

Universitat de Lleida

Bioconservación de pera mínimamente procesada mediante el uso de *Pseudomonas graminis* CPA-7 y *Lactobacillus rhamnosus* GG y su efecto en la calidad de la fruta y en la modificación del potencial patogénico de *Listeria monocytogenes*

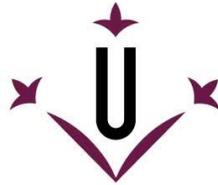
María Belén Iglesias Valenzuela

<http://hdl.handle.net/10803/406038>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida

TESIS DOCTORAL

Bioconservación de pera mínimamente procesada mediante el uso de *Pseudomonas graminis* CPA-7 y *Lactobacillus rhamnosus* GG y su efecto en la calidad de la fruta y en la modificación del potencial patogénico de *Listeria monocytogenes*

María Belén Iglesias Valenzuela

Memoria presentada para optar al grado de
Doctor por la Universitat de Lleida
Programa de **Doctorado en Ciencia y
Tecnología Agraria y Alimentaria**

Directoras
Dra. Maribel Abadías Seró
Dra. Inmaculada Viñas Almenar

Lleida, Junio de 2017

Los estudios presentados en esta tesis doctoral se realizaron en el laboratorio de Microbiología de Productos Vegetales del Programa de Poscosecha del Fruitcentre-IRTA de Lleida.

Para la realización de este trabajo se recibió aporte económico del Ministerio de Economía Industria y Competitividad mediante el proyecto nacional AGL-2012-38671, al Fondo Europeo del Desarrollo Regional (FEDER), al Programa CERCA (Generalitat de Catalunya) y a la Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya por la beca AGAUR 2015-FI-B100156, siendo la institución solicitante la Universitat de Lleida.

“No midas cada paso y dalo firme”

Vanesa Martín

“En la vida no existe nada que temer, solo cosas que comprender”

Marie Curie

ÍNDICE

ÍNDICE	1
RESUMEN/RESUM/ABSTRACT.....	13
Resumen.....	15
Resum.....	19
Abstract.....	23
INTRODUCCIÓN	27
1. Productos vegetales mínimamente procesados o de IV gama.....	29
1.1. Definición de producto mínimamente procesado y generalidades	31
1.2. Consumo y tendencias	32
1.3. Etapas de la producción de frutas mínimamente procesadas	33
1.3.1. Recepción, selección y almacenamiento.....	33
1.3.2. Lavado y desinfección del fruto entero.....	33
1.3.3. Pelado y cortado	34
1.3.4. Lavado, desinfección y escurrido del producto procesado	35
1.3.5. Envasado, almacenamiento y distribución	35
2. Aspectos de la calidad físico-química y sensorial de la fruta mínimamente procesada	35
2.1. Pardeamiento.....	36
2.2. Textura	37
2.3. Sabor y aroma.....	38
3. Microbiología de la fruta mínimamente procesada	39
3.1. Fuentes de contaminación.....	39
3.2. Microbiota propia.....	41
3.3. Microorganismos patógenos de transmisión alimentaria.....	42
4. Toxiinfecciones alimentarias y principales bacterias patógenas: epidemiología y patogénesis	43
4.1. Toxiinfecciones alimentarias.....	43
4.2. <i>Escherichia coli</i> O157:H7	48

Índice

4.3. <i>Salmonella</i> spp.	49
4.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	50
5. Estrategias de intervención para minimizar los riesgos microbiológicos en frutas y hortalizas mínimamente procesadas	53
5.1. Métodos químicos	54
5.2. Métodos físicos	55
5.2.1. Envasado en atmósfera modificada.....	55
5.2.2. Temperaturas de refrigeración	57
5.3. Métodos biológicos.....	58
5.3.1. Microbiota epífita	60
5.3.2. Bacterias ácido lácticas	60
5.3.3. Bacteriocinas	62
5.3.4. Bacteriófagos.....	62
5.3.5. Factores que pueden afectar a la efectividad	63
5.3.6. Posibles efectos adversos de los cultivos bioconservantes en la calidad sensorial y nutricional del producto.....	63
6. Control biológico mediante la aplicación de la bacteria <i>Pseudomonas graminis</i> CPA-7	64
6.1. Características generales	64
6.2. Estudios de biocontrol.....	65
6.3. Modo de acción.....	66
7. El potencial de los microorganismos probióticos como bioconservantes ..	67
7.1. Generalidades de los microorganismos probióticos	67
7.2. Criterios de selección de los probióticos	68
7.3. Mecanismos de acción de los probióticos en el huésped	70
7.4. Utilización de probióticos como agentes de biocontrol	74
7.5. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG.....	77
8. Interacción de <i>L. monocytogenes</i> y ambiente.....	77
OBJETIVOS.....	83

PLAN DE TRABAJO	87
MATERIALES Y MÉTODOS	91
MATERIALES	93
1. Fruta	95
2. Microorganismos y línea celular.....	95
2.1. Cepas de microorganismos.....	95
2.1.1. Microorganismos patógenos.....	95
2.1.2. Microorganismos antagonistas	95
2.1.2.1. Pseudomonas graminis CPA-7	95
2.1.2.2. Bacterias probióticas.....	95
2.2. Línea celular.....	96
3. Medios de cultivo	98
3.1. Medios de cultivo líquidos.....	98
3.2. Medios de cultivo sólidos	98
3.3. Diluyentes	98
3.4. Antibióticos.....	99
4. Material de laboratorio.....	99
5. Productos químicos	99
6. Enzimas.....	100
7. Material utilizado en el envasado de la fruta	101
METODOLOGÍA	103
1. Metodología general.....	107
1.1. Procesamiento de la fruta.....	107
1.2. Condiciones de crecimiento y producción de microorganismos.....	107
1.2.1. Condiciones de crecimiento	107
1.2.2. Producción de microorganismos y preparación del inóculo	108
1.2.2.1. Producción de microorganismos patógenos.....	108
1.2.2.2. Producción de microorganismos antagonistas	109

Índice

1.3. Inoculación de la fruta.....	109
1.4. Determinación de la población de los distintos microorganismos en pera mínimamente procesada	110
1.5. Determinación de la calidad de la fruta.....	111
1.5.1. Firmeza de la fruta entera	111
1.5.2. Concentración de gases en el espacio de cabeza de las barquetas.....	111
1.5.3. Contenido de sólidos solubles	111
1.5.4. Acidez titulable.....	111
1.5.5. Determinación del pH de la fruta.....	112
1.5.6. Color.....	112
1.5.7. Textura	112
1.5.8. Calidad visual.....	112
1.6. Evaluación de la supervivencia de los microorganismos en contacto con la solución antioxidante.	113
2. Metodología específica de cada experimento.....	114
2.1. Evaluación de la efectividad de la cepa <i>P. graminis</i> CPA-7 en el control de <i>S. enterica</i> y de <i>L. monocytogenes</i> en pera mínimamente procesada.....	114
2.1.1. Determinación de la capacidad antagonista de <i>P. graminis</i> CPA-7 en pera mínimamente procesada envasada en aire	114
2.1.2. Efecto de <i>P. graminis</i> CPA-7 sobre <i>S. enterica</i> y <i>L. monocytogenes</i> en condiciones simulando la aplicación comercial	115
2.1.3. Optimización de la solución antioxidante.....	115
2.1.3.1. Estudio <i>in vitro</i>	116
2.1.3.2. Estudio en fruta	117
2.1.4. Optimización de las condiciones de envasado	117
2.1.5. Efecto de las condiciones de envasado en la calidad de la pera mínimamente procesada.....	118
2.1.6. Análisis de los datos.....	119
2.2. Ampliación del espectro de acción de la cepa <i>P. graminis</i> CPA-7	119

2.2.1. Evaluación de la actividad de <i>P. graminis</i> CPA-7 antagonista frente a patógenos de transmisión alimentaria en distintas frutas.	119
2.2.2. Curvas de crecimiento de <i>P. graminis</i> CPA-7 en presencia de distintos ácidos orgánicos, a diferentes valores de pH y a diferentes temperaturas.....	120
2.2.3. Curvas de crecimiento de <i>P. graminis</i> CPA-7 en TSB preparado en una solución tamponada a 25 °C.....	121
2.2.4. Análisis estadístico de los datos	122
2.3. Uso de microorganismos probióticos como agentes de biocontrol en pera mínimamente procesada	122
2.3.1. Efecto antagonista de los probióticos <i>L. acidophilus</i> LA-5 y <i>L. rhamnosus</i> GG frente a <i>S. enterica</i> y <i>L. monocytogenes</i>	122
2.3.2. Combinación de <i>P. graminis</i> CPA-7 y <i>L. rhamnosus</i> GG para el control de microorganismos patógenos de transmisión alimentaria..	124
2.3.3. Análisis estadístico de los datos	124
2.4. Determinación del comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> CECT 4032 (serovar 4b) después de un período de adaptación en pera mínimamente procesada en presencia de <i>L. rhamnosus</i> GG.....	125
2.4.1. Inoculación de la fruta.....	126
2.4.2. Interacción de <i>L. monocytogenes</i> CECT 4032 (serovar 4b) y <i>L. rhamnosus</i> GG en pera mínimamente procesada.....	126
2.4.3. Tolerancia de <i>L. rhamnosus</i> GG a la simulación digestiva y su efecto en la supervivencia de <i>L. monocytogenes</i> CECT 4032 (serovar 4b) tras la simulación digestiva	127
2.4.3.1. Preparación soluciones madre y fluidos digestivos para la simulación	127
2.4.3.2. Simulación digestiva	129
2.4.4. Evaluación de la capacidad de adhesión e invasión de los microorganismos tras un período de adaptación en pera mínimamente procesada.....	131
2.4.4.1. Cultivo de las células Caco-2	131
2.4.4.2. Ensayo de adhesión e invasión	132

Índice

2.4.5. Análisis estadístico de los datos	133
2.5. Evaluación de la capacidad antagonista de <i>P. graminis</i> CPA-7 y <i>L. rhamnosus</i> GG frente a <i>S. enterica</i> y <i>L. monocytogenes</i> y en la calidad de la pera “Conference” mínimamente procesada tratada o no con CaCl ₂ en poscosecha	134
2.5.1. Tratamiento de CaCl ₂ poscosecha	134
2.5.2. Procesamiento de la fruta e inoculación.....	134
2.5.3. Determinación de la concentración de etanol y acetaldehído en pera mínimamente procesada	136
2.5.3.1. Preparación de las muestras	136
2.5.3.2. Análisis.....	136
2.5.4. Determinación de compuestos volátiles.....	136
2.5.4.1. Preparación de las muestras	136
2.5.4.2. Extracción de los compuestos volátiles	137
2.5.4.3. Análisis de los compuestos volátiles	137
2.5.5. Análisis estadístico de los datos	138
RESULTADOS.....	139
1. Evaluación de la efectividad de la cepa <i>Pseudomonas graminis</i> CPA-7 en el control de patógenos de transmisión alimentaria	141
1.1. Determinación de la capacidad antagonista de <i>P. graminis</i> CPA-7 en el control de <i>S. enterica</i> y <i>L. monocytogenes</i> en pera mínimamente procesada...	141
1.2. Efecto de <i>P. graminis</i> CPA-7 sobre <i>S. enterica</i> y <i>L. monocytogenes</i> simulando la aplicación comercial	144
1.3. Optimización de la solución antioxidante	148
1.4. Optimización de las condiciones de envasado	151
1.5. Efectos de las condiciones de envasado en la calidad de la pera mínimamente procesada.....	155
1.5.1. Color.....	155
1.5.2. Textura	155
1.5.3. Calidad visual	156

2. Ampliación del espectro de acción de <i>P. graminis</i> CPA-7.....	157
2.1. Evaluación de la capacidad antagonista de las distintas frutas.....	157
2.2. Curvas de crecimiento de <i>P. graminis</i> CPA-7 en presencia de distintos ácidos orgánicos, a diferentes valores de pH y a diferentes temperaturas .	162
2.3. Curvas de crecimiento de <i>P. graminis</i> CPA-7 en TSB preparado en una solución tamponada a 25 °C.....	167
3. Estudio del uso de microorganismos probióticos como agentes de biocontrol en pera mínimamente procesada	168
3.1. Efecto antagonista de <i>L. acidophilus</i> LA-5 en condiciones que simulan una aplicación comercial sobre <i>S. enterica</i> y <i>L. monocytogenes</i> en pera mínimamente procesada y almacenada a 5, 10 y 20 °C	169
3.2. Concentración de gases del espacio de cabeza de los envases de pera en el estudio con <i>L. acidophilus</i> LA-5	171
3.3. Efectividad de <i>L. rhamnosus</i> GG en condiciones semicomerciales frente a <i>S. enterica</i> y <i>L. monocytogenes</i> en pera mínimamente procesada a 5 °C	172
3.4. Efectividad de <i>L. rhamnosus</i> GG en condiciones semicomerciales frente a <i>S. enterica</i> y <i>L. monocytogenes</i> en pera mínimamente procesada a 10 °C...	174
3.5. Efectividad de <i>L. rhamnosus</i> GG en condiciones semicomerciales frente a <i>S. enterica</i> y <i>L. monocytogenes</i> en pera mínimamente procesada a 20 °C ..	175
3.6. Población de <i>L. rhamnosus</i> GG en pera mínimamente procesada ...	176
3.7. Concentración de gases del espacio de cabeza en los envases de pera.....	177
3.8. Evaluación del efecto de la combinación de dos agentes de biocontrol sobre patógenos de transmisión alimentaria en pera mínimamente procesada.....	178
4. Determinación del comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> CECT 4032 después de un período de adaptación en pera mínimamente procesada en presencia de <i>L. rhamnosus</i> GG.....	179
4.1. Interacción de <i>L. monocytogenes</i> y <i>L. rhamnosus</i> GG en pera mínimamente procesada a 10 °C.....	180
4.2. Tolerancia de <i>L. rhamnosus</i> GG a la simulación digestiva y su efecto en la supervivencia <i>L. monocytogenes</i> CECT 4032 tras la simulación digestiva	181

Índice

4.3 Evaluación de la capacidad de adhesión de <i>L. rhamnosus</i> GG tras un período de adaptación en pera mínimamente procesada a 10 °C.....	183
4.4. Evaluación de la capacidad de adhesión e invasión de <i>L. monocytogenes</i> CECT 4032 tras un período de adaptación en pera mínimamente procesada a 10 °C	184
5. Evaluación de la capacidad antagonista de los agentes de biocontrol y su efecto en la calidad de la pera mínimamente procesada tratada o no con CaCl ₂ en poscosecha.....	186
5.1. Efecto de <i>P. graminis</i> CPA-7	186
5.1.1. Población de los microorganismos en pera mínimamente procesada conservada a 5 °C.....	186
5.1.2. Análisis físico-químicos.....	189
5.1.2.1. Evolución de la concentración de oxígeno y dióxido de carbono del espacio de cabeza de los envases.....	189
5.1.2.2. Contenido en sólidos solubles y acidez titulable.....	190
5.1.2.3. Concentración de etanol y acetaldehído	192
5.1.2.4. Efecto de <i>P. graminis</i> CPA-7 en las emisiones de compuestos volátiles en pera mínimamente procesada.....	193
5.2. Efecto de <i>L. rhamnosus</i> GG	203
5.2.1. Población de los microorganismos en pera mínimamente procesada conservada a 5 °C.....	203
5.2.2. Análisis físico-químicos.....	205
5.2.2.1. Evolución de la concentración de oxígeno y dióxido de carbono del espacio de cabeza de los envases.....	205
5.2.2.2. Contenido de sólidos solubles y acidez titulable.....	206
5.2.2.3. Concentración de etanol y acetaldehído	207
5.2.2.4. Efecto de <i>L. rhamnosus</i> GG en las emisiones de compuestos volátiles en pera mínimamente procesada.....	209
DISCUSIÓN.....	219

1. Evaluación la capacidad antagonista de la cepa <i>Pseudomonas graminis</i> CPA-7 en el control de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> en pera mínimamente procesada	221
2. Ampliación del espectro de acción de <i>P. graminis</i> CPA-7	224
3. Estudio del uso de microorganismos probióticos como cultivos bioconservantes sobre <i>S. enterica</i> y <i>L. monocytogenes</i> en pera mínimamente procesada	226
4. Determinación del comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> CECT 4032 después de un período de adaptación en pera mínimamente procesada en presencia de <i>L. rhamnosus</i> GG.....	229
5. Evaluación de la capacidad antagonista de <i>P. graminis</i> CPA-7 y su efecto en la calidad de la pera mínimamente procesada tratada o no con CaCl ₂ en poscosecha	234
6. Evaluación de la capacidad antagonista de <i>L. rhamnosus</i> GG y su efecto en la calidad de la pera mínimamente procesada tratada o no con CaCl ₂ en poscosecha	238
CONCLUSIONES.....	243
PERSPECTIVAS DE FUTURO.....	249
REFERENCIAS.....	253

RESUMEN/RESUM/ABSTRACT

RESUMEN

El aumento en la demanda de productos listos para el consumo junto con el creciente interés por tener hábitos de vida saludables ha traído consigo el incremento del consumo de frutas y hortalizas mínimamente procesadas. Sin embargo, el hecho de que a estos alimentos no se les apliquen tratamientos térmicos hace que aumente el riesgo de ser portadores de patógenos de transmisión alimentaria. Además, los consumidores son cada vez más reticentes al uso de aditivos de carácter químico en los alimentos. Por ello, cada vez son más numerosos los estudios que plantean el uso de técnicas más saludables y respetuosas con el medioambiente para controlar el crecimiento de microorganismos patógenos de transmisión alimentaria, como son los cultivos bioconservantes o antagonistas. Así, en la presente tesis se estudió el efecto antagonista de un microorganismo epífita (*Pseudomonas graminis* CPA-7) y de dos cepas de microorganismos probióticos (*Lactobacillus acidophilus* LA-5 y *Lactobacillus rhamnosus* GG) frente a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* y *Listeria monocytogenes* en pera mínimamente procesada.

En primer lugar se evaluó la capacidad antagonista de *P. graminis* CPA-7 frente a *S. enterica* y *L. monocytogenes* en pera mínimamente procesada, inoculada artificialmente con 10^5 ufc/ml de ambos patógenos y 10^7 ufc/ml del antagonista. En este estudio se observó que el antagonista fue capaz de controlar el crecimiento de ambos patógenos en la pera envasada en aire y a 5, 10 y 20 °C. Sin embargo, cuando se probó el efecto de *P. graminis* CPA-7 en condiciones que simulan su aplicación comercial (en presencia de una solución antioxidante y bajo atmósfera modificada pasiva), se observó que la capacidad antagonista se redujo, llegándose a no observarse ningún efecto a 10 °C. De forma que, en segundo lugar se procedió a optimizar el film para el sellado de las barquetas de fruta y la solución antioxidante con el objetivo de mantener la efectividad de *P. graminis* CPA-7 frente a patógenos de transmisión alimentaria sin afectar a la calidad de la fruta. Tras este estudio, se seleccionó la solución antioxidante compuesta por ácido ascórbico 2 % + citrato de sodio 2 % + CaCl_2 1 % en base al crecimiento y al efecto de *P. graminis* CPA-7. En cuanto al film seleccionado, tuvo que ser lo suficientemente permeable para permitir que *P. graminis* CPA-7 desarrollara su capacidad antagonista y, al mismo tiempo, que se mantuviera la calidad de la fruta.

Una vez observada la capacidad antagonista de *P. graminis* CPA-7 frente a *S. enterica* y *L. monocytogenes* en pera mínimamente procesada, se evaluó este

Resumen

efecto en otras frutas mínimamente procesadas (kiwi, mango, piña, fresa, naranja, manzana, mandarina, nectarina, sandía y melón) tras 5 días de almacenamiento a 10 °C. Entre las frutas evaluadas, se observó reducción en la población de los microorganismos patógenos en las dos variedades de manzana (“Fuji” y “Pink Lady”), en mandarina, en sandía, y en el caso de la variedad de melón “Galia”, solamente se observó reducción en la población de *L. monocytogenes* y no en la de *S. enterica*. Tras observar estos resultados, se planteó evaluar el crecimiento de la cepa *P. graminis* CPA-7 en medio TSB (Caldo de Triptona Soya) ajustado a distintos valores de pH mediante la adición de ácido málico y ácido cítrico a 10, 15 y 25 °C y en TSB preparado en una solución tamponada a 25°. Estos resultados revelaron que *P. graminis* CPA-7 crecía de forma más rápida cuando se utilizó ácido málico para modificar el pH y que por debajo de valores 5,0 no fue capaz de crecer.

El conocimiento de las propiedades beneficiosas que pueden proporcionar los microorganismos probióticos, entre otras características, está haciendo posible el incremento del uso de estas bacterias como antagonistas frente a patógenos de transmisión alimentaria. En un segundo estudio, se evaluó la capacidad antagonista de *L. rhamnosus* GG y *L. acidophilus* LA-5 frente a *S. enterica* y *L. monocytogenes* en pera mínimamente procesada, aplicando una solución antioxidante y conservada en atmósfera modificada pasiva a 5, 10 y 20 °C. Los resultados mostraron que *L. acidophilus* LA-5 no tuvo efecto antagonista sobre los dos patógenos evaluados. Sin embargo, en presencia de *L. rhamnosus* GG la población de *S. enterica* se vio reducida 2 unidades logarítmicas en la pera conservada a 10 y 20 °C. En el caso de *L. monocytogenes*, la población en presencia del probiótico disminuyó aproximadamente 3 unidades logarítmicas tanto a 5 como a 10 y 20 °C. Además en este estudio, se observó que la población de ambos microorganismos probióticos en la pera mínimamente procesada se mantuvo alrededor de 10^7 - 10^8 ufc/g durante todo el tiempo de almacenamiento, rango que se encuentra entre los límites (10^6 - 10^9 ufc/g) que se han establecido para que un alimento sea vehículo de probióticos y estos puedan ejercer efectos positivos sobre la salud del consumidor. La combinación de *P. graminis* CPA-7 y *L. rhamnosus* GG no mejoró la efectividad frente los patógenos estudiados.

Muchas de las especies del género *Lactobacillus* son probióticos y, por tanto, forman parte de la microbiota intestinal del ser humano. Estos microorganismos pueden ser capaces de modificar la capacidad de virulencia de los patógenos de transmisión alimentaria impidiendo que estos penetren en las células epiteliales del intestino causando infección, de forma que ejercen también un efecto

antagonista sobre estos microorganismos a nivel intestinal. Basándonos en este hecho, se determinó el efecto de *L. rhamnosus* GG en la capacidad de la cepa *L. monocytogenes* CECT 4032 (serovar 4b) para sobrevivir al tracto gastrointestinal y su adhesión e invasión en la línea celular Caco-2 (simulando células epiteliales del intestino), habiendo estado sometida, previamente, a un período de habituación de 7 días en pera mínimamente procesada conservada a 10 °C. En este estudio, por un lado, se confirmó el efecto antagonista del probiótico sobre *L. monocytogenes* y, por otro lado, se observó que *L. rhamnosus* GG provocó una reducción en la supervivencia del patógeno al tracto gastrointestinal, al igual que una reducción en la capacidad de adhesión e invasión en las células Caco-2.

Para finalizar, se evaluó la capacidad antagonista de *P. graminis* CPA-7 y de *L. rhamnosus* GG frente a *S. enterica* y *L. monocytogenes* en pera mínimamente procesada y su efecto en la calidad de la fruta, principalmente el perfil de compuestos volátiles, simulando condiciones comerciales y conservando la fruta procesada 5 °C en peras que habían sido tratadas o no con CaCl₂ tras la cosecha. Las peras se conservaron en atmósfera controlada (2 % CO₂, 1 % O₂, 0 °C). Por un lado se observó que, *P. graminis* CPA-7 redujo la población de *L. monocytogenes* al final del almacenamiento en 1 unidad logarítmica, aproximadamente, aunque no se vio efecto sobre *S. enterica*. Al final del almacenamiento a 5 °C, *P. graminis* CPA-7 provocó un aumento de los valores del contenido en sólidos solubles independientemente de si las peras habían sido tratadas o no con CaCl₂ en la poscosecha y una disminución en la acidez titulable en las peras sin tratar con CaCl₂ en la poscosecha. Mediante cromatografía de gases, se determinaron un total de 43 compuestos volátiles, de los cuales, 13 de ellos se relacionaron con la presencia de *P. graminis* CPA-7: acetato de metilo, acetato de 3-metilbutilo, acetato de pentilo, acetato de (Z)-2-hexenilo, butanoato de 2-metilpropilo, hexanoato de butilo, 3-metil-2-butanol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol, 1-hexanol, (E)-2-hexen-1-ol, hexanal y acetona. Por otro lado, se observó que la población de *L. monocytogenes* se redujo 1,8 unidades logarítmicas en presencia del probiótico tras 9 días de almacenamiento de la pera mínimamente procesada, aunque no se observó efecto en la población de *S. enterica*. Con respecto a la calidad de la fruta, la presencia de *L. rhamnosus* GG no afectó ni a la acidez titulable ni al contenido de sólidos solubles ni a las concentraciones de etanol y acetaldehído. De las muestras de pera analizadas, se determinaron un total de 48 compuestos volátiles. Se detectaron 12 compuestos volátiles (acetato de metilo, acetato de propilo, acetato de hexil, acetato de (Z)-2-hexenil, etil-2-metilbutanoato, 2-metilbutil-2-metilbutanoato, pentil 3-metilbutanoato, etanol, 3-metil-2-butanoato, 1-hexanol, benzil alcohol y benzaldehído) en la pera tratada con el probiótico que no fueron

Resumen

identificados en el control, y que según sus descriptores de olor su presencia podría tener un efecto positivo en el sabor de las peras que contenían *L. rhamnosus* GG.

De este estudio se concluye que el uso de los microorganismos antagonistas *P. graminis* CPA-7 y *L. rhamnosus* GG puede contribuir a mejorar la seguridad microbiológica de la pera mínimamente procesada, si bien, no es un método sustitutivo a la desinfección, pues el efecto no es inmediato. Ninguno de los dos microorganismos afectó significativamente a la calidad de la pera mínimamente procesada, aunque sí se detectaron compuestos volátiles que podrían proporcionar buen sabor a la pera. Además, el hecho de que se pueda añadir *L. rhamnosus* GG sería un valor añadido, por una parte porque ha reducido la virulencia de la cepa *L. monocytogenes* CECT 4032 y, por otra, porque la pera podría ser una fuente de probióticos para personas no consumidoras de derivados lácteos.

RESUM

L'augment en la demanda de productes llestos per al consum, juntament amb el creixent interès per tenir hàbits de vida saludables, ha portat a l'increment del consum de fruites i hortalisses mínimament processades. No obstant, el fet que aquest tipus d'aliments no rebin cap tractament tèrmic, fa que augmenti el risc de ser vehicles de patògens de transmissió alimentaria. A més a més, els consumidors són cada cop més reticents a l'ús d'additius de caràcter químic en els aliments. Per tot això, son nombrosos els estudis que plantegen l'ús de tècniques més saludables i respectuoses amb el medi ambient per a controlar els microorganismes patògens, com els cultius bioconservants o antagonistes. En aquesta tesi, es va estudiar l'efecte antagonista d'un microorganisme epífit (*Pseudomonas graminis* CPA-7) i dues soques de microorganismes probiòtics (*Lactobacillus acidophilus* LA-5 i *Lactobacillus rhamnosus* GG) enfront a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* i *Listeria monocytogenes* en pera mínimament processada.

En primer lloc, es va avaluar la capacitat antagonista de *P. graminis* CPA-7 enfront a *S. enterica* i *L. monocytogenes* en pera mínimament processada inoculada artificialment a 10^5 ufc/ml d'ambdós patògens i 10^7 ufc/ml de l'antagonista. En aquest estudi es va observar que l'antagonista va ser capaç de reduir el creixement dels dos patògens en pera envasada en aire i conservada a 5, 10 i 20 °C. No obstant, quan la seva efectivitat es va assajar en condicions que simulen la seva aplicació comercial (amb solució antioxidant i envasat en atmosfera modificada passiva), la capacitat antagonista es va reduir, inclús a 10 °C no es va observar cap efecte. Així doncs, en segon lloc, es va optimitzar el film per al segellat de les barquetes de fruita i la solució antioxidant, amb la finalitat de mantenir l'efectivitat de *P. graminis* CPA-7 enfront ambdós patògens. En base als resultats de creixement i efectivitat de l'antagonista, es va seleccionar la solució antioxidant composta per àcid ascòrbic 2 % + citrat de sodi 2 % + CaCl₂ 1 %. El film va tenir que ser suficientment permeable per permetre que *P. graminis* CPA-7 pogués tenir efecte antagonista i al mateix temps, mantenir la qualitat de la fruita.

Un cop observada la capacitat antagonista de *P. graminis* CPA-7 enfront a *S. enterica* i *L. monocytogenes* en pera mínimament processada, es va avaluar la seva efectivitat en altres fruites mínimament processades (kiwi, mango, pinya, maduixa, taronja, poma, mandarina, nectarina, síndria i meló). Entre les fruites avaluades, es va observar reducció de la població de microorganismes patògens després de 5 dies de conservació a 10 °C en les dos varietats de poma avaluades ('Fuji' i 'Pink Lady'), en mandarina, en síndria i en el cas de la varietat de meló

Resum

'Galia', solament es va observar reducció en la població de *L. monocytogenes* i no en *S. enterica*. En vista dels resultats obtinguts, es va plantejar avaluar el creixement de la soca *P. graminis* CPA-7 en medi TSB (Brou de triptona i soja) amb el pH mitjançant l'addició d'àcid màlic i àcid cítric a 10, 15 i 25 °C i en TSB preparat amb una solució tamponada a 25 °C. Els resultats obtinguts van demostrar que *P. graminis* CPA-7 va créixer de forma més ràpida quan es va utilitzar àcid màlic per ajustar el pH i no va ser capaç de créixer a pH per sota de 5,0.

El coneixement de les propietats beneficioses que poden aportar els microorganismes probiòtics, entre altres característiques, està fent possible l'increment del seu ús com a antagonistes enfront patògens de transmissió alimentaria. Així, es va avaluar la capacitat antagonista de *L. rhamnosus* GG i *L. acidophilus* LA-5 enfront *S. enterica* i *L. monocytogenes* en pera mínimament processada, aplicant una solució antioxidant i conservant la pera en atmosfera modificada passiva a 5, 10 i 20 °C. Els resultats van demostrar que *L. acidophilus* LA-5 no va tenir cap efecte antagonista enfront els dos patògens avaluats. No obstant, en presència de *L. rhamnosus* GG, la població de *S. enterica* es va veure reduïda 2 unitats logarítmiques a 10 i 20 °C i la de *L. monocytogenes* es va reduir aproximadament 3 logaritmes tant a 5 com a 10 i 20 °C. A més a més, es va observar que la població dels dos microorganismes probiòtics es va mantenir en pera tallada al voltant de 10^7 - 10^8 ufc/g durant tot el període de conservació. Aquest rang es troba entre els límits que s'han establert per a que un aliment pugui ser vehicle de probiòtics i aquests puguin exercir efectes positius sobre la salut del consumidor. La combinació de *P. graminis* CPA-7 i *L. rhamnosus* GG no va millorar l'efectivitat enfront els patògens.

Moltes de les espècies del gènere *Lactobacillus* son probiòtics, i per tant, formen part de la microbiota intestinal de l'ésser humà. Aquests microorganismes poden modificar la capacitat de virulència dels microorganismes patògens de transmissió alimentaria, impeding que aquests penetrin en les cèl·lules epitelials de l'intestí i causin infecció, de forma que també exerceixen un efecte antagonista a nivell intestinal. Basant-nos en aquest fet, es va determinar l'efecte de *L. rhamnosus* GG en la capacitat de la soca *L. monocytogenes* CECT 4032 (serovar 4b) per a sobreviure al tracte intestinal i la seva capacitat d'adhesió i invasió de la línia cel·lular Caco-2 (que simula les cèl·lules epitelials de l'intestí), quan aquestes havien estat sotmeses a un procés d'habitució de 7 dies en pera mínimament processada conservada a 10 °C. En aquest estudi, d'una banda, es va confirmar l'efecte antagonista del probiòtic sobre *L. monocytogenes* CECT 4032 i d'altra

banda, es va veure que *L. rhamnosus* GG va causar una reducció en la supervivència del patogen al tracte intestinal i una reducció en la capacitat d'adhesió i invasió de les cèl·lules Caco-2.

Per finalitzar, es va avaluar la capacitat antagonista de *P. graminis* CPA-7 i *L. rhamnosus* GG enfront a *S. enterica* i *L. monocytogenes* en pera mínimament processada envasada en condicions que simulen la seva aplicació comercial i es va avaluar el seu efecte en la qualitat de la fruita, principalment el perfil de compostos volàtils. Les peres utilitzades, havien estat o no tractades amb CaCl₂ just després de la collita, es van conservar en atmosfera controlada (2 % CO₂, 1 % O₂, 0 °C), es van processar i conservar a 5 °C durant 9 dies. Per una banda, es va observar que *P. graminis* CPA-7 va reduir la població de *L. monocytogenes* al final de la conservació aproximadament 1 unitat logarítmica, i no es va veure efecte sobre *S. enterica*. Al final de la conservació a 5 °C, *P. graminis* CPA-7 va provocar un augment del contingut de sòlids solubles independentment de si les peres havien estat o no tractades amb CaCl₂ en postcollita i una disminució de l'acidesa titulable en els peres sense tractar amb CaCl₂. Mitjançant cromatografia de gasos, es van determinar un total de 43 compostos volàtils, dels quals 14 d'ells es van poder relacionar amb la presència de *P. graminis* CPA-7 mitjançant un anàlisi de components principals: acetat de metil, acetat de 3-metilbutil, acetat de pentil, acetat de (Z)-2-hexenil, butanoat de 2-metilpropil, hexanoato de butil, 3-metil-2-butanol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol, 1-hexanol, (E)-2-hexen-1-ol, hexanal i acetona. D'altra banda, es va observar que la població de *L. monocytogenes* en pera mínimament processada es va reduir 1,8 unitat logarítmica en presència de *L. rhamnosus* GG després de 9 dies de conservació i tampoc es va veure efecte sobre *S. enterica*. Pel que fa a la qualitat de la fruita tractada amb el probiòtic, la seva presència no va afectar ni a l'acidesa titulable, ni al contingut de sòlids solubles ni a la concentració d'etanol i acetaldehid. De les mostres de pera analitzades, es van determinar un total de 48 compostos volàtils. Es van detectar 12 compostos (acetat de metil, acetat de propil, acetat d'hexil, acetat de (Z)-2-hexenil, etil-2-metilbutanoat, 2-metilbutil 2-metilbutanoat, pentil 3-metilbutanoat, etanol, 3-metil-2-butanoat, 1-hexanol, benzil alcohol y benzaldehid) en la pera tractada amb el probiòtic que no van ser identificats en el control, i que segons els seus descriptors d'olor, la seva presència podria tenir un efecte positiu en el sabor de les peres que contenen *L. rhamnosus* GG.

D'aquest estudi es conclou que l'ús dels microorganismes antagonistes *P. graminis* CPA-7 i *L. rhamnosus* GG pot contribuir a millorar la seguretat microbiològica de pera mínimament processada, tot i que no és un mètode substitutiu a la

Resum

desinfecció, ja que el seu efecte no és immediat. Els microorganismes utilitzats no van afectar significativament a la qualitat de la pera mínimament processada, encara que sí es van detectar alguns compostos volàtils que podrien proporcionar un bon sabor a pera. A més a més, el fet que es pugui afegir *L. rhamnosus* GG seria un valor afegit, per una banda perquè també ha reduït la virulència de la soca de *L. monocytogenes* estudiada i per altra perquè podria ser una font de probiòtics per a persones no consumidores de productes lactis.

ABSTRACT

The increase in demand for ready-to-eat products coupled with the growing interest in healthy living habits has led to an increase of consumption of minimally processed fruits and vegetables. However, the fact that these foods are not subjected to heat treatments increases the risk of being vehicles of foodborne pathogens. Consumers are increasingly hesitant to the use chemical additives in foods, so the use of biopreservative cultures to control the growth of pathogenic foodborne microorganisms is currently being investigated. In the present thesis, the antagonistic effect of an epiphytic microorganism (*Pseudomonas graminis* CPA-7) and two strains of probiotic microorganisms (*Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG) against *Salmonella enterica* subsp *enterica* and *Listeria monocytogenes* in minimally processed pear has been investigated.

The first study was to assess the antagonistic activity of *P. graminis* CPA-7 against *S. enterica* and *L. monocytogenes* on fresh-cut pear artificially inoculated with the pathogenic strains at 10^5 cfu/ml and the antagonist at 10^7 cfu/ml. Results showed that *P. graminis* CPA-7 was able to control both pathogens on fresh-cut pear stored in air conditions at 5, 10 and 20 °C. However, when *P. graminis* CPA-7 antagonistic effect was tested simulating commercial application (with antioxidant solution and passive modified atmosphere packaging), its effect decreased and no reductions of foodborne pathogens were reported at 10 °C. Therefore, the second aim of this study was to optimise the antioxidant solution and the packaging film in order to retain its antagonistic capacity. According to the growth and efficacy of *P. graminis* CPA-7, the selected antioxidant solution was 2 % ascorbic acid + 2 % sodium citrate + 1 % CaCl₂. Film permeability, which affected gas composition inside fruit packages, influenced *P. graminis* CPA-7 efficacy. If the biopreservative strain is used, film has to be sufficiently gas permeable to allow *P. graminis* CPA-7 function and at the same time to maintain product quality.

After testing the antagonistic capacity of *P. graminis* CPA-7 against *S. enterica* and *L. monocytogenes*, its antagonistic effect was assessed on other minimally processed fruits (kiwi, mango, pineapple, apple, mandarin, orange, nectarine, watermelon and melon). Pathogens population after 5 days of storage at 10 °C was reduced on minimally processed apple ('Fuji' and 'Pink Lady'), mandarin, and watermelon. On 'Galia' melon, the reduction was only observed on *L. monocytogenes* population. Next step was evaluate *P. graminis* CPA-7 growth on TSB medium (Tryptone Soja Broth) amended to different pH values, using malic

Abstract

and citric acid and on TSB prepared in a buffer solution. Results shown that *P. graminis* CPA-7 grew faster when the pH of the medium was adjusted with malic acid than with citric acid and it was not able to grow below pH values of 5,0.

It is known that probiotic microorganisms provide beneficial properties to health. The use of probiotics as biopreservation agents of foodborne pathogens in food is becoming increasingly. Therefore, the second study carried out in the present thesis was to investigate the effectiveness of *L. rhamnosus* GG and *L. acidophilus* LA-5 against *S. enterica* and *L. monocytogenes* in minimally-processed pears during storage at 5, 10 and 20 °C in conditions simulating a commercial application. Pear wedges were artificially inoculated with a suspension containing *S. enterica*, *L. monocytogenes* and/or the probiotic strains *L. rhamnosus* GG or *L. acidophilus* LA-5, packaged and stored at 5, 10 and 20 °C. Microorganisms were periodically enumerated. *L. acidophilus* LA-5 did not shown any effect against both pathogens. However, *S. enterica* was affected by co-inoculation with *L. rhamnosus* GG at 10 and 20 °C, which reduced the population approximately 2-log units. Moreover, *L. monocytogenes* population was reduced approximately 3-log units at each temperature in presence of *L. rhamnosus* GG. Probiotic populations were maintained throughout the experiment around 10^7 - 10^8 cfu/g, which is in the range known to develop its probiotic role (10^6 - 10^9 cfu/g). Our results demonstrated that *L. rhamnosus* GG was able to control *S. enterica* and *L. monocytogenes* growth on fresh-cut pear. The combination of both biopreservative cultures (*P. graminis* CPA-7 and *L. rhamnosus* GG) did not improve their effect.

Most species of the genus *Lactobacillus* are probiotics and common inhabitants of the human gastrointestinal tract. Probiotics are able to modify the pathogenic ability of foodborne pathogens blocking the adhesion and invasion into intestinal epithelial cells. Therefore, they can be also antagonistic against foodborne pathogens in the intestine. In this study, we evaluated the effect of *L. rhamnosus* GG on the ability of a strain of *L. monocytogenes* CECT 4032 (serovar 4b) to survive the passage through the gastrointestinal tract, and its adhesion and invasion into Caco-2 cells when they have been previously habituated on fresh-cut pear for 7 days at 10 °C. Results confirmed that *L. rhamnosus* GG controlled the growth of *L. monocytogenes* CECT 4032. Moreover, at the end of the storage, *L. rhamnosus* GG caused a reduction in the survival of *L. monocytogenes* CECT 4032 to the gastrointestinal tract, and adhesion and invasion into Caco-2 cells.

Finally, the antagonistic effect of *P. graminis* CPA-7 and *L. rhamnosus* GG on *S. enterica* and *L. monocytogenes* was evaluated simulating commercial conditions on minimally processed pears stored at 5 °C. Pears used for this study, were treated or not with CaCl₂ after harvest and stored under controlled atmosphere conditions (2 % CO₂, 1 % O₂, 0 °C). Moreover, their effect on fruit quality, in particular, on the volatile profile, was evaluated during the storage time at 5 °C. On the one hand, *P. graminis* CPA-7 was able to reduce *L. monocytogenes* population about 1-log unit at the end of the storage regardless of the postharvest CaCl₂ treatment. No effect was observed on *S. enterica* population. The strain *P. graminis* CPA-7 caused an increase of soluble solids contain as well as of titratable acidity regardless of pears were treated or not with CaCl₂ after harvest. A total of 43 volatile compounds were detected and identified using gas chromatography, 13 of them were related with *P. graminis* CPA-7 treatment: methyl acetate, 3-methylbutyl acetate, pentyl acetate, (Z)-2-hexenyl acetate, 2-methylpropyl butanoate, butyl hexanoate, 3-methyl-2-butanol, 1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 1-hexanol, (E)-2-hexen-1-ol, hexanal and acetone. On the other hand, *L. monocytogenes* population was reduced by approximately 1.8-log units when inoculated with *L. rhamnosus* GG. Similarly to *P. graminis* CPA-7, no effect was observed against *S. enterica*. Fruit quality (solids soluble content, titratable acidity and concentration of ethanol and acetaldehyde) did not change when the probiotic was present. A total of 48 of volatile compounds were identified using gas chromatography. Twelve of them (methyl acetate, propyl acetate, hexyl acetate, (E)-2-hexenyl acetate, ethyl 2-methylbutanoate, 2-methylbutyl 2-methylbutanoate, pentyl 3-methylbutanoate, ethanol, 3-methyl-2-butanol, 1-hexanol, benzyl alcohol and benzaldehyde) allowed to discriminate *L. rhamnosus* GG treated and untreated pears. Considering their odour descriptors, their increases could be positive in the flavour perception of *L. rhamnosus* GG-treated pears

In conclusion, the use of *P. graminis* CPA-7 and *L. rhamnosus* GG as antagonistic microorganisms could improve the microbial safety of minimally processed pear. However, disinfection is essential, as these antagonistic microorganisms were not effective immediately after their application. Neither *P. graminis* CPA-7 nor *L. rhamnosus* GG had a significant effect on solids soluble contain and titratable acidity, but volatile compounds that could provide good flavor to fresh-cut pear were detected in their presence. The enrichment of minimally processed pear with *L. rhamnosus* GG also reduced the virulence of the *L. monocytogenes* strain studied and could be a source of probiotic to people who do not consume dairy products.

