriol*, 108, 1848–1854.

Ninfali P & Bacchiocca M (2003). Polyphenols and antioxidant capacity of vegetables under fresh and frozen conditions. *Agric Food Chem*, 51, 2222–2226.

Nisizawa K, Noda H, Kikuchi R, *et al.* (1987). The main seaweed foods in Japan. *Hydrobiologia*, 151, 5–29. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1007/BF00046102>

Nugrahedhi PY, Dekker M, Widianarko B, *et al.* (2016). Quality of cabbage during long term steaming; phytochemical, texture and colour evaluation. *LWT-Food Sci Technol*, 65, 421–427. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.034>

Nuno A, Catarino M, Silva A, *et al.* (2019). Brown macroalgae as valuable food ingredients. *Antioxidants*, 8(9),365. <https://doi.org/10.3390/antiox8090365>

Ocampo DM, Valverde CL, Colmenares AJ, *et al.* (2015). Fenoles totales y actividad antioxidante en hojas de dos especies colombianas del género *Meriania* (melastomataceae). *Rev Colomb Quim*, 43(2), 41–46. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v43n2.53124>

OECD (2016). *Brassica* crops (*Brassica* species). In: OECD Consensus Documents (Ed.), *Safety assessment of transgenic organisms in the environment* (Vol. 5). 151 pp. <https://doi.org/doi.org/10.1787/9789264253018-6-en>

Oh S & Koh C (1996). Growth and photosynthesis of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) on a cultivation ground in Korea. *Botanica Marina*, 39, 389–393.

Okamura K (1926). *Icones of Japanese algae*. *Bot Mag Tokyo*, 5(7): 117-125.

Olano-Martin E, Mountzouris K, Gibson G, *et al.* (2000). In vitro fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. *Br J Nutr*, 83, 247–255.

Olivas-Aguirre FJ, Wall-Medrano A, González-Aguilar GA, *et al.* (2015). Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutr Hosp*, 31(1), 55–66. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.7699>

Omar NB, Abriouel H, Keleke S, *et al.* (2008). Bacteriocin-producing *Lactobacillus* strains isolated from poto poto, a Congolese fermented maize product, and genetic fingerprinting of their plantaricin operons. *Int J Food Microbiol*, 127, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.037>

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2004). *Fomento del consumo mundial de frutas y verduras*. Estrategia Mundial Sobre Régimen Alimentario, Actividad Física y Salud. [www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/es/](http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/es/).

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2021). *Malnutrición*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition#:~:text=Las enfermedades no transmisibles relacionadas con la alimentación,de riesgo de esas enfermedades a escala mundial.>

Orla-Jensen, S (1919). *The lactic acid bacteria*. Andr. Fred. Host and Son, Copenhagen. 118 pp.

Osawa RO, Kuroiso K, Goto S, *et al.* (2000). Isolation of tannin-degrading lactobacilli from humans and fermented foods. *Appl Environ Microbiol*, 66(7), 3093–3097.

Özyürek M, Güçlü K, Tütem E, *et al.* (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical Methods*, 3(11), 2439–2453. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.1039/c1ay05320e>

Palasí Mascarós T (2015). *Caracterización físico-química y nutricional de algas en polvo empleadas como ingrediente alimentario*. [Tesis]. Universitat Politècnica de Valencia. <http://hdl.handle.net/10251/55641>.

Pandey KB & Rizvi SI. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2(5), 270–278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>

Park S, Vala M, Jiang N, *et al.* (2014). Metabolite profiling of phenolics, anthocyanins and flavonols in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Ind Crops Prod*, 60, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.037>

Park WP (2004). Quality characteristics of salted chinese cabbage treated with electrolyzed-acid water during storage. *Korean J Food Sci Technol*, 36(2), 365–367.

Parra Huertas RA (2010). Review Bacterias acido lacticas:papel funcional en los alimentos. *Rev Bio Agro*, 8(1), 93–104.

Patel A & Prajapati J (2013). Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J Adv Dairy Res*, 01(02), 1–7. <https://doi.org/10.4172/2329-888x.1000107>

Pazmiño-Durán A, Giusti M, Wrolstad R, *et al.* (2001). Anthocyanins from oxalis triangularis as potential food colorants. *Food Chem*, 75(2), 211–216.

Prachyakij P, Schnurer, J, Charernjitrakul W, Kantachote (2008). Selection and identification of lactic acid bacteria that inhibit yeast contaminants isolated from fermented plant beverages. *Songklanakarin J Sci Technol*, 2: 211-218.

Peña E, Martínez-Villaluenga C & Frías J (2017). Sauerkraut: production, composition, and health benefits. In Frías J, Martínez-Villaluenga C & Peña E (Eds.), *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. Academic Press. pp. 557–576. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00024-8>

Peñas E, Frías J, Sidro B & Vidal-Valverde C (2010). Impact of fermentation

conditions and refrigerated storage on microbial quality and biogenic amine content of sauerkraut. *Food Chem*, 123(1), 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.021>

Pérez MD, Martínez CCR & Rais DC (2013). *Enterococcus*, medios de cultivo convencionales y cromogénicos. *Rev Cubana Hig Epidemiol*, 51(1), 97–110.

Pessione E, Pessione A, Lamberti C, et al. (2009). First evidence of a membrane-bound, tyramine and beta-phenylethylamine producing, tyrosine decarboxylase in *Enterococcus faecalis*: A two-dimensional electrophoresis proteomic study. *Proteomics*, 9, 2695–2710.

Piard JC & Desmazeaud M (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Bacteriocins and other anti-bacterial substances. *Lait*, 72, 113–142.

Pinto D, Marzani B, Minervini F, et al., (2011). La plantaricina A sintetizada por *Lactobacillus plantarum* induce la proliferación y migración in vitro de queratinocitos humanos y aumenta la expresión de los genes TGF- $\beta$ 1, FGF7, VEGF-A e IL-8. *Peptides*, 32(9), 1815-1824.

Piovan A, Seraglia R, Bresin B, et al. (2013). Fucoxanthin from *Undaria pinnatifida*: photostability and coextractive effects. *Molecules*, 18, 6298–6310. <https://doi.org/10.3390/molecules18066298>

Pisoschi AM & Negulescu GP (2011). Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochem Anal Biochem*, 1(1), 1–10. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000106>

Podsedeck A (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: a review. *LWT-Food Sci Technol*, 40(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.07.023>

Portilla S, Rodríguez A, Ramírez-Lepe M, et al. (2016). Biodiversity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from Mexican regional cheeses and their contribution to milk fermentation. *Food Biotechnol*, 30(3), 155–172. <https://doi.org/10.1080/08905436.2016.1198263>

Prajapati J & Nair B (2003). Handbook of fermented functional foods. In: Farnworth ER (Ed.), *History of fermented foods*. CRC Press. pp. 1–25.

Patra JK, Das G, Paramithiostis S, et al. (2016). Kimchi and other widely consumed traditional fermented food of Korea: a review. *Front Microbiol*, 7, 1493. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01493>

Prior RL, Wu X & Schaich K (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*, 53, 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>

Radaic I, de Jesus MB & Kapila YL (2020). Bacterial anti-microbial peptides and nano-sized drug delivery systems: the state of the art toward improved bacteriocins. *J. Control. Release*, 321, 100–118. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.02.001>

Rao M, Pintado J, Stevens W, et al. (2004). Kinetic growth parameters of different amyolytic and non-amyolytic *Lactobacillus* strains under various salt and pH conditions. *Bioresour Technol*, 94(3), 331–337.

Remaud-Simeon M, Willemot R, Sarcabal P, et al. (2000). Glucansucrases: molecular engineering and oligosaccharide synthesis. *J Mol Catal B Enzym*, 10, 117–128.