INTRODUCCIÓN

1. Productos vegetales mínimamente procesados o de IV gama

Las frutas y hortalizas son componentes esenciales en una dieta equilibrada. Estos alimentos son beneficiosos para la salud, ya que además de aportarnos una gran cantidad de nutrientes, hay evidencias de que su consumo puede llegar a reducir el riesgo de mortalidad por enfermedades cardiovasculares y por cáncer (Wang *et al.*, 2014). Según un informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), se recomienda una ingesta de 400 g diarios de frutas y hortalizas (5 piezas por día). Según los últimos datos del consumo alimentario en España, el consumo de fruta en el año 2015 fue de 99,18 kg/persona/año, mientras que el consumo de frutas y hortalizas procesadas (conservadas y congeladas) fue de 13,29 kg/persona/año (MAPAMA, 2016).

La pera es una fruta con un pH de entre 4,5-5,0, rica en vitaminas y con un aporte calórico bajo (Tabla 1), aporta azúcares, principalmente fructosa, glucosa y sacarosa, ácidos orgánicos, como el málico, el cítrico y el quínico, minerales, entre los que destacan el yodo y el potasio, y fibra, fundamentalmente insoluble (Barroca *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007). También, posee cantidades apreciables de vitamina C. Así, en pera de la variedad "Rocha" se han encontrado 5,1-8,2 mg/100 g, 3,3-4,6 mg/100 g en "Flor de Invierno", 3 mg/100 g en "D'Anjou", 5,3 mg/100 g en "Forelle" y 7,2 mg/100 g en "Conference" entre otras (Galvis-Sánchez *et al.*, 2003; Galvis-Sánchez *et al.*, 2006; Oms-Oliu *et al.*, 2008a; Veltman *et al.*, 2000). Además, contiene compuestos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos) y flavonoides (flavonoles y flavanoles) (Amiot *et al.*, 1995; King y Young, 1999; Oms-Oliu *et al.*, 2008a; Salta *et al.*, 2010; Tanrıöven y Ekşi, 2005), los cuales han sido relacionados con efectos beneficiosos para la salud debido a sus propiedades antioxidantes (Wootton-Beard y Ryan, 2011). El contenido de estos compuestos bioactivos va a depender de muchos factores entre ellos la variedad, el grado de madurez y las prácticas pre y poscosecha (Galvis-Sánchez *et al.*, 2003).

Lleida es la principal provincia española productora de pera con un 50,4 % de la producción total en España (MAPAMA, 2015). En el año 2014, según datos del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació, en Lleida se produjeron 198.277 toneladas de pera, de las cuales 87.107 fueron de la variedad "Conference" (DARPA, 2015).

Introducción

Tabla 1. Composición nutricional de la pera. (Información extraída de BEDCA, 2007).

Componente	Valor	Unidad
Proximales		
Alcohol (etanol)	0	g
Energía total	187 (45) kJ (kcal)	
Grasa total (lípidos totales)	traza	g
Proteína total	0,4	g
Agua (humedad)	86,7	g
Hidratos de Carbono		
Fibra dietética total	2,3	g
Carbohidratos	10,6	g
Grasas		
Ácidos grasos monoinsaturados totales	0,022	g
Ácidos grasos poliinsaturados totales	0,044	g
Ácidos grasos saturados totales	0,014	g
Colesterol	0	mg
Vitaminas		
Vitamina A equivalentes de retinol de actividades de retinol y carotenoides	1	µg
Vitamina D	0	µg
Vitamina E equivalentes de alfa tocoferol de actividades de vitámeros E	traza	mg
Folato total	11	µg
Equivalentes de niacina totales	0,2	mg
Riboflavina	0,03	mg
Tiamina	0,03	mg
Vitamina B-12	0	µg
Vitamina B-6, Total	0,02	mg
Vitamina C (ácido ascórbico)	3	mg
Minerales		
Calcio	12	mg
Hierro, total	0,2	mg
Potasio	130	mg
Magnesio	7	mg
Sodio	2	mg
Fósforo	17,5	mg
Ioduro	2	µg
Selenio total	traza	µg
Zinc (cinc)	0,14	mg

Actualmente, la mayoría de la pera producida se destina al consumo en fresco tanto para mercado interior como para exportación. En el área de Lleida existen, aproximadamente, unas 290 centrales de conservación frigorífica, con más de 2,3 millones de m³ de frío. Puesto que la producción de pera es bastante importante en la provincia, la introducción de industrias dedicadas a la producción de fruta de IV gama daría a los productores y centrales hortofrutícolas un nuevo mercado para este producto, con gran valor añadido, pero para ello es necesario solucionar los problemas existentes para obtener un producto que tenga las mismas características que el producto fresco, conserve su valor nutricional, sea seguro desde el punto de vista microbiológico y rentable. La variedad “Conference” permite un período más largo de conservación que otras variedades y, por ello, la disponibilidad de materia prima para la industria está garantizada prácticamente durante todo el año. Se sabe que esta variedad presenta unas características que la hacen bastante apropiada para ser un alimento de IV gama (Arias *et al.*, 2008; Soliva-Fortuny *et al.*, 2004).

1.1. Definición de producto mínimamente procesado y generalidades

Las frutas y hortalizas mínimamente procesadas o de IV gama (en inglés “ready-to-eat”, “ready-to-cook”, “ready-to-use”, “minimally-processed” o “fresh-cut”) son aquellas que se obtienen mediante el pelado, lavado y cortado de las mismas y que se convierten en un producto 100 % comestible, el cual es posteriormente envasado y almacenado en frío, ofreciendo a los consumidores un producto fresco con un alto valor nutricional, comodidad de consumo y sabor, manteniendo al mismo tiempo las características del producto inicial (IFPA, 2002). Este tipo de alimentos no han sido sometidos a ningún proceso térmico ni de congelado. Sin embargo, pueden presentar recubrimientos, haber sido tratados con algún producto químico durante su lavado o haber sido sometidos a radiaciones ionizantes (FDA, 2016). Los consumidores están interesados en estos productos debido a la comodidad que presentan, a su disponibilidad en diferentes tamaños, a que se reduce el trabajo de preparación antes de su consumo y a que mantienen los nutrientes y las características de la materia prima (Bansal *et al.*, 2015). Por otra parte, estos productos, que tienen que conservarse en refrigeración, son bastante perecederos y, por tanto, presentan una vida útil corta (7-11 días), lo cual limita su vida comercial.

Las frutas mínimamente procesadas, al contrario que las frutas enteras, pierden la barrera natural que les proporciona la cutícula siendo más susceptibles a la

Introducción

contaminación por patógenos y a la desecación. Por ello, la fruta de IV gama debe estar protegida por un envase adecuado, entre otras cosas, para disminuir la pérdida de agua (Ayala-Zavala *et al.*, 2008).

Las operaciones del procesamiento de los productos vegetales mínimamente procesados no aseguran la esterilidad o estabilidad microbiológica del producto. El riesgo de proliferación de microorganismos, por tanto, se ve incrementado, aunque el crecimiento microbiano también se va a ver influido por el metabolismo del tejido vegetal y la atmósfera modificada creada dentro del envase, por el efecto combinado de la respiración y la permeabilidad de este (Nguyen-the y Carlin, 1994).

1.2. Consumo y tendencias

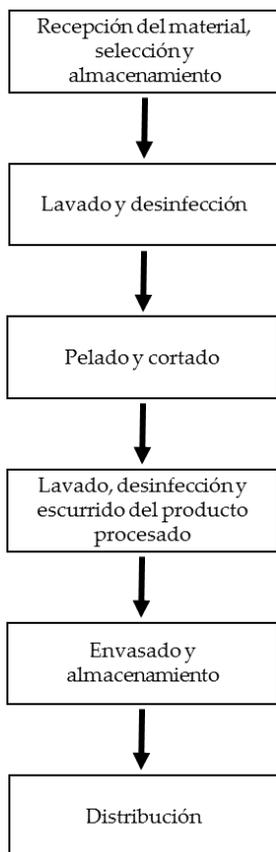
La producción de fruta y hortalizas mínimamente procesadas comenzó en los Estados Unidos alrededor de los años 70, sin embargo, no fue hasta finales de los años 80 cuando este sector se introdujo en España, concretamente en Navarra, extendiéndose posteriormente a Murcia, Comunidad Valenciana, Andalucía y Cataluña.

El mercado de los vegetales mínimamente procesados ha aumentado notablemente en los últimos años como consecuencia de los cambios en los hábitos de vida de los consumidores, junto con el interés por una dieta sana. Los productos vegetales de IV gama ofrecen al consumidor tanto la comodidad y rapidez en su consumo como un elemento clave en una dieta saludable. Sin embargo, se ha demostrado que el nivel de aceptación de estos y las preferencias de los consumidores son diferentes entre distintos países e incluso dentro del mismo país (Lindeman y Väänänen, 2000; Verbeke *et al.*, 2010).

Los datos del consumo de productos vegetales mínimamente procesados en 2014 apuntaban a 2,8 kg/persona/año en España, siendo inferiores a países como Reino Unido (12 kg/persona/año), Francia (6 kg/persona/año) y Italia (4 kg/persona/año) (Luna, 2014). En España, en el año 2015 se comercializaron 91.000 toneladas lo que representó un incremento en el comercio de estos productos del 11 % con respecto al año anterior. De estas, un 96,9 % fueron hortalizas mínimamente procesadas y el 3,1 % restante frutas (Monje, 2016). En España el mercado de frutas mínimamente procesadas está aún en expansión, pues generalmente, se limita a pera y manzana. No obstante, el objetivo de las empresas es ampliar el

abanico de frutas e incorporar: naranja, melocotón, nectarina, kiwi, melón, mango, piña, papaya e incluso granadas peladas (Lobo y González, Sin fecha).

1.3. Etapas de la producción de frutas mínimamente procesadas



Para la obtención de fruta de IV gama se suelen seguir una serie de etapas (Fig. 1) que variarán dependiendo del tipo de fruta que se esté procesando.

1.3.1. Recepción, selección y almacenamiento

Una vez recibida la fruta, se inspecciona y evalúa de acuerdo con estándares de seguridad y calidad y se realiza una etapa de selección del producto. Para ello se clasifican los frutos de acuerdo con su tamaño, estado de madurez, aspecto físico, etc., de manera que al final del procesamiento se obtenga un producto uniforme.

El almacenamiento poscosecha de la fruta se suele hacer a una temperatura de 0 a 5 °C dependiendo de la fruta. Frutas como la pera o la manzana, pueden almacenarse durante largos períodos de tiempo antes de su procesamiento. Sin embargo, esta conservación puede repercutir en un efecto negativo en el producto mínimamente procesado (García y Barrett, 2005). De esta forma, Gorny *et al.* (2000), observaron una reducción en la vida útil de la pera mínimamente procesada preparada a partir de fruta que había estado largos períodos de tiempo almacenada en condiciones de frío y atmósfera controlada.

Figura 1. Diagrama de flujo del procesamiento de la fruta.

1.3.2. Lavado y desinfección del fruto entero

Una vez seleccionada la materia prima, se realiza el lavado y la desinfección para eliminar tanto la suciedad, pesticidas, fertilizantes e insectos como posibles microorganismos patógenos y alterantes que se encuentren presentes en la fruta. Dependiendo de la fruta un simple lavado con agua podría ser suficiente. Sin embargo, con frutas como el melón que podrían presentar en su superficie una carga bacteriana alta, sería conveniente el uso de soluciones desinfectantes. El desinfectante más común es el agua clorada, pero también se usan el peróxido de

Introducción

hidrógeno, surfactantes, el ácido peroxiacético, el fosfato trisódico y el ozono, entre otros (García y Barrett, 2005). Aunque existen numerosos desinfectantes, se ha observado que no todos son efectivos contra el mismo tipo de microorganismos (Ukuku *et al.*, 2001).

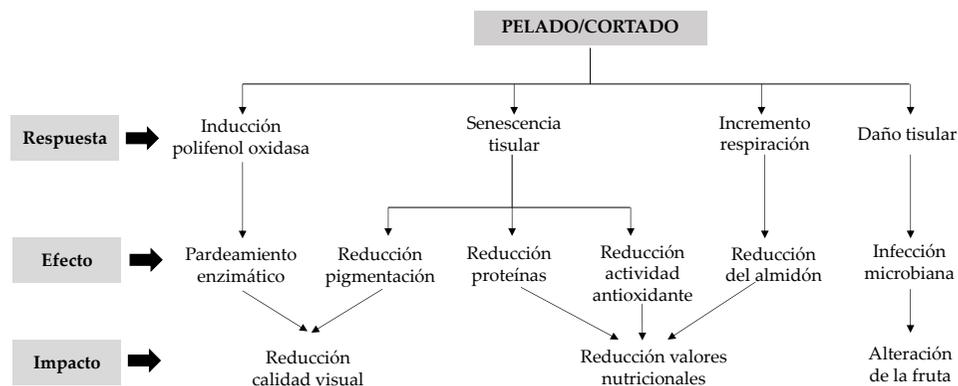


Figura 2. Consecuencias del pelado y el cortado en los productos vegetales mínimamente procesados. (Esquema tomado de Bansal *et al.*, 2015).

1.3.3. Pelado y cortado

La etapa de pelado y cortado de la fruta es uno de los pasos más delicados, ya que puede provocar un estrés en el tejido de forma que se incrementa la tasa de respiración y la producción de etileno conllevando a la producción de malos olores y sabores y al pardeamiento ocasionado por la oxidación enzimática. Además, durante el pelado y cortado de la fruta se elimina la piel que protege frente a microorganismos (Ayala-Zavala *et al.*, 2008). El pelado junto con la ruptura de células vegetales y la liberación de nutrientes, hace que se cree un ambiente idóneo para la proliferación de microorganismos no deseados (Brecht, 1995; Harris *et al.*, 2003). En esta operación, es muy importante utilizar material limpio y afilado. Algunos estudios han demostrado que estos factores podrían acortar la vida útil del producto (Fig. 2). Por ejemplo, Portela y Cantwell (2001) observaron que cortar melón con cuchillo afilado en lugar de con cuchillo romo alargaba la vida útil del producto mínimamente procesado. En este estudio, en los trozos de melón cortados con cuchillo romo se producía un aumento en la tasa de respiración y en la producción de etileno, además presentaban una mayor concentración de etanol, marcadores de mal olor y liberación de electrolitos comparados con los trozos de melón cortados con el cuchillo afilado. De forma que reduciendo los daños mecánicos en el pelado y cortado de la fruta se contribuye a mantener la calidad del producto mínimamente procesado.

1.3.4. Lavado, desinfección y escurrido del producto procesado

Como se ha dicho anteriormente, durante el cortado de la fruta, se liberan exudados que pueden promover el crecimiento microbiano y diversas reacciones bioquímicas, por tanto, es imprescindible eliminarlos a través del lavado de la fruta. Esta operación se suele llevar a cabo con agua clorada fría. Conjuntamente, se suelen aplicar tratamientos antioxidantes para reducir la oxidación enzimática, además de estabilizadores de la textura. Antes del envasado de la fruta se procede a su secado, generalmente por centrifugación o bien con aire. De esta manera, se eliminan los restos de las soluciones antioxidantes y de zumo, evitando el crecimiento de microorganismos durante el almacenamiento.

1.3.5. Envasado, almacenamiento y distribución

Debido a que la fruta cortada sigue respirando, el envasado se debe hacer empleando los recipientes y materiales adecuados al producto. Por lo general, se emplean atmósferas modificadas que se consiguen utilizando films con la permeabilidad adecuada, de forma que dentro del envase se alcance el equilibrio adecuado para que se reduzca la tasa de respiración, se eviten procesos anaeróbicos en el producto y la proliferación de microorganismos.

El almacenamiento de los productos de IV gama se hace en refrigeración (0-5 °C), evitando que se rompa la cadena de frío para prevenir, entre otros, el crecimiento de microorganismos alterantes o patógenos en el alimento y ralentizar la tasa de respiración. La vida útil de estos alimentos conservados en frío suele ser de 7 a 10 días.

2. Aspectos de la calidad físico-química y sensorial de la fruta mínimamente procesada

La calidad de la fruta ya está determinada desde antes de su recolección, pues se ve influenciada por factores genéticos, por las prácticas agrícolas, por las condiciones ambientales de cultivo y por el estado de madurez en el momento de la cosecha. Junto con los factores precosecha, las técnicas de poscosecha y el procesamiento también van a influir en la calidad del producto final. Como resultado del proceso del cortado de la fruta, las células se rompen y se pueden producir reacciones bioquímicas no deseadas. De esta manera, la fruta mínimamente procesada puede sufrir pardeamiento, pérdida de firmeza y de sabor y otras alteraciones físico-químicas. El pelado y la eliminación de los tejidos

Introducción

protectores provocan una pérdida de agua causando la deshidratación superficial, la pérdida de brillo y la contracción de los tejidos (Garcia y Barrett, 2005).

Un aspecto crucial a tener en cuenta es el material del que se parte para la obtención del producto mínimamente procesado, ya que tanto el cultivar, como el estado de madurez del fruto son factores muy importantes que determinarán la vida útil del producto de IV gama, definiendo en gran medida sus parámetros físico-químicos (Bai *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2000; Gorny *et al.*, 2000). Estudios recientes han demostrado que entre 4 cultivares de pera estudiados, la pera "Conference" fue la más adecuada para su uso como producto de IV gama basándose en aspectos relacionados con su calidad, como el pardeamiento y la textura (Colás-Medà *et al.*, 2016). Se sabe que un estado de madurez óptimo a la hora del procesamiento, que en el caso de pera "Conference" es de $44 \pm 3,2$ N, permite extender la vida útil y que el producto mantenga sus características hasta el final de esta (Soliva-Fortuny *et al.*, 2004).

2.1. Pardeamiento

El pardeamiento u oxidación enzimática de la fruta mínimamente procesada es la principal alteración y el factor más limitante de su vida útil. El pardeamiento enzimático se produce debido a que en la operación de pelado y cortado de la fruta se rompen compartimentos celulares liberándose enzimas como la polifenol oxidasa (PPO) que al entrar en contacto con los fenoles, en presencia de oxígeno, producen quinonas que se condensan formando polímeros insolubles de color oscuro (Martinez y Whitaker, 1995).

Existen métodos físicos y químicos que previenen esta alteración. Entre los físicos se encuentran la reducción de la temperatura y el oxígeno dentro de los envases, o bien el empleo de recubrimientos comestibles. Como métodos químicos se utilizan sustancias que, o bien inhiben la PPO, o que eliminan del medio sus sustrato o que actúan como sus propios sustratos. Se emplean agentes reductores como puede ser el ácido ascórbico, acidulantes como el ácido cítrico y sus derivados y agentes quelantes como por ejemplo el EDTA. A menudo también se emplean combinaciones de estas sustancias (Garcia y Barrett, 2005).

Existen numerosos trabajos en relación a estudios de distintos agentes antioxidantes para su uso en manzana (Alandes *et al.*, 2006; Raybaudi-Massilia *et al.*, 2007; Rojas-Graü *et al.*, 2006; Soliva-Fortuny *et al.*, 2001) y pera cortada (Arias

et al., 2008; Dong *et al.*, 2000; Gorny *et al.*, 2002; Oms-Oliu *et al.*, 2006; Oms-Oliu *et al.*, 2008a; Oms-Oliu *et al.*, 2010; Oms-Oliu *et al.*, 2008b; Soliva-Fortuny *et al.*, 2004; Soliva-Fortuny *et al.*, 2002a) en los que se utilizan, entre otros, ácido cítrico, ácido ascórbico, hexilresorcinol y cisteína, solos o combinados.

Los aditivos alimentarios permitidos en la fruta mínimamente procesada se encuentran regulados por el Reglamento de la Comisión Europea (CE) n° 1333/2008 de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios modificado por los Reglamentos (CE) n° 1129/2011 y (CE) n° 969/2014.

2.2. Textura

En ocasiones, la pérdida de firmeza en la fruta se observa a simple vista por la aparición de zonas translúcidas en esta. Además, esta alteración aumenta con el tiempo de almacenamiento.

Una vez que la fruta está mínimamente procesada, uno de los tratamientos más efectivos para mantener la firmeza es aplicar soluciones de calcio conjuntamente con los tratamientos antioxidantes. El efecto del calcio es atribuido a la formación de complejos con el ácido poligalacturónico formando complejos que refuerzan la pared celular (Van Buren, 1979). Diversos estudios han demostrado que los tratamientos con calcio en fruta mínimamente procesada disminuyen la pérdida de firmeza (Rosen y Kader, 1989).

Una alternativa al uso de CaCl_2 una vez la fruta está cortada, podría ser la aplicación en poscosecha. Diversos estudios han puesto de manifiesto que el calcio puede penetrar en la pulpa de la fruta a través de lenticelas, pero también las grietas en la cutícula juegan un papel importante en la entrada del calcio en el fruto (Conway *et al.*, 2002; Ortiz *et al.*, 2009). Entre los efectos del CaCl_2 aplicado en poscosecha, se ha visto que puede prevenir la aparición de *Bitter Pit* y mejorar la producción de compuestos volátiles aromáticos en manzana “Golden Reinders” y “Fuji Kiku-8” después de su conservación en cámara frigorífica en aire (Ortiz *et al.*, 2009; Ortiz *et al.*, 2010). Aplicaciones precosecha de calcio mediante spray (0,1-0,3 %) incrementaron el contenido de licopeno y el de vitamina C en tomate (Dumas *et al.*, 2003). Asimismo, en pera “Anjou”, la aplicación precosecha de calcio aumentó el contenido de calcio en las frutas tratadas respecto a las no tratadas, manteniéndose dicho incremento durante 115 días de conservación a $-1\text{ }^\circ\text{C}$ y retrasándose la pérdida de firmeza (Gerasopoulos

Introducción

y Richardson, 1996). Por tanto, los tratamientos con calcio pueden jugar un papel muy importante en el mantenimiento de la calidad poscosecha de frutas.

2.3. Sabor y aroma

El sabor y el aroma son quizás los rasgos más elusivos y subjetivos de la calidad. El sabor está constituido por el gusto más el aroma u olor. El sabor en fruta se compone principalmente de los gustos dulce y ácido, y por el aroma característico, que corresponde a azúcares, ácidos y compuestos volátiles con olor activo, respectivamente. La percepción del dulzor, es decir, los azúcares, uno de los componentes más importantes del sabor de frutas, se ve modificada por la acidez o niveles de ácido, así como también por la presencia de algunos compuestos volátiles aromáticos. La contribución del aroma a la calidad del sabor de los productos frescos está ganando cada vez más atención. La genética es el determinante primario del sabor de los productos frescos (Baldwin *et al.*, 1991; Baldwin *et al.*, 1992; Cunningham *et al.*, 1985), juntamente con factores climáticos pre-cosecha (Romani *et al.*, 1983), las prácticas culturales (Wright y Harris, 1985), el estado de madurez del fruto en la cosecha (Fellman *et al.*, 1993; Maul *et al.*, 1998; Baldwin *et al.*, 1999b), y el manejo poscosecha (Mattheis *et al.*, 1995; Baldwin *et al.*, 1999a; Baldwin *et al.*, 1999a). La percepción humana del sabor es extremadamente compleja. El gusto es la detección de compuestos no volátiles (en concentración de partes por cien) por varios tipos de receptores que existen principalmente en la lengua. Los compuestos aromáticos pueden detectarse en concentraciones de partes por billón (ppb) y son detectados por las terminaciones nerviosas olfativas en la nariz (DeRovira, 1997). El cerebro procesa la información de estos sentidos para dar una experiencia de sabor integrada.

Existen estudios realizados en zanahoria y en melón mínimamente procesados en los que se demuestra que la operación de cortado provoca cambios metabólicos los cuales inducen una pérdida del aroma y la producción de malos olores (Bermudez-Brito *et al.*, 2012; Portela y Cantwell, 2001). Los microorganismos presentes en los productos vegetales mínimamente procesados, como son bacterias ácido lácticas y levaduras, también pueden producir etanol y volátiles modificando el olor y el sabor de estos (Lievin-Le Moal y Servin, 2014).

El buen sabor y la ausencia de malos olores y sabores son aspectos críticos en la satisfacción del consumidor. La exposición a determinadas atmósferas dentro de los envases puede producir fermentación y como consecuencia malos olores, sin

embargo, la baja difusión a través del envase puede influir positivamente en el aroma, y por tanto en el sabor (Salminen *et al.*, 1998).

Hay que tener en cuenta que la conexión entre el sabor y la textura forma un enlace complejo entre los diferentes factores físico-químicos que podría afectar a la percepción de la calidad del producto. Por ejemplo, en un estudio con manzanas se observó que la jugosidad de la fruta inducía la liberación de compuestos que proporcionaban sabor, pero solo si las manzanas estaban firmes y contenían altas concentraciones de compuestos volátiles (Ting *et al.*, 2016).

Los consumidores buscan frutos firmes, con textura crujiente y con buen sabor. Se han llevado a cabo diferentes estudios para mantener estas características en la pera mínimamente procesada, combinando atmósferas modificadas con agentes de firmeza (Dong *et al.*, 2000).

3. Microbiología de la fruta mínimamente procesada

Las frutas poseen mecanismos naturales contra los patógenos como pueden ser la piel o sustancias antimicrobianas como aceites esenciales, fenoles y polifenoles (Bubonja-Sonje *et al.*, 2011; Lacombe *et al.*, 2010; Lacombe *et al.*, 2012). El hecho de que la fruta contenga ácidos orgánicos hace posible que tenga un pH ácido (valores de 4,6 o menores), a excepción de algunas frutas como el melón o algunas frutas tropicales que tienen un pH más cercano a la neutralidad. El tipo de ácido varía con la fruta, aunque los predominantes son el málico, el cítrico y el tartárico. Los valores bajos de pH junto con la naturaleza de los ácidos es lo que va a determinar la microbiota predominante en ellas. De esta manera, dentro de la microbiota nativa de la fruta, que suele ser diversa, predominan mohos y levaduras, aunque también pueden encontrarse algunas bacterias, la mayoría inofensivas, aunque también podrían encontrarse patógenas (ICMSF, 1980).

3.1. Fuentes de contaminación

Desde el desarrollo de la fruta hasta su procesamiento y distribución hay una serie de etapas en las que existe un riesgo microbiológico potencial. La contaminación microbiológica se puede traducir tanto en un riesgo para la salud pública debido a la presencia de microorganismos patógenos de transmisión alimentaria, como en una disminución de la vida útil del producto debido a la presencia de microorganismos alterantes en el alimento (García y Barrett, 2005). La contaminación, que puede proceder de distintos orígenes (ambiental, animal o

Introducción

humano), se puede producir en cualquier etapa desde que la fruta se produce hasta que llega al consumidor (producción, cosecha, poscosecha, almacenamiento y manipulación en casa) (Olaimat y Holley, 2012).

El primer punto de contaminación se puede dar durante la **producción**. La presencia en la zona de cultivo de animales, tanto domésticos como salvajes, supone un peligro, ya que constituyen un reservorio de patógenos que pueden ser transmitidos a través de las heces. El uso de fertilizantes orgánicos, como pueden ser abonos naturales, pueden contaminar los productos con patógenos de origen animal si no han sido procesados correctamente; de hecho, hay estudios que demuestran la presencia de patógenos propios del abono en fruta fresca (Dingman, 2000). En principio, el agua de riego no tendría que suponer un riesgo de contaminación. Sin embargo, los agricultores pueden utilizar agua procedente de embalses y sistemas naturales y que puede estar no tratada, de forma que podría ser un foco de contaminación (García y Barrett, 2005; James, 2006).

Durante la **cosecha**, al igual que en la **poscosecha**, el principal punto de contaminación son los trabajadores que pueden ser portadores de microorganismos patógenos de transmisión alimentaria. Los utensilios de trabajo y envases también pueden ser fuente de contaminación, por lo que es necesario limpiarlos y desinfectarlos con frecuencia para evitar contaminaciones cruzadas. El transporte hasta la industria se tiene que realizar en las condiciones de higiene y temperatura adecuadas para reducir riesgo de contaminación.

En las operaciones de **procesamiento** y de **envasado** también se puede producir la contaminación de la fruta mínimamente procesada a través de los empleados y los utensilios empleados. Se ha observado que el número de microorganismos mesófilos puede aumentar de 2 hasta 5 log ufc/g desde la fruta fresca hasta la fruta mínimamente procesada dependiendo del producto, la estación del año y la región de cultivo (Zhuang *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha observado que los microorganismos presentes en la piel de la fruta pueden transmitirse a la pulpa en el proceso de cortado (Madden, 1992).

Por todo ello, para evitar y minimizar los riesgos de contaminación de la fruta, es necesario llevar a cabo unas Buenas Prácticas de Producción y de Fabricación además, de aplicar un sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC). Existen distintas guías como la “*Guía de buenas prácticas de producción de IV gama*” (2010) a nivel español, la “*Guía de prácticas correctas de higiene para vegetales y derivados, frescos, pelados, troceados o envasados*” en Cataluña (2015) o en

Estados Unidos “*Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Fresh-cut Fruits and Vegetables*” (2008).

3.2. Microbiota propia

La fruta mínimamente procesada se diferencia considerablemente de la fruta entera en sus propiedades físicas (no presentan tejidos epidérmicos protectores y poseen una alta humedad), en sus características bioquímicas (respuesta a heridas) y el ambiente de manipulación (procesamiento y almacenamiento bajo temperaturas de refrigeración y atmósfera modificadas). Es por ello, probablemente, que los microorganismos presentes y que alteran la fruta sean diferentes en fruta entera y fruta mínimamente procesada (Barth *et al.*, 2009). En las hortalizas mínimamente procesadas se pueden encontrar concentraciones de microorganismos de 10^4 a 10^9 ufc/g y en las frutas mínimamente procesadas de 10^2 a 10^7 ufc/g (Abadias *et al.*, 2008). La mayoría de las especies son propias de estos alimentos, y solo una pequeña población de los microorganismos que se encuentran inicialmente en fruta mínimamente procesada se corresponde con microorganismos alterantes (Nguyen-the y Carlin, 1994). La diversidad de microorganismos alterantes presentes en la fruta cortada está principalmente determinada por factores intrínsecos como el material de partida y la composición y el pH de esta. Así por ejemplo, se ha observado que en productos con un contenido elevado de azúcares, como pueden ser las frutas mínimamente procesadas, principalmente, crecen bacterias ácido lácticas y levaduras originando malos olores debido a la producción de ácidos orgánicos tales como láctico, acético, málico, succínico y pirúvico. Además existen factores extrínsecos como la temperatura de almacenamiento y la atmósfera modificada dentro de los envases que influyen también en la producción de microorganismos. Así, la existencia de proliferación microbiana se caracteriza principalmente por la producción de enzimas y de metabolitos que causan alteración visual y de textura y mal olor (Ragaert *et al.*, 2011).

Tournas *et al.* (2006) observaron que en fruta mínimamente procesada las levaduras predominantes fueron *Pichia* spp., *Rhodotorula* spp., *Candida pulcherrima*, *C. lambica*, *C. sake* y *Debaryomyces polymorphus* y que se duplicaban en número con respecto a la cantidad observada en la fruta antes de su procesamiento. Especies de *Penicillium* y de *Cladosporium* son los mohos que más se encuentran en fruta de IV gama y que ocasionan su deterioro (Tournas *et al.*, 2006). Abadias *et al.* (2008) realizaron un estudio para determinar la microbiota en fruta mínimamente procesada, los resultados obtenidos fueron que el 90,4 % de

Introducción

las 21 muestras analizadas, en las que se incluían manzana, piña, naranja, mango y melocotón, contenían una concentración mayor de 10^5 ufc/g de microorganismos mesófilos aerobios. También determinaron que el 95,2 % de las muestras evaluadas presentaban una concentración de mohos y levaduras superior a 10^5 ufc/g.

En cuanto a bacterias alterantes, las especies Gram-negativas son las más frecuentes. Se han aislado, principalmente, cepas de *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp. y *Erwinia* spp. (Nguyen-the y Carlin, 1994). O'Connor-Shaw *et al.* (1994) demostraron en distintas frutas mínimamente procesadas (melón, kiwi, piña y papaya) que además de bacterias Gram-negativas, mohos y levaduras, se podían encontrar bacterias Gram-positivas del género *Lactobacillus*.

3.3. Microorganismos patógenos de transmisión alimentaria

El riesgo que puede presentar la contaminación por patógenos de transmisión alimentaria es bastante alto. Así, por ejemplo, la "U. S. Food and Drugs Administration" ha propuesto una guía práctica para empresas con el objetivo de reducir los riesgos microbianos y aumentar la seguridad alimentaria en frutas y hortalizas mínimamente procesadas. En esta guía se contemplan todos los posibles puntos de contaminación y el modo de controlarlos (FDA, 2008).

Las frutas mínimamente procesadas son consideradas productos menos seguros desde el punto de vista microbiológico que las frutas enteras, pero más seguros si se comparan con otros productos de IV gama. El hecho de que estos productos se consuman crudos y la ausencia de técnicas que empleen calor durante el procesado y el período de almacenamiento posterior, hace que estos productos puedan albergar y, por tanto, ser vehículos de transmisión de microorganismos patógenos. Diversos estudios han demostrado la presencia de microorganismos patógenos en fruta (Nguyen-the y Carlin, 1994). Chukwu *et al.* (2010) analizaron 150 muestras de fruta mínimamente procesada, entre las que se encontraban muestras de piña, sandía y paw-paw, los resultados demostraron que más del 90 % de las muestras eran portadoras de patógenos. En el caso de que microorganismos patógenos de transmisión alimentaria se encuentren presentes en la fruta mínimamente procesada, se ha observado que pueden mantenerse viables e incluso crecer a temperaturas de refrigeración (Feng *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2016). Sin embargo, existen otros estudios que no han mostrado la presencia de tales microorganismos patógenos en fruta mínimamente procesada (Abadias *et al.*, 2008).

4. Toxiinfecciones alimentarias y principales bacterias patógenas: epidemiología y patogénesis

4.1. Toxiinfecciones alimentarias

La OMS define una toxiinfección alimentaria como “cualquier enfermedad de naturaleza infecciosa o tóxica causada por el consumo de agua o de alimentos, o bien, que haya indicios de que este sea su origen”. De esta manera, se produce un brote de toxiinfección alimentaria cuando se diagnostican dos casos con síntomas similares causados por la ingestión del mismo alimento (Callejón *et al.*, 2015). Las toxiinfecciones alimentarias son un reto para la salud pública, ya que causan enfermedad y muertes cada año en todo el mundo.

El número de brotes de toxiinfecciones alimentarias causadas por la ingesta de productos mínimamente procesados se sitúa en una tasa bastante alta tanto en Estados Unidos como en la Unión Europea. Según el “Food Safety and Inspection Service” del “United States Department of Agriculture”, solo en Estados Unidos se producen aproximadamente 48 millones de toxiinfecciones alimentarias al año produciendo alrededor de 3.000 muertes (FSIS, 2013). A pesar de ello, solo un número reducido se corresponden con aquellas que tienen la fruta como vehículo de transmisión. El CDC ha reportado en Estados Unidos 24, 16, 15 y 10 brotes ocasionados por la ingesta de fruta en los años 2011, 2012, 2013 y 2014, respectivamente (CDC 2014a; CDC 2014b; CDC, 2015a; CDC, 2016) (Tabla 2). Por otra parte, en la Unión Europea el número de brotes detectados producidos por el consumo de fruta o derivados de esta es inferior que Estados Unidos (EFSA, 2013; EFSA 2014; EFSA 2015a; EFSA 2015b; EFSA 2016) (Tabla 3) de 17 (2,4 % del total anual de brotes de toxiinfecciones alimentarias) en el año 2011, 6 (0,8 %) en el 2012, 10 (1,2 %) en el 2013, 8 (1,4 %) en el año 2014. Estos datos revelan que son *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. las principales bacterias causantes de toxiinfecciones alimentarias debido al consumo de fruta, aunque también hay numerosos casos originados por el virus de la hepatitis A y Norovirus.

Tabla 2. Toxiinfecciones producidas en los Estados Unidos por el consumo de fruta entre los años 2011-2014.

Año	Nº toxiinfecciones causadas por ingesta de fruta ^a	Principales agentes etiológicos ^b	Casos ^c	Frutas relacionadas
2011	24 (13 %)	Norovirus (11) <i>L. monocytogenes</i> (1) <i>E. coli</i> (1)	440 (0) 147 (33) 15 (2)	4 melón, 3 fruta de pepita, 1 frutas silvestres, 1 frutas subtropicales, 14 no clasificados
2012	16 (8 %)	Norovirus (4) <i>Salmonella</i> spp.(6)	210 (0) 446 (1)	4 melón, 2 frutas silvestres, 1 frutas tropicales, 9 no clasificados
2013	15 (7 %)	Norovirus (6) <i>Salmonella</i> spp.(5) Virus de la hepatitis A (2)	196 (1) 49 (1) 159 (0)	3 melón, 3 fruta de pepita, 1 frutas silvestres, 1 frutas subtropicales, 1 frutas tropicales, 6 no clasificados
2014	10 (5 %)	<i>L. monocytogenes</i> (2)	37 (8)	1 melón, 2 frutas de pepita, 2 frutos silvestres, 1 fruta de hueso, 1 frutas subtropicales, 1 frutas tropicales, 2 no clasificados

^a Número de toxiinfecciones (porcentaje de toxiinfecciones producidas por el consumo de fruta del total de toxiinfecciones producidas)

^b Principales agentes etiológicos (número de toxiinfecciones causadas por ese microorganismo)

^c Número de enfermos (número de muertes)

Tabla 3. Toxiinfecciones producidas en la Unión Europea por el consumo de fruta y derivados entre los años 2011-2015.

Año	2011	2012	2013	2014	2015
Nº toxiinfecciones causadas por ingesta de fruta ^a	17 (2,4 %)	6 (0,8 %)	10 (1,2 %)	8 (1,4 %)	2 (0,5 %)

^a Número de toxiinfecciones (porcentaje de toxiinfecciones producidas por el consumo de fruta del total de toxiinfecciones producidas)

Los criterios microbiológicos aplicados a los alimentos están regulados por el Reglamento de la Comisión Europea (CE) nº 1441/2007 de la comisión de 5 de diciembre de 2007 que modifica al Reglamento (CE) nº 2073/2005. En este reglamento se contemplan los criterios de seguridad alimentaria que regulan presencia de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* para frutas y hortalizas procesadas (Tabla 4) y los criterios de higiene que regulan los niveles de *E. coli* en frutas y hortalizas listas para el consumo (Tabla 5).

Tabla 4. Criterios de seguridad alimentaria descritos por el Reglamento (CE) nº 1441/2007 para frutas y hortalizas listas para su consumo.

Categoría	Microorganismo	Plan de muestreo ⁽¹⁾			Límites		Método analítico de referencia ⁽²⁾	Fase en la que se aplica el criterio
		N	c	m	M			
Frutas y hortalizas troceadas (listas para el consumo)	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g	EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil		
		5	0	100 ufc/g ⁽³⁾	EN/ISO 11290-2 ⁽⁴⁾	Productos comercializados durante su vida útil		
Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	Ausencia en 25 g ⁽⁵⁾	EN/ISO 11290-1	Antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido		
		5	0	100 ufc/g	EN/ISO 11290-2 ⁽⁴⁾	Productos comercializados durante su vida útil		

- (1) n = número de unidades que componen la muestra; c = número de muestras que dan valores entre m y M .
- (2) Se utilizará la última versión de la norma.
- (3) Este criterio se aplica si el fabricante puede demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil. El explotador podrá fijar sus límites intermedios durante el proceso que deberían ser lo suficientemente bajos para garantizar que no se supere el límite de 100 ufc/gal final de la vida útil.
- (4) Sobre una placa Petri de 140 mm de diámetro o tres placas Petri de 90 mm de diámetro se siembra 1 mL de inóculo.
- (5) Este criterio se aplica a los productos antes de que hayan abandonado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria cuando este no pueda demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil.
- (6) Se considerará automáticamente que pertenecen a esta categoría los productos con $pH \leq 4,4$ o $a_w \leq 0,92$, productos con $pH \leq 5,0$ y $a_w \leq 0,94$, y los productos con una vida útil inferior a 5 días. Otras categorías de productos pueden pertenecer a esta categoría, siempre que se justifique científicamente.

Tabla 5. Criterios de higiene de los procesos para hortalizas, frutas y productos derivados descritos por el Reglamento (CE) nº 1441/2007.

Categoría	Microorganismo	Plan de muestreo ⁽¹⁾		Límites		Método analítico de referencia ⁽²⁾	Fase en la que se aplica el criterio	Acción en caso de resultados insatisfactorios
		n	c	m	M			
Frutas y hortalizas troceadas (listas para el consumo)	<i>E. coli</i>	5	2	100 ufc/g	1000 ufc/g	ISO 11290-1 o 2	Proceso de elaboración	Mejoras en la higiene de la producción y en la selección de materias primas

⁽¹⁾ n= número de unidades que componen la muestra; c = número de muestras que dan valores entre m y M.

⁽²⁾ Se utilizará la última versión de la norma.

4.2. *Escherichia coli* O157:H7

E. coli es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo y, a veces, presenta flagelos que lo hacen móvil. Esta especie está serotipada de acuerdo con los antígenos O (somático), K (capsular) y H (flagelar). No todos los serotipos son patógenos, de hecho hay serotipos que forman parte de nuestra microbiota intestinal. Así, los serotipos patógenos se clasifican en cuatro grupos atendiendo a su virulencia: enteropatogénicos, enteroinvasivos, enterotoxigénicos y enterohemorrágicos.

E. coli O157:H7 pertenece al grupo de *E. coli* enterohemorrágicas. Crece a temperaturas de entre 8-45 °C, siendo la óptima 37 °C. El rango de pH en el que es capaz de crecer también es bastante amplio (4,4-9,0), aunque su óptimo se restringe a pH de entre 6-7 (Khaleque y Bari, 2016). En 1982 fue la primera vez que se aisló este serotipo (Wells *et al.*, 1983). A partir de aquí se ha relacionado con numerosos brotes de toxiinfección alimentaria. Alimentos con muy bajo número de células patógenas han estado implicados en toxiinfecciones alimentarias (0,3-0,4 células/g), aunque lo normal es que la mínima dosis infectiva sea de 10⁵ células/g (Khaleque y Bari, 2016).

La forma de infección de *E. coli* O157:H7 comienza con la unión a los enterocitos del intestino delgado gracias a un flagelo y al pili. De esta forma se producen una serie de acontecimientos, entre ellos el cambio morfológico de la célula. A estos se les llama lesión de adhesión y borrado (A/B). Las características de esta lesión son las que originan el cuadro diarreico. Sin embargo, esta bacteria puede producir también la toxina Shiga que es la que origina la colitis hemorrágica y que puede durar de entre 4 a 10 días. Otra patología que causa esta bacteria es el síndrome hemolítico urémico que se caracteriza por fallo renal, anemia hemolítica y trombocitopenia (Adams y Moss, 2008; Ryan y Ray, 2014b).

4.3. *Salmonella* spp.