Rezac S, Kok C, Heermann M, et al. (2018). Fermented foods as a dietary source of live organisms. *Front Microbiol*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01785>

Rivera Carriles K, Argaiz A, Palou E, et al. (2005). Synergistic inhibitory effect of

citral with selected phenolics against *Zygosaccharomyces bailii*. *J Food Prot*, 68(3), 602–606. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.3.602>

Robards K, Prentzler P, Tucker G, *et al.* (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66, 401–436.

Roberts JS & Kidd DR (2005). Lactic acid fermentation of onions. *LWT-Food Sci Technol*, 38(2), 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.05.007>

Rochmawati N (2019). Food science and sensory analysis. In: Mukti YP (Ed.). *Ottimmo International Mastergourmet Academy*. 35 pp.

Rodríguez H, Curiel JA, Landete JM, *et al.* (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*, 132(2–3), 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.025>

Rodríguez H, Landete J, Rivas B, *et al.* (2008). Metabolism of food phenolic acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. *Food Chem*, 107(4), 1393–1398.

Rodríguez J, Martínez M, Horn N, *et al.* (2003). Review. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*, 80(2), 101–116.

Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Navarro L, *et al.* (2008). Characterization of a new organization of the plantaricin locus in the inducible bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* J23 of grape must origin. *Arch Microbiol*, 189, 491–499.

Rosa E, David M & Gomes MH (2001). Glucose, fructose and sucrose content in broccoli, white cabbage and Portuguese cabbage grown in early and late seasons. *J Sci Food Agric*, 81(12), 1145–1149. <https://doi.org/10.1002/jsfa.919>

Ross P, Morgan S & Hill C (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *Int J Food Microbiol*, 79, 3–16.

Ruiz-Capillas C, Herrero AM, Pintado T, *et al.* (2021). Sensory analysis and consumer research in new meat products development. *Foods*, 10(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/foods10020429>

Rupérez P (2002). Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chem*, 79, 23–26.

Rupérez P, Gómez-Ordóñez E & Jiménez-Escrig A (2011). Nutritional quality and biological properties of brown and red edible seaweeds. In: VH Pomin (Ed.), *Seaweed: Ecology, Nutrient Composition and Medicinal Uses*. pp. 51–66.

Rupérez P & Saura-Calixto F (2001). Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds. *Eur Food Res Technol*, 212, 349–354.

Russo P, Caggianiello G, Arena MP, *et al.* (2017). Lactic acid bacteria of fermented fruit and vegetables. In: Paramithiotis S (Ed.), *Lactic acid fermentation of fruit and vegetables*. CRC Press, Taylor & Francis Group. pp 19–32.

Saad N, Delattre C, Urdaci M, *et al.* (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Sci Technol*, 50, 1–16.

Sabel A, Bredefeld S, Schlander M, *et al.* (2017). Wine phenolic compounds: antimicrobial properties against yeasts, lactic acid and acetic acid bacteria. *Beverages*, 3(3). <https://doi.org/10.3390/beverages3030029>

Saito Y (1975). *Undaria*. In: Tokida J & Hirose H (Eds.), *Advance of Phycology in Japan* (1st ed.,). Junk Publishers. pp. 304–320.

Sakellaris G, Nikolaropoulos S & Evangelopoulos E (1989). Purification and characterization of an extracellular polygalacturonase from *Lactobacillus plantarum* strain BAII. *J. Appl. Bacteriol*, 67, 77–85.

- Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, López-Hernández J, *et al.* (2004). Fatty acids , total lipid , protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chemistry*, 85, 439–444. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.08.001>
- Sánchez-Maldonado AF, Schieber A & Gänzle MG (2011). Structure-function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol*, 111(5), 1176–1184. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05141.x>
- Sanderson J (1990). A preliminary survey of the introduced macroalga, *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar on the east coast of Tasmania, Australia. *Bot Mar*, 33, 153–157.
- Sangeetha Mahadevaiah S & Gopal S (2014). Incidence of *Listeria* species in food and food processing environment : a review. *J Microbil Biotechnol*, 3(1), 1–12.
- Sanz Cervera, S. (2011). *Prácticas de Microbiología* (2nd ed.). Universidad de la Rioja. 104 pp.
- Semedo T, Santos M, Martins P, *et al.* (2003). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the cyl operon in enterococci. *J Clin Microbiol*, 41, 2569–2576. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2569>
- Seong GU, Hwang IW & Chung SK (2016). Antioxidant capacities and polyphenolics of chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) leaves. *Food Chem*, 199, 612–618. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.066>
- Seseña Prieto S (2007). *Caracterización tecnológicas de cepas autóctonas y selección de cultivos iniciadores para la fermentación de la berenjena de almagro*. [Tesis]. Universidad de Castilla-La Mancha. 246 pp.
- Shahidi F (1997). Antinutrients and phytochemical in food. In: Shahid F (Ed.), *American Chemical Society*. Washington, DC. 334 pp.
- Shahidi F, Gabon JE, Rubin LJ, *et al.* (1990). Effect of methanol–ammonia–water treatment on the fate of glucosinolates. *J Agric Food Chem*, 38, 251–255.
- Shahidi F & JuDong Y (2018). Bioactivities of phenolics by focusing on suppression of chronic diseases: a review. *Int J Mol Sci*, 19(6), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms19061573>
- Shahidi F & Zhong Y (2015). Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods*, 18, 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Sharpe ME (1981). The genus *Lactobacillus*. In *The Prokariote*. Springer-Verlang. pp. 1653–1679.
- Silla Santos MH (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol*, 29, 213–231.
- Singh J, Upadhyay A, Prasad K, *et al.* (2007). Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in *Brassica* vegetables. *J Food Comp Anal*, 20, 106–112.
- Siqueira J, Safir G & Nair M (1991). Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. *New Phytol*, 118, 87–93.
- Stuart M, Hurd C & Brown M (1999). Effects of seasonal growth rate on morphological variation of *Undaria pinnatifida* (Alariaceae, Phaeophyceae). *Hydrobiologia*, 399, 191–199.
- Stuar M (2004). *Review of research on Undaria pinnatifida in New Zealand and its potential impacts on the eastern coast of the South Island*. DOC Science Internal Series 166. 40 pp.

- Sun YP, Chou CC & Yu RC (2009). Antioxidant activity of lactic-fermented chinese cabbage. *Food Chem*, 115(3), 912–917. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.097>
- Swain MR, Anandharaj M, Ray RC, *et al.* (2014). Fermented fruits and vegetables of Asia: a potential source of probiotics. *Biotechnol Res Int*, ID250424, 1–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2014/250424>
- Tabart J, Pincemail J, Kevers C, *et al.* (2018). Processing effects on antioxidant, glucosinolate, and sulforaphane contents in broccoli and red cabbage. *Eur Food Res Technol*, 244(12), 2085–2094. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3126-0>
- Tagg JR, Dajani AS & Wannamaker LW (1976). Bacteriocins or Gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev*, 40, 722–756.
- Tai HF, Foo HL, Abdul Rahim R, *et al.* (2015). Molecular characterisation of new organisation of *plnEF* and *plw* loci of bacteriocin genes harbour concomitantly in *Lactobacillus plantarum* I-UL4. *Microb Cell Fact*, 14(89), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0280-y>
- Tapia MS (2020). Contribución al concepto de la actividad de agua (aw) y su aplicación en la ciencia y la tecnología en latinoamérica y Venezuela. *Boletín de la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales*, LXXX(2), 18–40.
- Thakur PK, Panja P & Kabir J (2017). Effect of temperature on fermentation and quality of sauerkraut. *Indian J Ecol*, 44(5), 494–496. <https://www.researchgate.net/publication/319547291>
- Thakur PK, Panja P, Kabir J, *et al.* (2020). Studies on shelf life of sauerkraut. *J Crop Weed*, 16(2), 204–209. <https://doi.org/10.22271/09746315.2020.v16.i2.1338>
- Tieking M, Korakli M, Ehrmann MA, *et al.* (2003). In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 69(2), 945–952. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.945>
- Tomita H, Fujimoto S, Tanimoto K, *et al.* (1996). Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pY117. *J Bacteriol*, 178, 3585–3593.
- Torres AI, Casas GN, Gil MN, *et al.* (2011). *Evaluación de la composición químico-nutricional y del nivel de metales pesados e hidrocarburos en Undaria pinnatifida de los golfos San José y Nuevo, Chubut*. Centro Nacional Patagónico – CONICET. 46 pp.
- Uchida M & Miyoshi T (2013). Algal fermentation-The seed for a new fermentation industry of food and related products. *Jpn Agric Res Q*, 1, 53–63.
- Upadhyay R, Sehwal S & Singh SP (2016). Antioxidant activity and polyphenol content of *Brassica oleracea* varieties. *In J Veg Sci*, 22(4), 353–363. <https://doi.org/10.1080/19315260.2015.1048403>
- Urbano M & Goni I (2002). Bioavailability of nutrients in rats fed on edible seaweeds, Nori (*Porphyra tenera*) and Wakame (*Undaria pinnatifida*), as a source of dietary fibre. *Food Chem*, 76, 281–286.
- Urueña C, Mancipe J, Hernandez J, *et al.* (2013). Gallotannin-rich caesalpinia spinosa fraction decreases the primary tumor and factors associated with poor prognosis in a murine breast cancer model. *BMC Complement Altern Med*, 3(1), 74. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-74>
- USDA, U. S. Department of Agriculture (2019). *PLANTS Database*. National Plant Data Team, Greensboro. <http://plants.usda.gov>
- USDA, U. S. Department of Agriculture (2022). *Germplasm Resources Information*