Es muy común encontrar en frutas y hortalizas que se hayan podido contaminar con especies del género *Salmonella* a través de fertilizantes de origen animal, del agua de riego o bien a través de los humanos. Son bacilos Gram-negativos, anaerobios facultativos y con flagelos que los hacen móviles. La temperatura óptima de crecimiento es 37 °C, sin embargo, puede crecer a temperaturas desde los 8 a los 45 °C. El rango de pH en el que se observa crecimiento va de 4 a 8, aunque su óptimo está situado entre valores de 6,5-7,5 (Khaleque y Bari, 2016).

Introducción

A lo largo de la historia, este género se ha clasificado en numerosas especies, hoy en día esta clasificación se reduce a dos, *S. enterica* y *S. bongori* de acuerdo con los antígenos somáticos, O y flagelares, H. El resto de especies han sido relegadas a serotipos de estas. Otra característica que distingue a los serotipos de *Salmonella* es el rango de organismos en los que se puede hospedar. Algunos están adaptados a mamíferos y a anfibios y otros infectan a una amplia gama de huéspedes, así por ejemplo, hay brotes de toxiinfección alimentaria registrados que están relacionados con *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium que son capaces de infectar a humanos. La dosis mínima infectiva de *Salmonella enterica* varía de 200 a 10^6 células ingeridas dependiendo del serotipo (Ryan y Ray, 2014b), llegando en algunos casos clínicos a ser inferior (4-45 células) (Khaleque y Bari, 2016). El huésped también influye en la dosis infectiva necesaria, es decir, niños, personas mayores e inmunodeprimidos son susceptibles a dosis más bajas de esta bacteria (Cox y Pavic, 2014).

La salmonelosis se suele manifestar con picos agudos de fiebre, dolor abdominal, gastroenteritis, náuseas y vómitos. El período de incubación, por lo general, es de 12 a 36 h. Cuando se ingiere un alimento contaminado, la bacteria pasa a través de estómago y del duodeno para colonizar el íleon y el colon. Una vez allí, se cree que la bacteria interactúa con las vellosidades de las células intestinales de manera que se induce la creación de unos pliegues en la membrana celular de la célula intestinal. Estos pliegues envuelven a la bacteria creando una vacuola endocítica que transporta al patógeno desde la superficie apical de la célula hasta superficie basal donde se va a multiplicar estando aún dentro de la vacuola. La invasión de las células epiteliales por la bacteria induce una respuesta inflamatoria que podría ser la que causa el daño en el intestino y los síntomas de la enfermedad. A veces, en individuos susceptibles, el patógeno puede pasar a la lámina propia (tejido conectivo localizado justo debajo del epitelio) y de aquí diseminarse a través del aparato circulatorio a otros órganos (Cox y Pavic; 2014, Ryan y Ray, 2014b).

4.4. *Listeria monocytogenes*

De todas las especies del género *Listeria*, *L. monocytogenes* es la única de importancia como patógeno humano. Es un bacilo Gram-positivo, anaerobio facultativo, no formador de esporas y psicrótrofo. El rango de temperatura de crecimiento va de 0 a 45 °C, estando su óptimo a 37 °C. A temperaturas por debajo de 5 °C, la fase de adaptación del microorganismo puede durar hasta 33

días. Este microorganismo es capaz de formar flagelos a temperaturas de entre 20-25 °C mientras que no los forma a 35 °C. El valor de pH mínimo de crecimiento observado para *L. monocytogenes* es de 4,4 y el máximo de 9,4. Es una bacteria que tolera niveles de salinidad de incluso el 16 % de NaCl, y es capaz de crecer a niveles del 10 %. Es un microorganismo ubicuo. Se ha aislado de agua dulce y salada, del suelo, de lodos de depuradora, de vegetación en descomposición y de forraje, aunque la aparición de esta bacteria en el suelo y en la vegetación se atribuye a la contaminación fecal a través de animales (Batt, 2014; Khaleque y Bari, 2016).

Una característica poco común de patógenos humanos es que este microorganismo es capaz de crecer a temperaturas de refrigeración e incluso a 0 °C, debido a enzimas que se activan a bajas temperaturas. La especie *L. monocytogenes* se divide en 13 serotipos diferenciados de acuerdo con sus antígenos de superficie y flagelares. Sin embargo, la mayoría de casos de listeriosis producidos en humanos se deben a los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b, siendo este último el más virulento (Kathariou, 2002; Rocourt *et al.*, 2000). Los factores de virulencia más importantes que presenta *L. monocytogenes* son un grupo de proteínas de invasión asociadas a superficie llamadas internalinas y una citotoxina formadora de poros llamada listeriosina O.

La incidencia de infección por *L. monocytogenes*, no obstante, es baja, ya que solo se producirá infección si un individuo susceptible se expone a una alta dosis del microorganismo. Aunque no se sabe con seguridad, hay estudios que sugieren que la mínima dosis infectiva en los casos de listeriosis invasiva es de 10^2 células (Golnazarian *et al.*, 1989). Por lo general en los casos de toxiinfecciones se suelen detectar 10^3 células y en los casos más epidémicos, aunque también más esporádicos, se han detectado 10^6 células. Para la listeriosis no invasiva la mínima dosis infectiva es más alta, se habla de 10^5 células e incluso 10^{11} células (Khaleque y Bari, 2016). Una vez el individuo es infectado, lo común es que se produzca un período de incubación de dos semanas hasta que se manifiestan los primeros síntomas. La listeriosis afecta generalmente a individuos inmunodeprimidos, a personas mayores y a embarazadas. Los síntomas pueden variar desde los propios de una gripe (fiebre, dolor de cabeza, náuseas, vómitos...) a septicemia, meningitis y meningoencefalitis. En mujeres embarazadas la enfermedad puede ser asintomática, o bien se suelen producir síntomas parecidos a los de la gripe con fiebre y dolor de cabeza, sin embargo, en ambos casos, la enfermedad se traduce en abortos y partos prematuros debido a que la infección se transmite a través de la placenta al feto.

Introducción

L. monocytogenes es un patógeno intracelular facultativo, que puede causar enfermedad invasiva y no invasiva. La forma no invasiva suele manifestarse como gastroenteritis tras 24 h de incubación, aunque hay poca información al respecto. Es la forma invasiva la más severa, pues se traduce en una infección sistémica potencialmente mortal. La forma de infección suele ser como se describe a continuación. Una vez que el patógeno alcanza el intestino penetra en los enterocitos para seguir su ciclo (Fig. 3). Para ello es necesario que en primer lugar, varias proteínas de membrana se unan a la fibronectina de los enterocitos, seguidamente la internalina (IntA), otra proteína de membrana, se unirá al receptor de la célula hospedadora, la E-cadherina. A partir de aquí, se desencadenará la formación de una vacuola endocítica que internalizará al patógeno. Una vez dentro del enterocito, y con la ayuda de la listeriosina O y a las fosfolipasas bacterianas, *L. monocytogenes* quedará libre en el citosol celular. Una vez dentro de la célula, la bacteria se multiplica y modifica el citoesqueleto del enterocito creándose una polimerización de actina a su alrededor que le sirve de ayuda para pasar a otras células hospedadoras donde iniciará de nuevo el proceso. Al mismo tiempo, es capaz de modificar otras rutas de manera que suprime la reacción inmune del enterocito, y por tanto, el sistema inmune del hospedador (Ryan y Ray, 2014a).

Hay que tener en cuenta que para que se produzca la infección por parte de *L. monocytogenes*, el patógeno tiene, en primer lugar, que sobrevivir en la matriz alimentaria, posteriormente superar el tracto digestivo y después en el intestino franquear las sales biliares.

En los últimos años, *L. monocytogenes* ha producido tres brotes de listeriosis en Estados Unidos siendo la fruta el vehículo de transmisión. En el año 2011, se asoció con el consumo de melón "Cantaloupe" produciendo 147 casos con 143 hospitalizaciones y 33 muertes (CDC, 2012). En julio de 2014 se produjo una toxiinfección debida al consumo de fruta de hueso (melocotón, nectarina, ciruelas y pluots), 2 personas resultaron afectadas, produciéndose 1 muerto (Buchanan *et al.*, 2017). En diciembre de 2014 fue debido al consumo de manzanas caramelizadas. El brote resultó con 35 casos de los cuales 34 fueron hospitalizados y se produjeron 7 muertes (CDC, 2015b). Aunque los casos de toxiinfección alimentaria producidos por esta bacteria son bajos, la tasa de mortalidad es bastante alta (>30 %) (EFSA, 2015a).

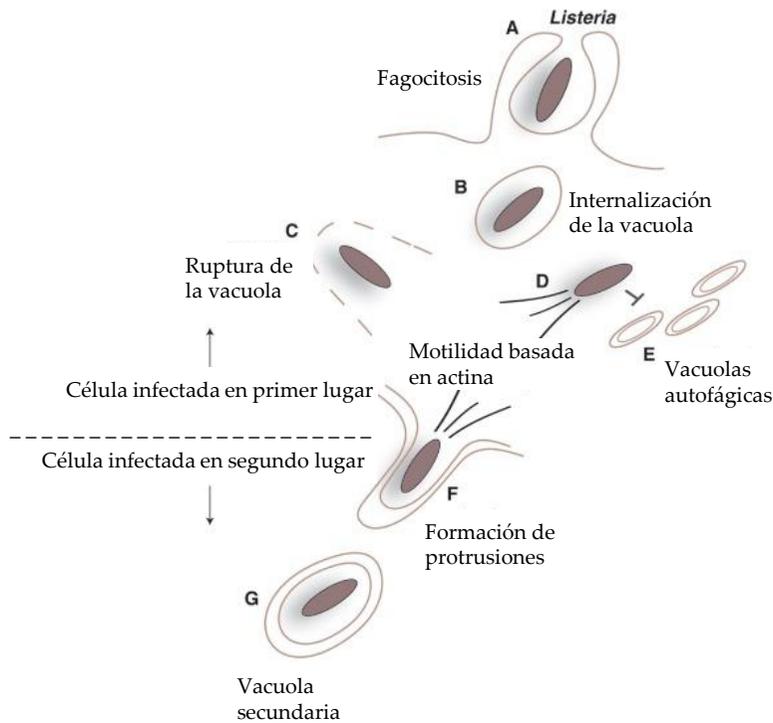


Figura 3. Ciclo intracelular de *L. monocytogenes*. A) El patógeno interactúa con las células intestinales provocando su fagocitosis. B) Se forma una vacuola que permite la entrada de *L. monocytogenes*. C) Lisis de la vacuola. D) Liberación de la bacteria y polimerización de actina para movilizarse. E) Esta actina permite a la bacteria escapar de los sistemas de degradación de la célula intestinal. F) Formación de protrusiones que originarán la vacuola secundaria. G) Formación de la vacuola secundaria de doble membrana que originará el nuevo ciclo de infección. (Figura tomada de Pizarro-Cerdá et al., 2016).

5. Estrategias de intervención para minimizar los riesgos microbiológicos en frutas y hortalizas mínimamente procesadas

La seguridad alimentaria es un tema que preocupa a nuestra sociedad, ya que cada vez hay nuevos microorganismos emergentes y, por otro lado, los ya existentes se hacen resistentes a sustancias antimicrobianas y a productos

Introducción

químicos utilizados para su eliminación. Se sabe que las bacterias patógenas están involucradas en respuestas a cambios medioambientales, por lo que pueden desarrollar nuevos mecanismos de virulencia y ocupar nuevos nichos. Por otra parte, la susceptibilidad a las toxiinfecciones está cambiando debido a una disminución de la inmunidad adquirida con la mejora de la higiene y el aumento de los individuos inmunodeprimidos asociados con cambios demográficos y tratamientos inmunodepresores y enfermedades (Newell *et al.*, 2010).

La eficacia del método utilizado para reducir la carga microbiana depende del tipo de tratamiento, del tipo y la fisiología del microorganismo, de las características del producto a tratar, el tiempo de exposición, la concentración del desinfectante, del pH de este y de la temperatura. Además, hay que tener en cuenta que las estrategias de control de microorganismos utilizados no deben dañar las características sensoriales del producto alimentario (Parish *et al.*, 2003).

Los métodos para la reducción y el control de microorganismos en alimentos se pueden clasificar en tres grupos: químicos, físicos y biológicos.

5.1. Métodos químicos

El lavado de productos con agua elimina suciedad, exudados y células muertas que, obviamente, contribuyen al deterioro de la fruta. Sin embargo, para eliminar o reducir la carga bacteriana se suelen emplear desinfectantes químicos. El tratamiento con desinfectantes se lleva a cabo mediante inmersión. El uso de desinfectantes, por un lado, elimina carga microbiana del alimento y, por otro, mantiene el agua del proceso libre de contaminación microbiana, evitando así posibles contaminaciones cruzadas (Gil *et al.*, 2009). Además, dado que el agua podría convertirse en un reservorio de patógenos, los tratamientos deberían ser lo suficientemente eficientes y eliminar rápidamente a los microorganismos para asegurar que no pasan a la siguiente fase. Con el uso de tratamientos desinfectantes, se logra una reducción de la carga microbiana inicial, además de mantener la calidad y extender la vida útil del producto (Zagory, 1999).

El cloro es uno de los desinfectantes más usados en la industria de frutas y hortalizas procesadas (Nguyen-the y Carlin, 1994) y, en particular, el derivado del cloro más común, el hipoclorito de sodio. Este es efectivo a dosis de entre 50-200 ppm (partes por millón) y con un tiempo de contacto con el producto de 1 o 2 minutos (Beuchat, 1998). Sin embargo, el cloro tiene algunas limitaciones y es que, por ejemplo, los niveles de cloro solo reducen la población microbiana de 1 a 2 log

ufc/g. El hipoclorito es bastante sensible a factores como la luz, a la temperatura y al aire, de manera que se descompone fácilmente en otras formas de cloro que pueden ser peligrosas para la salud y, además, inefectivas como desinfectante. Otro inconveniente de este producto es que hay esporas bacterianas que son resistentes. Se sabe también que se pueden formar compuestos trihalogenados que pueden ser potencialmente cancerígenos. Por ello, cada vez son más los estudios llevados a cabo para sustituir este producto, ya que su uso excesivo causa daños medioambientales y a la salud humana. De hecho, en países como Alemania o Suiza su uso está prohibido. Es por ello que, en los últimos años se han realizado numerosos estudios para encontrar alternativas. Entre las más estudiadas se encuentran el ozono, los ácidos orgánicos, el ácido peroxiacético y el peróxido de hidrógeno (Ölmez y Kretzschmar, 2009).

5.2. Métodos físicos

Existe una gran variedad de métodos físicos entre los que se encuentran la luz ultravioleta (UV-C), la alta presión hidrostática, ultrasonidos, irradiación, campos eléctricos de alta intensidad, campos magnéticos oscilantes y destellos de luz blanca (Herrero y Romero de Avila, 2006). La aplicación de estos en frutas mínimamente procesadas se encuentra aún en fase de estudio. Actualmente, los métodos físicos más utilizados son el envasado en atmósfera modificada y temperaturas de refrigeración. La combinación de ambos permite alargar la vida útil de las frutas de IV gama, ya que evitan el desarrollo de microorganismos y retardan la senescencia del producto.

5.2.1. Envasado en atmósfera modificada

El envasado de atmósfera modificada se define como el envasado de un producto perecedero en una atmósfera que ha sido modificada para que su composición sea distinta a la del aire (0,03 % CO₂, 20,9 % O₂ y 78 % N₂) (Tewari, 2002). Aunque esta técnica se usa principalmente para mantener la calidad y mantener la vida útil de frutas y hortalizas mínimamente procesadas, también puede afectar a los microorganismos presentes.

La atmósfera se puede crear de forma **pasiva** mediante el uso de envases que permitan el intercambio de gases producidos por la respiración del producto y el exterior de este durante el tiempo de almacenamiento a una determinada temperatura, o bien de forma **activa** modificando la atmósfera interior desde el inicio del envasado retirando los gases de dentro del envase mediante materiales

Introducción

absorbentes o reemplazándolos con otros gases para lograr la composición deseada (Charles *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 1996; Werner y Hotchkiss, 2006). Aunque se han estudiado diferentes gases para crear atmósferas modificadas, los más comunes son el CO₂, el O₂ y el N₂. Se tiene que lograr un equilibrio interno que está determinado por el peso y la fisiología del producto (tasa de respiración, estado de madurez...), las condiciones ambientales como pueden ser la temperatura y la humedad relativa, y las propiedades del material de envasado (grosor del film, permeabilidad, densidad de perforación y el área superficial) (Caleb *et al.*, 2013).

El efecto de concentraciones bajas de O₂ y altas de CO₂ se traduce en una reducción de la tasa de respiración, síntesis de etileno, deshidratación, oxidación fenólica y la carga microbiana aeróbica. Sin embargo, estos efectos dependen del cultivar, de las estrategias de cultivo, del estado de madurez y del manejo en poscosecha (Ghidelli y Perez-Gago, 2016). Se sabe que concentraciones de CO₂ por encima del 5 % tienen efecto antimicrobiano. Sin embargo, bajas concentraciones de O₂ y altas de CO₂ pueden estimular el crecimiento de microorganismos anaerobios además de producir metabolitos que pueden originar mal sabor en el alimento (Soliva-Fortuny *et al.*, 2002b; Zagory y Kader, 1988).

Giménez *et al.* (2003) estudiaron el efecto de varios films con distinta permeabilidad en la microbiología y la calidad de la alcachofa mínimamente procesada y almacenada a 4 °C. Observaron que debido a la actividad respiratoria de la alcachofa y a la diferente permeabilidad de los films, se crearon diferentes atmósferas dentro de los envases. En los envases donde se alcanzó la anaerobiosis, la cantidad de microorganismos fue menor del límite legal establecido (7,7 log ufc/g de microorganismos totales), aunque la calidad de la alcachofa se vio afectada negativamente. Oms-Oliu *et al.* (2008c) en un ensayo realizado envasando pera cortada en distintas atmósferas (alta concentración de O₂, baja concentración de O₂ y atmósfera pasiva) detectaron que las peras conservadas en altas concentraciones de O₂ eran susceptibles del pardeamiento enzimático y aunque la firmeza no se veía afectada, se redujo el crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa*, una levadura que deteriora la fruta. Las peras almacenadas en atmósfera pasiva presentaron una vida útil más corta que en los otros casos. En un estudio realizado en fresas y frambuesas envasadas en atmósfera modificada pasiva y en alta concentración de O₂, se observó que bajo estas condiciones de atmósfera la población de *E. coli*, *Salmonella* spp. y

L. monocytogenes no aumentaron durante la vida útil de los productos (Siro *et al.*, 2006).

En general, en productos envasados con elevadas concentraciones de CO₂ se inhibe el crecimiento de la mayoría de los patógenos, aunque suele ir acompañado por temperaturas de refrigeración ya que una atmósfera modificada o un almacenamiento en frío por separado podrían ser insuficientes para evitar el crecimiento de los microorganismos patógenos. Por ejemplo, se sabe que *L. monocytogenes* no se ve afectada por elevadas concentraciones de CO₂ si dentro del envase la concentración de O₂ sigue siendo mayor del 5 % (Vermeulen *et al.*, 2013).

En el envasado de fruta mínimamente procesada se recomienda entre 1-5 % de O₂ para mantener la seguridad microbiológica y la calidad de la fruta, aunque por lo general se alcanzan niveles de O₂ menores del 1 % (Farber *et al.*, 2003). Hay que tener en cuenta que en ambientes anaeróbicos se pueden activar rutas fermentativas en las que se liberan metabolitos secundarios entre los que están, por ejemplo, el etanol y el acetaldehído. En un proceso normal de maduración, el etanol, el acetaldehído y los esteroides que se sintetizan a través de estos podrían contribuir al aroma natural de la fruta, sin embargo, en situaciones donde se produzca un estrés de la fruta, estos metabolitos podrían inhibir la síntesis de otros volátiles alterando el aroma y produciendo malos olores (Mattheis *et al.*, 1991). En un estudio realizado en peras mínimamente procesadas, se observó que atmósferas modificadas activas con altas concentraciones de O₂ no inhibieron la síntesis de metabolitos fermentativos, pero por otra parte bajas concentraciones de O₂ (atmósfera activa) o las atmósferas pasivas promovieron su acumulación dentro de los envases. En este estudio se observó que en los envases con atmósferas modificadas activas con baja concentración de O₂ se inhibió la producción de etileno y además se redujo la acumulación de CO₂ (Oms-Oliu *et al.*, 2008c).

5.2.2. Temperaturas de refrigeración

La refrigeración es la forma más práctica y efectiva para mantener las propiedades organolépticas, reducir el deterioro y extender la vida útil de los productos mínimamente procesados. La “*International Fresh-cut Produce Association*” recomienda mantener los productos de IV gama entre 1 y 4 °C para mantener la calidad y la seguridad microbiológica.

Introducción

Las temperaturas bajas disminuyen la tasa de respiración y además modifican la permeabilidad de los gases, condicionando de esta manera la composición dentro de los envases (Hertog *et al.*, 1998). Por otra parte, la temperatura de refrigeración inhibe el pardeamiento enzimático.

Del Rosario y Beuchat (1995) realizaron un estudio sobre el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en melón y sandía mínimamente procesados a diferentes temperaturas y observaron que el patógeno crecía tanto en melón como en sandía a 25 °C, sin embargo, a 5 °C la población se mantenía constante durante todo el tiempo de almacenamiento. Resultados similares obtuvieron Pao *et al.* (1998) en naranja, tanto *E. coli* O157:H7 como *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* crecieron a 24 °C, sin embargo a 4 y a 8 °C la población de *Salmonella* spp. se redujo y la de los otros dos patógenos se mantuvo constante. Sin embargo, *L. monocytogenes* es un microorganismo psicrótrofo, por lo que puede crecer a temperaturas de refrigeración. Así, Abadias *et al.* (2014) observaron crecimiento de este patógeno en melón mínimamente procesado a 5 °C, al igual que Colás-Medà *et al.* (2015) en pera y Alegre *et al.* (2010) en manzana.

Aunque las bajas temperaturas controlan el crecimiento de los microorganismos, hay que tener en cuenta la existencia de los microorganismos psicrótrofos, que gracias a cambios en la composición y en la estructura de la membrana plasmática pueden sobrevivir y crecer a temperatura de refrigeración.

5.3. Métodos biológicos

Aunque los productos químicos se usan habitualmente para controlar el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes en alimentos, los consumidores tienen una percepción negativa debido a que presentan aspectos controvertidos, ya que algunos de ellos pueden ser carcinogénicos, teratogénicos, tóxicos y, además, requieren períodos de tiempo bastante extensos para degradarse creando consecuentes problemas de contaminación ambientales (Faleiro, 2010). Por ese motivo se buscan alternativas para el control de microorganismos e incrementar así la seguridad alimentaria.

Las primeras interacciones antagonistas entre microorganismos probablemente daten de 1877 cuando Pasteur y Joubert (1877) observaron un efecto inhibitorio de bacterias comunes de la orina frente a *Bacillus anthracis*. El concepto de control biológico o bioconservación implica la utilización de organismos vivos o sus

componentes para la eliminación de patógenos, de manera que es un método que prolonga la vida útil y mantiene la seguridad microbiológica (Stiles, 1996).

Para ser buenos antagonistas, los microorganismos tienen que cumplir una serie de características, entre ellas están: no ser tóxicos (no ser un riesgo para la salud), ser estables durante el almacenamiento (por ejemplo, que mantenga la actividad inhibitoria durante la vida útil del alimento), ser efectivos frente a un amplio espectro de microorganismos, ser compatibles con las características fisiológicas y químicas de la matriz alimentaria, ser microorganismos aceptados dentro del marco normativo y no producir modificaciones en la calidad del alimento tales como mal olor o mal sabor (Jones *et al.*, 2011).

El control biológico se puede llevar a cabo de las siguientes maneras (Stiles, 1996):

1. Adicionando microorganismos que crecen rápidamente y que además pueden producir sustancias antagonistas (cultivos protectores o agentes de biocontrol).
2. Añadiendo esas sustancias antagonistas purificadas (por ejemplo bacteriocinas o ácido láctico).
3. Agregando líquidos de fermentación producidos por microorganismos antagonistas.
4. Incorporando bacterias ácido lácticas mesófilas como una protección en caso de ruptura de la cadena de frío.

Por lo general, los cultivos protectores ejercen su función ocupando el mismo nicho que los patógenos (compitiendo por el espacio y por los nutrientes), produciendo sustancias antimicrobianas, y en caso de algunas bacterias, en concreto las probióticas, también pueden actuar a nivel de intestino impidiendo que los patógenos se adhieran e invadan los enterocitos y activando una respuesta inmunitaria como barrera defensiva contra los patógenos (Fliss *et al.*, 2011).

Cabe destacar que, las estrategias de biocontrol no sustituyen las buenas prácticas de higiene, de forma que siempre se deben considerar como un parámetro adicional para mejorar la seguridad y la calidad del producto (Holzapfel *et al.*, 1995).

Introducción

5.3.1. Microbiota epífita

Los microorganismos aislados de plantas o frutas son probablemente los mejores candidatos como agentes de biocontrol ya que estarán mejor adaptados y deberían ser más competitivos que otros cultivos. Sin embargo, aunque hay evidencias de este control por parte de los microorganismos epífitos de las frutas y hortalizas, hay que tener en cuenta que el grado de inhibición va a depender del patógeno, del antagonista y de la matriz que se esté evaluando (Olanya *et al.*, 2015).

Diversos estudios han demostrado que los microorganismos propios de la fruta juegan un papel importante en la inhibición de patógenos mediante la competencia durante el almacenamiento. Por ejemplo, Bennik *et al.* (1996) observaron que *L. monocytogenes* crecía mejor en hojas de espinaca desinfectadas con agua clorada que en aquellas no desinfectadas. De esta manera, se podría deducir que los microorganismos epífitos desempeñan un papel importante en la inhibición de patógenos y que los desinfectantes químicos deberían ser optimizados para eliminar solo aquellos microorganismos que deterioran el alimento. Ukuku *et al.* (2004) observaron en melón mínimamente procesado que la microbiota propia controlaba el crecimiento de *L. monocytogenes* tanto a 5 como a 25 °C. Por su parte, Leverentz *et al.* (2006) demostraron que *Gluconobacter asaii*, *Candida* spp., *Discosphaerina fagi* y *Metschnikowia pulcherrima* eran efectivos contra *Salmonella enterica* serovar Poona y *L. monocytogenes* en manzana mínimamente procesada a 10 y 25 °C. En espinacas también se ha demostrado el control de *L. monocytogenes* por parte de la microbiota presente (Omac *et al.*, 2015). Olanya *et al.* (2015) observaron reducciones de *Salmonella serovars* de hasta 2 unidades logarítmicas en tomate en presencia de las cepas *Pseudomonas chlororaphis* y *Pseudomonas fluorescens* propias de la microbiota del tomate.

5.3.2. Bacterias ácido lácticas

Otro grupo de microorganismos que se han estado utilizando ampliamente para el control biológico en alimentos son las bacterias ácido lácticas. Las bacterias ácido lácticas constituyen un grupo de bacterias Gram-positivas que tienen cierta similitud en sus características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. Dentro de las bacterias ácido lácticas se incluyen los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (Von Wright y Axelsson, 2012). El género *Bifidobacterium*, aunque filogenéticamente no está relacionado con

las bacterias ácido lácticas, es a menudo incluido dentro de este grupo debido a sus similitudes en cuanto a bioquímica, fisiología y ecología se refiere (Adams, 1999).

Las bacterias ácido lácticas se han utilizado desde la antigüedad para controlar el crecimiento de microorganismos no deseados en alimentos de una manera instintiva, sin embargo, es en estos últimos años cuando su uso está adquiriendo un carácter científico. Las bacterias ácido lácticas han sido categorizadas según la FDA como GRAS (Generally Regarded As Safe) y la EFSA los ha incluido en la lista de QPS (Qualified Presumption of Safety), lo que quiere decir que son organismos seguros para el ser humano. El principal objetivo de estas bacterias es reducir la incidencia de enfermedades causadas por patógenos de transmisión alimentaria reduciendo la prevalencia o el número de estas bacterias y, en segundo lugar, disminuir los microorganismos alterantes e incrementar la vida útil del producto (Jordan *et al.*, 2014). Se han llevado a cabo numerosos estudios con bacterias ácido lácticas para demostrar su efecto antagonista. Por ejemplo, Siroli *et al.* (2015) demostraron el efecto antagonista de las cepas de *Lactobacillus plantarum* CIT3 y V7B3 en manzana y lechuga mínimamente procesadas, respectivamente, frente a *L. monocytogenes* y *E. coli*. Aunque una gran cantidad de bacterias ácido lácticas se pueden aislar de frutas y hortalizas, solo un bajo porcentaje de ellas tienen capacidad antagonista sobre patógenos de transmisión alimentaria. Así, Trias *et al.* (2008b) encontraron que de 523 bacterias ácido lácticas aisladas de frutas y hortalizas, 18 cepas, la mayoría *Leuconostoc* spp. y *Lactobacillus plantarum*, fueron capaces de mostrar actividad antagonista en manzana “Golden Delicious” y lechuga “Iceberg”, frente a distintos patógenos de transmisión alimentaria. Así, demostraron que el efecto antagonista dependía de la cepa utilizada y del patógeno evaluado, observando como se redujo el crecimiento de *E. coli* y de *S. typhimurium* y una inhibición el crecimiento de *L. monocytogenes*. Trias *et al.* (2008a), también observaron el efecto inhibitorio de 3 cepas de *Leuconostoc* spp. sobre *L. monocytogenes* en manzana y lechuga mínimamente procesadas.

El antagonismo de las bacterias ácido lácticas radica básicamente en la competición por nutrientes y en la producción de metabolitos con características antimicrobianas. Además de esto, las bacterias ácido lácticas ocupan nichos vitales impidiendo así la colonización de microorganismos no deseados (Holzapfel *et al.*, 1995). La utilización de bacterias ácido lácticas como agentes bioconservantes no solo tiene efecto en mejorar la seguridad microbiana en los

Introducción

alimentos, sino también como probióticos mejorando el balance de la microbiota e inhibiendo bacterias patógenas en el tracto intestinal (Soomro *et al.*, 2002).

5.3.3. Bacteriocinas

Otro método de control biológico son las bacteriocinas. Son pequeños péptidos con carácter antimicrobiano (Cotter *et al.*, 2005). Las bacteriocinas son producidas en general por bacterias Gram-positivas. Estos péptidos se agrupan atendiendo a si sufren modificaciones postraslacionales o no, y dentro de esta última se clasifican en 2 dependiendo del tamaño, existiendo así 3 clases diferentes. Se cree que el modo de acción de las bacteriocinas es crear poros en la membrana de la bacteria, de manera que den paso a la migración de iones y pequeñas moléculas a través de ellos (Nes *et al.*, 2011). Estas bacteriocinas poseen las características adecuadas para ser utilizadas en la bioconservación de alimentos: (1) son reconocidas como GRAS, (2) no son tóxicas para las células eucariotas, (3) son inactivadas por las proteasas digestivas, no influyendo, por tanto, en la microbiota intestinal, (4) son tolerantes a pH ácido y a sales biliares, (5) tienen un amplio espectro de acción contra numerosos microorganismos patógenos de transmisión alimentaria, (6) actúan, generalmente, a nivel de la membrana celular, no interfiriendo con los antibióticos, y (7) generalmente están codificadas por plásmidos, lo que facilita su manipulación genética (Galvez *et al.*, 2007).

Una de las bacteriocinas más estudiadas es la nisina. Así, por ejemplo, Siroli *et al.* (2016) observaron la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* en manzana mínimamente procesada aplicando *Lactococcus lactis* CMB21, el cual es productor de esta bacteriocina.

5.3.4. Bacteriófagos

Los bacteriófagos son virus bacterianos que invaden las células bacterianas, interfieren en el metabolismo de la bacteria y pueden o no causar lisis celular. Los bacteriófagos líticos son los más utilizados para eliminar los microorganismos patógenos de los alimentos. Hay numerosos estudios que proponen el efecto antagonista de los bacteriófagos en alimentos, incluidas las frutas mínimamente procesadas (Hudson *et al.*, 2005). Por ejemplo, se ha observado como la aplicación de bacteriófagos en melón inmediatamente redujo aproximadamente 2 unidades logarítmicas la población de *L. monocytogenes* y además continuó inhibiendo el crecimiento de este patógeno durante 2 días a 10 °C. Tras 7 días la población de *L. monocytogenes* se había reducido en 4 unidades logarítmicas con respecto al

tratamiento control (Leverentz *et al.*, 2003). Por otro lado, también se ha observado que los bacteriófagos ejercen efecto antagonista sobre *S. enterica* serovar Poona en melón (Leverentz *et al.*, 2001).

5.3.5. Factores que pueden afectar a la efectividad

Por lo general, las frutas mínimamente procesadas son medios ácidos que suponen un ambiente hostil para el microorganismo. Además, existen otros factores como pueden ser la temperatura, sustancias antimicrobianas, como los antioxidantes, o bien la atmósfera que se crea dentro del envase que pueden influir en su efecto antagonista frente a patógenos de transmisión alimentaria (Gálvez *et al.*, 2011). Es por ello que, se debe seleccionar con cautela el cultivo bioconservante atendiendo siempre a las características de la matriz alimentaria en la que se va a aplicar y a las condiciones de almacenamiento de esta para mantener su efectividad.

5.3.6. Posibles efectos adversos de los cultivos bioconservantes en la calidad sensorial y nutricional del producto

La mayoría de cultivos bioconservantes que hay descritos se corresponden con microbiota epífita, ya que no suponen un riesgo para el producto y tienen poco impacto en la matriz. Aunque uno de los criterios para la selección de los cultivos antagonistas es que no produzca alteraciones negativas en la calidad del producto, por lo general siempre se suelen esperar algunos mínimos cambios. El hecho de que el cultivo se mantenga en la matriz alimentaria y que tenga la capacidad de crecer en ella hace que se liberen metabolitos que podrían afectar negativamente al alimento. Durante el crecimiento, el microorganismo podría degradar componentes del tejido vegetal y se podría originar pérdida de textura con la consiguiente modificación organoléptica. El crecimiento de los cultivos antagonistas también podría traer consigo un cambio en el aspecto visual del producto que podría producir el rechazo por parte del consumidor (Gálvez *et al.*, 2012).

Sin embargo, en la mayoría de los estudios no se explicita si el cultivo antagonista produce desajustes en la calidad nutricional o físico-química o en la calidad sensorial del producto. Pero, y aunque son pocos los estudios, se ha comprobado que cuando se aplica un cultivo bioconservante a las heridas causadas por un patógeno en fruta, el antagonista disminuye o inhibe completamente el daño en el tejido causado por el patógeno sin causar un daño adicional (Trias *et al.*, 2008a).

Introducción

Salmeron *et al.* (2015) estudiaron los compuestos volátiles producidos por 3 cepas de lactobacilos diferentes en la fermentación de la cebada y la malta y observaron que el perfil de compuestos volátiles era diferente dependiendo de la matriz utilizada. El perfil de compuestos volátiles además puede proporcionar notas de sabor agradables para el consumidor, contribuyendo así al sabor y al aroma de determinados alimentos (Sreekumar *et al.*, 2009). En el caso del género *Lactobacillus*, se producen compuestos volátiles en la fermentación como pueden ser etanol, acetaldehído, acetona, diacetil y etil acetato, los cuales son responsables del sabor en determinadas bebidas y alimentos (Beshkova *et al.*, 2003; Salmeron *et al.*, 2015). Sin embargo, los mismos compuestos volátiles pueden causar mal sabor y olor en algunas matrices alimentarias (Kopsahelis *et al.*, 2007).

Es importante conocer la evolución de los parámetros de calidad de los productos mínimamente procesados como el olor, el sabor, el color y la textura para relacionarlos con las características microbiológicas y fisiológicas del producto durante el tiempo de almacenamiento.

6. Control biológico mediante la aplicación de la bacteria *Pseudomonas graminis* CPA-7

6.1. Características generales

Pseudomonas graminis es una bacteria Gram-negativa aerobia estricta que se describió por primera vez en 1999 (Behrendt *et al.*, 1999). Es un bacilo no formador de esporas, móvil a temperaturas de entre 15-20 °C. Crece en un rango de temperatura de 4 a 40 °C, aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 25 °C. Forma colonias de aspecto amarillento (Crovadore *et al.*, 2016).

La cepa *P. graminis* CPA-7 fue aislada de la superficie de manzanas (Alegre *et al.*, 2013b). Esta cepa se encuentra depositada en la institución de depósito "Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)" de Utrech (Holanda) con el número CBS124167. Se han concedido la patente a nivel europeo (EP 2886665) (Viñas *et al.*, 2017) y la patente estadounidense (US8735136) (Viñas *et al.*, 2014).

6.2. Estudios de biocontrol

Se han realizado diversos estudios para evaluar el efecto antagonista de *P. graminis* CPA-7 frente a patógenos de transmisión alimentaria en fruta mínimamente procesada y cómo podría verse afectada la calidad de esta. Alegre *et al.* (2013b), realizaron un estudio en el que evaluaron la efectividad de *P. graminis* CPA-7 frente a *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y *L. innocua* en cilindros de manzana y melocotón almacenando la fruta en aire (21,0 % de O₂ y 0,0 % de CO₂) durante 2 días a 20 °C y, en el caso de la manzana, también a 5 °C durante 10 días frente a *E. coli* O157:H7. Los resultados de este estudio revelaron que tras 2 días de conservación de la fruta a 20 °C, *P. graminis* CPA-7 redujo 4,5 unidades logarítmicas la población de *E. coli* O157:H7, 4,7 unidades logarítmicas la población de *Salmonella* y 5,9 unidades logarítmicas la de *L. innocua* en manzana. En melocotón se dieron valores de reducciones menores en manzana, 1,8 unidades logarítmicas en las poblaciones de *E.coli* O157:H7 y *Salmonella* y de 0,9 unidades logarítmicas en la de *L. innocua*. El efecto antagonista a 5 °C no fue inmediato, sino que se produjo tras días 6 de almacenamiento de la manzana, observándose una reducción de aproximadamente 3,5 unidades logarítmicas de la población de *E. coli* O157:H7 en presencia de *P. graminis* CPA-7.

Posteriormente, Alegre *et al.* (2013a) aplicaron el agente de biocontrol *P. graminis* CPA-7 en un estudio utilizando manzana mínimamente procesada y simulando condiciones comerciales (antioxidante y atmósfera modificada) a 5 y 10 °C. En las condiciones ensayadas *P. graminis* CPA-7 no mostró efectividad cuando se inoculó a una concentración de 10⁵ ufc/mL a ninguna de las temperaturas evaluadas. Sin embargo, cuando se aplicó a una concentración superior (10⁷ ufc/mL) controló el crecimiento de *Salmonella* a 10 °C, con una reducción con respecto del control de aproximadamente 2 unidades logarítmicas y, con respecto a la población de *L. monocytogenes*, esta se vio reducida significativamente en presencia del antagonista al final del ensayo a ambas temperaturas evaluadas. *P. graminis* CPA-7 aumentó su población aunque de forma más ligera a 5 °C que a 10 °C.

Abadias *et al.* (2014), por su parte, estudiaron el efecto antagonista de *P. graminis* CPA-7 en melón mínimamente procesado tratado con una solución antioxidante y envasado en atmósfera modificada. No observaron el efecto antagonista en ninguno de los dos patógenos tras 8 días de almacenamiento del melón mínimamente procesado en atmósfera modificada a 5 °C, aunque sí observaron una reducción de aproximadamente 1 unidad logarítmica en la población de

Introducción

L. monocytogenes en presencia de *P. graminis* CPA-7 y cuando la fruta se conservó en aire. A 10 °C no observaron diferencias significativas entre las poblaciones de los patógenos inoculados solos o en presencia de *P. graminis* CPA-7 en la fruta envasada bajo atmósfera modificada y conservada durante 8 días. Sin embargo, cuando la fruta se envasó en aire, se observaron valores de reducción mayores de 4 unidades logarítmicas tanto en *Salmonella* como en *L. monocytogenes*. La población de *P. graminis* CPA-7 creció en todas las condiciones evaluadas, sin embargo, igual que en manzana mínimamente procesada, creció de forma más rápida a 10 °C.

Por otra parte, Plaza *et al.* (2016) determinaron el efecto de *P. graminis* CPA-7 sobre la calidad del melón mínimamente procesado y las propiedades antioxidantes de la fruta simulando la aplicación comercial (antioxidante y atmósfera modificada). En este estudio se observó que el tratamiento con *P. graminis* CPA-7 no afectó a las actividades antioxidantes evaluadas y las propiedades nutricionales se mantuvieron durante la vida útil de la fruta. También observaron que los principales parámetros físicos y de calidad visual se conservaron mejor bajo atmósfera modificada que en la fruta envasada en aire.

6.3. Modo de acción

Se ha estudiado el modo de acción de *P. graminis* CPA-7 analizando la formación de biofilms y producción de alginato, las actividades proteolíticas, hemolíticas y biosurfactantes, la actividad antimicrobiana en medio sólido y la asimilación de nutrientes (Collazo *et al.*, In Press). Sin embargo, de los resultados obtenidos no se pudo ver claramente cuál es el modo de acción de la bacteria. *P. graminis* CPA-7 no fue capaz de formar biofilms y la producción de alginato fue también negativa, por lo que la adherencia y competición por el espacio del medio no podrían explicar su capacidad antagonista. En el análisis del efecto antagonista de la bacteria utilizando los sobrenadantes obtenidos después de su cultivo en diferentes medios líquidos no se reveló un efecto sobre los patógenos evaluados, de forma que se podría afirmar que los metabolitos producidos por la bacteria no son efectivos frente a los patógenos en las condiciones ensayadas. Tampoco se obtuvo información relevante sobre la asimilación de nutrientes y su posible competencia por el nicho con otras bacterias. Sin embargo, el hecho de no formar biofilms, ni producir biosurfactantes o actividad hemolítica o proteolítica proporciona ventajas para que se pueda incluir en la lista de microorganismos QPS.

7. El potencial de los microorganismos probióticos como bioconservantes

7.1. Generalidades de los microorganismos probióticos

La palabra probiótico proviene del griego “*pro bios*” que significa “*a favor de la vida*”. Según la Organización Mundial de la Salud, los organismos probióticos son “microorganismos vivos que al administrarse en las cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del hospedador” (FAO/WHO, 2001).

Metchnikoff (1907) fue el primero en describir el papel beneficioso por parte de algunas bacterias de la microbiota intestinal y sugirió que “la dependencia de los microorganismos intestinales en los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la microbiota de nuestro organismo y reemplazar a los microbios nocivos por microbios útiles”. Este concepto que un día expuso Metchnikoff es a lo que ahora nosotros llamamos probióticos.

El tracto gastrointestinal humano es una superficie expuesta al exterior y además se ve continuamente afectado por la dieta y los antígenos derivados de la microbiota intestinal. El tracto gastrointestinal se encuentra colonizado por alrededor de 10^{13} - 10^{14} microorganismos (Kerckhoffs *et al.*, 2006), de los cuales se pueden diferenciar al menos 80 géneros y 1.800 filotipos (Rajilić-Stojanović *et al.*, 2009). La prevalencia de bacterias en las distintas partes del tracto gastrointestinal depende del pH, de la peristalsis, del potencial redox de cada tejido, de la adhesión bacteriana, de la simbiosis entre microorganismos, de la secreción de mucinas, de la disponibilidad de nutrientes, de la dieta y de la capacidad antagonista bacteriana (Kerckhoffs *et al.*, 2006). A parte de su implicación en la asimilación de nutrientes y en la eliminación de desechos, el tracto gastrointestinal juega un papel importante en la protección frente a factores nocivos como pueden ser los medicamentos, las toxinas y los organismos infecciosos. Esta función la lleva a cabo, bien mediante mecanismos inmunológicos o bien, no inmunológicos. Es en esta última opción en la que la microbiota intestinal parece ser que tiene un mayor protagonismo actuando como una barrera no específica contra la invasión. Numerosos estudios realizados en estos últimos años han puesto en evidencia que la microbiota propia del intestino tiene propiedades que podrían utilizarse para mejorar la salud y paliar ciertas enfermedades (Ng *et al.*, 2009).

Introducción

Los probióticos tienen efectos beneficiosos para el hospedador ejerciendo su función a nivel intestinal, entre ellos se encuentran la modulación del sistema inmune (función antiinflamatoria y antialérgica, protección frente a diferentes enfermedades), la potenciación de la barrera intestinal impidiendo la colonización de patógenos, el efecto anticarcinogénico y antimutagénico (Soccol *et al.*, 2010). Algunas de ellas se tratarán con más detalle a continuación.

Los alimentos enriquecidos con microorganismos probióticos se engloban dentro de los alimentos funcionales. Un alimento funcional es aquel que se ha demostrado que satisfactoriamente afecta positivamente a una o más funciones vitales, más allá de los efectos nutricionales adecuados, de forma que sea relevante tanto para mejorar la salud como para reducir el riesgo de enfermedad. Un alimento funcional debe seguir cumpliendo su función de alimento y debe demostrar su efecto en cantidades en las que normalmente es ingerido en la dieta: no es una píldora o cápsula, sino que forma parte del alimento en sí (Diplock *et al.*, 1999).

El Reglamento (CE) nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos modificado por los Reglamentos (CE) nº 107/2008, (CE) nº 109/2008, (CE) nº 116/2010, (CE) nº 1169/2011, (CE) nº 1047/2012 y (CE) nº 907/2013 es el que, de cierta manera, armoniza la legislación de los miembros estado, y por otra parte, protege al consumidor de información engañosa, pérdidas económicas o problemas de salud.

7.2. Criterios de selección de los probióticos

Aunque dos de los criterios fundamentales para la selección de las cepas probióticas son la resistencia la ácido y a las sales minerales y la capacidad para adherirse a las células intestinales (Argyri *et al.*, 2013; Saarela *et al.*, 2000; Salminen *et al.*, 1996; Savage, 1992), existen otros criterios relacionados con la seguridad y la estabilidad, además de ciertos aspectos funcionales y fisiológicos que un microorganismo debe cumplir para que pueda ejercer su función como probiótico (Soccol *et al.*, 2010). Saarela *et al.* (2000) sintetizaron y clasificaron los criterios de selección de los probióticos en tres grupos: seguridad, funcionales y aspectos tecnológicos.

Los criterios de seguridad que se deben tener en cuenta son:

- Microorganismos aislados del tracto gastrointestinal humano, sobre todo si van a ser administrados a personas.
- Cepas no patógenas.
- No relacionados con desórdenes del tracto gastrointestinal.
- Microorganismos incapaces de deshidroxilar las sales biliares.
- Ausencia de genes de resistencia a antibióticos.

Los criterios funcionales están relacionados principalmente con el modo de acción en el intestino y se suelen establecer con el uso de métodos *in vitro*.

- Tolerancia al jugo gástrico.
- Tolerancia a las sales biliares, importante para su establecimiento en el intestino.
- Adherencia al epitelio intestinal y persistencia en el tracto gastrointestinal.
- Estimulación y supresión del sistema inmune, pero no efecto proinflamatorio.
- Capacidad antagonista contra patógenos.
- Propiedades anticarcinogénicas y antimutagénicas.

En los criterios tecnológicos se recogen aquellos aspectos a tener en cuenta en la industria alimentaria cuando se empleen microorganismos beneficiosos:

- Actividad y viabilidad en los productos durante el tiempo de almacenamiento.
- Adherencia a la matriz e invasión.
- Resistencia a pH ácidos.
- Tolerantes al O₂.
- Resistentes a conservantes.
- Buenas propiedades sensoriales.
- Fáciles de producir a gran escala.

Aunque muchos de los probióticos conocidos se han aislado de la microbiota intestinal humana, no todos los probióticos necesariamente forman parte de ella.

Introducción

Se han propuesto como probióticos muchos grupos de microorganismos entre ellos levaduras como *Saccharomyces*, mohos como *Aspergillus*, bacterias como *E. coli*, sin embargo, las bacterias ácido lácticas son uno de los grupos más comunes utilizados como probióticos. Los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son los probióticos más utilizados en alimentos (Arques *et al.*, 2015).

Existen numerosas cepas de probióticos que se comercializan como cultivos probióticos. Entre ellos se encuentran *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* Bb-12 y *Lactobacillus rhamnosus* GG (Soccol *et al.*, 2010).

7.3. Mecanismos de acción de los probióticos en el huésped

El efecto de la mayoría de los mecanismos de acción solamente está probado en estudios *in vitro*, por lo que estos resultados deberían ser confirmados por estudios *in vivo*. Los mecanismos por los cuales los probióticos ejercen su efecto antagonista contra otros microorganismos básicamente incluyen la competición por sustratos, el antagonismo directo por la liberación de sustancias inhibitoras, la exclusión competitiva y la activación del sistema inmune del hospedador (O'Toole y Cooney, 2008) (Fig. 4).

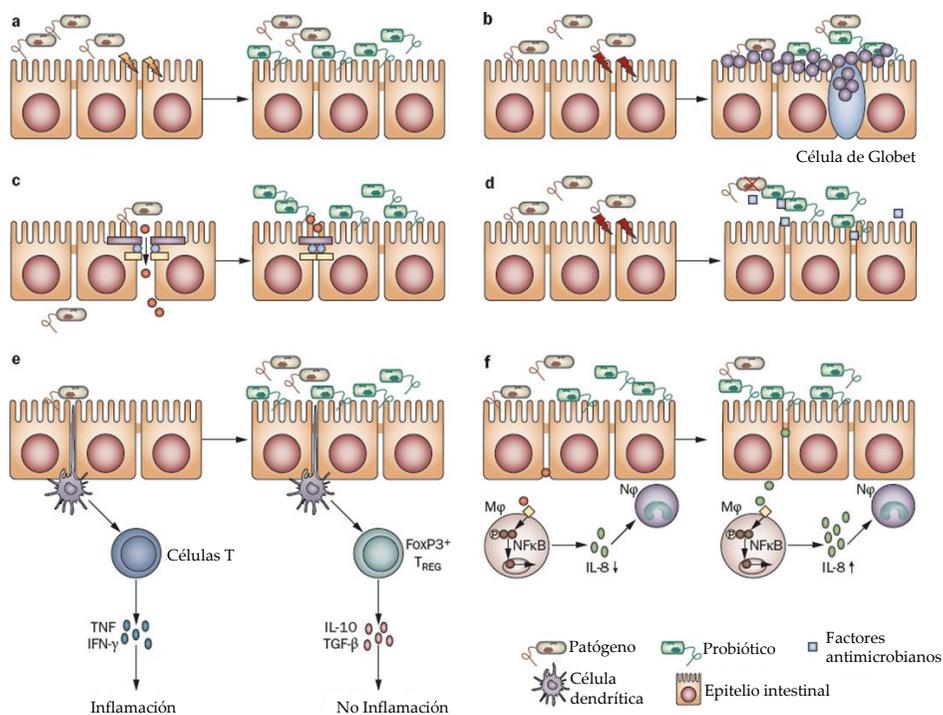


Figura 4. Esquema de los principales mecanismos de acción de los probióticos en el intestino. a) Impidiendo de la invasión de los microorganismos patógenos e las células del epitelio intestinal bloqueando los sitios de adhesión o b) provocando la secreción de mucina por parte de las células de Goblet. c) Manteniendo la permeabilidad intestinal. d) Produciendo sustancias antimicrobianas. e) Estimulando el sistema inmune innato a través de las células dendríticas. f) Previendo una respuesta del sistema inmune innato. Abreviaciones: Mφ, macrófago; Nφ, neutrófilo. (Imagen tomada y adaptada de Gareau et al., 2010).

A grandes rasgos, varios autores han agrupado los mecanismos de acción de la siguiente manera (Corr *et al.*, 2009; Oelschlaeger, 2010):

1. Modulación del sistema inmune

Los probióticos pueden modular las defensas del huésped incluyendo tanto el sistema inmune innato como el adquirido (Gill *et al.*, 2000). Este modo de acción es importante para la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas, pero también para el tratamiento de la inflamación (crónica) del tracto digestivo. Las bacterias probióticas regulan el sistema inmune induciendo citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β , a la vez que reducen la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF y IFN- γ (Corr *et al.*, 2009). Los probióticos pueden modular el sistema inmune mediante metabolitos secundarios, componentes de la pared celular, e incluso ADN. Por tanto, los efectos se pueden obtener incluso con bacterias muertas o bien con componentes derivados de estas como fragmentos de peptidoglicano o de ADN (Zhang *et al.*, 2014). Al activar el sistema inmune del hospedador, protege al hospedador de ciertas enfermedades como, por ejemplo, se demostró que el hecho de que *Lactobacillus rhamnosus* GG potenciara el sistema inmune, podría ser utilizado como una terapia para los enfermos de Crohn (Baldwin *et al.*, 2007).

Además, también estimulan el sistema inmune de manera que este reacciona en contra de microorganismos patógenos en el intestino, por ejemplo, Shu y Gill (2001) demostraron que *Bifidobacterium lactis* HN019 redujo la infección causada por *E. coli* O157:H7 sugiriendo que podría estar relacionada con la activación del sistema inmune proporcionada por el probiótico. En otro estudio, Corr *et al.* (2007a) demostraron una reducción significativa de la IL-8 y un aumento de la IL-10 en las células epiteliales intestinales (línea celular C2Bbe1) tras haberlas tratado con distintos probióticos antes de la infección con *L. monocytogenes*. Resultados similares se obtuvieron en otro estudio *in vitro*, en el cual *Bifidobacterium infantis* 35624 and *Lactobacillus salivarius* UCC118 redujeron la respuesta proinflamatoria

Introducción

inducida por *Salmonella typhimurium* (O'Hara *et al.*, 2006). Otros estudios también han puesto en evidencia que los probióticos estimulan la producción de IgA y activan las células T reguladoras. De forma que, se ha demostrado, en un estudio humano, que los niveles de IgA anti-poliovirus aumentaron al tratar al administrar a los individuos una preparación de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 (Fukushima *et al.*, 1998).

2. Exclusión competitiva (bloqueo de los sitios de adhesión)

Los probióticos también pueden tener un efecto directo sobre otros microorganismos comensales o patógenos. Esta acción en muchos casos es de importancia para prevenir el tratamiento de infecciones y reestablecer el equilibrio en el intestino. La exclusión competitiva se puede llevar a cabo compitiendo por los sitios de unión en el intestino, o bien estimulando la función de la barrera epitelial.

Diferentes estudios han demostrado la capacidad que tienen los probióticos de unirse a la superficie de las células epiteliales del intestino, además, algunos de ellos han probado que los probióticos aislados del intestino humano se adhieren mejor que los que se aíslan de otras fuentes (Duary *et al.*, 2011), es esta misma capacidad lo que hace posible que se unan a los sitios específicos de unión de los enteropatógenos (Gueimonde *et al.*, 2007; Servin, 2004).

Se sabe que también existe una exclusión competitiva indirecta. Por ejemplo, Johnson-Henry *et al.* (2008) demostraron que al tratar células que simulaban el epitelio intestinal con *Lactobacillus rhamnosus* GG se producían menos cambios morfológicos y disminuían el número de lesiones A/B inducidas en respuesta a la infección por *E. coli* O157:H7, impidiendo así el desarrollo de los mecanismos de virulencia de esta bacteria.

Los microorganismos probióticos son capaces de inducir cambios fisiológicos en los que se ven involucrados tanto la inducción como la sobreexpresión de mucina en el epitelio intestinal. La mucina actúa formando una barrera físico-química que protege a las células epiteliales de daños químicos, enzimáticos, mecánicos y microbiológicos y además limita la adhesión y, por tanto, la invasión de microorganismos (Mack *et al.*, 2003). Así, se ha observado que la adhesión de distintas cepas de *Lactobacillus* induce la secreción extracelular de mucina en la línea celular que simula el epitelio intestinal HT29. Utilizando la línea celular Caco-2, se comprobó que *L. casei* LGG indujo la expresión del gen MUC2 en las

células, produciéndose la secreción de mucina e impidiendo la translocación bacteriana en el epitelio intestinal (Mattar *et al.*, 2002).

3. Producción de ácido y secreción de sustancias inhibidoras

El antagonismo directo básicamente consiste en la liberación de sustancias. La producción de **ácidos orgánicos** (en su mayoría ácido láctico) forma parte del metabolismo de estas bacterias. Estos hacen que se reduzca el pH del medio, además de que al disociarse pueden penetrar dentro las células patógenas acidificando el citoplasma y ralentizando la actividad metabólica de la bacteria. En un estudio realizado por Asahara *et al.* (2004), en ratones, demostraron que los animales pretratados con una cepa de *Bifidobacterium breve* y que posteriormente fueron tratados con *E. coli* O157:H7 no sufrieron pérdida de peso ni murieron, al contrario que lo que pasaba con aquellos animales a los que no se les administraba el probiótico. Este hecho se pensó que podría haber sido debido a que la sinergia entre la producción de ácido acético por *B. breve* y la consecuente bajada de pH intestinal inhibía la producción de la toxina Shiga por parte del patógeno. La producción de ácido láctico y otras sustancias de naturaleza proteínica por las cepas *Lactobacillus rhamnosus* DR20 y *Bifidobacterium lactis* DR10 impidió la infección por *E. coli* O157:H7 en células HT-29 y Caco-2 (Gopal *et al.*, 2001).

El **peróxido de hidrógeno** se forma durante el crecimiento de las bacterias ácido lácticas en presencia de O₂ (Todoriki *et al.*, 2001). Es una molécula tóxica para muchos microorganismos, entre ellos patógenos de transmisión alimentaria (Garner *et al.*, 2006). Por ejemplo, Pridmore *et al.* (2008) confirmaron la capacidad de *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 de producir peróxido de hidrógeno *in vitro* además de las propiedades inhibidoras que tenía esta molécula frente a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344.

La **reuterina** es producida por *Lactobacillus reuteri* bajo condiciones anaeróbicas y en presencia de glicerol, y es efectiva contra muchas bacterias, mohos y levaduras (Axelsson *et al.*, 1989). La **reuteroclicina** es otra molécula antimicrobiana producida por una cepa de *L. reuteri* LTH2584 que solo tiene efecto negativo sobre bacterias Gram-positivas (Ganzle *et al.*, 2000).

Diversos estudios han demostrado que la producción de **bacteriocinas** por parte de los probióticos en el intestino provoca la supresión de las infecciones de patógenos en el intestino. En los últimos años se han hecho numerosos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* en los que se demuestra el efecto protector que tienen

Introducción

estas moléculas contra patógenos en el intestino (Diakogiannis *et al.*, 2013; Lou y Yousef, 1997; Roche *et al.*, 2005). Corr *et al.* (2007b) observaron que *Lactobacillus salivarius* UCC118 tenía la capacidad de producir la bacteriocina ABP118 que protegía frente a *L. monocytogenes*. Al utilizar un mutante de esta bacteria no productora de la dicha bacteriocina, se observó que no ofrecía protección frente al patógeno. De forma que se concluyó que existía un antagonismo directo entre la bacteria probiótica y el patógeno mediado por tal bacteriocina.

4. Otros mecanismos de acción

El efecto de los probióticos también podría estar basado en acciones que afecten a productos microbianos como las toxinas o productos del propio huésped como pueden ser las sales biliares y los ingredientes de los alimentos. Estas acciones resultarían en la inactivación de toxinas y desintoxicación del huésped y de los componentes de los alimentos en el intestino. Se sabe también que hay probióticos que inhiben los factores de virulencia de los patógenos. Por ejemplo, Carey *et al.* (2008) demostraron que la incubación conjunta de *L. rhamnosus* GG con *E. coli* O157:H7 redujo la expresión de los genes *stx* que codifican para la toxina Shiga.

Sabiendo el modo en el que los probióticos actúan a nivel intestinal, podría ser extrapolable al control biológico que pueden ejercer en una matriz alimentaria contra patógenos.

7.4. Utilización de probióticos como agentes de biocontrol

Un requisito imprescindible para el uso de probióticos como bioconservantes en alimentos es que deben ser resistentes al procesamiento y mantenerse viables durante la vida útil del producto (10^6 ufc/g o mL) (Chaikham *et al.*, 2012). En el caso de la fruta cortada, los probióticos deberían sobrevivir en condiciones de bajo pH, baja temperatura, baja concentración de O₂ y alta de CO₂ y, además, ser compatibles con los antioxidantes utilizados. De esta manera, hay estudios enfocados al uso de probióticos para enriquecer alimentos y comprobar si, de alguna manera, modifican la calidad de estos. En un estudio realizado en melón mínimamente procesado se evaluó la viabilidad de *L. rhamnosus* HN001 observándose que después de 15 días de almacenamiento a 6 °C se mantuvo por encima del nivel mínimo para ser considerado probiótico (de Oliveira *et al.*, 2014). Resultados similares obtuvieron Rößle *et al.* (2010a) y Alegre *et al.* (2011) en manzana mínimamente procesada enriquecida con *L. rhamnosus* GG. Estos

hallazgos demuestran que las frutas mínimamente procesadas podrían ser una nueva opción como alimentos funcionales ricos en probióticos.

Los probióticos, en general, se han utilizado desde hace mucho tiempo en productos lácteos y derivados (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001). Sin embargo, el hecho de que se sepa que los probióticos ejercen un efecto negativo contra ciertos microorganismos, entre ellos los patógenos de transmisión alimentaria, hace que se potencie el estudio y su posible uso en el control biológico de productos vegetales mínimamente procesados. En los últimos años, numerosos estudios han puesto en evidencia la capacidad antagonista de los probióticos contra patógenos de transmisión alimentaria en frutas y hortalizas mínimamente procesadas, además de que dependiendo del tipo de probiótico y de la matriz alimentaria estudiados el efecto antagonista podría verse afectado. Por ejemplo, Russo *et al.* (2014) en un estudio llevado a cabo en piña mínimamente procesada demostraron que *L. plantarum* B2 fue capaz de controlar el crecimiento tanto de *E. coli* O157:H7 como *L. monocytogenes*, sin embargo *L. fermentum* PBCC11.5 solo mostró efecto antagonista frente a *L. monocytogenes*. Este hecho se podría atribuir a las diferentes propiedades coagregativas de ambos probióticos con los patógenos estudiados (Lacerda-Ramos *et al.*, 2015).

De forma similar a lo que ocurre en el tracto gastrointestinal, en la matriz alimentaria, los probióticos pueden controlar el desarrollo de microorganismos patógenos con estrategias diferentes:

1. Competición por el mismo nicho

En la competición por el nicho, los probióticos podrían bloquear los sitios de unión de los patógenos a la matriz alimentaria (**exclusión competitiva**), de forma similar a como actúan a nivel intestinal. Por otra parte, otro de los factores limitantes en el éxito del microorganismo en colonizar un nicho es la **competencia por los nutrientes**, como puede ser la capacidad que tiene que utilizar las fuentes de carbono disponibles de manera más rápida que los patógenos. En un estudio realizado en ratones se observó como la presencia de dos bacterias probióticas alteraba la expresión de genes de una bacteria de la microbiota intestinal relacionados con el metabolismo de carbohidratos (Sonnenburg *et al.*, 2006). De forma que, de este hecho, se puede deducir que los probióticos pueden competir con otros microorganismos por los mismos nutrientes, alterando la dinámica de utilización de carbohidratos.

Introducción

2. Producción de sustancias antimicrobianas: antagonismo directo

Un ejemplo de este mecanismo de acción en alimentos sería la producción de **ácidos orgánicos**. En un estudio realizado tratando lechuga mínimamente procesada con diferentes ácidos (acético, propiónico, cítrico y láctico) como desinfectantes, se observó que el ácido láctico fue el más efectivo en el control de *L. monocytogenes* (Samara y Koutsoumanis, 2009).

Añadir probióticos a los productos vegetales mínimamente procesados hace que potencialmente se reduzca el desarrollo de microorganismos patógenos en la matriz alimentaria y, por otro lado, que una vez ingerido el alimento y estos microorganismos alcancen el intestino puedan llevar a cabo su papel como probióticos. Aunque en la literatura es bastante controvertida la cantidad de células viables que hay que tomar para que ejerzan su función como probiótico a nivel intestinal, se estiman alrededor de 10^6 - 10^8 ufc/g o 10^8 - 10^{10} ufc/día (Champagne *et al.*, 2011). Pocos son los estudios que evalúan la capacidad antagonista de los probióticos a nivel intestinal contra patógenos de transmisión alimentaria después de un período de adaptación en una matriz alimentaria y tras una simulación digestiva.

Sin embargo, los probióticos podrían verse afectados por el bajo pH, la temperatura, la alta presión osmótica y altos niveles de oxígeno durante el almacenamiento del producto (Endo *et al.*, 2014; Kailasapathy, 2006), además de estar expuestos altas concentraciones de ácido en el estómago y sales biliares en el intestino. De manera que la opción de la microencapsulación de estas bacterias está siendo cada vez más considerada. La microencapsulación es un proceso por el cual las células bacterianas son retenidas dentro de una matriz o una membrana a modo de cápsula (Pimentel-González *et al.*, 2009). Estas microcápsulas pueden crear un ambiente anaerobio más adecuado para el microorganismo, además de protegerlo de factores externos como los cambios de pH y la temperatura y por consiguiente sobrevivir mejor a las condiciones adversas del medio hasta llegar al intestino.

Hoy en día, los consumidores son conscientes del vínculo que existe entre el estilo de vida, la dieta y la buena salud, lo que explica la demanda de productos que son capaces de mejorar la salud más allá de proporcionar las necesidades nutricionales básicas. De esta manera, en los últimos años se está ampliando el uso de probióticos en alimentos no derivados de la leche, como son los productos de origen vegetal. Las frutas enriquecidas con probióticos pueden considerarse una alternativa a los productos lácticos portadores de probióticos para

vegetarianos, veganos y personas que son intolerantes a la lactosa o alérgicas a las proteínas de la leche (Gupta y Abu-Ghannam, 2012).

7.5. *Lactobacillus rhamnosus* GG

L. rhamnosus GG se aisló en 1983 del tracto gastrointestinal humano. Es uno de los probióticos más estudiados, y del que se sabe que tiene numerosas propiedades beneficiosas para la salud del hospedador. Saarela *et al.* (2000) resumieron estas propiedades en base a la bibliografía en las siguientes: disminución de la actividad de las enzimas fecales, reducción en niños de la diarrea asociada al tratamiento con antibióticos, tratamiento y prevención de rotavirus y diarrea acuosa en niños, tratamiento de la diarrea recidiva causada por *Clostridium difficile*, modulación del sistema inmune y alivio de los síntomas de la dermatitis en niños.

Se ha observado que *L. rhamnosus* GG es efectivo frente a *L. monocytogenes* en manzana mínimamente procesada y conservada durante 28 días a 5 y 10 °C, produciéndose una reducción de 1 unidad logarítmica en la población del patógeno (Alegre *et al.*, 2011).

También se ha estudiado el efecto de *L. rhamnosus* GG en la calidad de la manzana mínimamente procesada (color, contenido en sólidos solubles, acidez titulable, pH y firmeza). Los resultados obtenidos demostraron que la calidad de la manzana no se vio afectada negativamente por estar en contacto con el probiótico durante 10 días a 2-4 °C (Alegre *et al.*, 2011; Röösle *et al.*, 2010a).

El hecho de que presente estas características, hacen de esta bacteria un microorganismo interesante para su uso en la industria alimentaria con el desarrollo de alimentos funcionales. Además, este microorganismo se encuentra dentro de la lista QPS, por tanto, se puede utilizar como tal (Ricci *et al.*, 2017).

8. Interacción de *L. monocytogenes* y ambiente

El hecho de que *L. monocytogenes* sea un microorganismo psicrótrofo la convierte en una bacteria de importante relevancia en los brotes de toxiinfección alimentaria, ya que durante el tiempo de almacenamiento a temperaturas de refrigeración puede crecer y alcanzar la mínima dosis infectiva para causar la enfermedad. Este microorganismo es capaz de responder al estrés del medio y esto le permite desarrollar una serie de mecanismos de adaptación que son los

Introducción

que le proporcionan al patógeno la habilidad de persistir en tan variados ambientes, lo que lo convierte en un microorganismo ubicuo. Esta cualidad hace también posible que le sea más fácil el paso de la matriz alimentaria al tracto gastrointestinal, lo cual es necesario para infectar al individuo en cuestión.

Los microorganismos están expuestos a distintos tipos de estrés a lo largo de toda la cadena de producción del alimento procesado hasta llegar a la digestión del propio alimento. El término estrés se define como cualquier perturbación en el medio que reduce la tasa de crecimiento (estrés leve o subletal) o que afecta negativamente sobre la supervivencia celular (estrés severo o letal). Un ejemplo de estrés letal o choque ácido se da cuando el microorganismo pasa del alimento al estómago, donde se encuentra de repente con una bajada brusca del pH. Por su parte, un estrés subletal serían, por ejemplo, los cambios graduales de pH que experimentan los microorganismos en las fermentaciones de los alimentos. Los microorganismos encuentran un amplio rango de tipos de estrés subletal en los alimentos y en el ambiente. Estos estreses podrían inducir una respuesta adaptativa en los microorganismos que los hiciera resistentes a posibles estreses letales. Por lo general, los microorganismos frente al estrés subletal actúan de la siguiente manera:

1. Produciendo proteínas que reparan el daño, mantienen la célula o eliminan el agente que ha causado estrés.
2. Aumentando de forma transitoria la resistencia o la tolerancia a esos factores deletéreos.
3. Entrando en un estado de latencia, por ejemplo, formando esporas o pasando a estado viable no cultivable.
4. Evadiendo las defensas del hospedador.
5. Desarrollando mutaciones adaptativas.

El hecho de que se desarrollen respuestas adaptativas al estrés puede ser, por una parte, una ventaja si el microorganismo adaptado es beneficioso, ya que sería más resistente, pero puede ser también un aspecto negativo en el caso de que el microorganismo adaptado sea, por ejemplo, un patógeno de transmisión alimentaria.

Los cambios adaptativos a condiciones extremas o condiciones cambiantes del medio, entre las que se incluyen la temperatura, la osmolaridad, la acidez y la presencia de conservantes, requieren el empleo de grandes cantidades de energía

y por lo general durante esta adaptación las células detienen su división. Este hecho presenta consecuencias importantes para la intoxicación por el consumo de alimentos contaminados o el deterioro microbiano de los alimentos; y es que como la fase de latencia (período donde tiene lugar la aclimatación y adaptación del microorganismo) antes del crecimiento se extiende, la tasa de crecimiento disminuye y, por tanto, el número de células finales disminuye también. Sin embargo, se ha observado una respuesta a estrés en un gran número de bacterias, y que en estos casos, la fase de latencia es más corta (Beales, 2004).

En el estómago, la presencia de jugos gástricos, los cuales presentan un bajo pH, hace que este se convierta es un mecanismo efectivo de destrucción de microorganismos patógenos que puedan ser ingeridos con los alimentos. Sin embargo, esta barrera puede verse afectada por varios factores como puede ser la edad del individuo, pues se sabe que individuos con edad más avanzada presentan un pH más alto (Smith, 2003). Dado que el pH de la fase gástrica es bastante bajo, en condiciones normales, esto podría suponer una barrera para *L. monocytogenes*. Se sabe que puede desarrollar tolerancia a valores de pH ácidos una vez que ha estado expuesta a condiciones de estrés subletales de pH ya que adquiere una respuesta adaptativa. Esta respuesta va a depender de dos factores que son el valor de pH al que haya sometido para esta adaptación y el tiempo de exposición. Se ha observado que cuando se produce una adaptación a valores bajos de pH, *L. monocytogenes* sobrevive al tracto digestivo mejor que aquellas que no se han sido previamente adaptadas (van Schaik *et al.*, 1999). Davis *et al.* (1996) demostraron que la tasa de supervivencia *L. monocytogenes* a valores de pH letales (pH 3) aumentó cuando se expuso, previamente, durante 1 hora a valores de pH subletales (pH 5) comparándola con las células no expuestas. El hecho de que *L. monocytogenes* sea albergada por una matriz alimentaria durante un período de tiempo puede inducir a esa respuesta adaptativa a pH ácido. La fruta, por lo general, presenta pH ácido, en concreto, la pera mínimamente procesada de 4,5-5,0, y el hecho de que *L. monocytogenes* experimente un período de habituación durante el almacenamiento a este pH, le conferiría esa adaptación primero para poder sobrevivir en la matriz alimentaria durante todo el tiempo de almacenamiento hasta su consumo (O'Driscoll *et al.*, 1996). Así Gahan *et al.* (1996) compararon células de *L. monocytogenes* no adaptadas a pH ácido y células adaptadas y observaron que aquellas que habían sido previamente adaptadas sobrevivieron mejor en alimentos con un pH bajo (yogur, zumo de naranja y queso cheddar); y en segundo lugar al tracto gastrointestinal, especialmente al estómago, barrera que tienen que superar para que se desarrolle la infección. *L. monocytogenes* tiene que desafiar el pH ácido del estómago y la presencia de

Introducción

sales biliares en el intestino delgado. Sin embargo, son numerosos los estudios que demuestran que este microorganismo desarrolla mecanismos para tolerar las condiciones ácidas y la presencia de bilis en el tracto gastrointestinal (Grif *et al.*, 2003). En un estudio realizado inoculando *L. monocytogenes* sobre distintos tipos de queso y después realizando una simulación digestiva, se observó que cuando la bacteria provenía de aquellos quesos donde fue capaz de crecer durante el tiempo de almacenamiento tenía una mayor supervivencia al proceso de digestión (Kapetanakou *et al.*, 2017).

Por otra parte, numerosos estudios han puesto en evidencia que existe un efecto cruzado en la adaptación a diferentes estreses. Un ejemplo es el de la adaptación a pH ácido. Así, se observó que las células de la cepa *L. monocytogenes* LO28 adaptadas a bajos valores de pH incrementaron su resistencia al estrés por calor (52 °C), al estrés osmótico (25-30 % NaCl) y al estrés por alcohol (15 %) (Phan-Thanh *et al.*, 2000). Igual ocurrió cuando *L. monocytogenes* se adaptó a bajas temperaturas, después, respondió de manera más rápida para mantener su equilibrio osmótico cuando se inocula sobre alimentos con baja actividad de agua (Ferreira *et al.*, 2003). Shen *et al.* (2014) demostraron en un estudio *in vitro* que la temperatura fue fundamental en el proceso de adaptación de *L. monocytogenes* a pH ácido, mientras que a 22 y 37 °C se inducía la respuesta al estrés ácido después de la exposición del patógeno a un estrés subletal, a 4 °C esto no ocurría, sugiriendo, por tanto, el procesamiento y el almacenamiento del alimento en frío podía prevenir el riesgo de que aparezcan cepas de *L. monocytogenes* resistentes al estrés ácido. Sin embargo, en otro estudio observaron que la respuesta al estrés ácido en *L. monocytogenes* solo fue estable a 4 y no a 22 o 37 °C cuando no se había producido, previamente, una respuesta subletal al ácido (Shen *et al.*, 2015).

Además de potenciar la tolerancia fisiológica al estrés, se sabe que también se potencia la resistencia a las sustancias antimicrobianas. Van Schaik *et al.* (1999) observaron que la adaptación ácida a pH 5,5, provocó una mayor supervivencia de *L. monocytogenes* a la nisina. Este hecho hay que tenerlo presente, ya que el microorganismo podría ser resistente a los antimicrobianos con los que pueda ser tratado el alimento.

Para que *L. monocytogenes* alcance el intestino e invada las células tiene que superar el obstáculo del bajo pH del estómago y la elevada osmolaridad por la presencia de sales biliares en el intestino delgado. Los estudios *in vivo* están bastante limitados sobre todo por temas éticos, y aunque son mucho más exactos, para representar los procesos biológicos se suelen utilizar sistemas *in vitro*. Para

simular la adhesión e invasión de los microorganismos se utilizan sistemas modelo *in vitro* como son las líneas celulares del carcinoma humano HT-29 y Caco-2 (Kadlec y Jakubec, 2014). La ventaja de estas células es que se diferencian en enterocitos, por lo que simulan de forma bastante exacta las características y el ambiente que se encuentran los microorganismos una vez alcanzan el intestino.

Se sabe que la adaptación de *L. monocytogenes* a valores bajos de pH hace que se incremente su virulencia, lo que se puede traducir en un incremento de su capacidad de adhesión e invasión, ya que parece ser que el factor que regula la expresión de los genes relacionados con la adaptación a estrés también podría estar implicado en la regulación de la expresión de los genes relacionados con la virulencia (Conte *et al.*, 2000; Grif *et al.*, 2003). Este hecho hace que posible que si el patógeno se adapta a las características de la matriz alimentaria se incremente su potencial patogénico. Pricope-Ciolacu *et al.* (2013) demostraron que la incubación de *L. monocytogenes* a 4 °C en leche pasteurizada provocaba un aumento de la invasión y de la proliferación celular de la bacteria comparando con leche cruda y utilizado células Caco-2. Garner *et al.* (2006) demostraron que *L. monocytogenes* incrementó su capacidad invasiva en las células Caco-2 cuando creció a pH 7,4 en presencia de lactato de sodio y de cloruro de sodio con respecto a las bacterias crecidas en medio BHI solo y con el mismo pH.

En la fruta mínimamente procesada, además del estrés por bajos valores de pH, *L. monocytogenes* también se encuentra sometida a bajas temperaturas, a atmósferas modificadas e incluso a la aplicación de sustancias antioxidantes. Estos factores hay que tenerlos presentes ya que pueden suponer un estrés para la bacteria y pueden incrementar su potencial patogénico.

OBJETIVOS

La búsqueda de métodos alternativos más seguros para el consumidor y más respetuosos con el medioambiente para controlar el crecimiento de patógenos de transmisión alimentaria en frutas y hortalizas mínimamente procesadas está potenciando la investigación en aspectos relacionados con el control biológico.

El **objetivo principal** de la presente tesis fue estudiar la bioconservación como estrategia de mitigación de microorganismos patógenos de transmisión alimentaria en pera mínimamente procesada mediante el uso de dos microorganismos, *Pseudomonas graminis* CPA-7, como modelo de microbiota epífita, y *Lactobacillus rhamnosus* GG, como modelo de microorganismo probiótico, y evaluar su efecto sobre la calidad de la fruta. Para ello, los objetivos específicos fueron los siguientes:

1. **Evaluar la capacidad antagonista de *P. graminis* CPA-7 en el control de *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes* en pera mínimamente procesada.**
 - 1.1. Determinar la actividad antagonista en envasado en aire.
 - 1.2. Evaluar de la capacidad antagonista en condiciones que simulan su aplicación comercial: aplicación con solución antioxidante y uso de atmósfera modificada pasiva.
 - 1.3. Optimizar la solución antioxidante y las condiciones de envasado.
2. **Ampliar el espectro de acción de *P. graminis* CPA-7.**
 - 2.1. Evaluar la actividad antagonista frente a patógenos de transmisión alimentaria en distintas frutas.
 - 2.2. Curvas de crecimiento de *P. graminis* CPA-7 en presencia de distintos ácidos orgánicos, a diferentes valores de pH y a diferentes temperaturas.
 - 2.3. Curvas de crecimiento de *P. graminis* CPA-7 en TSB preparado en una solución tamponada a 25 °C.
3. **Estudiar el posible uso de microorganismos probióticos como cultivos bioconservantes frente a *S. enterica* y *L. monocytogenes* en pera mínimamente procesada.**

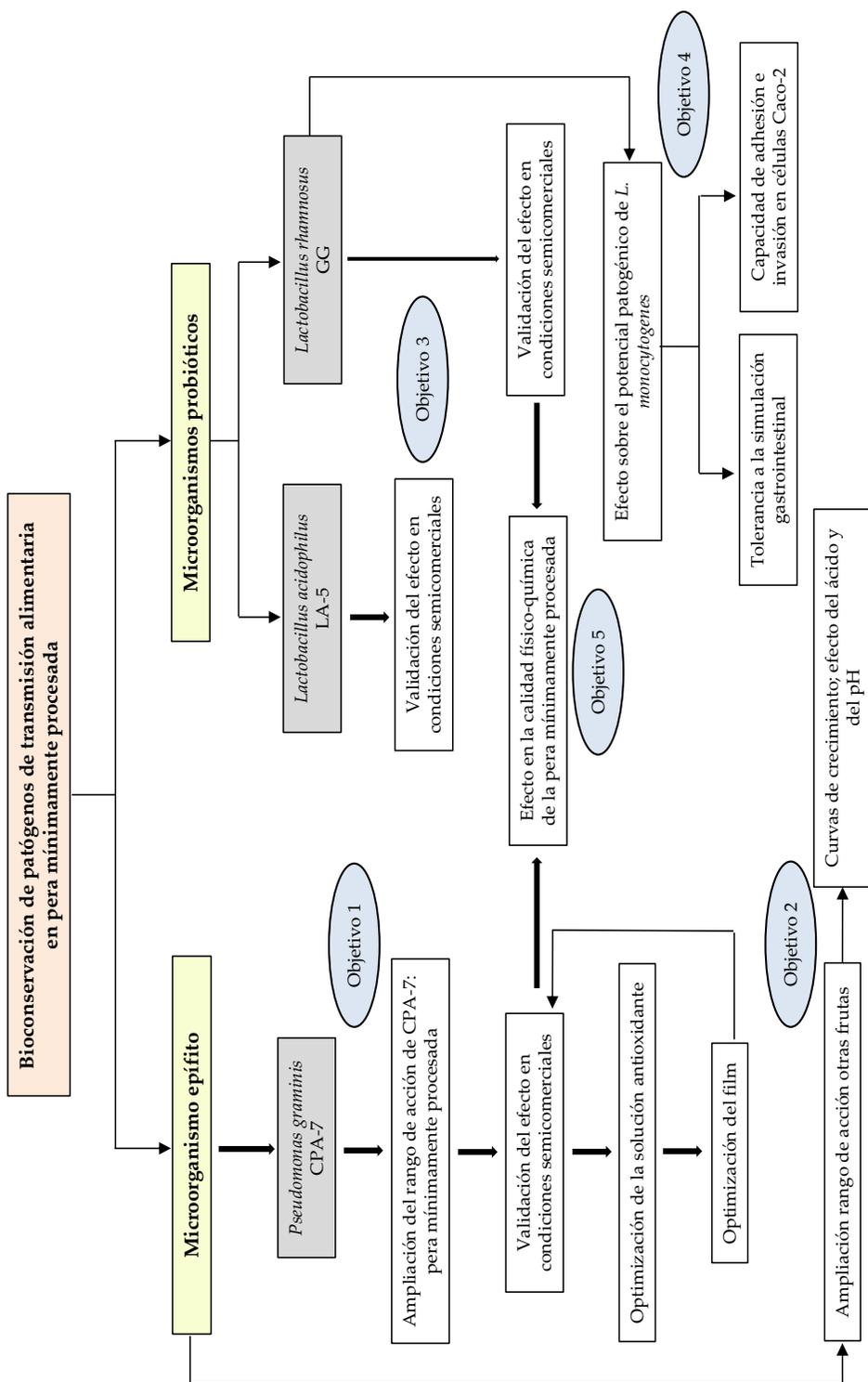
Objetivos

- 3.1. Efecto antagonista del probiótico *Lactobacillus acidophilus* LA-5 frente a *S. enterica* y *L. monocytogenes*.
- 3.2. Efecto antagonista del probiótico *L. rhamnosus* GG frente a *S. enterica* y *L. monocytogenes*.
- 3.3. Combinación de *P. graminis* CPA-7 y *L. rhamnosus* GG para el control de microorganismos patógenos de transmisión alimentaria.

- 4. Determinar el comportamiento de *L. monocytogenes* CECT 4032 después de un período de adaptación en pera mínimamente procesada en presencia de *L. rhamnosus* GG.**
 - 4.1. Interacción de *L. monocytogenes* CECT 4032 con el probiótico en la matriz alimentaria.
 - 4.2. Tolerancia de *L. monocytogenes* CECT 4032 al tracto gastrointestinal.
 - 4.3. Capacidad de adhesión e invasión de *L. monocytogenes* CECT 4032 a las células intestinales (Células Caco-2).

- 5. Evaluar la capacidad antagonista de los agentes de biocontrol y su efecto en la calidad de la pera mínimamente procesada tratada o no con CaCl₂ en poscosecha.**
 - 5.1. Capacidad antagonista de *P. graminis* CPA-7 y de *L. rhamnosus* GG frente a patógenos de transmisión alimentaria en condiciones que simulan la aplicación comercial en pera tratada o no con CaCl₂.
 - 5.2. Efecto de *P. graminis* CPA-7 y de *L. rhamnosus* GG en la calidad físico-química de la pera mínimamente procesada.
 - 5.3. Efecto de *P. graminis* CPA-7 y de *L. rhamnosus* GG en la concentración de etanol y acetaldehído en la pera mínimamente procesada.
 - 5.4. Efecto de *P. graminis* CPA-7 y de *L. rhamnosus* GG en el perfil de compuestos volátiles.

PLAN DE TRABAJO



MATERIALES Y MÉTODOS

Materials

1. Fruta

La fruta elegida para la realización de la presente tesis fue pera de la variedad "Conference" (*Pyrus communis* L. cv. Conference). Dependiendo del estudio, las peras o se recolectaron y se almacenaron a 0 °C hasta su uso, o bien se obtuvieron de centrales hortofrutícolas de la zona y posteriormente se acondicionaron a 20 °C hasta alcanzar la madurez adecuada para su procesamiento.

2. Microorganismos y línea celular

2.1. Cepas de microorganismos

2.1.1. Microorganismos patógenos

Para llevar a cabo los estudios se utilizaron 5 serovares de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* y 5 serovares de *Listeria monocytogenes* (Tabla 6). Cada una de las cepas se conservaban en criobolas a -80 °C.

2.1.2. Microorganismos antagonistas

2.1.2.1. *Pseudomonas graminis* CPA-7

Este microorganismo fue aislado en el laboratorio de Microbiología de Productos Vegetales (UdL-IRTA) de la superficie de manzanas, e inhibe el crecimiento de *E. coli* O157:H7, *S. enterica* y *L. innocua* (Alegre et al., 2013b). Esta cepa se encuentra en el depósito de "Centraalbureau voor Schimmelcultures" (CBS) de Utrecht (Holanda) con el número CBS124167.