Network - (GRIN). National Germplasm Resources Laboratory. <http://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxon/taxonomygenus?id=1687>.

Usov A & Bilan M (2009). Fucoidans – sulfated polysaccharides of brown algae. *Russ Chem Rev*, 78, 785–799.

Vallejo M, Ledesma P, Anselmino L, *et al.* (2014). Efecto de las condiciones de crecimiento y composición del medio de cultivo sobre la producción de bacteriocina de *Enterococcus mundtii* Tw56. *Rev Colom Biotecnol*, XVI(2), 174–179.

van Dam R, Rimm E, Willett W, *et al.* (2002). Dietary patterns and risk for type 2 diabetes mellitus in US men. *Ann Int Med*, 136, 201–209.

Vaquero I, Marcobal A & Muñoz R (2004). Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Int J Food Microbiol*, 96, 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.004>

Vatansever S, Vegi A, Garden-Robinson J, *et al.* (2017). The effect of fermentation on the physicochemical characteristics of dry-salted vegetables. *J Food Res*, 6(5), 32–40. <https://doi.org/10.5539/jfr.v6n5p32>

Verraes C, Boxstael S, Meervenne E, *et al.* (2013). Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *Int J Environ Res Public Health*, 10(April), 2643–2669. <https://doi.org/10.3390/ijerph10072643>

Vicas S, Teusdea AC, Carbunar M, *et al.* (2013). Glucosinolates profile and antioxidant capacity of Romanian *Brassica* vegetables obtained by organic and conventional agricultural practices. *Plant Foods for Hum Nutr*, 68(3), 313–321. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11130-013-0367-8>

Vidhyasagar V, Saraniya A & Jeevaratnam K (2013). Identification of pectin degrading lactic acid bacteria from fermented food sources. *Int J Adv Life*, 6(1), 8–12.

Villegas R, Shu XO, Gao YT, *et al.* (2008). Vegetable but not fruit consumption reduces the risk of type 2 diabetes in chinese women. *J Nutr*, 138, 574–580.

Wang B, Song Q, Zhao F, *et al.* (2019). Purification and characterization of dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* PC as a potential exopolysaccharide suitable for food applications. *Process Biochem*, 87, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.08.020>

Warwick SI, Francis A & Al-Shehbaz IA (2006). *Brassicaceae*: species checklist and database on CD-Rom. *Plant Syst Evol*, 259, 249–258.