2.1.2.2. Bacterias probióticas

Lactobacillus rhamnosus GG (ATCC 53103) (*L. rhamnosus* GG) (cedido por el Ashtown Food research Centre, Teagasc, Ashtown, Dublin, Irlanda).

Lactobacillus acidophilus LA-5 (*L. acidophilus* LA-5) (Chr. Hansen Hørsholm, Dinamarca).

2.2. Línea celular

Para el estudio de la adhesión e invasión se utilizó la línea celular Caco-2 procedente del carcinoma colorrectal humano (ECACC 86012202). Este modelo celular se emplea frecuentemente en este tipo de estudios debido a las ventajas que presentan dichas células, pues se diferencian en células con características morfológicas y fisiológicas similares a la de los enterocitos del epitelio intestinal humano (Gaillard *et al.*, 1987; Hidalgo *et al.*, 1989).

Tabla 6. Cepas de los microorganismos patógenos utilizados en este estudio.

Microorganismo	Serovar	Número colección	Origen
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (ex Kaufmann y Edwards, 1952) Le Minor and Popoff 1987	Agona	ATCC BAA-707	Brotos de alfalfa
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (ex Kaufmann y Edwards, 1952) Le Minor and Popoff 1987	Michigan	ATCC BAA-709	Melón "Cantaloupe"
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (ex Kaufmann y Edwards, 1952) Le Minor and Popoff 1987	Montevideo	ATCC BAA-710	Paciente con salmonelosis asociada al consumo de tomates
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (ex Kaufmann y Edwards, 1952) Le Minor and Popoff 1987	Gaminara	ATCC BAA-711	Zumo de naranja
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (ex Kaufmann y Edwards, 1952) Le Minor and Popoff 1987	Enteritidis	CECT-4300	Cepa tipo de <i>Salmonella</i> Enteritidis
<i>L. monocytogenes</i> (Murray <i>et al.</i> , 1926) Pirie 1940	1a	CECT 4031	Conejo
<i>L. monocytogenes</i> (Murray <i>et al.</i> , 1926) Pirie 1940	3a	CECT 933	Humano
<i>L. monocytogenes</i> (Murray <i>et al.</i> , 1926) Pirie 1940	4d	CECT 940	Oveja
<i>L. monocytogenes</i> (Murray <i>et al.</i> , 1926) Pirie 1940	4b	CECT 4032	Paciente con listeriosis asociada al consumo de queso
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	LM 230/3*	Lechuga

*Según la colección de microorganismos del laboratorio de Microbiología de Productos Vegetales (Udl-IRTA).

3. Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante y con los protocolos establecidos en nuestro laboratorio.

3.1. Medios de cultivo líquidos

- Caldo de triptona y soja (TSB, Biokar diagnostics, Francia)
- Caldo de triptona y soja (TSB, Biokar diagnostics, Francia) más extracto de levadura (6 g/L) (TYSEB)
- Caldo de Man, Rogosa y Sharpe (Caldo MRS, Biokar diagnostics, Francia)
- Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM 1X, Gibco-BRL, Reino Unido)
- Suero fetal bovino (Gibco-BRL, Reino Unido)

3.2. Medios de cultivo sólidos

- Agar de triptona y soja (TSA, Biokar diagnostics, Francia)
- Agar de triptona y soja (TSA, Biokar diagnostics, Francia) más extracto de levadura (6 g/L) (TSA YE)
- Agar de Xilosa Lisina Deoxycolato (XLD, Biokar diagnostics, Francia)
- Agar de Man, Rogosa y Sharpe (Agar MRS, Biokar diagnostics, Francia)
- Palcam agar base con suplemento (Biokar diagnostics, Francia)

3.3. Diluyentes

- Solución salina (SS, 8,5 g/L NaCl)
- Peptona salina (PS, 8,5 g/L NaCl y 1 g/L peptona)
- Agua de peptona tamponada (APT, Biokar diagnostics, Francia)
- Tampón fosfato salino (PBS; 8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,7 g/L Na₂HPO₄ y 0,2 g/L KH₂PO₄, pH ajustado a 7,4 con HCl)

3.4. Antibióticos

- Suplemento Palcam agar: Polimixina B, ceftadizimina, acriflavina (Biokar diagnostics, Francia)
- Penicilina (Sigma, EE.UU.)
- Estreptomicina (Sigma, EE.UU.)
- Gentamicina (Gentamicin solution, Sigma, EE.UU.)

4. Material de laboratorio

- Placas Petri de 90 mm de diámetro
- Placas 24 pocillos de poliestireno (Falcon, EE.UU.)
- Pipetas Pasteur estériles
- Micropipetas automáticas y puntas
- Vasos de precipitado
- Matraces Erlenmeyer
- Tubos de ensayo de vidrio
- Tubos para centrífuga
- Botellas de poliestireno con un sistema de filtración al vacío y un filtro de 0,22 μm (VWR, Radnor, PA, EE.UU.)
- Filtros de acetato de nitrocelulosa 0,22 μm (Sartorius Sedim Biolab Products, Aubagne, Francia)
- Balanza
- Balanza de precisión
- Descorazonador/cortador de manzanas
- Bisturí, pinzas, cucharas, espátulas y otro material diverso

5. Productos químicos

- Fenolftaleína (Sigma-Aldrich, EE.UU.)
- Hidróxido de sodio (NaOH, Sigma-Aldrich, EE.UU.)

Materialles y métodos

- Ácido clorhídrico (HCl, VWR International bvba, Bélgica)
- Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, PanReac AppliChem, España)
- Cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$, PanReac AppliChem, España)
- Cloruro de potasio (KCl, PanReac AppliChem, España)
- Cloruro de sodio (NaCl, VWR International bvba, Bélgica)
- Carbonato amónico ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, Sigma-Aldrich, Alemania)
- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3 , VWR International bvba, Bélgica)
- Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4 , VWR International bvba, Bélgica)
- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4 , VWR International bvba, Bélgica)
- Ácido ascórbico (AA, Quality Chemicals, España)
- Ácido cítrico (AC, PanReac AppliChem, España)
- Ácido málico (AM, PanReac AppliChem, España)
- Ascorbato de calcio (AscCa, Sigma-Aldrich, EE.UU.)
- Citrato de sodio (CitNa, PanReac AppliChem, España)
- Naturseal® AS1 (NS, 5 %, AgriCoat Ltd., Reino Unido)
- Fruit-Fresh® (FF, 1 %, Ball Products)
- Etanol
- Bilis (Bile bovine, 160 mM, Sigma-Aldrich, Alemania)
- Tritón 100X (Triton® X-100, Sigma, EE.UU.)
- Mezcla de aminoácidos no esenciales

6. Enzimas

- α -amilasa (α -amilasa from *Bacillus cereus*, 400 U/mg proteína, Sigma, Alemania)
- Pepsina (Pepsin from porcine gastric mucosa, 400 U/mg proteína, Sigma, Alemania)
- Pancreatina (Pancreatin from porcine pancreas, 100 U/mg proteína, Sigma, Alemania)

7. Material utilizado en el envasado de la fruta

- Barquetas con bisagra de tereftalato de polietileno (PET) con una capacidad de 500 mL
- Barquetas de polipropileno (PP) de 375 mL de capacidad
- Film de propileno no despegable (PP-110, ILPRA, Italia) de 64 μm de grosor con una permeabilidad al O_2 de $110 \text{ cm}^3/(\text{m}^2\text{día}^1\text{atm}^1)$ a $23 \text{ }^\circ\text{C}$
- Barquetas de tereftalato de polietileno (PET) ShelfMaster™ Pronto™ trays (PlusPack, Dinamarca) de 400 mL de capacidad
- Film plástico despegable compuesto por una película de poliéster antivaho (OLAF) de 14 μm de grosor y por una película de polipropileno mono-orientado (OPP) de 20 μm de grosor. La permeabilidad de este film al O_2 es de $180 \text{ cm}^3/(\text{m}^2\text{día}^1\text{atm}^1)$ a $23 \text{ }^\circ\text{C}$. Este film se utilizó aplicando distintas permeabilidades, que se detallarán en el ensayo correspondiente.

Metodología

En este apartado se explicará la metodología común a todos los ensayos en un primer epígrafe, para posteriormente detallar las metodologías específicas de cada experimento.

Debido a la utilización de microorganismos patógenos incluidos dentro del grupo de riesgo 2 (RD 664/1997, BOE nº 124 del 24 de mayo de 1997), se trabajó en un laboratorio de nivel de bioseguridad 2.

1. Metodología general

En el siguiente esquema (Fig. 5) se resume la metodología general común en todos los ensayos.

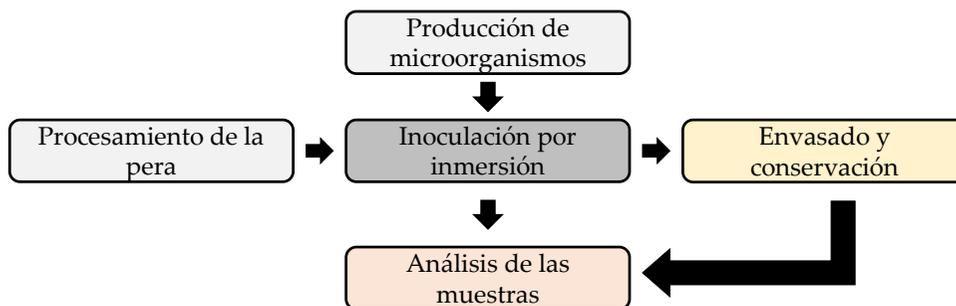


Figura 5. Esquema del procesamiento, inoculación y análisis de la fruta.

1.1. Procesamiento de la fruta

Las peras se procesaron en el estado de madurez óptimo (Soliva-Fortuny *et al.*, 2004). Para ello, se acondicionaron a 20 °C hasta alcanzar una firmeza de $44 \pm 3,2$ N. La firmeza se midió en las dos caras opuestas del fruto usando un penetrómetro (Effegi, Milán, Italia) equipado con una sonda de 8 mm de diámetro.

Las peras se lavaron con agua del grifo y se desinfectaron superficialmente con etanol al 70 %. Se pelaron con un pelador automático (Orange peel, Peelamatic, Valencia) y se cortaron en 10 gajos con la ayuda de un descorazonador/cortador de manzanas.

1.2. Condiciones de crecimiento y producción de microorganismos

1.2.1. Condiciones de crecimiento

Las condiciones y los medios de cultivo para cada microorganismo se encuentran especificados en la Tabla 7. Para cada uno de los ensayos, la producción de microorganismos se llevó a cabo tal y como se explica a continuación. En el caso de que en algún ensayo la forma de producción hubiera sido diferente, se matizará más adelante en el apartado de metodología específica de cada ensayo.

Material es y métodos

Tabla 7. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de los microorganismos empleados para la realización de los ensayos.

	<i>S. enterica</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>P. graminis</i> CPA-7	Microorganismos probióticos
Producción medio líquido	TSB 37 °C, 20-24 h Agitación 150 rpm	TSBYE 37 °C, 20-24 h Agitación 150 rpm	TSB 25 °C, 20-24 h. Agitación 150 rpm	Caldo MRS ¹ 37 °C, 20-24 h Estático
Recuento en placa	TSA 37 °C, 20-24 h XLD ² 37 °C, 20-24 h	TSAYE 37 °C, 20-24 h Palcam ³ 37 °C, 40-48 h	TSA 30 °C, 20-24 h	Agar MRS ³ 37 °C, 40-48 h

¹Medio selectivo para lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas

²Medio selectivo para *S. enterica*

³Medio selectivo para *L. monocytogenes*

1.2.2. Producción de microorganismos y preparación del inóculo

1.2.2.1. Producción de microorganismos patógenos

A partir de una criobola de cada una de las cepas de los microorganismos patógenos se realizó una triple estría en placa en el medio no selectivo correspondiente y se incubó en las condiciones que se indican en la Tabla 7. De cada una de las triples estrías se picó una colonia aislada y se inoculó un matraz Erlenmeyer conteniendo el medio líquido adecuado para cada microorganismo y se incubaron en las condiciones indicadas en la Tabla 7. Pasado el tiempo de incubación, el contenido de los matraces se centrifugó a 9.800 xg durante 10 min a una temperatura de 10 °C (Sorvall Legend™ XTR centrifuge, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). El sobrenadante se descartó y las células precipitadas se resuspendieron con la mitad de volumen de SS, obteniéndose un inóculo concentrado. Volúmenes iguales de cada una de las 5 soluciones concentradas de *S. enterica* se mezclaron para obtener una única suspensión (cóctel de 5 cepas) que fue la utilizada como inóculo, y de la misma manera se hizo para *L. monocytogenes*. Para confirmar la población bacteriana de ambos inóculos, se realizó un recuento mediante siembra en placa en el medio selectivo correspondiente para cada microorganismo. Antes de la siembra en placa se realizaron series de diluciones decimales en tubos de ensayo con peptona salina (PS) como diluyente. Tras realizar las diluciones correspondientes, en función de

la muestra y del ensayo, se pasó a la siembra en placa. Para ello, se tomaron placas de Petri con el medio correspondiente de cada microorganismo según la Tabla 7 y se realizó la siembra en superficie. En la superficie del agar se depositó una cantidad determinada de la muestra y se extendió con un asa de siembra estéril. Las placas se incubaron el tiempo y la temperatura indicados en la Tabla 7. Se contaron el número de unidades formadoras de colonia (ufc) en las placas y se calculó el número de ufc/mL.

1.2.2.2. Producción de microorganismos antagonistas

De cada una de las cepas de los microorganismos antagonistas se hizo una triple estría a partir de una criobola en el medio correspondiente y se incubaron como se indica en la Tabla 7. Tras la incubación, se picaron colonias aisladas de cada una de las cepas antagonistas y se inocularon tantos matraces Erlenmeyer como cepas con el medio líquido correspondiente para cada bacteria. Una vez inoculados los matraces, se hicieron crecer las bacterias a la temperatura y durante el tiempo indicados en la Tabla 7. Transcurrido el tiempo de incubación, el contenido de los matraces se centrifugó a 9.800 xg, 10 min y 10 °C, en el caso de *P. graminis* CPA-7, y para los microorganismos probióticos a 9.820 xg durante 12 min y a 10 °C (Avanti™ centrifuge, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.). El sobrenadante obtenido en la centrifugación se descartó y el precipitado se resuspendió con la mitad de volumen de agua estéril (concentración 2:1, v/v). De esta manera se obtuvieron soluciones concentradas de cada uno de los microorganismos empleados como antagonistas. La concentración bacteriana de cada una de las soluciones obtenidas se determinó mediante siembra en placa en el medio correspondiente para cada bacteria como se ha indicado en el apartado 1.2.2.1 de la metodología.

1.3. Inoculación de la fruta

Para la preparación del inóculo, se añadió una alícuota de cada una de las suspensiones bacterianas preparadas según lo descrito anteriormente a agua desionizada o bien a una solución antioxidante (dependiendo de las condiciones del ensayo) para obtener aproximadamente 10⁵ ufc/mL en el caso de *S. enterica* y *L. monocytogenes*, 10⁷ ufc/mL para *P. graminis* CPA-7 y 10⁸ ufc/mL para las bacterias probióticas. En el caso de que las concentraciones del inóculo fueran distintas para un determinado ensayo, se detallará en el epígrafe de metodología específica. Una vez preparado el inóculo, la concentración se comprobó mediante siembra en placa, tal y como se ha descrito en el apartado 1.2.2.1.

Materiales y métodos

Después del procesamiento de las peras, los gajos de fruta se inocularon mediante la inmersión en la solución antioxidante o agua desionizada (dependiendo del ensayo) conteniendo los microorganismos correspondientes según el ensayo (en la proporción 1:2 (peso fruta/volumen líquido)) durante 2 min y en agitación a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, los gajos de pera se dejaron secar a temperatura ambiente y se envasaron en distintas atmósferas de acuerdo con el ensayo llevado a cabo. Las barquetas se almacenaron a distintas temperaturas.

Estos datos se detallarán más adelante en la metodología específica para cada ensayo.

1.4. Determinación de la población de los distintos microorganismos en pera mínimamente procesada

La población de los microorganismos en la fruta se determinó el día de comienzo de cada ensayo y a cada tiempo de análisis establecido en cada experimento. Para el análisis, se tomaron 10 g de muestra de cada barqueta ($n = 3$) y se mezclaron con 90 mL de APT en una bolsa estéril (1:10, p/v). Con la ayuda de un Stomacher® 400 (Seward, London, Reino Unido) se homogeneizó la muestra durante 2 min a 250 golpes/min. A partir de esta mezcla se determinó la población mediante siembra en placa como se indica en el apartado 1.2.2.1 y en los medios de cultivo correspondientes (para los patógenos se escogieron los medios selectivos) y con las condiciones de incubación previamente indicadas en la Tabla 7. Los resultados obtenidos se expresaron en log ufc/g. En algunos casos se calculó la reducción de las poblaciones de los patógenos se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Reducción} = \log N_{\text{Pat}} - \log N_{\text{Pat+Ant}}$$

Siendo N_{Pat} la población del patógeno (ufc/g) en el tratamiento sin el antagonista después del período de almacenamiento y $\log N_{\text{Pat+Ant}}$ la población del patógeno (ufc/g) en presencia del microorganismo antagonista.

1.5. Determinación de la calidad de la fruta

1.5.1. Firmeza de la fruta entera

La firmeza de los frutos enteros se midió a utilizando un penetrómetro (Effegi, Milán, Italia) equipado con una sonda de 8 mm de diámetro. Con un cuchillo se quitó la piel de la fruta en dos caras opuestas de la zona ecuatorial de la pera, es ahí donde se introdujo la sonda del aparato para registrar la firmeza. Los resultados se expresaron en N (Newtons).

1.5.2. Concentración de gases en el espacio de cabeza de las barquetas

La concentración de O₂ y CO₂ de dentro de cada una de las barquetas de los ensayos se midió utilizando un analizador de gases portátil (CheckPoint O₂/CO₂, PBI Dansensor, Dinamarca). Se colocó un septum adhesivo en cada barqueta y la aguja se introdujo a través de él para tomar la muestra necesaria. Los resultados se expresaron en porcentaje (%).

1.5.3. Contenido de sólidos solubles

El contenido de sólidos solubles (CSS) se determinó según Alegre *et al.* (2013a) a 20 °C con un refractómetro portátil (PR-100, Atago Co.Ltd., Tokio, Japón) en el zumo extraído mediante el licuado de los gajos de pera. Se realizaron 3 medidas por tratamiento. Los resultados se expresaron en °Brix.

1.5.4. Acidez titulable

Para medir la acidez titulable (AT) se tomaron tres medidas por tratamiento a cada tiempo de análisis. La determinación se hizo aplicando el protocolo de Alegre *et al.* (2013a). Se tomaron 10 mL de zumo obtenido mediante el licuado de los gajos de pera, el mismo que para la determinación del CSS, y se diluyeron con 10 mL de agua destilada. Además, se le añadieron dos gotas de fenolftaleína. Esta solución se valoró con NaOH 0,1 N con la ayuda de una bureta automática hasta que la solución viró de color. Los resultados se expresaron como g de ácido por L de solución:

$$\text{g málico/L zumo} = \text{mL NaOH} * 0,67$$

$$\text{g cítrico/L zumo} = \text{mL NaOH} * 0,64$$

Materiales y métodos

1.5.5. Determinación del pH de la fruta

Para determinar el pH de la fruta se tomaron 5 trozos (n = 5) y de cada uno se realizó una medida de pH utilizando un pH-metro GPL 22 (Crison Instruments, Barcelona, España) con un electrodo de penetración (52 31 Crison).

1.5.6. Color

El color de la pera mínimamente procesada se midió con un cromámetro Minolta CR-200 (Minolta, INC., Tokio, Japón). Se determinaron los parámetros L^* (luminosidad), a^* (nivel rojo-verde), b^* (nivel azul-amarillo) con un iluminador D65 y con un ángulo de observación de 10° .

El día del inicio del ensayo se midieron 6 gajos de pera por ambas caras (n = 12) y el resto de tiempos de muestreo 5 gajos de cada barqueta y tres barquetas por tratamiento (n = 30). Además, se calculó el índice de pardeamiento (IP) de acuerdo con Cliffe-Byrnes y O'Beirne (2008) siguiendo la siguiente ecuación:

$$IP = 100 * (x - 0,31) / 0,17,$$

siendo $x = (a - 1,75 * L) / (5,645 * L) + (a - (3,012 * b))$

1.5.7. Textura

La textura se analizó utilizando un medidor de textura TA-TX2 (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, Inglaterra) siguiendo la metodología de Altisent *et al.* (2014). Los gajos de pera se cortaron en cubos de 20 mm x 20 mm. Las condiciones de medida fueron: velocidad antes de la medida 2,0 mm/s; velocidad durante la medida: 5,0 mm/s; velocidad después de la medida: 5,0 mm/s y la distancia de penetración: 10 mm. Para el análisis se utilizó una sonda de 4 mm de diámetro. En el día de inicio del experimento se tomaron 5 medidas. En el resto de tiempos de muestreo se tomaron tres medidas por barqueta y tres barquetas por tratamiento (n = 9). Los resultados se expresaron en N (Newtons).

1.5.8. Calidad visual

La evaluación de la calidad visual se realizó para cada una de las barquetas por un panel de personas no entrenado compuesto por personal del laboratorio (n =

12). Se utilizó la escala hedónica de 5 puntos propuesta por Gil *et al.* (1998), donde un 9 = excelente, 7 = muy bien, 5 = bien, límite de aceptación, 3 = suficiente, límite de uso y 1 = pobre, incomedible.

1.6. Evaluación de la supervivencia de los microorganismos en contacto con la solución antioxidante.

En este estudio se evaluó la capacidad de supervivencia de los dos patógenos, *S. enterica* y *L.monocytogenes* y de los dos probióticos, *L. rhamnosus* GG y *L. acidophilus* LA-5, tras dos horas de contacto con una solución antioxidante formada por ácido ascórbico (2 %), citrato de sodio (2 %) y CaCl₂ (1 %). Los microorganismos se produjeron como se ha detallado anteriormente (apartado 1.2.2.).

Se preparó una solución antioxidante y se repartió en 3 tubos de ensayo y se inocularon, a una concentración de 10⁵ ufc/mL, los patógenos, y los probióticos a una concentración de 10⁸ ufc/mL. Además se inocularon también tubos de ensayo que contenían agua desionizada estéril como control. Se tomó muestra tras la inoculación y pasadas 2 h y se hizo un recuento de los microorganismos mediante siembra en placa (apartado 1.2.2.1).

2. Metodología específica de cada experimento

2.1. Evaluación de la efectividad de la cepa *P. graminis* CPA-7 en el control de *S. enterica* y de *L. monocytogenes* en pera mínimamente procesada

En este estudio se determinó el efecto de *P. graminis* CPA-7 frente a *S. enterica* y *L. monocytogenes* en pera mínimamente procesada y se optimizaron las condiciones de envasado y la solución antioxidante para su aplicación a nivel comercial.

La preparación del inóculo de cada microorganismo, el procesamiento de la fruta y la inoculación de esta se llevaron a cabo como se ha indicado en el apartado de metodología general (apartados 1.1, 1.2.2 y 1.3). Para determinar las concentraciones reales aplicadas se realizó un recuento en placa (apartado 1.2.2.1). La determinación de la población bacteriana en la pera mínimamente procesada se realizó siguiendo el protocolo explicado en el apartado 1.4.

*2.1.1. Determinación de la capacidad antagonista de *P. graminis* CPA-7 en pera mínimamente procesada envasada en aire*

En este ensayo se realizaron los siguientes tratamientos:

- (a) Sal + Lm: agua desionizada con una concentración de 10^5 ufc/mL de *S. enterica* y *L. monocytogenes*
- (b) CPA-7: agua desionizada conteniendo *P. graminis* CPA-7 a 10^7 ufc/mL
- (c) Sal + Lm + CPA-7: agua desionizada con *S. enterica* y *L. monocytogenes* a una concentración de 10^5 ufc/mL y *P. graminis* CPA-7 a 10^7 ufc/mL

Una vez la fruta estuvo inoculada y seca, se tomaron 50 ± 5 g de pera y se depositaron en barquetas PET de 500 mL, en aire (21,0 % O₂ y 0,0 % CO₂) y se almacenaron a 5, 10 y 20 °C. Cada una de las barquetas se consideró una repetición y se envasaron 3 repeticiones por tratamiento y por cada día de seguimiento.

Las poblaciones de *S. enterica* y *L. monocytogenes* se determinaron en los tratamientos (a) y (c) y la población de *P. graminis* CPA-7 únicamente en el tratamiento (b). Para las muestras almacenadas 20 °C, la determinación de la población de microorganismos se realizó después de la inoculación y después 2

días de almacenamiento. A 5 y 10 °C los tiempos de muestreo fueron a los 0, 3, 6 y 10 días de almacenamiento.

El experimento se llevó a cabo 2 veces. Los resultados se evaluaron comparando la población de cada microorganismo patógeno inoculado solo con la población de cada uno inoculado junto con el antagonista.

2.1.2. Efecto de P. graminis CPA-7 sobre S. enterica y L. monocytogenes en condiciones simulando la aplicación comercial

En este caso, los gajos de pera se trataron con una solución antioxidante (AOX) para prevenir el pardeamiento durante la vida útil. La solución antioxidante estaba compuesta por 20 g/L de ácido ascórbico, 20 g/L de citrato de sodio y 10 g/L de CaCl₂. Fue en esta solución donde se sumergieron los gajos de pera una vez los microorganismos estuvieron inoculados. Se realizaron los mismos tratamientos que en el ensayo anterior pero utilizando la solución antioxidante en lugar de agua desionizada:

- (a) Sal + Lm: AOX con una cantidad de 10⁵ ufc/mL de *S. enterica* y *L. monocytogenes*
- (b) CPA-7: AOX inoculado con *P. graminis* CPA-7 (10⁷ ufc/mL)
- (c) Sal + Lm + CPA-7: AOX con *S. enterica* y *L. monocytogenes* a una concentración de 10⁵ ufc/mL y *P. graminis* CPA-7 a 10⁷ ufc/mL

Una vez la pera se inoculó y se secó, aproximadamente 8 gajos (110 ± 5 g) se envasaron en atmósfera pasiva en barquetas de PP que se sellaron con el film PP-110. Las barquetas se almacenaron a 5, 10 y 20 °C y se determinó la población microbiana. Para las muestras almacenadas a 20 °C, la determinación de la población de microorganismos se realizó tras la inoculación y después de 2 días de almacenamiento. A 5 y 10 °C, los tiempos de muestreo fueron a los 0, 3, 6 y 10 días de almacenamiento.

Además en este caso, a cada tiempo de muestreo, se determinó la concentración de gases existente en el interior de cada barqueta utilizando un analizador de gases portátil (apartado 1.5.2.).

2.1.3. Optimización de la solución antioxidante

Se determinó el efecto de distintos compuestos antioxidantes en la supervivencia y efectividad de *P. graminis* CPA-7.

Materiales y métodos

2.1.3.1. Estudio *in vitro*

En una primera fase, diferentes productos antioxidantes a distintas concentraciones y sus combinaciones se analizaron en condiciones *in vitro* para evaluar la supervivencia de *P. graminis* CPA-7. Se probaron diferentes productos, regulados por el Reglamento (UE) n° 1129/2011 de la comisión de 11 de noviembre de 2011, y distintas combinaciones de estos, además de dos productos comerciales:

- (1) Ácido ascórbico 2 % (AA) (E300)
- (2) Ácido cítrico 1 % (AC) (E330)
- (3) Ascorbato de calcio 1 % (AscCa) (E302)
- (4) AscCa 2 %
- (5) Citrato de sodio 2 % (CitNa) (E331)
- (6) CaCl₂ 1 % (E509)
- (7) CaCl₂ 2 %
- (8) AA 2 % + AscCa 2 %
- (9) AA 2 % + ascorbato de sodio 2 % (AscNa)
- (10) AA 2 % + CaCl₂ 2 %
- (11) AscCa 2 % + CaCl₂ 1 %
- (12) AA 2 % + AC 1 % + 1 % CaCl₂ pH 1.6
- (13) AA 2 % + AC 1 % + CaCl₂ 1 % ajustada con Na₂HPO₄ hasta pH 3,9
- (14) AA 2 % + CitNa 2 % + CaCl₂ 1 %
- (15) Naturseal® AS1 5 %
- (16) Fruit-Fresh®

Se tomaron 3 tubos de ensayo por cada uno de los tratamientos (n = 3) con 10 mL de solución. En cada uno de estos tubos se inoculó una cantidad de *P. graminis* CPA-7 para obtener aproximadamente 10⁷ ufc/mL. Paralelamente, se inocularon otros 3 tubos con agua desionizada estéril para utilizarlos como control. La supervivencia de *S. enterica* y *L. monocytogenes* se determinó también en la solución que combinaba AA 2 % + CitNa 2 % + CaCl₂ 1 %. Los patógenos se inocularon en agua estéril también simulando el tratamiento control.

Las poblaciones de *P. graminis* CPA-7, *S. enterica* y *L. monocytogenes* se evaluaron tras 1 y 2 h después de la inoculación mediante siembra en placa (apartado 1.2.2.1).

2.1.3.2. Estudio en fruta

En una segunda etapa del ensayo, aquellas soluciones antioxidantes que no afectaron a la viabilidad de *P. graminis* CPA-7 en el estudio *in vitro* se seleccionaron para llevar a cabo un estudio *in vivo* utilizando la pera mínimamente procesada como matriz. Una vez la fruta se procesó, los gajos de pera se sumergieron en las dos soluciones antioxidantes seleccionadas inoculadas con una cantidad aproximada de 10^7 ufc/mL de *P. graminis* CPA-7. Los tratamientos fueron:

- (a) AOX1: AA 2 % + CitNa 2 % + CaCl₂ 1 %
- (b) AOX2: AscCa 2 % + CaCl₂ 1 %
- (c) Control: Agua desionizada

Tras la inmersión en la solución, los gajos de pera se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente, los gajos de pera (50 ± 5 g) se envasaron en aire (21,0 % O₂ y 0,0 % CO₂) en barquetas PET de 500 mL de capacidad y se almacenaron a 10 °C. La población de *P. graminis* CPA-7 se determinó el día del ensayo y tras 5 días de almacenamiento en 3 barquetas por cada tratamiento mediante siembra en placa como se ha descrito en el apartado 1.2.2.1.

2.1.4. *Optimización de las condiciones de envasado*

Se estudiaron 3 atmósferas modificadas distintas que se consiguieron por el sellado de las barquetas con films de diferentes permeabilidades (atmósferas modificadas pasivas) y se compararon con peras envasadas en condiciones atmosféricas (aire). Los gajos de pera se inocularon con los microorganismos por inmersión en agua desionizada habiendo sido previamente inoculada. Los 3 tratamientos fueron:

- (a) Sal + Lm: agua desionizada con una concentración de 10^5 ufc/mL de *S. enterica* y *L. monocytogenes*
- (b) CPA-7: agua desionizada inoculada con *P. graminis* CPA-7 (10^7 ufc/mL)
- (c) Sal + Lm + CPA-7: agua desionizada con *S. enterica* y *L. monocytogenes* a una concentración de 10^5 ufc/mL y *P. graminis* CPA-7 a 10^7 ufc/mL

Materiales y métodos

Tras la inoculación de la fruta, esta se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, aproximadamente 120 ± 5 g se colocaron en barquetas PET de 400 mL que se sellaron con el film constituido por una película antivaho (OLAF) de 14 μm de grosor y por una película de polipropileno mono-orientado (OPP) de 20 μm de grosor, logrando distintas permeabilidades:

- Film 1: film con microperforaciones alineadas de 100-120 μm de diámetro cada una y con 10 mm de separación entre ellas.
- Film 2: con microperforaciones alineadas de 60-80 μm de diámetro cada una y 75 mm de separación entre ellas.
- Film 3: film sin orificios
- Aire: film perforado con 9 orificios de 400 μm de diámetro cada uno.

Las barquetas se almacenaron a 10 °C. La población de los microorganismos (*S. enterica* y *L. monocytogenes* en tratamientos (a) y (c), y *P. graminis* CPA-7 en tratamiento (b) se determinó en 3 muestras (cada muestra es una barqueta) de cada film utilizado justo después de la inoculación y tras 5 días de almacenamiento. El ensayo se llevó a cabo por duplicado.

La composición de gases (O_2/CO_2) del espacio de cabeza de cada barqueta se determinó a los 5 días de almacenamiento con la ayuda de un analizador de gases portátil (apartado 1.5.2.).

2.1.5. Efecto de las condiciones de envasado en la calidad de la pera mínimamente procesada

Para evaluar si las diferentes atmósferas pasivas creadas en el interior de los envases afectaron a la calidad de la fruta, se analizaron diversos parámetros. Estos parámetros de calidad se evaluaron en fruta tratada con el AOX 1 y no inoculada con los microorganismos. La fruta se trató en la solución antioxidante durante 2 min en una relación 1:2 (p/v). Se sellaron 3 barquetas con 120 ± 5 g con cada uno de los films descritos anteriormente y se almacenaron a 10 °C durante 5 días.

Tras este tiempo de almacenamiento, se determinó la concentración de gases del espacio de cabeza de las barquetas, el color, la textura y la calidad visual (apartados 1.5.2, 1.5.6, 1.5.7 y 1.5.8).

2.1.6. Análisis de los datos

Para el análisis estadístico se empleó el software estadístico JMP®8 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Antes del análisis estadístico, los datos de la población bacteriana se transformaron a log ufc/g. Todos los datos se evaluaron usando el análisis de varianzas (ANOVA). Posteriormente, las diferencias significativas se analizaron aplicando el test de Tukey o el t-Student con un nivel de significación de $P < 0,05$.

2.2. Ampliación del espectro de acción de la cepa *P. graminis* CPA-7

2.2.1. Evaluación de la actividad de *P. graminis* CPA-7 antagonista frente a patógenos de transmisión alimentaria en distintas frutas.

Tras evaluar la efectividad de *P. graminis* CPA-7 en pera mínimamente procesada frente a *S. enterica* y *L. monocytogenes*, se amplió el estudio a otras frutas.

La preparación del inóculo de cada microorganismo, el procesamiento de la fruta y la inoculación de esta se llevaron a cabo como se ha indicado en el apartado de metodología general (apartados 1.1, 1.2.2 y 1.3). El recuento en placa se realizó como se ha detallado en el apartado 1.2.2.1. La determinación de la población bacteriana en la pera mínimamente procesada se realizó siguiendo el protocolo explicado en el apartado 1.4.

Las frutas sobre las que se evaluó la capacidad antagonista de *P. graminis* CPA-7 se obtuvieron de supermercados de la ciudad y fueron las siguientes:

- Kiwi (*Actinidia deliciosa* L. cv. Haywar) (cortado a cuartos)
- Mango (*Mangifera indica* L. cv. Kent) (cortado en trozos)
- Fresa (*Fragaria × ananassa* cv. Splendour) (entera)
- Naranja (*Citrus sinensis* L. cv. Lane late) (cortada a rodajas)
- Piña (*Ananas comosus* L. cv. Gold) (cortada a trozos)
- Mandarina (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis* cv. Ortanique) (gajos con membrana carpelar)
- Melón (*Cucumis melo* L. cv. Cantaloupe) (cortado a trozos)
- Melón (*Cucumis melo* L. cv. Galia) (cortado a trozos)

Materiales y métodos

- Manzana (*Malus domestica* L. cv. Fuji) (cortada a gajos)
- Manzana (*Malus domestica* L. cv. Pink Lady) (cortada a gajos)
- Sandía (*Citrullus lanatus* L. cv. Fashion) (cortada a cubos)
- Nectarina “Big Top” (*Prunus persica* var. nectarine (Ait.) Maxim.) (cortada a gajos)

En este ensayo, se realizaron los siguientes tratamientos:

- (a) Sal + Lm: agua desionizada con una concentración de 10^5 ufc/mL de *S. enterica* y *L. monocytogenes*
- (b) CPA-7: agua desionizada conteniendo *P. graminis* CPA-7 a 10^7 ufc/mL
- (c) Sal + Lm + CPA-7: agua desionizada con *S. enterica* y *L. monocytogenes* a una concentración de 10^5 ufc/mL y *P. graminis* CPA-7 a 10^7 ufc/mL

Una vez la fruta estuvo inoculada y seca, se tomaron 50 ± 5 g de fruta mínimamente procesada y se depositaron en barquetas PET de 500 mL, en aire (21,0 % O₂ y 0,0 % CO₂) y se almacenaron a 10°C durante 5 días. Cada una de las barquetas era una repetición con 3 repeticiones por tratamiento y por cada día de seguimiento.

Las poblaciones de *S. enterica* y *L. monocytogenes* se determinaron en los tratamientos (a) y (c) y la población de *P. graminis* CPA-7 únicamente en el tratamiento (b). La determinación de la población de microorganismos se realizó después de la inoculación y tras 5 días de almacenamiento (metodología apartado 1.4). Los resultados se evaluaron comparando la población de cada microorganismo inoculado solo con la población de cada uno inoculado con el antagonista.

El día de inicio del ensayo, además, se determinó el pH, el CSS y la AT de las frutas (apartados 1.5.3, 1.5.4 y 1.5.5).

2.2.2. Curvas de crecimiento de P. graminis CPA-7 en presencia de distintos ácidos orgánicos, a diferentes valores de pH y a diferentes temperaturas

Se estudió como afectó tanto el pH como el ácido orgánico utilizado para ajustarlo en el crecimiento de *P. graminis* CPA-7 a distintas temperaturas. A partir de una triple estría de *P. graminis* CPA-7 en medio TSA realizada a partir de una criobola del microorganismo, se inoculó un matraz Erlenmeyer con 50 mL de TSB y se

incubó en agitación a 25 °C durante 20-24 h. Este matraz fue el cultivo estérter-iniciador en los ensayos de crecimiento. De este matraz se tomaron las alícuotas para los distintos análisis. Los matraces Erlenmeyer con 50 mL de medio TSB ajustados a distintos valores de pH y con distintos ácidos se inocularon con 50 µL del cultivo iniciador. La concentración de *P. graminis* CPA-7 inicial de estos matraces fue de aproximadamente 10⁵ ufc/mL. Para ajustar el pH de los matraces se utilizaron ácido málico 5 M y ácido cítrico 5 M. Los tratamientos fueron los siguientes:

- (a) TSB (control)
- (b) TSB ajustado a pH 6,0 con ácido málico 5 M
- (c) TSB ajustado a pH 5,5 con ácido málico 5 M
- (d) TSB ajustado a pH 5,0 con ácido málico 5 M
- (e) TSB ajustado a pH 4,5 con ácido málico 5 M
- (f) TSB ajustado a pH 6,0 con ácido cítrico 5 M
- (g) TSB ajustado a pH 5,5 con ácido cítrico 5 M
- (h) TSB ajustado a pH 5,0 con ácido cítrico 5 M
- (i) TSB ajustado a pH 4,5 con ácido cítrico 5 M

Se inocularon 3 matraces Erlenmeyer por cada uno de los tratamientos y por temperatura evaluada. Los matraces se incubaron a 10, 15 y 25 °C en agitación a 150 rpm. De cada uno de los matraces se tomó muestra para hacer un seguimiento de la población bacteriana a distintos tiempos y además se tomó 1 mL de muestra de cada tiempo de análisis para medir el pH del medio utilizando un pH-metro GPL 22 (Crison Instruments, Barcelona, España) equipado con un electrodo convencional (52 02 Crison). Los resultados de la población bacteriana se expresaron como población bacteriana en log ufc/mL. El ensayo se repitió 2 veces.

2.2.3. Curvas de crecimiento de P. graminis CPA-7 en TSB preparado en una solución tamponada a 25 °C

Se determinó el crecimiento de *P. graminis* CPA-7 en medio TSB preparado en una solución tamponada a base de ácido cítrico 0,1 M y Na₂HPO₄ 0,2 M según el protocolo indicado por McIlvaine (1921) ajustada a pH 6,0, 5,5, 5,0, y 4,5. Para ello, los 3 matraces Erlenmeyer de cada uno de los valores de pH indicados

Materiales y métodos

anteriormente se inocularon con 50 μ L del cultivo iniciador, con lo que la concentración inicial de *P. graminis* CPA-7 fue de aproximadamente 10^5 ufc/mL. Estos matraces se incubaron a 25 °C en agitación (150 rpm). Se determinó la población bacteriana mediante recuento en placa el día de la inoculación y pasadas 24, 30, y 48 h de incubación. Los resultados se expresaron en log ufc/mL. El ensayo se llevó a cabo 2 veces.

Una vez conocidos los resultados de la fase anterior, se seleccionó el pH 5,5 como el valor mínimo de pH al que *P. graminis* CPA-7 pudo crecer en medio TSB tamponado.

2.2.4. Análisis estadístico de los datos

Los datos relativos a poblaciones microbianas en la fruta en ufc/g se transformaron a log ufc/g y los relativos a los de las curvas de crecimiento en ufc/mL se transformaron a log ufc/mL. Los datos se analizaron aplicando un modelo lineal general con el software JMP® 8 software (SAS Institute, Cary, NC, USA). Después de realizar la ANOVA, las diferencias significativas entre los tratamientos en el mismo tiempo de muestreo se analizaron mediante el test t-Student con una significación de $P < 0,05$, en el caso del ensayo de efectividad, y en caso del ensayo de curvas de crecimiento, tanto las diferencias significativas en los valores de población como de pH se analizaron mediante el test de Tukey ($P < 0,05$).

2.3. Uso de microorganismos probióticos como agentes de biocontrol en pera mínimamente procesada

La preparación del inóculo de cada microorganismo, el procesamiento de la fruta y la inoculación de esta se llevaron a cabo como se ha indicado en el apartado de metodología general (apartados 1.1, 1.2.2 y 1.3). El recuento en placa se realizó como se ha detallado en el apartado 1.2.2.1. La determinación de la población bacteriana en la pera mínimamente procesada se realizó siguiendo el protocolo explicado en el apartado 1.4.

2.3.1. Efecto antagonista de los probióticos L. acidophilus LA-5 y L. rhamnosus GG frente a S. enterica y L. monocytogenes

Tras haber procesado la pera y preparado los concentrados de los microorganismos, se procedió a inocular la fruta mediante inmersión en la

solución antioxidante (20 g/L de ácido ascórbico, 20 g/L de citrato de sodio y 10 g/L de CaCl₂). Previamente, para comprobar que esta solución antioxidante no afectaba a la viabilidad de los microorganismos se llevaron a cabo diferentes estudios *in vitro*. Para ello, se produjeron los concentrados de los microorganismos y se inocularon en tubos conteniendo 10 mL de la solución antioxidante anteriormente indicada (patógenos a 10⁵ ufc/mL y probióticos a 10⁸ ufc/mL). A las 2 h de inocularlos se tomó muestra y se hizo un recuento de la población bacteriana mediante siembra en placa. Como control se inocularon también tubos con agua desionizada estéril. Una vez comprobada que la solución antioxidante no afectaba a los probióticos estudiados, se procedió a realizar el ensayo.

Los tratamientos fueron los que se indican a continuación:

- (a) Sal + Lm: solución antioxidante inoculada con *S. enterica* y *L. monocytogenes* a 10⁵ ufc/mL cada microorganismo
- (b) *L. rhamnosus* GG o LA-5: solución antioxidante con *L. rhamnosus* GG o *L. acidophilus* LA-5 a una concentración de 10⁸ ufc/mL
- (c) Sal + Lm + *L. rhamnosus* GG o LA-5: solución antioxidante inoculada con *S. enterica* y *L. monocytogenes* (10⁵ ufc/mL) y con *L. rhamnosus* GG o *L. acidophilus* LA-5 (10⁸ ufc/mL)

Los gajos de pera se dejaron secar a temperatura ambiente. A continuación, 110 ± 5 g (8 gajos aproximadamente) se envasaron en barquetas de PP de 375 mL de capacidad y se sellaron con el film PP-110. Las barquetas con la pera mínimamente procesada se almacenaron a 5, 10 y 20 °C.

La población de los microorganismos se determinó en 3 barquetas por cada tratamiento (a, b y c) y a cada tiempo de análisis y temperatura. Las muestras se determinaron el día del inicio del ensayo y después de dos días de almacenamiento para la pera almacenada a 20 °C y tras 3, 6 y 10 días para aquellas barquetas almacenadas 5 y 10 °C. Cada una de las barquetas representaba una repetición con 3 repeticiones por tratamiento y por día de muestreo y temperatura. El experimento se llevó a cabo 2 veces.

Antes de cada recuento, se determinó la concentración de O₂ y CO₂ contenidos en el espacio de cabeza de cada uno de los envases de pera mínimamente procesada (apartado 1.5.2).

Materiales y métodos

2.3.2. Combinación de P. graminis CPA-7 y L. rhamnosus GG para el control de microorganismos patógenos de transmisión alimentaria

En este estudio se investigó el hecho de si al combinar los dos microorganismos antagonistas (*P. graminis* CPA-7 y *L. rhamnosus* GG) se podría mejorar el control de *S. enterica* y *L. monocytogenes*. Una vez procesada la pera y preparado los concentrados de los microorganismos, inoculó la fruta mediante inmersión en la solución antioxidante (20 g/L de ácido ascórbico, 20 g/L de citrato de sodio y 10 g/L de CaCl₂). Los tratamientos fueron los que se indican a continuación:

- (a) Sal + Lm: solución antioxidante inoculada con *S. enterica* y *L. monocytogenes* a 10⁵ ufc/mL cada microorganismo
- (b) *L. rhamnosus* GG o CPA-7: solución antioxidante con *L. rhamnosus* GG a una concentración 10⁸ ufc/mL o *P. graminis* CPA-7 a 10⁷ ufc/mL
- (c) Sal + Lm + *L. rhamnosus* GG o CPA-7: solución antioxidante inoculada con *S. enterica* y *L. monocytogenes* (10⁵ ufc/mL) y con *L. rhamnosus* GG (10⁸ ufc/mL) o *P. graminis* CPA-7 (10⁷ ufc/mL)
- (d) Sal + Lm + *L. rhamnosus* GG + CPA-7: solución antioxidante inoculada con *S. enterica* y *L. monocytogenes* (10⁵ ufc/mL) y con *L. rhamnosus* GG (10⁸ ufc/mL) y *P. graminis* CPA-7 (10⁷ ufc/mL)

Los gajos de pera se dejaron secar a temperatura ambiente. A continuación, 110 ± 5 g (8 gajos aproximadamente) de pera se envasó en barquetas PET de 400 mL con el film seleccionado en ensayos anteriores (film PET OLAF + OPP con una hilera de orificios de 60-80 µm cada uno y 75 mm de separación entre ellos). Las barquetas con la pera mínimamente procesada se almacenaron a 5 y 10 °C.

Las muestras se determinaron el día del inicio del ensayo y tras 6 y 9 días de almacenamiento. Cada una de las barquetas representaba una repetición con 3 repeticiones por tratamiento y por día de muestreo y temperatura. El experimento se llevó a cabo 2 veces.

Antes de cada recuento, se determinó la concentración de O₂ y CO₂ contenidos en el espacio de cabeza de cada uno de los envases de pera mínimamente procesada (apartado 1.5.2.).

2.3.3. Análisis estadístico de los datos

Los datos correspondientes al crecimiento microbiano se transformaron previamente a log ufc/g. Posteriormente, tanto los datos de población bacteriana

como los obtenidos al medir la concentración de gases dentro de las barquetas (O₂ y CO₂) se analizaron mediante un análisis de varianzas (ANOVA). Las diferencias significativas se analizaron, después, mediante el test estadístico t-Student con un nivel de significación de $P < 0,05$. Los datos se analizaron para determinar cualquier diferencia significativa entre tratamientos control (sin probióticos, solo patógenos) y peras tratadas con los probióticos y días de almacenamiento.

2.4. Determinación del comportamiento de *L. monocytogenes* CECT 4032 (serovar 4b) después de un período de adaptación en pera mínimamente procesada en presencia de *L. rhamnosus* GG

Este estudio se desarrolló siguiendo el siguiente esquema (Fig. 6):

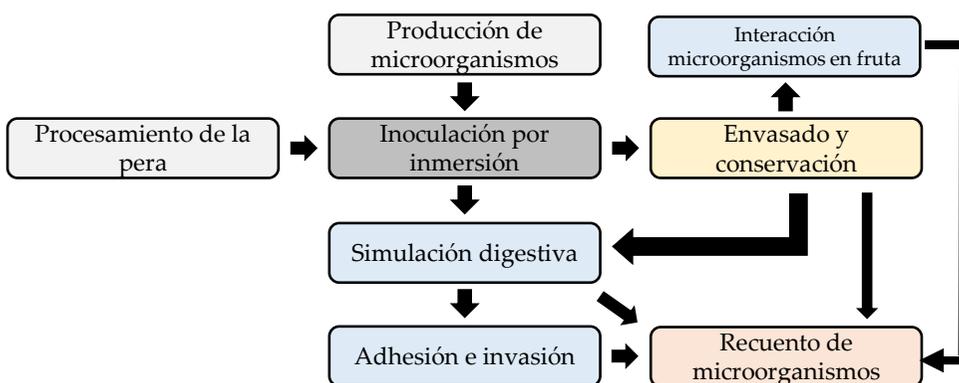


Figura 6. Esquema general de la metodología empleada para la realización del estudio de determinación del comportamiento de *L. monocytogenes* CECT 4032 tras habituarse en pera mínimamente procesada en presencia de *L. rhamnosus* GG.

La preparación del inóculo de cada microorganismo, el procesamiento de la fruta y la inoculación de esta se llevaron a cabo como se ha indicado en el apartado de metodología general (apartados 1.1, 1.2.2 y 1.3). En este caso se trabajó con una sola cepa de *L. monocytogenes*, y no con el cóctel de cepas. El recuento en placa se realizó como se ha detallado en el apartado 1.2.2.1. La determinación de la población bacteriana en la pera mínimamente procesada se realizó siguiendo el protocolo explicado en el apartado 1.4.

Materiales y métodos

2.4.1. Inoculación de la fruta

Para la realización de este estudio se utilizó solo la cepa de *L. monocytogenes* serovar 4b CECT 4032 y *L. rhamnosus* GG como microorganismo antagonista. La selección de esta cepa del patógeno para el estudio se hizo en base a que es uno de los serovares *L. monocytogenes* más virulentos y de los más frecuentes en las infecciones por esta bacteria (Kathariou, 2002; Rocourt *et al.*, 2000).

Los gajos de pera se sumergieron en una solución antioxidante (20 g/L de ácido ascórbico, 20 g/L de citrato de sodio y 10 g/L de CaCl₂) junto con los microorganismos con los siguientes tratamientos:

- (a) Lm: solución antioxidante con *L. monocytogenes* a una concentración de 10⁷ ufc/mL
- (b) *L. rhamnosus* GG: solución antioxidante con *L. rhamnosus* GG inoculado a 10¹⁰ ufc/mL
- (c) Lm + *L. rhamnosus* GG: solución antioxidante con *L. monocytogenes* (10⁷ ufc/mL) y *L. rhamnosus* GG (10¹⁰ ufc/mL)

Una vez inoculada la fruta se dejó secar temperatura ambiente y aproximadamente 8 gajos de pera (110 ± 5 g) se envasaron en atmósfera pasiva en barquetas de PP de 375 mL selladas con film PP-110. Las peras se almacenaron a 10 °C durante 7 días. A este período se le llamó período de adaptación o habituación.

2.4.2. Interacción de L. monocytogenes CECT 4032 (serovar 4b) y L. rhamnosus GG en pera mínimamente procesada

La determinación de la población bacteriana de ambos microorganismos se llevó a cabo en todos los tratamientos donde estaban presentes y a cada tiempo de muestreo. Las muestras se analizaron el día de la inoculación y tras 7 días de almacenamiento a 10 °C. La evaluación de los resultados se realizó comparando la población del patógeno inoculado solo con la población del patógeno inoculado con el probiótico.

Cada barqueta se consideró una repetición y se realizaron 3 repeticiones por tratamiento y por cada día de muestreo. El experimento se realizó 2 veces.

Además, a cada tiempo de muestreo y antes de la determinación bacteriana se determinó también la concentración de O₂ y CO₂ del espacio de cabeza de los envases (apartado 1.5.2).

2.4.3. Tolerancia de L. rhamnosus GG a la simulación digestiva y su efecto en la supervivencia de L. monocytogenes CECT 4032 (serovar 4b) tras la simulación digestiva

La simulación digestiva se llevó a cabo siguiendo el protocolo estándar para digestiones estáticas *in vitro* establecido por Minekus *et al.* (2014) con pequeñas modificaciones (Zudaire *et al.*, 2017) detalladas a continuación. Las muestras de pera mínimamente procesada procedían de las mismas barquetas utilizadas para el análisis del apartado anterior.

2.4.3.1. Preparación soluciones madre y fluidos digestivos para la simulación

En primer lugar se prepararon las soluciones madre de los electrolitos en las cantidades indicadas en la Tabla 8. Las soluciones se esterilizaron por filtración con botellas de poliestireno con un sistema de filtración al vacío y un filtro de 0,22 μm (VWR, Radnor, PA, EE.UU.). Las soluciones se almacenaron a 5 °C y un tiempo máximo de 6 meses, excepto la solución de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) que solo se almacenó durante 1 mes.

El flujo salival simulado (FSS), el flujo gástrico simulado (FGS) y el flujo intestinal simulado (FIS) se prepararon el día anterior al ensayo con las correspondientes soluciones de electrolitos indicadas en la Tabla 8. Las soluciones se enrasaron hasta el volumen final deseado con agua desionizada estéril y se determinó el pH de cada una con un pH-metro para asegurarnos de que el pH era el adecuado. A continuación, se filtraron con matraces Kitasato y filtros de acetato de nitrocelulosa 0,22 μm (Sartorius Sedim Biolab Products, Aubagne, Francia) con la ayuda de una bomba de vacío. Los flujos se almacenaron a temperatura ambiente hasta el día siguiente. El pH de cada flujo se midió en el momento de la preparación.

Tabla 8. Preparación de las soluciones madre de los flujos para la simulación digestiva. Los volúmenes indicados en la tabla están calculados para preparar soluciones madre de 500 mL.

Constituyente	FSS			FGS			FIS		
	Concentración sol. madre	pH7		pH3		pH7		Conc. en FIS	
		Vol. sol. madre	Conc. en FSS	Vol. sol. madre	Conc. en FGS	Vol. sol. madre	Conc. en FGS		
g/L	M	mL	mM	mL	mM	mL	mM	mM	
KCl	37,3	0,5	15,1	15,1	6,9	6,8	6,9	6,8	
KH ₂ PO ₄	68	0,5	3,7	3,7	0,9	0,8	0,9	0,8	
NaHCO ₃	84	1	6,8	13,6	12,5	42,5	25	85	
NaCl	117	2	-	-	11,8	9,6	47,2	38,4	
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30,5	0,15	0,5	0,15	0,4	1,1	0,1	0,33	
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0,5	0,06	0,06	0,5	-	0,5	-	
Ajustar pH	M	mL	mM	mL	mM	mL	mM	mM	
NaOH	1	-	-	-	-	-	-	-	
HCl	6	0,1	1,1	24	2	1,2	14,4	14,4	
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ *	M	M	mM	mM	mM	mM	mM	mM	
	44,1	0,3	1,5	0,15	0,15			0,6	

*CaCl₂(H₂O)₂ no se añadió a las soluciones madre de los electrolitos ya que podría precipitar. Todas las soluciones madre y los flujos se filtraron con la ayuda de una bomba de vacío y con un filtro de 0,22 µm. Los flujos se prepararon el día de la realización de la digestión, al igual que las soluciones madre de las enzimas y la bilis.

Para lograr la concentración adecuada de las enzimas y la bilis que indicaba el protocolo seguido para la simulación digestiva, se prepararon soluciones madre como se indica en la Tabla 9. Las soluciones enzimáticas se prepararon con agua destilada estéril y la bilis se preparó con FIS y en agitación. Estas soluciones se prepararon el mismo día del ensayo.

Tabla 9. Composición de las soluciones madre enzimáticas y biliar.

Enzima	g/10mL	U/mL
α-amilasa (400U/mg de proteína)	0,0375	1500
Pepsina (400U/mg de proteína)	0,625	25000
Pancreatina (100 U/mg de proteína)	0,08	800
	g/10 mL	mM
Bilis (400U/mg de proteína)	0,8	160

2.4.3.2. Simulación digestiva

Se determinó la supervivencia al tracto gastrointestinal de *L. monocytogenes* CECT 4032 y *L. rhamnosus* GG inoculados en la pera mínimamente procesada en cada uno de los tratamientos tanto el día del comienzo del ensayo como después de 7 días de almacenamiento de la pera a 10 °C, siguiendo el esquema descrito en la Figura 7.

Para simular la masticación y la fase oral de la digestión, se colocaron 5 g de pera de cada muestra en una bolsa de 80 mL estéril con filtro (BagPage®, Interscience BagSystem, Francia) junto con 3,5 mL de FSS atemperado a 37 °C, que se añaden para crear una consistencia pastosa fina, similar a la de la pasta de tomate o la mostaza, y se mezclaron en un homogeneizador Minimix (BagMixer® 100 MiniMix®, Interscience, Francia) durante 2 min a 7 golpes/s. A continuación, se añadieron 0,5 mL de la solución madre de α -amilasa, 25 μ L de la de CaCl₂ 0,3 M y 0,975 mL de agua desionizada. Esta mezcla se incubó durante 5 min a 37 °C.

Para simular la fase gástrica, a la mezcla anterior se le añadieron 7,5 mL de FGS atemperado a 37 °C, 1,6 mL de la solución madre de pepsina, 0,010 mL de la de CaCl₂ 0,15 M y 0,475 mL de agua desionizada. El pH se ajustó a 2,5-3,0 con 0,30 mL de HCl 1M. La mezcla se incubó a 37 °C durante 2 h.

Material es y métodos

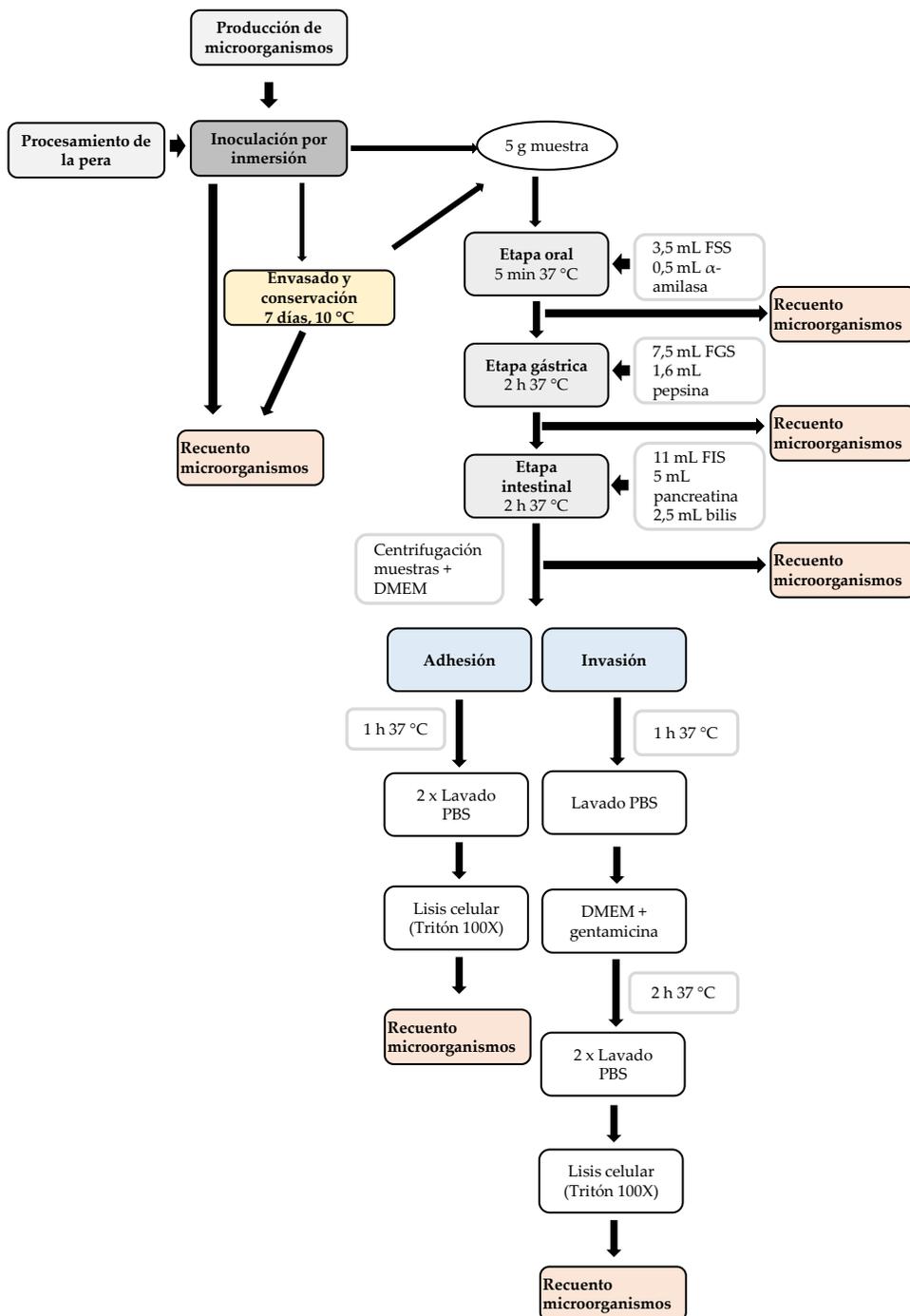


Figura 7. Esquema de la metodología empleada en los estudios de simulación digestiva y de la adhesión e invasión en las células Caco-2.

Pasado este tiempo se adicionaron 11,0 mL de FIS atemperado a 37 °C, 5,0 mL de pancreatina, 2,5 mL de bilis, 0,040 mL de CaCl₂ 0.3 M y 1,16 mL de agua desionizada para simular, así, la fase intestinal de la digestión. El pH se ajustó a 7,0-7,5 con 0,30 mL de NaOH 1M.

Después de cada fase, se tomó muestra para determinar la población de ambos microorganismos mediante siembra en placa en medios selectivos. En el caso de *L. monocytogenes* CECT 4032, se comparó la población del patógeno inoculado solo con la población en presencia del probiótico para analizar los resultados. Los resultados se expresaron en log ufc/g teniendo en cuenta las diluciones realizadas antes de calcular la tasa de supervivencia. La tasa de supervivencia se calculó de acuerdo con Guo *et al.* (2009) siguiendo la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de supervivencia (\%)} = (\log N_1 / \log N_0) * 100$$

Donde N_1 es el número total de bacterias viables después de la simulación digestiva *in vitro* (ufc/g) y N_0 el número total de bacterias viables contadas antes de la exposición a la simulación digestiva (ufc/g). El ensayo se llevó a cabo dos veces.

2.4.4. Evaluación de la capacidad de adhesión e invasión de los microorganismos tras un período de adaptación en pera mínimamente procesada

2.4.4.1. Cultivo de las células Caco-2

Células Caco-2 procedentes de la “European Collection of Authenticated Cell Cultures” (ECACC 86012202) se cultivaron en medio DMEM suplementado con 20 % (v/v) de suero fetal bovino, inactivado mediante un tratamiento térmico a 56 °C durante 30 min, 1 % de una solución de aminoácidos no esenciales y con penicilina (20.000 U/mL) y estreptomycin (20 g/L). Las células Caco-2 se prepararon en monocapa en placas de poliestireno de 24 pocillos (Falcon, EE.UU.). Las células se sembraron a una concentración de 10⁴ células/pocillo (una confluencia de un 50-60 %) que contenían medio DMEM y se incubaron a 5 % CO₂, 95 % de aire atmosférico, 90 % de humedad relativa y a 37 °C (Autoflow CO₂ water-jacketed incubator NuAire, MN, EE.UU.). Cada dos días se cambió el medio de los pocillos. Transcurridos 10-12 días, las células alcanzaron una

Materiales y métodos

concentración de 2×10^6 células por pocillo y estaban completamente diferenciadas.2.4.4.2. Ensayo adhesión e invasión

2.4.4.2. Ensayo de adhesión e invasión

Tras la simulación digestiva, 30 mL de cada una de las muestras sometidas al proceso digestivo se centrifugaron a 17.035 xg, durante 20 min y a 10 °C (Sorvall Legend™ XTR centrifuge, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en 15 mL de medio DMEM, obteniéndose el inóculo para el ensayo. La concentración del inóculo se comprobó por siembra en placa con las diluciones apropiadas y con el medio selectivo correspondiente de cada microorganismo.

Antes del ensayo de adhesión e invasión, las células Caco-2, ya diferenciadas, se estabilizaron con medio sin antibiótico durante 2 h. Pasado este tiempo, el medio se aspiró y los pocillos se lavaron con 1 mL de PBS dos veces. Cada pocillo (n = 6) se inoculó con 1 mL del inóculo que se había preparado anteriormente en DMEM.

Para el ensayo de adhesión, las células se incubaron durante 1 h a 37 °C, 5 % CO₂ y 90 % de humedad relativa para que se llevaran a cabo la adhesión y la invasión bacteriana en las células Caco-2. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a determinar los microorganismos adheridos. Para ello, el medio de cada pocillo se aspiró, y las bacterias no adheridas a las células Caco-2 se eliminaron mediante dos lavados con 1 mL PBS cada uno. A continuación, las células Caco-2 se lisaron (para liberar las bacterias invasoras) con 1 mL de Tritón 100X durante 5 min a temperatura ambiente. El lisado celular de tres pocillos se recogió en un mismo tubo de ensayo para hacer su posterior determinación mediante siembra en placa.

El ensayo de invasión se llevó a cabo solamente para *L. monocytogenes* CECT 4032 (tratamientos a y c). Se inocularon 6 pocillos de las placas con las células Caco-2 diferenciadas por cada uno de los tratamientos con 1 mL de suspensión bacteriana preparada en DMEM y se incubaron durante 1 h a 37 °C, 5 % CO₂ y 90 % de humedad relativa. Durante este período tuvo lugar la adhesión y penetración de las bacterias en dentro de las células. El medio de cada pocillo se absorbió y se lavaron con 1 mL de PBS dos veces, eliminando las células no adheridas. Cada pocillo se incubó con 1 mL de medio DMEM que contenía 0,1 % de gentamicina durante 2 h para destruir las bacterias adheridas. Transcurridas las 2 h, el medio se aspiró y las células se lavaron dos veces con 1 mL de PBS cada vez. Posteriormente se añadió 1 mL de Tritón 100X a cada pocillo y se dejó 5 min

a temperatura ambiente para lisar las células y liberar las bacterias contenidas en su interior (invasoras). El tritón con las células lisadas y las bacterias de 3 pocillos diferentes se recogió en un mismo tubo de ensayo. Las células viables de *L. monocytogenes* CECT 4032 que habían invadido las células Caco-2 se determinaron mediante siembra en placa. El experimento se realizó por duplicado.

Los datos obtenidos se transformaron en log ufc/g antes de calcular el índice de adhesión e invasión. Los resultados se expresaron en porcentaje de bacterias adheridas en relación a las del inóculo inicial y en porcentaje de bacterias que invadieron en relación al número de bacterias inicialmente añadidas, siguiendo las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ de Adhesión} = (\log N_{\text{adheridas+invasivas}} / \log N_{\text{inóculo}}) * 100$$

$$\% \text{ de Invasión} = (\log N_{\text{invasivas}} / \log N_{\text{inóculo}}) * 100$$

Donde $N_{\text{adheridas+invasivas}}$ son las bacterias adheridas y las que han invadido (ufc/g) expresadas en, $N_{\text{inóculo}}$ son las bacterias añadidas al principio del ensayo (ufc/g) y $N_{\text{invasivas}}$ las bacterias que penetraron en las células (ufc/g).

En caso de que los valores estuvieran por debajo del límite de detección (que en este caso es de 2,50 ufc/g), el valor utilizado para calcular el porcentaje fue la mitad del límite de detección (1,25 ufc/g).

2.4.5. Análisis estadístico de los datos

Para analizar los datos de la interacción de microorganismos, antes de realizar el análisis, los resultados de la población de los microorganismos en la pera se transformaron en log ufc/g. Los datos obtenidos se analizaron mediante ANOVA con la ayuda del software JMP® 8 software (SAS Institute, Cary, NC, USA). Tras la ANOVA, las diferencias significativas entre la población de los microorganismos se analizaron aplicando el test t-Student ($P < 0,05$). Los tratamientos se compararon a cada tiempo de muestreo del ensayo.

Además, en cada tiempo de muestreo, las diferencias significativas observadas entre la población de *L. monocytogenes* CECT 4032 de ambos tratamientos (inoculada junto con *L. rhamnosus* GG o sin su presencia) en cada una de las fases de la simulación digestiva, también se analizaron mediante el test t-Student con

Materiales y métodos

una significación de $P < 0,05$. Por otra parte, se analizaron las diferencias significativas entre las distintas fases de la digestión dentro del mismo tratamiento aplicando el test de Tukey ($P < 0,05$).

Las diferencias significativas entre los valores de adhesión e invasión del mismo microorganismo obtenidos entre tratamientos se analizaron con el test t-Student ($P < 0,05$). Los tratamientos se compararon entre ellos a cada tiempo de muestreo y, por otra parte, se compararon los resultados obtenidos en el mismo tratamiento a lo largo del ensayo.

2.5. Evaluación de la capacidad antagonista de *P. graminis* CPA-7 y *L. rhamnosus* GG frente a *S. enterica* y *L. monocytogenes* y efecto en la calidad de la pera “Conference” mínimamente procesada tratada o no con CaCl_2 en poscosecha

2.5.1. Tratamiento de CaCl_2 poscosecha

Para la realización de este estudio, se recolectó pera “Conference” de un campo comercial situado en la Partida Grealó de Lleida. La recolección se realizó el 11 de agosto de 2014, con unos valores iniciales de firmeza de $61,3 \pm 5,6$ N, $12,7 \pm 0,4$ °Brix y $2,6 \pm 0,3$ g ácido málico/L.

Una vez recolectada, la fruta se trasladó inmediatamente a las instalaciones del FruitCentre. Allí las peras se dividieron en dos lotes. Los frutos enteros del lote 1 se sumergieron durante 5 min en agua a 25 °C, este grupo se utilizó como control. Los frutos enteros del lote 2 se sumergieron en una solución de CaCl_2 que contenía una concentración de 10 g/L durante 5 min a 25 °C. Posteriormente, ambos lotes de peras se almacenaron a 0 ± 1 °C en atmósfera controlada (2 % O_2 y 1 % CO_2) durante 5 y 8 meses.

2.5.2. Procesamiento de la fruta e inoculación

La preparación del inóculo de cada microorganismo, el procesamiento de la fruta y la inoculación de esta se llevaron a cabo como se ha indicado en el apartado de metodología general (apartados 1.1, 1.2.2 y 1.3). El recuento en placa se realizó como se ha detallado en el apartado 1.2.2.1. La determinación de la población bacteriana en la pera mínimamente procesada se realizó siguiendo el protocolo explicado en el apartado 1.4.

Para la realización de los ensayos con ambos antagonistas, las peras se inocularon por inmersión en una solución antioxidante (20 g/L ácido ascórbico, 20 g/L citrato de sodio y 10 g/L) con la concentración de microorganismos descrita en el apartado de metodología general.

- (a) Control (solución antioxidante sin inocular con los microorganismos)
- (b) Sal + Lm (a 10^5 ufc/mL cada microorganismo)
- (c) CPA-7 o *L. rhamnosus* GG (a una concentración de ufc/mL, respectivamente)
- (d) Sal + Lm + CPA-7 o *L. rhamnosus* GG (los patógenos a una concentración 10^5 , *P. graminis* CPA-7 a 10^7 y *L. rhamnosus* GG a 10^8 ufc/mL, respectivamente)

Una vez los gajos de pera se secaron a temperatura ambiente, 110 ± 5 g se envasaron en atmósfera pasiva. Para el experimento con *P. graminis* CPA-7, la pera se envasó en barquetas PET de 400 mL con el film seleccionado en ensayos anteriores (film PET OLAF + OPP con una hilera de orificios de 60-80 μ m cada uno y 75 mm de separación entre ellos). Para el ensayo con *L. rhamnosus* GG, se utilizaron barquetas de PP de 375 mL y se sellaron con film PP-110. Las barquetas con la pera mínimamente procesada se almacenaron a 5 °C. Las muestras se examinaron el día de la inoculación y transcurridos 2, 6 y 9 días desde el inicio del ensayo.

Las poblaciones de *S. enterica* y *L. monocytogenes* se determinaron en los tratamientos (b) y (d), *P. graminis* CPA-7 se evaluó en el tratamiento (c) y *L. rhamnosus* GG en los tratamientos (c) y (d). Los análisis se efectuaron en tres barquetas por cada tratamiento y a cada tiempo de análisis.

Para evaluar los resultados, se compararon las poblaciones de los patógenos inoculados solos con las poblaciones en presencia del microorganismo antagonista.

De cada una de las barquetas, antes del análisis microbiológico, se determinó la concentración de gases del espacio de cabeza.

Además se analizaron el día del ensayo y tras 2, 6 y 9 días de almacenamiento el CSS (metodología apartado 1.5.3), la AT (metodología apartado 1.5.4), la concentración de etanol y acetaldehído y el perfil de volátiles de la pera mínimamente procesada. La evaluación de estos parámetros se llevó a cabo solo

Materiales y métodos

en los tratamientos que no presentaban microorganismos patógenos (tratamientos a y c).

2.5.3. Determinación de la concentración de etanol y acetaldehído en pera mínimamente procesada

2.5.3.1. Preparación de las muestras

La concentración de etanol y acetaldehído en pera se determinaron de acuerdo con el protocolo descrito por Ke *et al.* (1994) con algunas modificaciones. Estos compuestos se determinaron a partir del mismo zumo extraído para evaluar el CSS y la AT. Las muestras de zumo (5 mL) se almacenaron a -20 °C hasta el día del análisis.

2.5.3.2. Análisis

Las muestras se colocaron en tubos de ensayo de 10 mL tapados con un tapón de goma a presión y se incubaron en un baño a 60 °C. Después de 60 min, se tomó, con la ayuda de una jeringa, 1 mL del gas contenido en el espacio de cabeza del tubo y se inyectó en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N (Agilent Technologies, Inc., Littleton, EE.UU.) asociado a un detector de llama ionizante (FID) y a una columna (2 m × 2 mm d.i.) de Carbopack de 60/80 de malla recubierto con un 5 % de Carbowax (Supelco, Bellefonte, PA, EE.UU.). La temperatura del inyector, del detector y del horno fueron 180, 220 y 80 °C, respectivamente. La concentración de ambos productos se calculó utilizando curvas de calibración obtenidas mediante la medida del espacio de cabeza de los tubos conteniendo agua Milli-Q y una cantidad conocida de etanol y acetaldehído a concentraciones crecientes. Los resultados fueron expresados en ppm (partes por millón).

2.5.4. Determinación de compuestos volátiles

2.5.4.1. Preparación de las muestras

Para la determinación, se tomaron 4 piezas de fruta por cada barqueta (n = 12) y por cada tratamiento. Las piezas de fruta se cortaron en trozos pequeños, se congelaron con N₂ líquido y se trituraron. Se almacenaron a -80 °C hasta su determinación.

2.5.4.2. Extracción de los compuestos volátiles

La extracción y concentración de los compuestos volátiles se llevó a cabo mediante técnica de microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME) descrita por Qin *et al.* (2012) con algunas modificaciones. Las fibras de SPME estaban recubiertas por una capa de polidimetilsiloxano-divinilbenceno (65 μm PDMS/DVB; Supelco Co., Bellefonte, PA, EE.UU.). Las fibras se activaron previamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En un vial de vidrio se introdujeron 4 g de la muestra triturada, 1 μL de butilbenceno 0,086 $\mu\text{g/L}$ (patrón estándar) y 0,5 g de NaCl (para facilitar la liberación de compuestos volátiles). Esta mezcla se agitó con una varilla de vidrio, se le introdujo un imán y se cerró el vial. A continuación se calentó la muestra 60 $^{\circ}\text{C}$ en un baño y se mantuvo en agitación durante 20 min. Transcurrido este tiempo se introdujo la fibra de SPME en el espacio de cabeza del vial durante 30 min para adsorber los analitos presentes. Los compuestos volátiles se desorbieron en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases a una temperatura de 240 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 min.

2.5.4.3. Análisis de los compuestos volátiles

La cuantificación de los compuestos volátiles extraídos se llevó a cabo mediante cromatografía de gases (GC) en un cromatógrafo HP 5890A (Hewlett-Packard Co., Barcelona, España) con un detector de llama ionizante. La separación de los analitos se hizo con una columna capilar con ácidos grasos libres reticulados como fase estacionaria (FFAP; 50 m \times 0.2 mm \times 0.33 μm) y helio como gas portador con un flujo constante de 1,0 mL/min. La temperatura del inyector y del detector fue de 240 $^{\circ}\text{C}$. La temperatura del horno se mantuvo a 40 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 min incrementando posteriormente 2,5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 115 $^{\circ}\text{C}$ y, por último, subiendo hasta 225 $^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, donde se mantuvo durante 15 min.

La confirmación de los compuestos se llevó a cabo mediante un cromatógrafo de gases asociado a un espectrómetro de masas (GC-MS) Agilent 6890N (Agilent Technologies, Inc., Littleton, EE.UU.), usando la misma columna que en el análisis de cromatografía de gases. El espectro de masas se obtuvo con una fuente de ionización con un impacto electrónico de 70 eV. Se utilizó helio como gas portador y el mismo gradiente de temperatura explicado anteriormente. Los datos del espectro se registraron (Hewlett-Packard 3398 GC Chemstation) y se

Materiales y métodos

compararon con aquellos del espectro de masas de la base de datos original NIST HP59943C. Los resultados se expresaron en ppb (partes por billón).

2.5.5. Análisis estadístico de los datos

Antes de llevar a cabo el análisis de varianzas (ANOVA), los datos relativos a poblaciones microbianas en ufc/g se transformaron a log ufc/g. El resto de datos no se transformaron. Los datos se analizaron aplicando un modelo lineal general con el software JMP® 8 software (SAS Institute, Cary, NC, USA). Después de realizar la ANOVA, las diferencias significativas entre los tratamientos en el mismo tiempo de muestreo se analizaron mediante el test t-Student con una significación de $P < 0,05$.

Se realizó un modelo de regresión de mínimos cuadrados parciales (partial least square regression, PLSR) con el software Unscrambler 9.1.2. (CAMO, 2004). El modelo de regresión se usó como un modelo predictivo para relacionar la población de los microorganismos antagonistas con un conjunto de variables (X) entre las que se encontraban los compuestos volátiles emitidos y la concentración de O₂ y CO₂. Previamente a la realización del modelo, Previamente a la realización del modelo, los datos fueron centrados y pesados usando la inversa de la desviación estándar de cada variable para evitar el efecto o influencia de las distintas escalas de medida usadas en cada una de las variables analizadas (Martens y Naes, 1989). Una validación cruzada completa fue utilizada como método de validación de la regresión.

RESULTADOS

1. Evaluación de la efectividad de la cepa *Pseudomonas graminis* CPA-7 en el control de patógenos de transmisión alimentaria

Estudios previos con *P. graminis* CPA-7 revelaron que esta bacteria es capaz de controlar el crecimiento de distintos patógenos de transmisión alimentaria en manzana, melocotón y melón mínimamente procesados bajo las condiciones evaluadas. Por ello, y con la finalidad de ampliar su espectro de acción, se analizó su efecto antagonista frente *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes* en pera mínimamente procesada.

1.1. Determinación de la capacidad antagonista de *P. graminis* CPA-7 en el control de *S. enterica* y *L. monocytogenes* en pera mínimamente procesada

En un primer estudio, se determinó la población de los microorganismos en pera mínimamente procesada, envasada en aire (21,0 % O₂ y 0,0 % CO₂) y almacenada a 5, 10 y 20 °C (Fig. 8). La población de *P. graminis* CPA-7 en los gajos de pera se incrementó de 5,6 a 8,3 log ufc/g tras 10 días de almacenamiento a 5 °C (Fig. 8A). Por su parte, la población de *S. enterica* justo después de inocular la pera fue de 3,7 log ufc/g independientemente de estar inoculada conjuntamente con *P. graminis* CPA-7 o no. Durante el tiempo de almacenamiento de la pera mínimamente procesada a 5 °C (10 días), la población de este patógeno descendió 0,5 unidades logarítmicas cuando se inoculó solo y más de 2 unidades logarítmicas cuando se inoculó junto con *P. graminis* CPA-7. Se observaron diferencias significativas entre la población del tratamiento control (Sal + Lm) y la población en el tratamiento con *P. graminis* CPA-7 (Sal + Lm + CPA-7) tras 6 y 10 días de almacenamiento, con una reducción final de 1,6 unidades logarítmicas. Por otra parte, la población inicial de *L. monocytogenes* fue de 2,1 en el tratamiento control (Sal + Lm) y de 1,9 log ufc/g inoculada conjuntamente con *P. graminis* CPA-7 (Sal + Lm + CPA-7). La población del patógeno inoculado solo se incrementó significativamente hasta 5,6 log ufc/g después de 10 días de almacenamiento a 5 °C. Sin embargo, cuando el patógeno se inoculó junto con *P. graminis* CPA-7, la tendencia fue diferente. Hasta el día 6 de almacenamiento se observó un crecimiento del patógeno de casi 2 unidades logarítmicas (3,8 log ufc/g), pero tras este período, la población descendió hasta situarse en 3,3 log ufc/g al final del ensayo (10 días). Se observaron diferencias significativas entre los dos tratamientos tras 6 y 10 días. La población de *L. monocytogenes* inoculada

Resultados

con *P. graminis* CPA-7 se vio reducida 2,4 unidades logarítmicas al final del ensayo comparando con el tratamiento en el que no se inoculó con el antagonista.

A 10 °C, la población de *P. graminis* CPA-7 aumentó, aproximadamente, 3 unidades logarítmicas tras 10 días (Fig. 8B), alcanzando una población final de 8,4 log ufc/g. La población inicial de *S. enterica* en la pera mínimamente procesada en ambos tratamientos fue de 3,7 log ufc/g. Cuando el patógeno se inoculó solo, su población no varió significativamente durante el ensayo. Por el contrario, cuando se inoculó junto con *P. graminis* CPA-7, su población disminuyó alcanzando 1,5 log ufc/g al final del tiempo de almacenamiento de la pera. Se observaron diferencias significativas (excepto el día de la inoculación), con una reducción final de 2,2 unidades logarítmicas con respecto del tratamiento control. En el caso de *L. monocytogenes* la población aumentó, aproximadamente, 4 unidades logarítmicas a lo largo del ensayo cuando se inoculó sin *P. graminis* CPA-7 en la pera mínimamente procesada. Sin embargo, cuando el patógeno se inoculó conjuntamente con *P. graminis* CPA-7 la población aumentó 1,6 unidades logarítmicas durante los 3 primeros días para después descender hasta alcanzar el valor inicial (2,1 log ufc/g). Se observaron diferencias significativas entre el tratamiento control y el tratamiento con *P. graminis* CPA-7, con una reducción final de 4 unidades logarítmicas.

A 20 °C, *P. graminis* CPA-7 aumentó, aproximadamente, 3 unidades logarítmicas durante los 2 días de conservación (Fig. 8C). La población de *S. enterica* cuando se inoculó sin *P. graminis* CPA-7 se vio incrementada en aproximadamente 3 unidades logarítmicas, sin embargo, cuando se inoculó junto con *P. graminis* CPA-7 solamente creció 0,6 unidades logarítmicas. Así pues, se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos después de 2 días de almacenamiento a 20 °C. Con respecto a la población de *L. monocytogenes* en el tratamiento sin *P. graminis* CPA-7 aumentó aproximadamente 5 unidades logarítmicas durante los 2 días de almacenamiento. Se observaron diferencias significativas entre el control y el tratamiento con *P. graminis* CPA-7, en el cual el patógeno creció 2,2 unidades logarítmicas.

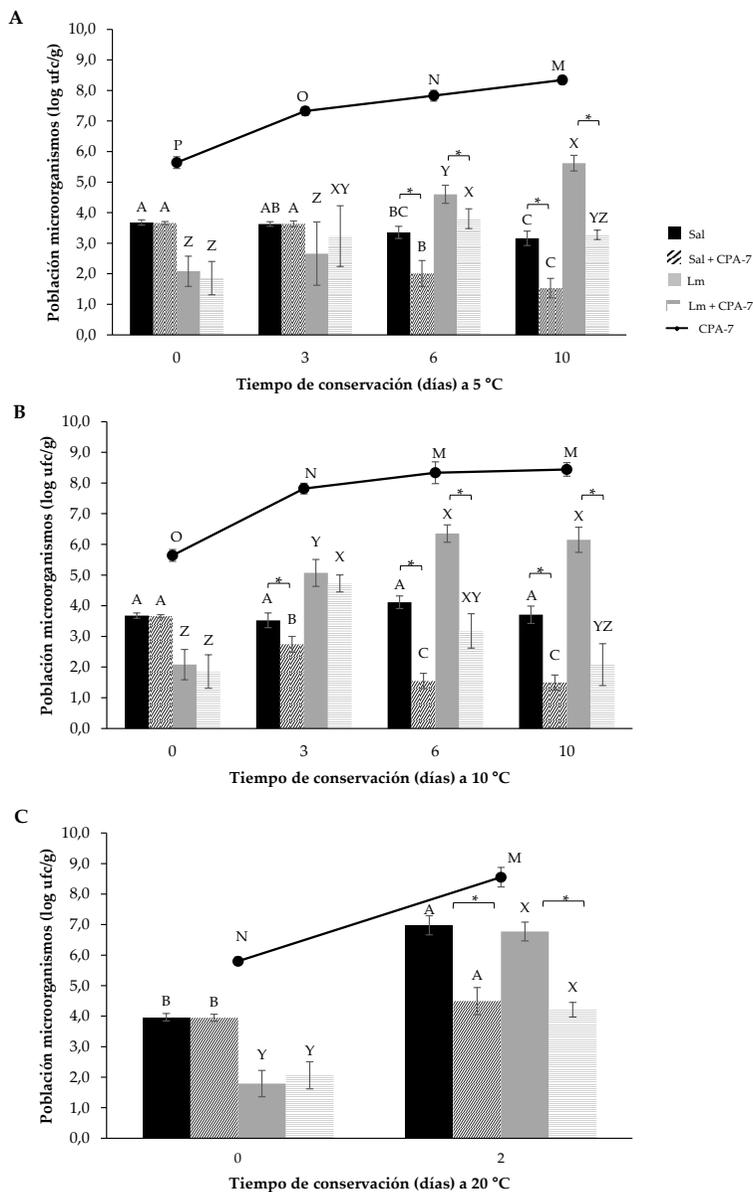


Figura 8. Población de *S. enterica*, *L. monocytogenes* y *P. graminis* CPA-7 (log ufc/g) en pera mínimamente procesada envasada en aire y almacenada a 5 (A), 10 (B) y 20 °C (C). Los resultados son la media de 6 valores. Las barras verticales indican la desviación de la media. Dentro del mismo tratamiento, diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas a lo largo del almacenamiento de acuerdo con el test de Tukey ($P < 0,05$) para 5 y 10 °C y con el test *t*-Student ($P < 0,05$) para 20 °C. Para cada tiempo de muestreo, * indica diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al test *t*-Student ($P < 0,05$).