Waters C, Antiporta MH, Murray BE, *et al.* (2003). Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J Bacteriol*, 185, 3613–3623.

Watts BM, Ylimaki GL, Jeffery LE, *et al.* (1989). Basic sensory method for food evaluation. International Development Research Centre, Canada, 164 pp.

Wegkamp A, Teusink B, De Vos W, *et al.* (2010). Development of a minimal growth medium for *Lactobacillus plantarum*. *Lett Appl Microbiol*, 50, 57–64. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02752.x>

Wells ML, Potin P, Craigie JS, *et al.* (2017). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *J Appl Phycol*, 29(2), 949–982. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0974-5>

Wiczowski W, Szawara-Nowak D & Romaszko J (2016). The impact of red cabbage fermentation on bioavailability of anthocyanins and antioxidant capacity of human plasma. *Food Chem*, 190, 730–740. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.021>

- Wiedemann I, Bottiger T, Bonelli RR, *et al.* (2006). Lipid II-based antimicrobial activity of the lantibiotic plantaricin C. *Appl Environ Microbiol*, 72, 2809-2814.
- Williams R, Spencer J & Rice-Evans C (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules. *Free Rad Bio Med*, 36, 838–849.
- Wplyw K, Kapustnych W, Zdrowie NA, *et al.* (2012). The beneficial effects of *Brassica* vegetables on human health. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 63(4), 389–395.
- Wu C, Li D, Liu H, *et al.* (2004). Mass culture of *Undaria* gametophyte clones and their use in sporeling culture. *Hydrobiologia*, 512(1–3), 153–156.
- Yagnentkovsky N (2011). Aplicación de técnicas de biorremediación para el tratamiento de residuos industriales con alto contenido de metales pesados [Tesis]. Universidad Nacional de la Plata. 173 pp.
- Yang C, Crowley DE, Borneman J, *et al.* (2001). Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 98(7), 3889–3894.
- Yang L, Jiang JG, Li WF, *et al.* (2009). Optimum extraction process of polyphenols from the bark of *Phyllanthus emblica* L. based on the response surface methodology. *J. Sep. Science*, 32, 1437-1444. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800744>
- Ye J, Li Y, Teruya K, *et al.* (2005). Enzyme-digested fucoidan extracts derived from seaweed *Mozuku* of *Cladosiphon novae-caledoniae kylin* inhibit invasion and angiogenesis of tumor cells. *Cytotechnology*, 47, 117–126.
- Yu R, Lo P, Lai M, *et al.* (2001). Effect of nisin, EDTA and lactics starters on sauerkraut fermentation against *Escherichia coli* O157:H7. *Taiwan. J. Agric. Chem.*, 39, 298–302.
- Zacharof MP & Lovitt RW (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: a review article. *APCBEE Procedia*, 2, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.010>
- Zaharudin N, Salmeán AA & Dragsted LO (2018). Inhibitory effects of edible seaweeds, polyphenolics and alginates on the activities of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase. *Food Chem*, 245, 1196–1203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.027>
- Zhang H, Pang Z & Han C (2014). *Undaria pinnatifida* (Wakame): a seaweed with pharmacological properties. *Sci Int*, 2(2), 32–36. <https://doi.org/10.17311/sciintl.2014.32.36>
- Zhang Y (2007). Advances in the treatment of tuberculosis. *Clin Pharm Therap*, 82, 595–600.
- Zhang Y & Talalay P (1994). Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms. *Cancer Res*, 54, 1976s-1981s.
- Zhao Y, Zheng Y, Wang J, *et al.* (2018). Fucoidan extracted from *Undaria pinnatifida*: Source for nutraceuticals/functional foods. *Mar Drugs*, 16(9). <https://doi.org/10.3390/md16090321>
- Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, *et al.* (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zubaidah E, Susanti I, Yuwono SS, *et al.* (2020). Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures in lower salt concentration fermentation on the sauerkraut quality. *Food Res*, 4(4), 1038–1044. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.4\(4\).029](https://doi.org/10.26656/fr.2017.4(4).029)