Resultados

1.2. Efecto de *P. graminis* CPA-7 sobre *S. enterica* y *L. monocytogenes* simulando la aplicación comercial

En un segundo estudio, tras comprobar que *P. graminis* CPA-7 fue efectiva en el control del crecimiento de los microorganismos patógenos de transmisión alimentaria evaluados en pera mínimamente procesada conservada en aire a distintas temperaturas, se analizó su efectividad bajo condiciones que simulan la aplicación comercial (bajo atmósfera modificada pasiva y en presencia de una solución antioxidante).

La población de los microorganismos en la pera mínimamente procesada tratada con la solución antioxidante y envasada en atmósfera modificada pasiva se muestra en la Figura 9.

A 5 °C, la población de *S. enterica* descendió de 3,6 a 2,9 log ufc/g tras 10 días de almacenamiento (Fig. 9A). Además, la población también disminuyó cuando se inoculó conjuntamente con *P. graminis* CPA-7, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos. En el caso de *L. monocytogenes*, su población aumentó en los dos tratamientos (con y sin *P. graminis* CPA-7) durante el ensayo (10 días). Sin embargo, la población del patógeno cuando se inoculó junto a *P. graminis* CPA-7 fue significativamente menor que la población en la pera mínimamente procesada inoculada sin el antagonista. A pesar de ello, la reducción observada (1,3 unidades logarítmicas) fue más baja que la que se observó previamente en la pera envasada en aire (2,4 unidades logarítmicas).

A 10 °C (Fig. 9B), no se observó el efecto de *P. graminis* CPA-7 sobre los patógenos. Tanto la población de *S. enterica* como la de *L. monocytogenes* aumentaron, independientemente de la presencia de *P. graminis* CPA-7.

A 20 °C, la población de *S. enterica* aumentó 3,7 unidades logarítmicas cuando se inoculó sola sobre la pera mínimamente procesada y 3,3 unidades logarítmicas inoculada junto con *P. graminis* CPA-7 (Fig. 9C). Estos datos mostraron diferencias significativas entre ambos tratamientos. *L. monocytogenes* creció aproximadamente 4 unidades logarítmicas cuando se inoculó sola y 3,7 unidades logarítmicas cuando se inoculó junto con *P. graminis* CPA-7. Aunque se encontraron diferencias significativas cuando se comparó la población del microorganismo del tratamiento control con la del tratamiento con *P. graminis* CPA-7, la reducción observada (0,4 unidades logarítmicas) fue menor que la

obtenida en la pera mínimamente procesada envasada en aire y sin solución antioxidante (2,8 unidades logarítmicas).

A todas las temperaturas evaluadas, la población de *P. graminis* CPA-7 aumentó, aproximadamente, 2 unidades logarítmicas hasta el final del almacenamiento, alcanzando una población final en todos los casos de, aproximadamente, 7 unidades logarítmicas.

Resultados

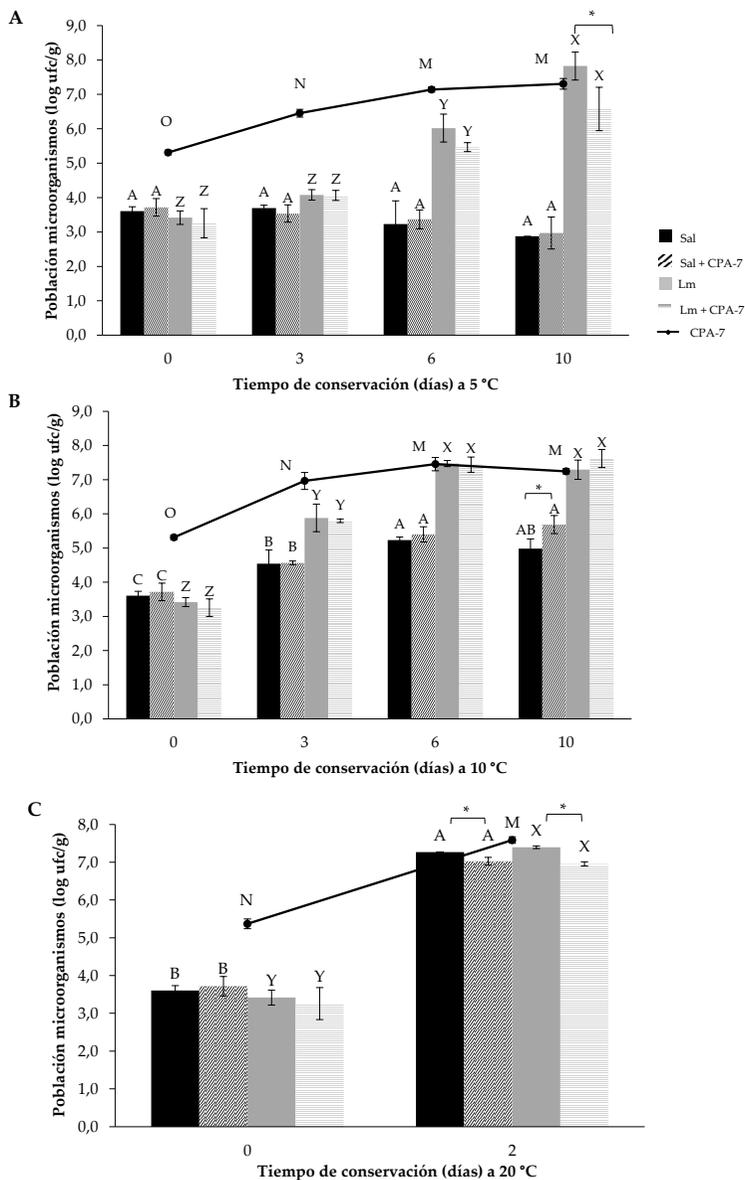


Figura 9. Población de *S. enterica*, *L. monocytogenes* y *P. graminis* CPA-7 (log ufc/g) en pera mínimamente procesada envasada en atmósfera modificada pasiva y almacenada a 5 (A), 10 (B) y 20 °C (C). Los resultados son la media de 3 valores. Las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Dentro del mismo tratamiento, diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas a lo largo del almacenamiento de acuerdo con el test de Tukey ($P < 0,05$) para 5 y 10 °C y con el test *t*-Student ($P < 0,05$) para 20 °C. Para cada tiempo de muestreo, * indica diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al test *t*-Student ($P < 0,05$).

La composición de gases del espacio de cabeza de los envases varió durante el almacenamiento en función de la temperatura de conservación. A 5 °C (Fig. 10A) la concentración de O₂ se redujo de forma más paulatina que a 10 °C (Fig. 10B) y a 20 °C (Datos no mostrados), alcanzando valores de 0,0 % tras 6 días de almacenamiento, mientras que a 10 y 20 °C, la concentración, prácticamente, fue 0,0 % a los 3 y 2 días de almacenamiento, respectivamente.

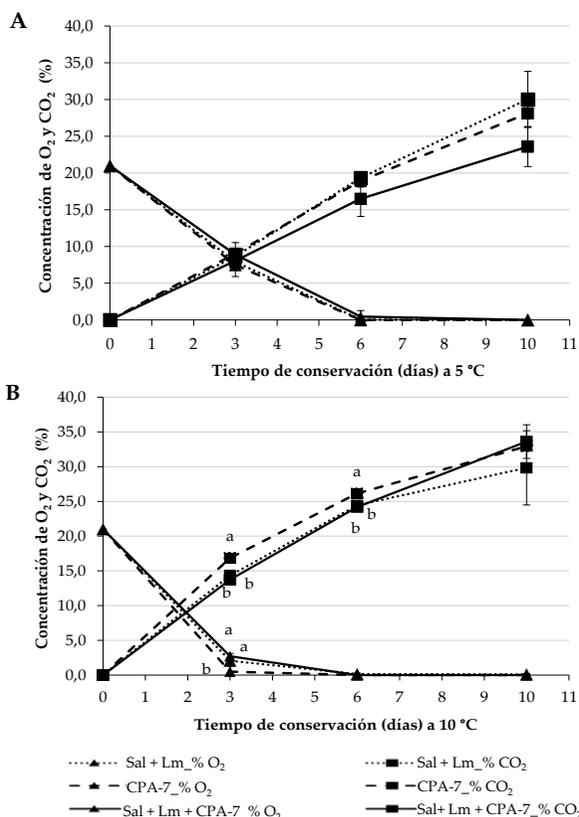


Figura 10. Concentración de O₂ y CO₂ (%) en el espacio de cabeza de las barquetas de pera mínimamente procesada almacenadas a 5 (A) y 10 °C (B). Los resultados son la media de 3 valores. Para cada tiempo de muestreo, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con el test de Tukey ($P < 0,05$). Donde no hay letras, no se observaron diferencias significativas.

En las barquetas almacenadas a 5 °C no se observaron diferencias significativas ni en la concentración de O₂ ni de CO₂ entre tratamientos en cada uno de los días analizados. A 10 °C la concentración de CO₂ dentro de las barquetas de pera tratada con *P. graminis* CPA-7 después de 3 y 6 días de almacenamiento fue significativamente mayor que en resto de tratamientos, en los cuales la

Resultados

concentración de CO₂ fue $\geq 25,0$ % tras 5 días. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos con respecto a la concentración de O₂, excepto a los 3 días cuando la concentración en los envases con la pera tratada con *P. graminis* CPA-7 fue menor (0,1 %) que en los otros tratamientos (2,1 y 2,7 %, respectivamente).

Debido a la reducción de la efectividad de *P. graminis* CPA-7 cuando se evaluó en condiciones que simulaban su aplicación comercial, es decir, en presencia de una solución antioxidante y envasado en atmósfera modificada pasiva. El efecto de ambos factores se estudió independientemente.

1.3. Optimización de la solución antioxidante

Para determinar si era la solución antioxidante la que afectaba a *P. graminis* CPA-7 se analizaron *in vitro* diferentes sustancias y sus combinaciones (Tabla 10), poniendo en contacto el antagonista con la suspensión estudiada y determinando su población tras 1 y 2 h.

La mayoría de las sustancias evaluadas causaron una reducción en la población de *P. graminis* CPA-7 (> 2 unidades logarítmicas) tras 1 y 2 h después de la inoculación, observándose diferencias significativas comparando con el tratamiento control (agua), en el cual la bacteria se mantuvo constante tras 2 h de incubación. Sin embargo con las combinaciones AA 2 % + CitNa 2 % + CaCl₂ 1 % (AOX1) y AscCa 2 % + CaCl₂ 1 % (AOX 2) la población de *P. graminis* CPA-7 no se vio afectada, por lo que se seleccionaron para realizar el estudio *in vivo*, evaluando el efecto de las dos soluciones antioxidantes seleccionadas en la población de *S. enterica*, *L. monocytogenes* y de *P. graminis* CPA-7 y en la efectividad de *P. graminis* CPA-7 en pera mínimamente procesada y almacenada a 10 °C envasada en aire (Tabla 11).

En el caso de *S. enterica*, tras la inoculación de la fruta no se observaron diferencias significativas entre las poblaciones en el control y los dos tratamientos antioxidantes independientemente de la presencia o no de *P. graminis* CPA-7. Tras 5 días de almacenamiento a 10 °C, el uso de antioxidante afectó a la población de *S. enterica* ya que se encontraron diferencias significativas con respecto del tratamiento control. Sin embargo, puesto que no se vieron diferencias significativas en la población del patógeno entre los tres tratamientos en el caso de que el patógeno estuviera inoculado con *P. graminis* CPA-7, se podría decir que el antioxidante no afectó al efecto del antagonista.

Tabla 10. Supervivencia de *P. graminis* CPA-7 (log ufc/mL) tras 1 y 2 h de contacto con soluciones compuestas por diferentes agentes antioxidantes.

Productos	(% p/v)	pH solución	Reducción bacteria 1 h (log ufc/mL)	Reducción bacteria 2 h (log ufc/mL)
Control (agua)	-	-	No reducción	No reducción
AA	2 %	2,2	2,9 ± 0,0*	2,6 ± 0,2*
AC	1 %	1,6	2,7 ± 0,0*	2,5 ± 0,0*
AscCa	1 %	7,4	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	2 %	7,4	0,3 ± 0,2*	0,6 ± 0,3*
CitNa	2 %	8,7	2,5 ± 0,2*	2,3 ± 0,2*
CaCl ₂	1 %	9,7	0,3 ± 0,1*	0,1 ± 0,1*
	2 %	9,7	0,1 ± 0,1*	0,3 ± 0,0*
AA + AscCa	2 % + 2 %	4,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,0
AA + AscNa	2 % + 2 %	4,2	1,1 ± 0,1*	3,1 ± 0,2*
AA + CaCl ₂	2 % + 2 %	2,1	3,2 ± 0,0*	3,2 ± 0,0*
AscCa + CaCl ₂	2 % + 1 %	7,3	No reducción	No reducción
AA + AC + CaCl ₂	2 % + 1 % + 1%	1,6	3,4 ± 0,0*	3,3 ± 0,0*
	2 % + 1 % + 1%	3,9	0,0 ± 0,0	No reducción
AA + CitNa + CaCl ₂	2 % + 2 % + 1%	4,0	No reducción	No reducción
NS	5 %	7,4	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1
FF	1 %	1,7	3,2 ± 0,1*	3,2 ± 0,0*

Cada valor representa la media de tres repeticiones.

“No reducción” indica un ligero incremento de la población de *P. graminis* CPA-7.

* indica diferencias significativas respecto a los tratamientos control (agua desionizada) de acuerdo con el test t-Student con una significación de $P < 0,05$.

Resultados

Tabla 11. Población de los microorganismos en la pera mínimamente procesada tratada o no con las soluciones antioxidantes y almacenadas a 10 °C y en aire (21,0 % O₂ y 0,0 % CO₂).

Microorganismos	Tratamientos	Solución antioxidante	Días de almacenamiento	
			0	5
CPA-7	CPA-7	Control	5,6 x	8,2 x
		AOX1	5,5 x	8,2 x
		AOX2	5,3 x	7,9 x
<i>S. enterica</i>	<i>S. enterica</i>	Control	4,1 a	5,1 a
		AOX1	4,0 a	4,2 b
		AOX2	3,9 a	4,3 b
	<i>S. enterica</i> + CPA-7	Control	4,1 m	3,6 m
		AOX1	4,1 m	3,0 m
		AOX2	4,1 m	3,2 m
<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Control	3,8 a	6,9 a
		AOX1	3,8 a	6,6 a
		AOX2	3,8 a	6,3 a
	<i>L. monocytogenes</i> + CPA-7	Control	3,7 m	5,4 m
		AOX1	3,8 m	5,8 m
		AOX2	3,7 m	5,1 m

AOX 1: AA 2 % + CitNa 2 % + CaCl₂ 1 %; AOX 2: AscCa 2% + CaCl₂ 1 %; Control: agua

Los valores mostrados son la media de los obtenidos (log ufc/g) (n = 6).

Para cada tratamiento, letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre la población en el tratamiento control y la de las soluciones antioxidantes de acuerdo con el test de Tukey con un nivel de significación de P < 0,05.

Ninguno de los dos antioxidantes, independientemente del tiempo de muestreo y de la presencia *P. graminis* CPA-7, influyeron en la población de *L. monocytogenes*. Tampoco se observaron diferencias significativas en el crecimiento de *P. graminis* CPA-7 entre aquellas peras tratadas o no con ambas soluciones antioxidantes y el control a ninguno de los tiempos de análisis, por lo que se podría decir que las soluciones antioxidantes no afectaron la población de *P. graminis* CPA-7 ni a su efectividad. La solución antioxidante AOX 1, utilizada en el ensayo previo, no afectó a la efectividad y fue el que se utilizó en el ensayo, por lo que se puede deducir que no fue el factor causante de la reducción de la efectividad de *P. graminis* CPA-7 en condiciones que simulan su aplicación comercial.

1.4. Optimización de las condiciones de envasado

Para optimizar el film se tuvieron en cuenta criterios de efectividad de la cepa junto con criterios de calidad ya que la permeabilidad del film es crucial para mantener la calidad del producto. Se ensayaron 3 films y se compararon con el envasado en aire.

La población inicial de *S. enterica* en la pera mínimamente procesada (Fig. 11A) fue de 4,0 log ufc/g en las muestras inoculadas o no con *P. graminis* CPA-7. A los 5 días de almacenamiento a 10 °C, las poblaciones de *S. enterica* en el tratamiento control (Sal) fueron de 5,7, 5,7, 5,2 y 5,4 log ufc/g en la pera mínimamente procesada envasada en aire, con el film 1, el film 2 y el film 3, respectivamente. Así, no se observaron diferencias significativas en la población de *S. enterica* entre las distintas atmósferas de envasado. Sin embargo, cuando *S. enterica* se inoculó junto con *P. graminis* CPA-7, tras 5 días de almacenamiento a 10 °C, la población del patógeno disminuyó en pera envasada en aire y con los films 1 y 2, sin embargo, se produjo un incremento en los envases con el film 3 con respecto a la población inicial. Las reducciones observadas con respecto al tratamiento sin el antagonista fueron de 2,5, 3,6 y 2,9 unidades logarítmicas en los envases de aire, con el film 1 y con el film 2, respectivamente. Sin embargo, con el film 3, el patógeno creció hasta alcanzar valores similares (5,4 log ufc/g) a los obtenidos en el tratamiento control (sin *P. graminis* CPA-7), por lo que en este caso no se observó el efecto de *P. graminis* CPA-7 sobre el patógeno.

La población inicial de *L. monocytogenes* en el tratamiento control (Lm) fue de 3,7 log ufc/g y en el tratamiento donde se inoculó conjuntamente con *P. graminis* CPA-7 fue de 3,5 log ufc/g (Fig. 11B). Transcurridos 5 días desde el inicio del ensayo y tras haber almacenado la pera mínimamente procesada en aire, la

Resultados

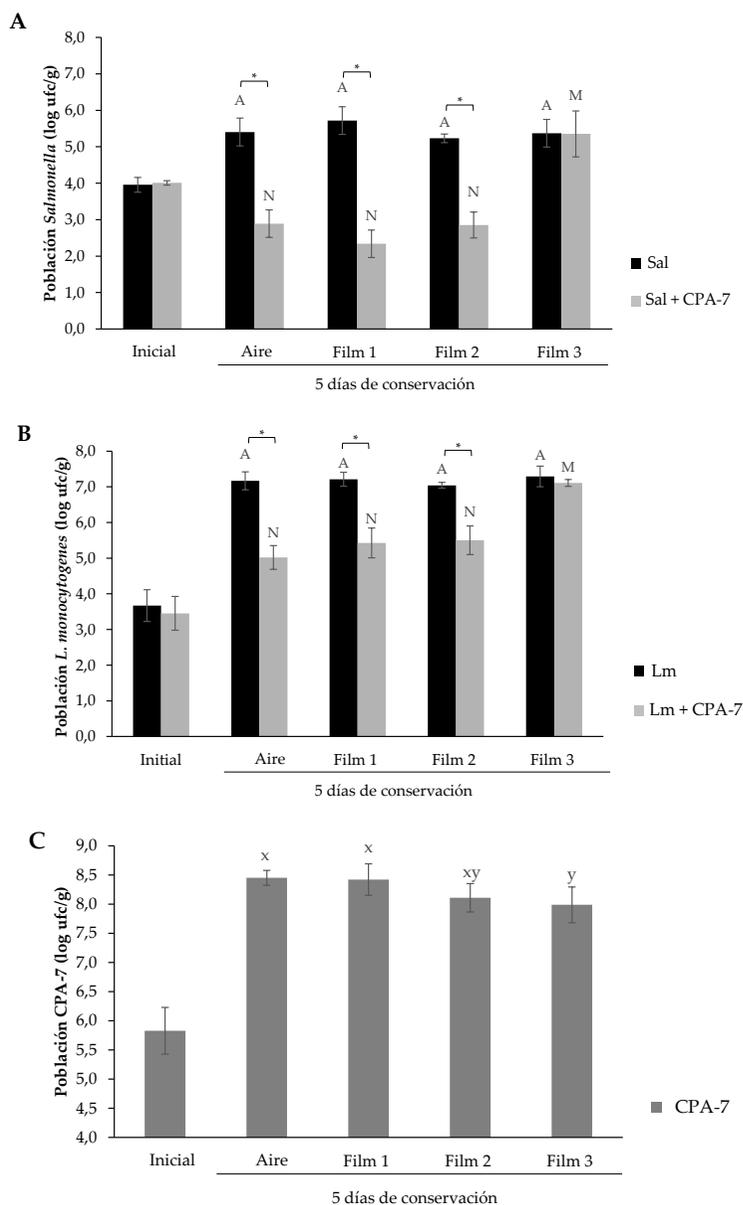


Figura 11. Población (log ufc/g) de *S. enterica* (A), *L. monocytogenes* (B) y *P. graminis* CPA-7 en pera mínimamente procesada envasada con diferentes atmósferas pasivas y almacenada a 10 °C. Los resultados son la media de 6 valores. Letras diferentes indican diferencias a lo largo del tiempo de almacenamiento dentro del mismo tratamiento de acuerdo con el test de Tukey ($P < 0,05$). Para cada tiempo de muestreo, * muestra diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con el test t-Student ($P < 0,05$).

población de este patógeno en el tratamiento control se vio incrementada en casi 4 unidades logarítmicas (7,2 log ufc/g) e inoculada conjuntamente con *P. graminis* CPA-7 aumentó hasta 5,0 log ufc/g, lo cual significó una reducción de, aproximadamente, 2 unidades logarítmicas. Algo similar sucedió cuando la pera se envasó con el film 1. La población de *L. monocytogenes* del tratamiento control alcanzó 7,2 log ufc/g, este patógeno en el tratamiento control se vio incrementada en casi 4 unidades logarítmicas (7,2 log ufc/g) e inoculada conjuntamente con *P. graminis* CPA-7 aumentó hasta 5,0 log ufc/g, lo cual significó una reducción de, aproximadamente, 2 unidades logarítmicas. Algo similar sucedió cuando la pera se envasó con el film 1. La población de *L. monocytogenes* del tratamiento control alcanzó 7,2 log ufc/g, mientras que inoculada junto con *P. graminis* CPA-7 la población solamente creció hasta 5,4 log ufc/g. Cuando la pera se envasó con el film 2 y se almacenó a 10 °C durante 5 días, la población del patógeno aumentó hasta 7,0 log ufc/g y 5,0 log ufc/g en el tratamiento control e inoculada con *P. graminis* CPA-7, respectivamente. De forma que se obtuvieron reducciones similares en la población de *L. monocytogenes* en la pera envasada con los films 1 y 2. Sin embargo, la población del patógeno en la pera envasada con el film 3, tras 5 días de almacenamiento, fue prácticamente la misma inoculada o no conjuntamente con el *P. graminis* CPA-7, con valores de 7,3 y 7,1 log ufc/g, respectivamente.

La población de *P. graminis* CPA-7 en pera mínimamente procesada (Fig. 11C) se incrementó 2,6 unidades logarítmicas tras 5 días de almacenamiento a 10 °C en aire. Un aumento similar se observó en la pera envasada con los films 1 y 2. Sin embargo, la población de *P. graminis* CPA-7 en la pera mínimamente procesada envasada con el film 3 fue significativamente menor (0,5 unidades logarítmicas respecto a la población observada en aire).

Las concentraciones de CO₂ y O₂ en los envases con el film 1 (Tabla 12) fueron, prácticamente, igual que las observadas en los envases con aire. La concentración de O₂ dentro de los envases sellados con el film 2 fue de 4,8-6,2 % y la de CO₂ estuvo entre 14,0-14,6 %. Sin embargo, en las barquetas con el film 3 la concentración de O₂ alcanzó valores de 0,0 % y los valores más altos de la concentración de CO₂ (18,7-21,1 %). No se observaron diferencias significativas de las concentraciones de gases entre las barquetas selladas con el mismo film en función del tratamiento aplicado. Sin embargo, sí que se observaron diferencias significativas entre barquetas del mismo tratamiento selladas con los diferentes films utilizados. Por tanto, podemos decir que la permeabilidad de los films es un

Resultados

factor que afecta a la efectividad de la cepa *P. graminis* CPA-7 y que fue el factor causante de la reducción de efectividad en el ensayo anterior (apartado 1.2).

Tabla 12. Composición del espacio de cabeza (% O₂ y CO₂) de las barquetas de pera mínimamente procesada. Los gajos de pera se trataron con AOX1, se envasaron con un film con diferente permeabilidad y se almacenaron a 10 °C durante 5 días.

	Días	Tratamiento	Atmósfera dentro del envase				
			Aire	Film 1	Film 2	Film 3	
O ₂	0	CPA-7	21,0 Aw	21,0 Aw	21,0 Aw	21,0 Aw	
		Sal + Lm	21,0 Aw	21,0 Aw	21,0 Aw	21,0 Aw	
		Sal + Lm + CPA-7	21,0 Aw	21,0 Aw	21,0 Aw	21,0 Aw	
	5	CPA-7	21,3 Aw	18,9 Aw	6,2 Bw	0,0 Cw	
		Sal + Lm	20,3 Aw	19,2 Aw	4,8 Bw	0,0 Cw	
		Sal + Lm + CPA-7	20,1 Aw	18,3 Aw	5,8 Bw	0,0 Cw	
	CO ₂	0	CPA-7	0,0 Aw	0,0 Aw	0,0 Aw	0,0 Aw
			Sal + Lm	0,0 Aw	0,0 Aw	0,0 Aw	0,0 Aw
			Sal + Lm + CPA-7	0,0 Aw	0,0 Aw	0,0 Aw	0,0 Aw
5		CPA-7	0,8 Cw	3,0 Cw	14,0 Bw	20,2 Aw	
		Sal + Lm	0,7 Dw	2,2 Cw	14,2 Bw	18,7 Aw	
		Sal + Lm + CPA-7	0,8 Dw	3,2 Cw	14,6 Bw	21,1 Aw	

Los valores mostrados son la media de los obtenidos en los envases (%) ($n = 6$).

Letras mayúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias entre diferentes atmósferas de envasado en el mismo tiempo de muestreo de acuerdo con el test de Tukey ($P < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos para cada gas usando la misma atmósfera de envasado y en el mismo tiempo muestral de acuerdo al test de Tukey ($P < 0,05$).

1.5. Efectos de las condiciones de envasado en la calidad de la pera mínimamente procesada

Como la elección de la permeabilidad del film es un parámetro crítico para mantener la calidad de la fruta mínimamente procesada, se evaluó el efecto de los diferentes films sobre el color, la textura y la calidad visual.

1.5.1. Color

Los parámetros de color se midieron inicialmente y tras 5 días de almacenamiento a 10 °C (Tabla 13). El índice de pardeamiento aumentó a lo largo del almacenamiento, y excepto para aquellas peras envasadas con el film 3, se observaron diferencias significativas con respecto del valor inicial.

1.5.2. Textura

Las diferentes atmósferas afectaron a la textura de la pera mínimamente procesada (Tabla 13). No se observaron diferencias significativas entre el valor inicial (16,0 N) y las muestras envasadas en aire (16,1 N), con el film 2 (15,9 N) y con el film 3 (16,0 N). Sin embargo, la firmeza de la pera envasada con el film 1 disminuyó de forma significativa durante el ensayo.

Tabla 13. Parámetros de calidad de la pera mínimamente procesada el día del ensayo (inicial) y tras 5 días de almacenamiento a 5 °C envasada bajo distintas atmósferas pasivas.

Parámetros de calidad	Inicial	5 días			
		Aire	Film 1	Film2	Film 3
Calidad visual	9 A	2,6 C	2,8 BC	4,1 B	5,2 B
Índice de pardeamiento	13,2 B	18,6 A	18,2 A	18,7 A	17,9 AB
Textura	16,0 AB	16,1 AB	13,8 B	15,9 AB	17,1 A

Cada valor es la media de 3 repeticiones. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre distintas atmósferas de envasado de acuerdo con el test de Tukey ($P < 0,05$).

Resultados

1.5.3. Calidad visual

Inicialmente, la pera mínimamente procesada obtuvo la mayor puntuación en la escala hedónica (9, excelente) (Tabla 13). Sin embargo, después de 5 días de almacenamiento a 10 °C solo la fruta envasada con el film 3 alcanzó el límite de comercialización (5,2 puntos) y las muestras envasadas con el film 2 obtuvieron casi la puntuación necesaria para alcanzar ese límite (4,1). Las peras envasadas en atmósferas similares a la composición del aire atmosférico (aire y film 1) tuvieron la menor puntuación.

En base a los resultados obtenidos en el estudio (Tabla 14) en relación a la efectividad de *P. graminis* CPA-7 y a la calidad de la pera mínimamente procesada se seleccionó el film 2.

Tabla 14. Resumen de los parámetros considerados para la selección del film de envasado de la pera mínimamente procesada.

	Efectividad <i>P. graminis</i> CPA-7		Calidad		
	<i>S. enterica</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Visual	Color	Textura
Aire	✓	✓	✗	✗	✓
Film 1	✓	✓	✗	✗	✗
Film 2	✓	✓	—	✗	✓
Film 3	✗	✗	✓	✓	✓

✓ indica buen resultado, — indica resultado aceptable; ✗ indica resultado negativo

2. Ampliación del espectro de acción de *P. graminis* CPA-7

2.1. Evaluación de la capacidad antagonista en las distintas frutas

P. graminis CPA-7 creció en todas las frutas evaluadas entre 1,6 y 4,0 log ufc/g, excepto en la piña, en la que su población se redujo 1,4 unidades logarítmicas tras 5 días de almacenamiento a 10 °C (Figs. 12 y 13). Naranja y fresa fueron las frutas donde menos aumentó su población (< 1 unidad logarítmica) y en sandía donde más (4 unidades logarítmicas). Naranja, fresa, manzana “Fuji” y piña fueron las frutas que mostraron los valores más bajos de pH (3,5-3,6) (Tabla 15). La mandarina también presentó un pH bajo, pero la bacteria no estuvo en contacto directo con la pulpa de la fruta ya que los gajos conservaban la membrana carpelar, podría ser por este motivo por el que *P. graminis* CPA-7 fue capaz de crecer 3 unidades logarítmicas.

El efecto antagonista de *P. graminis* CPA-7 sobre *S. enterica* y *L. monocytogenes* se observó en las dos variedades de manzanas (“Fuji” y “Pink Lady”), sandía, nectarina, mandarina, y melón “Galia” (Fig. 12). Por lo general, en todas las frutas mencionadas, se observaron mayores reducciones en la población de *S. enterica* que en la de *L. monocytogenes* tras 5 días de almacenamiento a 10 °C, excepto en melón “Galia”, donde solo se observó una reducción de 1,3 unidades logarítmicas en la población de *L. monocytogenes* (Fig. 12A).

En sandía (Fig. 12B), cuando *S. enterica* se inoculó sin *P. graminis* CPA-7 aumentó, aproximadamente, 2 unidades logarítmicas, sin embargo, en presencia de *P. graminis* CPA-7 su población se vio reducida 2 unidades logarítmicas al finalizar el tiempo de conservación. Por su parte, *L. monocytogenes* fue capaz de crecer aproximadamente 4 unidades logarítmicas cuando se inoculó sin el antagonista en la sandía mínimamente procesada tras los 5 días de conservación, aunque en presencia de este, su población aumentó solamente 2 unidades logarítmicas, lo que significó una reducción de 2 unidades logarítmicas con respecto del tratamiento sin *P. graminis* CPA-7.

En las dos variedades de manzana evaluadas (Figs. 12C y 12D), la población de *S. enterica* inoculada sola prácticamente se mantuvo constante durante todo el ensayo, sin embargo, cuando se inoculó con *P. graminis* CPA-7 disminuyó 2,7 unidades logarítmicas con respecto del control. *L. monocytogenes* inoculada sin *P. graminis* CPA-7 aumentó 2 unidades logarítmicas tras 5 días de conservación a

Resultados

10 °C, pero al ser inoculada junto con el antagonista, su población se redujo alrededor de 2 unidades logarítmicas.

En mandarina (Fig. 12E), tanto *S. enterica* como *L. monocytogenes* inoculadas sin el antagonista aumentaron su población, sin embargo, la población de *S. enterica* se redujo 2,3 unidades logarítmicas y la de *L. monocytogenes* 1,8 unidades logarítmicas en presencia de *P. graminis* CPA-7.

En nectarina (Fig. 12F) se observó un aumento de la población de *S. enterica* de, aproximadamente, 2 logaritmos cuando se inoculó sola, sin embargo, cuando el patógeno se inoculó con *P. graminis* CPA-7, la población se situó 1,6 unidades logarítmicas por debajo de la población inicial, lo que supuso una reducción de 3,4 unidades logarítmicas con respecto del control al final del tiempo de conservación de la fruta. *L. monocytogenes* por su parte, creció 3,3 unidades logarítmicas cuando se inoculó sobre la fruta sin el antagonista, sin embargo, en presencia de *P. graminis* CPA-7, su población aumentó menos de 1 unidad logarítmica, obteniéndose casi 3 unidades logarítmicas de reducción al final del ensayo.

En el resto de frutas (kiwi, mango, piña, fresa, naranja y melón “Cantaloupe”) no se observó efecto antagonista de *P. graminis* CPA-7 (Fig. 13), ya que las poblaciones de ambos patógenos fueron las mismas en presencia o no del antagonista.

Tabla 15. Parámetros de calidad de las diferentes frutas evaluadas.

Fruta "Variedad"	pH	CSS ^a	AT
Kiwi "Haywar"	4,4 ± 0,2	12,5 ± 0,1	9,4 ± 0,5 ^b
Mango "Kent"	4,3 ± 0,1	16,7 ± 0,1	2,8 ± 0,1 ^b
Fresa "Splendour"	3,5 ± 0,1	13,8 ± 0,0	2,2 ± 0,1 ^b
Naranja "Lane Late"	3,6 ± 0,1	15,0 ± 0,1	8,3 ± 0,1 ^b
Piña "Gold"	3,5 ± 0,1	13,8 ± 0,0	6,0 ± 0,3 ^b
Mandarina "Ortanique"	4,3 ± 0,3	12,1 ± 0,1	3,8 ± 0,0 ^b
Melón "Cantaloupe"	6,1 ± 0,1	13,0 ± 0,0	1,0 ± 0,1 ^b
Melón "Galia"	6,4 ± 0,2	10,4 ± 0,1	1,0 ± 0,0 ^b
Sandía "Fashion"	5,5 ± 0,2	11,5 ± 0,1	1,2 ± 0,0 ^b
Manzana "Fuji"	4,4 ± 0,1	12,4 ± 0,0	1,6 ± 0,0 ^c
Manzana "Pink Lady"	3,6 ± 0,1	15,4 ± 0,1	4,4 ± 0,0 ^c
Nectarina "Big Top"	3,8 ± 0,1	11,8 ± 0,1	4,1 ± 0,0 ^c

Los resultados de pH son la media de 5 valores ± la desviación estándar de la media.

Los resultados de CSS y AT son la media de 3 valores ± la desviación estándar de la media.

^a CSS están expresados como °Brix

^b AT expresada en g ácido cítrico/L

^c AT expresada en g ácido málico/L

Resultados

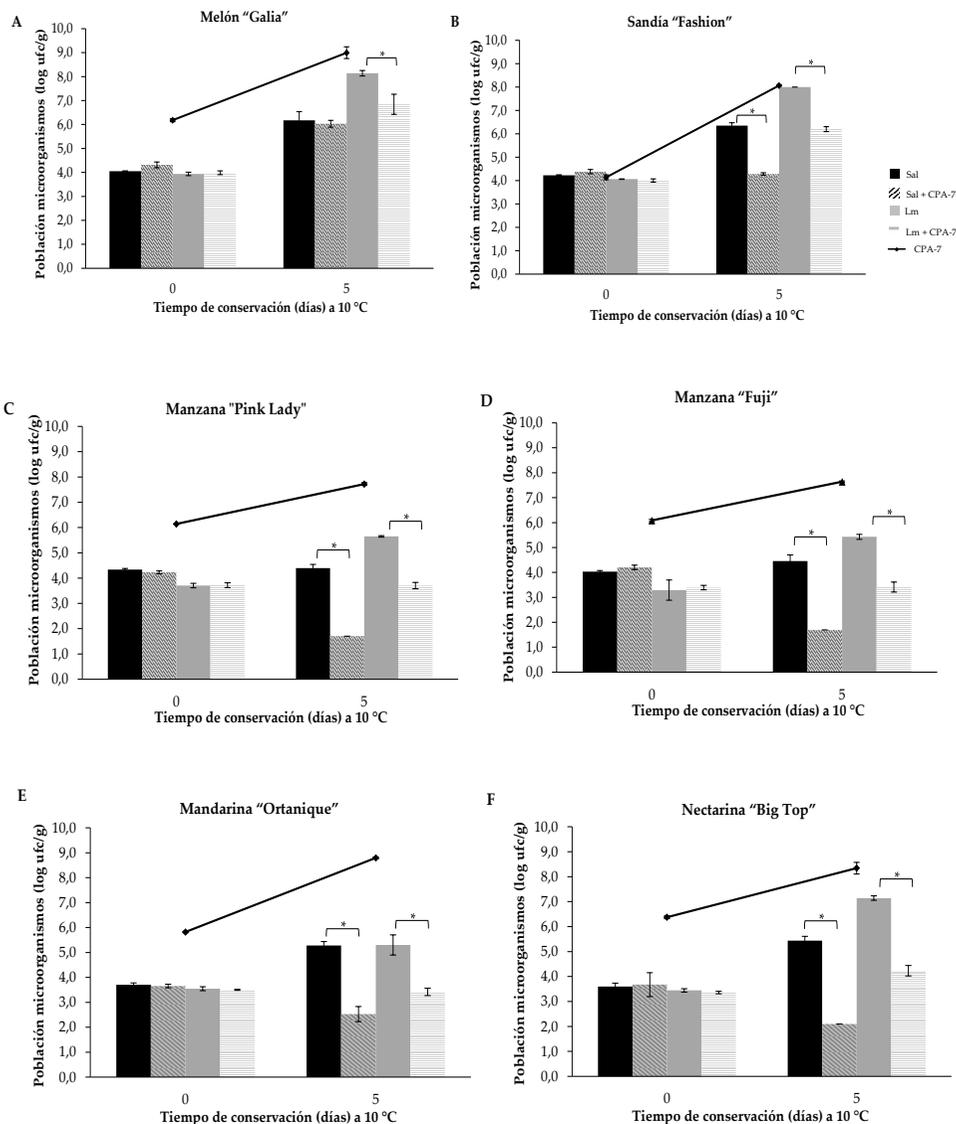


Figura 12. Población de *S. enterica*, *L. monocytogenes* y *P. graminis* CPA-7 (log ufc/g) en diferentes frutas procesadas envasadas en aire y almacenadas a 10 °C. Los resultados son la media de 3 valores. Las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Para cada tiempo de muestreo, * indica diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al test *t*-Student ($P < 0,05$).

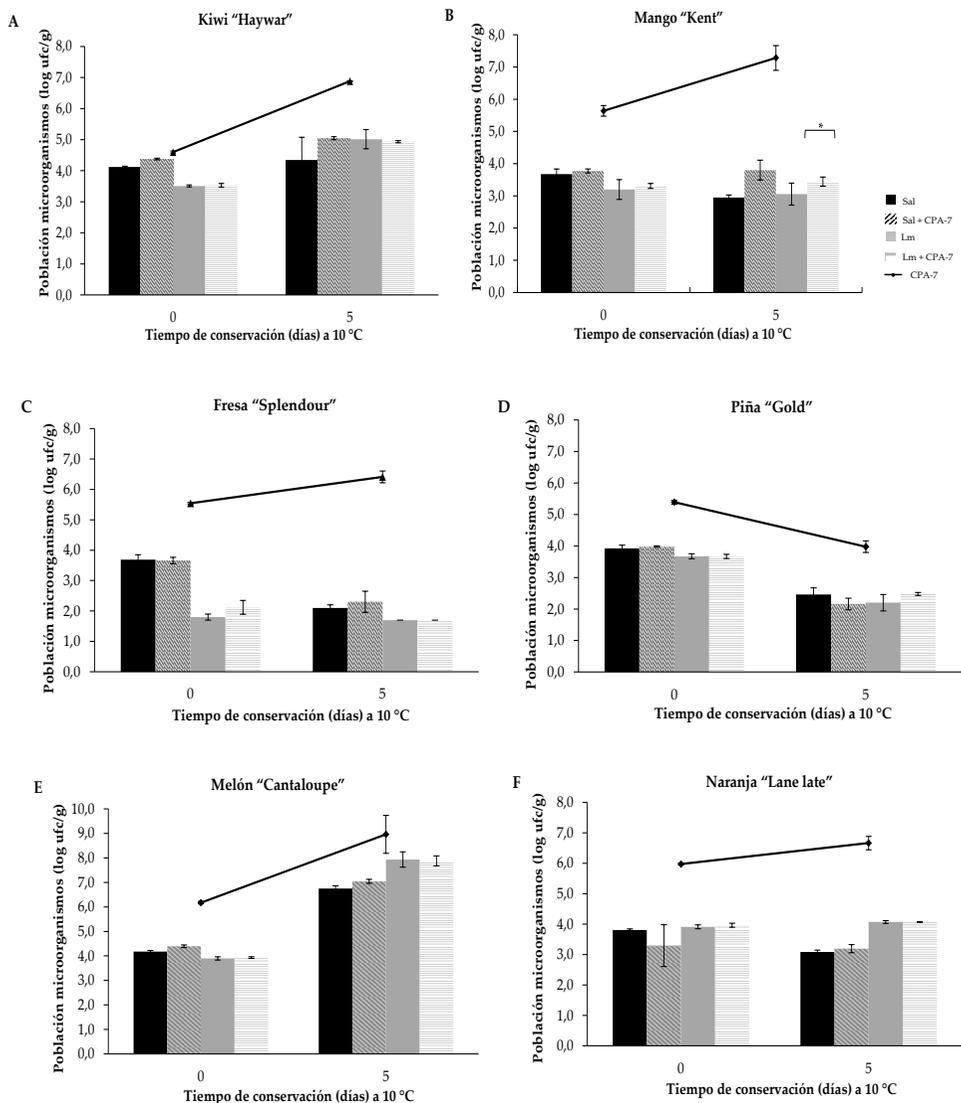


Figura 13. Población de *S. enterica*, *L. monocytogenes* y *P. graminis* CPA-7 (*log ufc/g*) en diferentes frutas procesadas envasadas en aire y almacenadas a 10 °C. Los resultados son la media de 3 valores. Las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Para cada tiempo de muestreo, * indica diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al test *t*-Student ($P < 0,05$).

Resultados

2.2. Curvas de crecimiento de *P. graminis* CPA-7 en presencia de distintos ácidos orgánicos, a diferentes valores de pH y a diferentes temperaturas

Tras observar que el efecto antagonista de *P. graminis* CPA-7 se vio afectado dependiendo de la fruta utilizada, se planteó estudiar su crecimiento a distintas temperaturas en medio líquido (TSB) en presencia de distintos ácidos (málico y cítrico) y distintos pH para ver estos si fueron los factores que le podían afectar.

A 10 °C (Fig.14), se observó que, independientemente del ácido utilizado, *P. graminis* CPA-7 creció, aproximadamente, 5 unidades logarítmicas en todos los tratamientos excepto a pH 4,5 (en el que no se observó crecimiento alguno). A pH 5,0 la fase estacionaria se alcanzó más tarde (5 días) cuando el pH se ajustó con ácido málico y 10 días cuando se ajustó con cítrico. El pH del medio aumentó con el tiempo de incubación, excepto en el tratamiento a pH 4,5, hasta situarse alrededor de 8,5 tanto cuando el medio fue ajustado con ácido málico como con cítrico.

A 15 °C (Fig. 15), *P. graminis* CPA-7 alcanzó la fase estacionaria antes que a 10 °C, alcanzando una población de, aproximadamente, 10^{10} ufc/mL. Cuando el pH del medio se ajustó con ácido málico, se alcanzó la fase estacionaria a los 3 días aproximadamente en todos los tratamientos, excepto a pH 4,5, en el que no se observó crecimiento. Cuando el pH del medio se ajustó con ácido cítrico, se observó que la población de *P. graminis* CPA-7 alcanzó la fase estacionaria a los 3 días en los tratamientos control, a pH 6,0 y a pH 5,5, sin embargo, a pH 5,0 alcanzó la fase estacionaria a los 5 días. Al igual que a 10 °C, el pH del medio aumentó a medida que lo hizo la población de *P. graminis* CPA-7, excepto el de pH 4,5.

A 25 °C (Fig. 16) no se observó crecimiento de *P. graminis* CPA-7 en el tratamiento a pH 4,5. La población de *P. graminis* CPA-7 en los medios ajustados con ácido málico (Fig. 16A), la fase estacionaria en los medios ajustados a pH 6,0, 5,5 y 5,0 se alcanzó en torno a las 30 h de incubación. En los tratamientos donde el pH se ajustó con ácido cítrico (Fig. 16B) se alcanzó la fase estacionaria también en torno a las 48 h en el tratamiento control, a pH 6,0 y a pH 5,5, sin embargo, a pH 5,0 se llegó a este punto aproximadamente 50 h tras haber comenzado el ensayo.

El pH del medio aumentó a medida que aumentaba la población de la bacteria hasta situarse, aproximadamente, a 8,0-8,5 en todos los tratamientos, excepto a pH 4,5 en el que no se observó crecimiento.

Resultados

De los resultados obtenidos se observó que el crecimiento de *P. graminis* CPA-7, por lo general, fue más lento a pH 5,0, independientemente de la temperatura evaluada y del ácido utilizado para ajustar el pH del medio. A pH 4,5 no se observó crecimiento de *P. graminis* CPA-7 a ninguna de las condiciones ensayadas, al igual que no hubo variación del pH.

Resultados

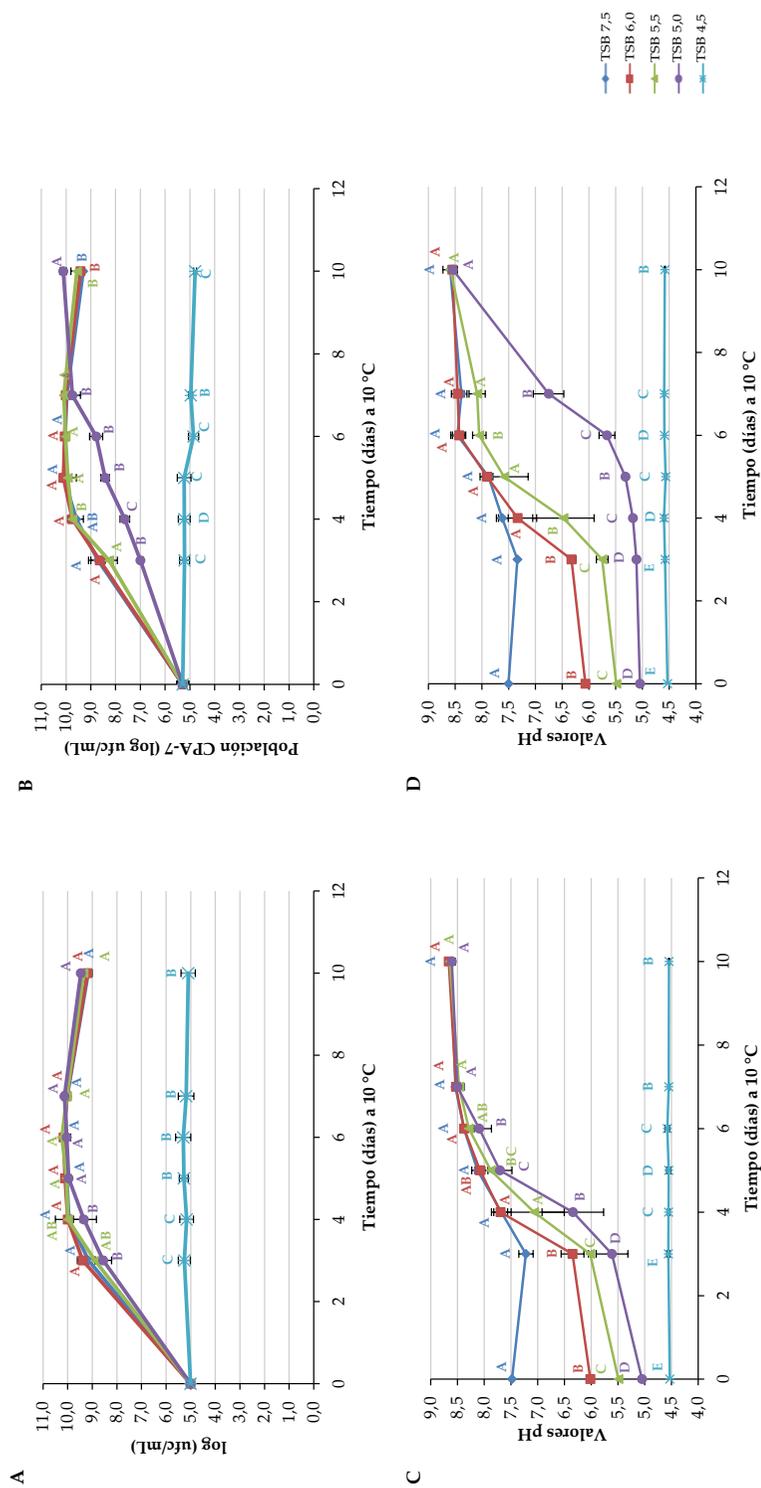


Figura 14. Población de *P. graminis* CPA-7 (log ufc/mL) en el medio TSB ajustado con ácido málico (A) o con ácido cítrico (B) y valores de pH del medio TSB ajustado con ácido málico (C) o con ácido cítrico (D) incubado a 10 °C. Los resultados son la media de 6 valores. Las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tiempo de muestreo de acuerdo con el test de Tukey ($P < 0,05$).

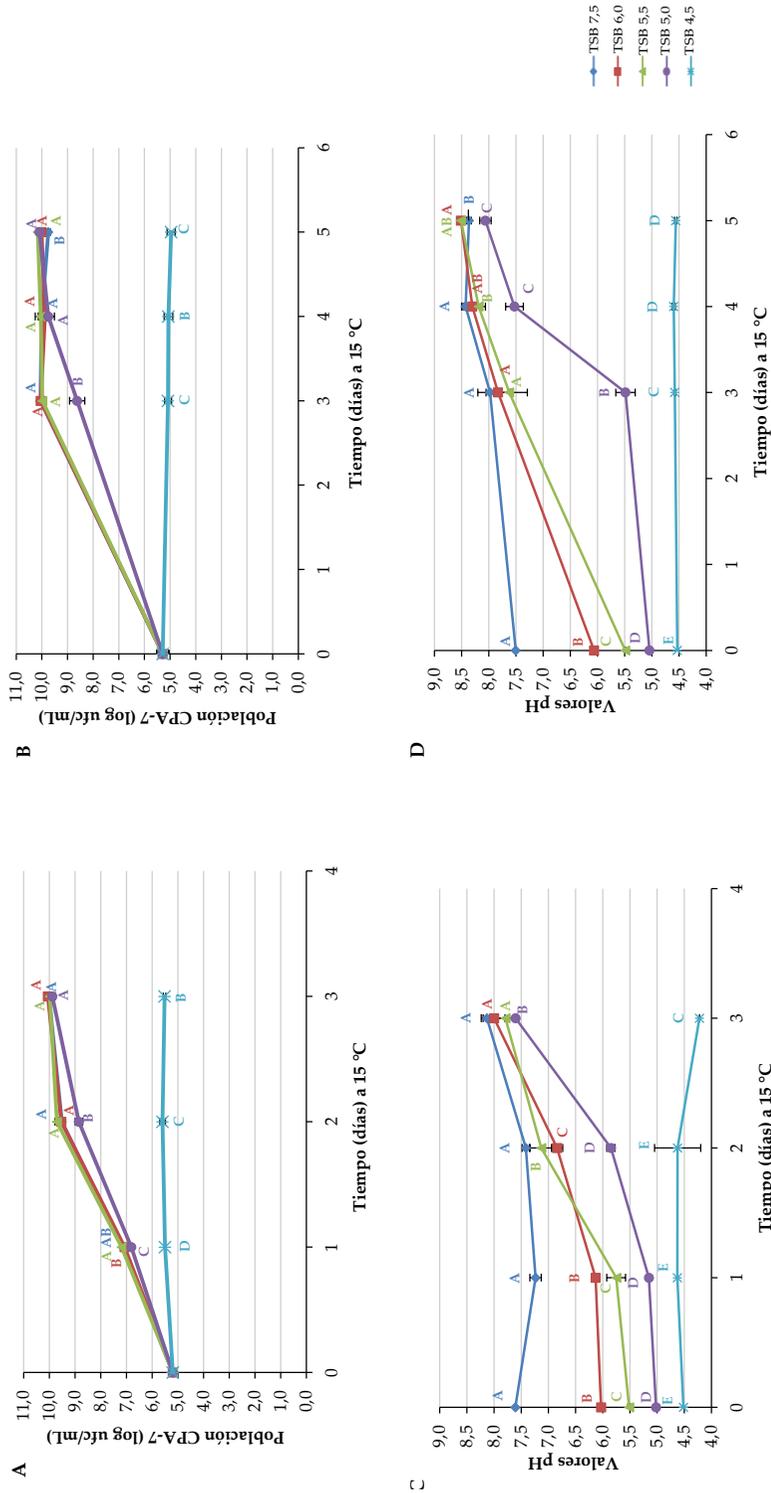


Figura 15. Población de *P. graminis* CPA-7 (log ufc/mL) en el medio TSB ajustado con ácido málico (A) o con ácido cítrico (B) y valores de pH del medio TSB ajustado con ácido málico (C) o con ácido cítrico (D) incubado a 15 °C. Los resultados son la media de 6 valores. Las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tiempo de muestreo de acuerdo con el test de Tukey ($P < 0,05$).

Resultados

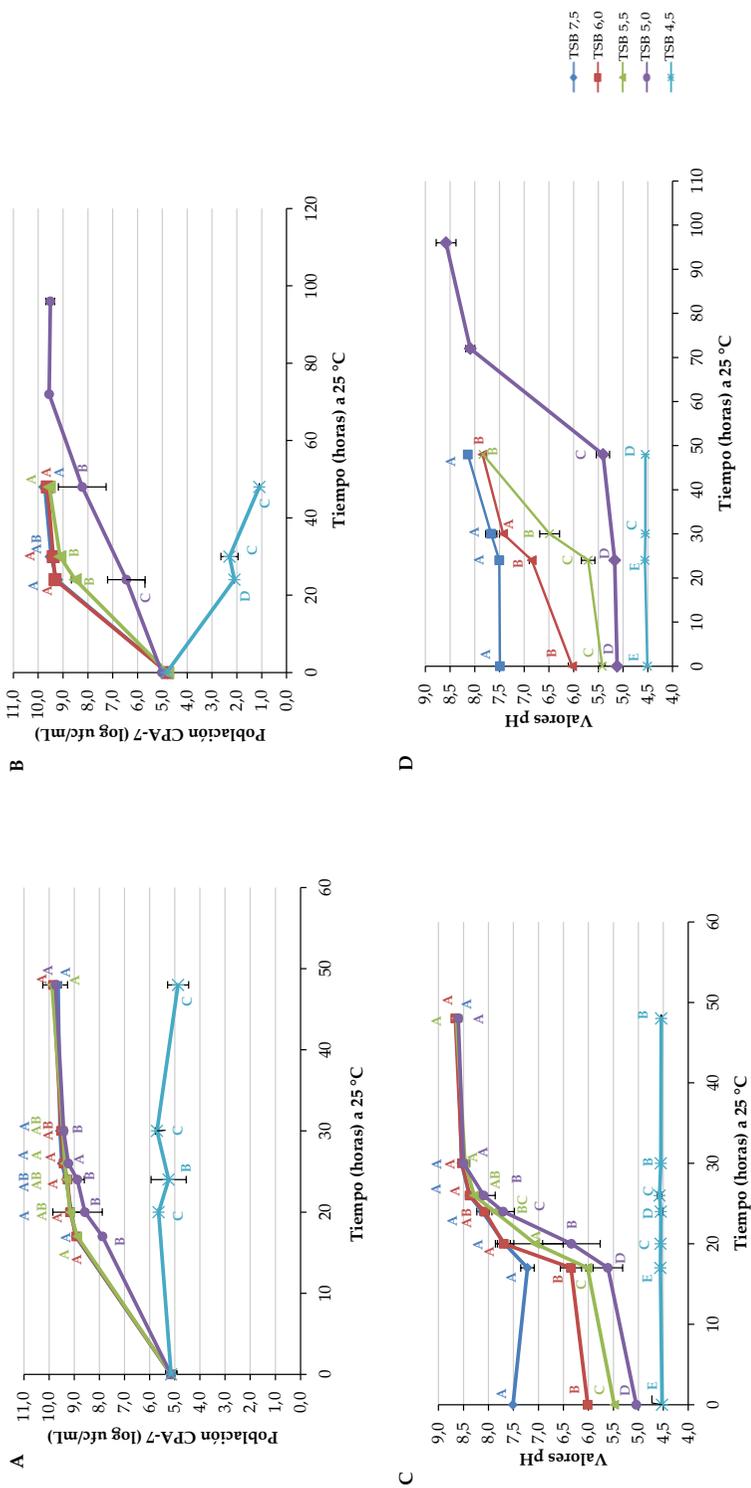


Figura 16. Población de *P. graminis* CPA-7 (log UFC/mL) en el medio TSB ajustado con ácido málico (A) o con ácido cítrico (B) y valores de pH del medio TSB ajustado con ácido málico (C) o con ácido cítrico (D) incubado a 25 °C. Los resultados son la media de 6 valores. Las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tiempo de muestreo de acuerdo con el test de Tukey ($P < 0,05$).

2.3. Curvas de crecimiento de *P. graminis* CPA-7 en TSB preparado en una solución tamponada a 25 °C

Tras observar en el estudio anterior que había una relación entre el pH del medio y el crecimiento de *P. graminis* CPA-7 se decidió estudiar su crecimiento en medio TSB tamponado a distintos pH comparando con el control (TSB) (Fig. 17).

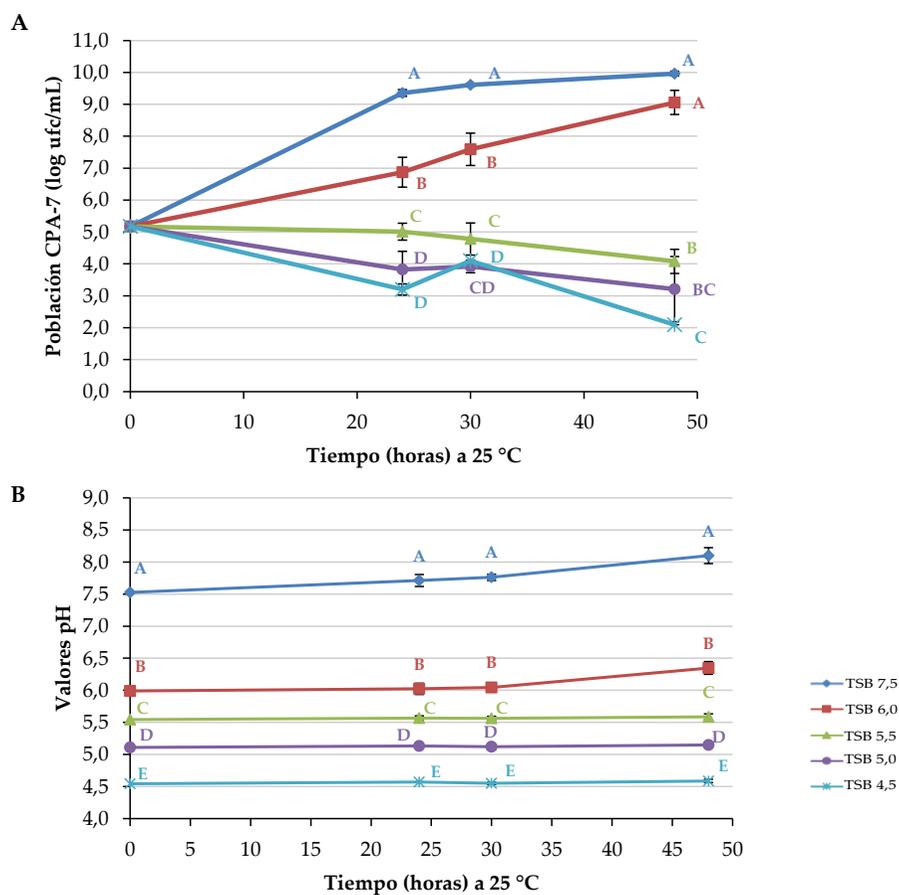


Figura 17. Población de *P. graminis* CPA-7 (log ufc/mL) (A) y valores de pH (B) inoculado en TSB tamponado e incubado a 25 °C durante 48 h. Los resultados son la media de 6 valores. Las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tiempo de muestreo de acuerdo con el test de Tukey ($P < 0,05$).

La población inicial de *P. graminis* CPA-7 fue de, aproximadamente, 5 unidades logarítmicas (Fig. 17A). En el caso de la población del tratamiento control (TSB)

Resultados

creció hasta alcanzar 10 unidades logarítmicas a las 48 h de incubación a 25 °C. En el tratamiento a pH 6,0, la población creció más lentamente y alcanzó su máximo a 9 unidades logarítmicas. A diferencia del ensayo anterior, no se observó crecimiento en pH igual o inferior a 5,5, e incluso tras 30 h la población disminuyó incluso hasta 2 unidades logarítmicas en el caso del tratamiento a pH 4,5.

Con respecto a los valores de pH (Fig. 17B), excepto en los tratamientos control y a pH 6,0 en los que el pH aumentó ligeramente con respecto a los valores iniciales, en el resto de tratamientos el pH se mantuvo constante durante todo el ensayo.

3. Estudio del uso de microorganismos probióticos como agentes de biocontrol en pera mínimamente procesada

Se sabe que existen diversas bacterias ácido lácticas que son capaces de controlar el crecimiento de patógenos de transmisión alimentaria, si además estas están referenciadas como probióticas, su efecto en el alimento podría ser doble. Así, en este estudio se evaluó la capacidad antagonista de dos bacterias probióticas en pera mínimamente procesada: *Lactobacillus acidophilus* LA-5 y *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Antes de la realización del estudio, se evaluó la compatibilidad de *L. acidophilus* LA-5 (Fig. 18A) y la de *L. rhamnosus* GG (Fig. 18B) con la solución antioxidante utilizada (20 g/L de AA, 20 g/L de CitNa y 10 g/L de CaCl₂).

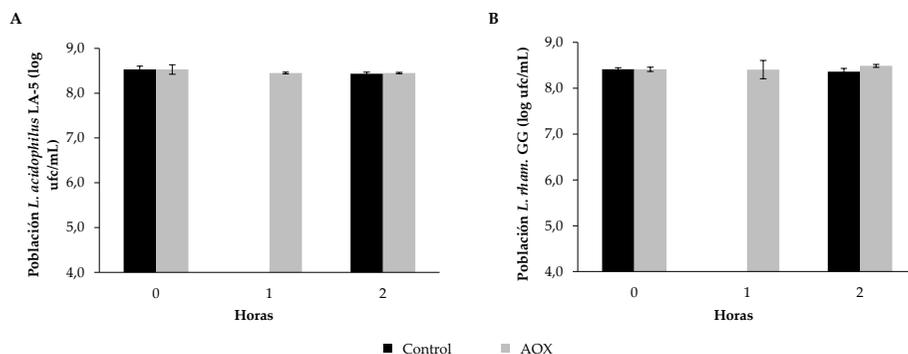


Figura 18 Población (log ufc/g) de *L. acidophilus* LA-5 (A) y *L. rhamnosus* GG (B) inoculadas en agua (control) o con la solución antioxidante (AOX). Los resultados son la media de 3 valores y las barras verticales indican la desviación estándar de la media. La ausencia de letras indica que no se encontraron diferencias significativas ni entre tratamientos en el mismo tiempo de muestreo de acuerdo con test *t*-Student ($P < 0,05$), ni dentro del mismo tratamiento a lo largo del tiempo de acuerdo con el test de Tukey ($P < 0,05$).

3.1. Efecto antagonista de *L. acidophilus* LA-5 en condiciones que simulan una aplicación comercial sobre *S. enterica* y *L. monocytogenes* en pera mínimamente procesada y almacenada a 5, 10 y 20 °C

Se evaluó la efectividad del probiótico *L. acidophilus* LA-5, aplicado a 10^8 ufc/mL, frente a *S. enterica* y *L. monocytogenes* en condiciones que simulaban la aplicación comercial con la solución antioxidante (20 g/L de AA, 20 g/L de CitNa y 10 g/L de CaCl_2) y envasado en atmósfera modificada pasiva (usando el film PP-110).

Durante la conservación de la pera mínimamente procesada a 5 °C (10 días), la población de *S. enterica* se mantuvo constante, mientras que *L. monocytogenes* incrementó su población (Fig. 19A y 19C). Sin embargo cuando la pera se almacenó a 10 (Fig. 19B y 19D) y 20 °C (Tabla 16), la población de ambos patógenos aumentó tanto inoculados solos como en presencia de *L. acidophilus* LA-5. Aunque se observaron reducciones de las poblaciones de los patógenos, la reducción de *L. monocytogenes* después de 6 días a 5 °C y la de *S. enterica* después de 3 y 6 días a 10 °C fueron menores de 0,5 unidades logarítmicas, de forma que no se consideró suficiente como para asegurar que el probiótico ejerció efecto de biocontrol sobre el patógeno.

Resultados

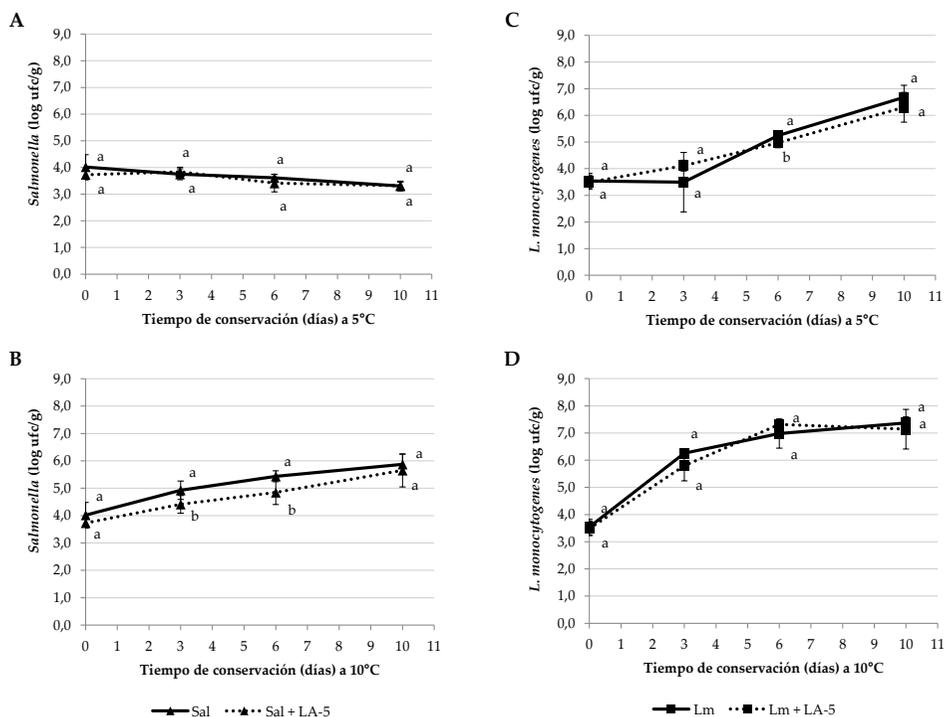


Figura 19. Población (log ufc/g) de *S. enterica* (A y B) y *L. monocytogenes* (C y D) en pera mínimamente procesada y almacenada a 5 (A y C) y 10 °C (B y D). Los resultados son la media de 6 valores y las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Para cada tiempo muestral, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con el test *t*-Student ($P < 0,05$).

Tabla 16. Población de *S. enterica*, *L. monocytogenes* y *L. acidophilus* LA-5 (log ufc/g) en pera mínimamente procesada inoculada solo con los patógenos (Sal + Lm) o solo con *L. acidophilus* LA-5 (LA-5) o en combinación (Sal + Lm + LA-5) y almacenada a 20 °C durante 2 días.

Día	<i>S. enterica</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>L. acidophilus</i> LA-5	
	Sal + Lm	Sal + Lm + LA-5	Sal + Lm	Sal + Lm + LA-5	LA-5	Sal + Lm + LA-5
0	4,0 ± 0,4	3,7 ± 0,2	3,5 ± 0,3	3,5 ± 0,3	7,2 ± 0,3	7,0 ± 0,2
2	8,0 ± 0,2	7,6 ± 0,2	7,1 ± 0,5	7,5 ± 0,1	6,7 ± 0,4	7,0 ± 0,2

Cada valor es la media ± la desviación estándar de 6 repeticiones.

En el caso de no haber letras, no se observaron diferencias significativas entre distintos tratamientos del mismo microorganismo el mismo día de muestreo aplicando el test *t*-Student ($P < 0,05$).

La población de *L. acidophilus* LA-5 permaneció, aproximadamente, a 7 log ufc/g durante 10 días independientemente de la temperatura de conservación de la pera (Fig. 20).

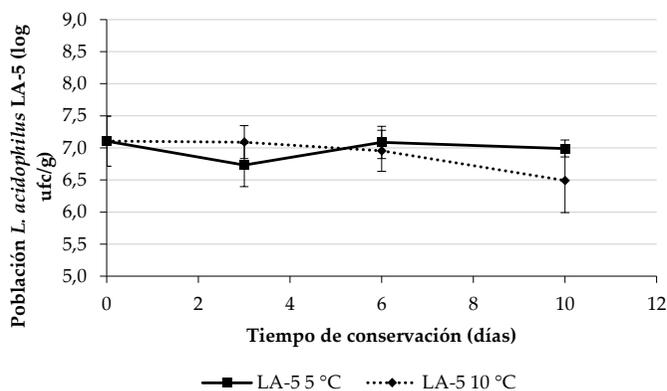


Figura 20 Población (log ufc/g) de *L. acidophilus*.LA-5 en pera mínimamente procesada almacenada a 5 y 10 °C. No se observaron diferencias significativas en la población de *L. acidophilus* LA-5 a ninguna de las temperaturas evaluadas ya estuviera inoculado solo o en presencia de los patógenos, de forma que los resultados se combinaron. Así pues, los resultados expresan la media de 12 valores y las barras verticales la desviación estándar de esa media.

3.2. Concentración de gases del espacio de cabeza de los envases de pera en el estudio con *L. acidophilus* LA-5

La concentración de O₂ y CO₂ del espacio de cabeza de los envases evolucionó de la misma manera en todos los tratamientos (Fig. 21).

A 5 °C (Fig. 21A), la concentración de O₂ alcanzó valores de entre un 7,8-8,8 % tras 3 días de almacenamiento, mientras que a 10 °C (Fig. 21B), descendió más rápidamente situándose en torno al 3,0 % en el mismo día de muestreo. Por el contrario, la concentración de CO₂ se incrementó, aunque de forma más rápida a 10 °C alcanzando al final del almacenamiento valores de aproximadamente 32,0-34,0 %, mientras que a 5 °C, los valores máximos alcanzados fueron de 20,9-21,9 % tras 10 días de conservación de la pera mínimamente procesada.

Resultados

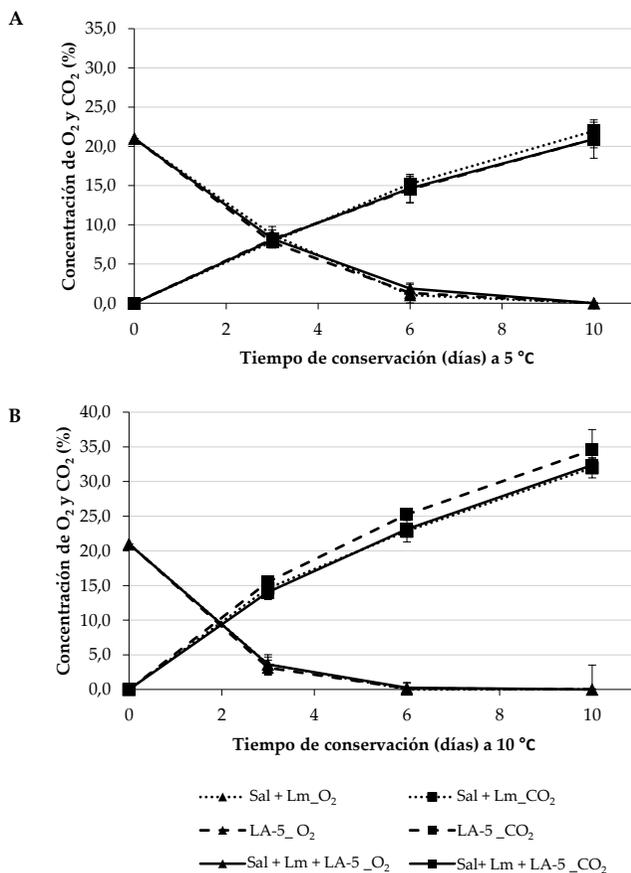


Figura 21. Concentración (%) O₂ y CO₂ en el espacio de cabeza de los envases de pera mínimamente procesada almacenada a 5 (A) y 10 (B) °C. Los resultados son la media de 6 valores y las barras verticales indican la desviación estándar de la media. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos en el mismo día aplicando el test de Tukey ($P < 0,05$).

3.3. Efectividad de *L. rhamnosus* GG en condiciones semicomerciales frente a *S. enterica* y *L. monocytogenes* en pera mínimamente procesada a 5 °C

La efectividad de *L. rhamnosus* GG se evaluó en las mismas condiciones que la de *L. acidophilus* LA-5.

Tras la inoculación de la pera mínimamente procesada, la población inicial de *S. enterica* fue de 3,7 log ufc/g, independientemente de la presencia de *L. rhamnosus* GG (Fig. 22A). No se observó efecto antagonista de *L. rhamnosus* GG,

ya que no se observaron diferencias significativas después de 3, 6 y 10 días (3,8 log ufc/g) entre la población del patógeno inoculado solo o con el probiótico. La población inicial de *L. monocytogenes* inoculada sin o con *L. rhamnosus* GG fue de 3,5 y 3,4 log ufc/g, respectivamente. En el caso de la pera inoculada sin *L. rhamnosus* GG, la población de *L. monocytogenes* se incrementó progresivamente durante los 10 días hasta alcanzar 7,0 log ufc/g. Sin embargo, cuando *L. monocytogenes* se inoculó en combinación con *L. rhamnosus* GG, la población del patógeno aumentó solamente 0,4 unidades logarítmicas tras 10 días de almacenamiento (Fig. 22B). No se observó el efecto antagonista del probiótico a los 3 días de conservación. Sin embargo, los valores de reducción detectados tras 6 días fueron de 1,8 unidades logarítmicas y de 3,0 unidades logarítmicas después de 10 días de almacenamiento.

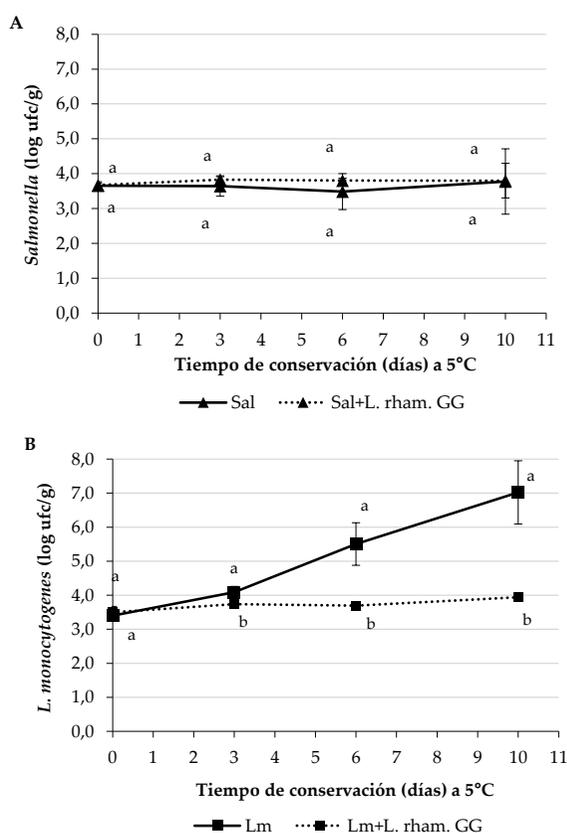


Figura 22. Población (log ufc/g) de *S. enterica* (A) y *L. monocytogenes* (B) en pera mínimamente procesada almacenada a 5 °C. Los resultados son la media de 6 valores y las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Para cada tiempo muestral, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con el test *t*-Student ($P < 0,05$).

Resultados

3.4. Efectividad de *L. rhamnosus* GG en condiciones semicomerciales frente a *S. enterica* y *L. monocytogenes* en pera mínimamente procesada a 10 °C

La población inicial de *Salmonella* en la pera mínimamente procesada fue de 3,7 log ufc/g, independientemente de si se inoculó con o sin *L. rhamnosus* GG. Al cabo de 10 días de conservación a 10 °C, el patógeno creció hasta 5,5 log ufc/g cuando se inoculó solo (Fig. 23A). Cuando *S. enterica* se inoculó en combinación con *L. rhamnosus* GG, su población se incrementó después de 3 días de almacenamiento, sin embargo empezó a decrecer y su población se vio reducida 0,5 unidades logarítmicas tras 10 días de conservación. Estos datos revelaron una reducción de 2 unidades logarítmicas comparando con las peras tratadas con el patógeno pero no con el probiótico.

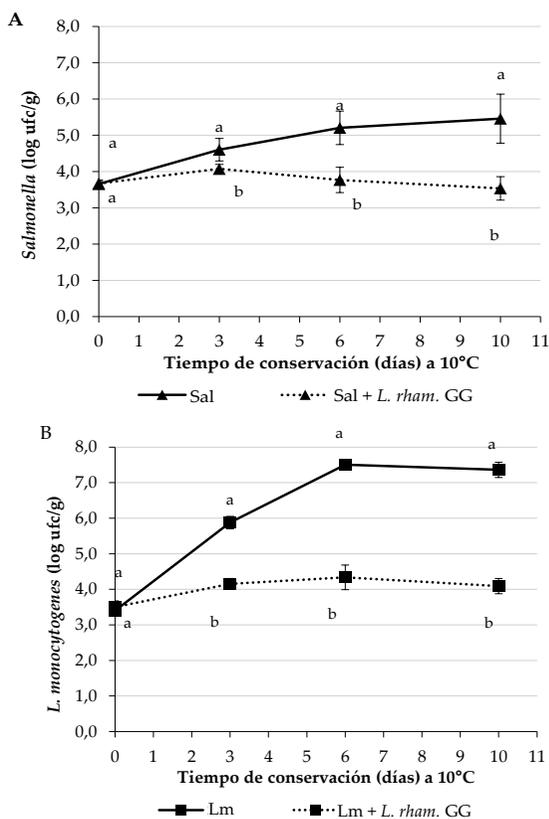


Figura 23. Población (log ufc/g) de *S. enterica* (A) y *L. monocytogenes* (B) en pera mínimamente procesada almacenada a 10 °C. Los resultados son la media de 6 valores y las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Para cada tiempo muestral, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con el test t-Student ($P < 0,05$).

Tras la inoculación de la pera, la población de *L. monocytogenes* inoculada sola o conjuntamente con *L. rhamnosus* GG fue de 3,5 and 3,4 log ufc/g (Fig. 23B), respectivamente. La población de *L. monocytogenes* inoculada sin *L. rhamnosus* GG aumentó, aproximadamente, 1,7, 3,2 y 3,5 unidades logarítmicas tras 3, 6 y 10 días de almacenamiento a 10 °C, respectivamente, alcanzando una población final de 7 log ufc/g. Sin embargo, cuando el patógeno se inoculó junto con *L. rhamnosus* GG, su población fluctuó entre 3,5 y 4,3 log ufc/g durante los 10 días, lo cual representó una reducción de aproximadamente 3 unidades logarítmicas tras 6 y 10 días al comparar con el tratamiento sin probiótico.

3.5. Efectividad de *L. rhamnosus* GG en condiciones semicomerciales frente a *S. enterica* y *L. monocytogenes* en pera mínimamente procesada a 20 °C

La población inicial de *S. enterica*, tanto inoculada con *L. rhamnosus* GG como sin él, fue de 3,7 log ufc/g (Tabla 17).

Tabla 17. Población de *S. enterica*, *L. monocytogenes* y *L. rhamnosus* GG (log ufc/g) en pera mínimamente procesada inoculada con *S. enterica* y *L. monocytogenes* o *L. rhamnosus* GG (Sal + Lm o *L. rham.* GG) o en combinación (Sal + Lm + *L. rham.* GG) y almacenada a 20 °C durante 2 días.

Día	<i>S. enterica</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
	Sal + Lm	Sal + Lm + <i>L. rham.</i> GG	Sal + Lm	Sal + Lm + <i>L. rham.</i> GG
0	3,7 ± 0,1a	3,7 ± 0,1a	3,4 ± 0,1m	3,5 ± 0,2m
2	7,5 ± 0,2a	5,5 ± 0,4b	7,5 ± 0,1m	4,5 ± 0,1n

Cada valor es la media ± la desviación estándar de la media de 6 repeticiones.

Distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas en el mismo tiempo de muestreo entre los tratamientos del mismo microorganismo con y sin *L. rhamnosus* GG de acuerdo con el test t-Student ($P < 0,05$).

Después de 2 días, la población de *S. enterica* inoculada sin *L. rhamnosus* GG se incrementó 3,8 unidades logarítmicas, sin embargo, la población del patógeno inoculado junto con *L. rhamnosus* GG mostró un aumento de, aproximadamente, 1,8 unidades logarítmicas, lo que significó una reducción de 2 unidades

Resultados

logarítmicas. La población inicial de *L. monocytogenes* en la pera mínimamente procesada, inoculada sin o con *L. rhamnosus* GG fue de 3,5 y 3,4 log ufc/g, respectivamente. La población de *L. monocytogenes* inoculada sin *L. rhamnosus* GG después de 2 días se incrementó rápidamente hasta situarse 4,5 unidades logarítmicas por encima del nivel inicial, sin embargo, cuando el patógeno fue inoculado junto con *L. rhamnosus* GG, su población solo aumentó 1,0 unidades logarítmicas, lo que representó una reducción de 3,5 unidades logarítmicas.

3.6. Población de *L. rhamnosus* GG en pera mínimamente procesada

Independientemente de la temperatura de almacenamiento, la población de *L. rhamnosus* GG en la pera mínimamente procesada se incrementó ligeramente durante el ensayo, fluctuando entre 7,4 y 8,5 log ufc/g. Para cada temperatura, los resultados de la población de *L. rhamnosus* GG inoculado con patógenos o sin ellos se representaron de forma conjunta, ya que no se observaron diferencias significativas en la población del probiótico inoculado con o sin patógenos (Fig. 24).

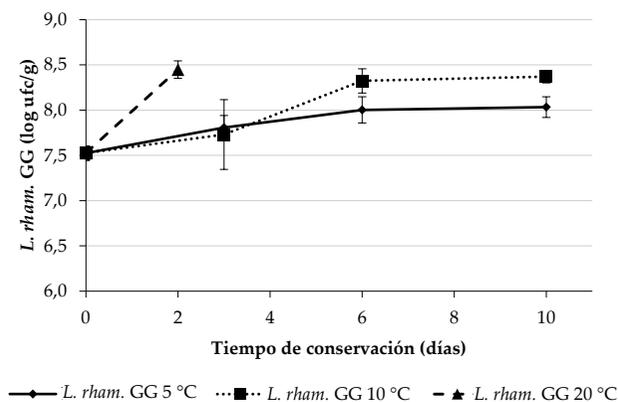


Figura 24. Población (log ufc/g) de *L. rhamnosus* GG en pera mínimamente procesada almacenada a 5, 10 y 20 °C. No se observaron diferencias significativas en la población de *L. rhamnosus* GG a ninguna de las temperaturas evaluadas ya estuviera inoculado solo o en presencia de los patógenos, de forma que los resultados se combinaron. De forma que, los resultados expresan la media de 12 valores y las barras verticales la desviación estándar de esa media.

3.7. Concentración de gases del espacio de cabeza en los envases de pera

La concentración de O₂ disminuyó y la de CO₂ aumentó en los envases durante el tiempo en el que se desarrolló el experimento. La concentración de O₂ en las barquetas almacenadas a 10 °C decreció rápidamente de 21,0 % a 2,0 %, aproximadamente, tras 3 días de almacenamiento y 0,0 % después de 6 días de almacenamiento. Sin embargo, cuando las barquetas se almacenaron a 5 °C, la concentración de O₂ descendió hasta 0,0 % tras 10 días de almacenamiento (Fig. 25). Se observó un incremento de la concentración de CO₂ más acusado en los envases de pera mínimamente procesada almacenada a 10 °C que en la almacenada a 5 °C.

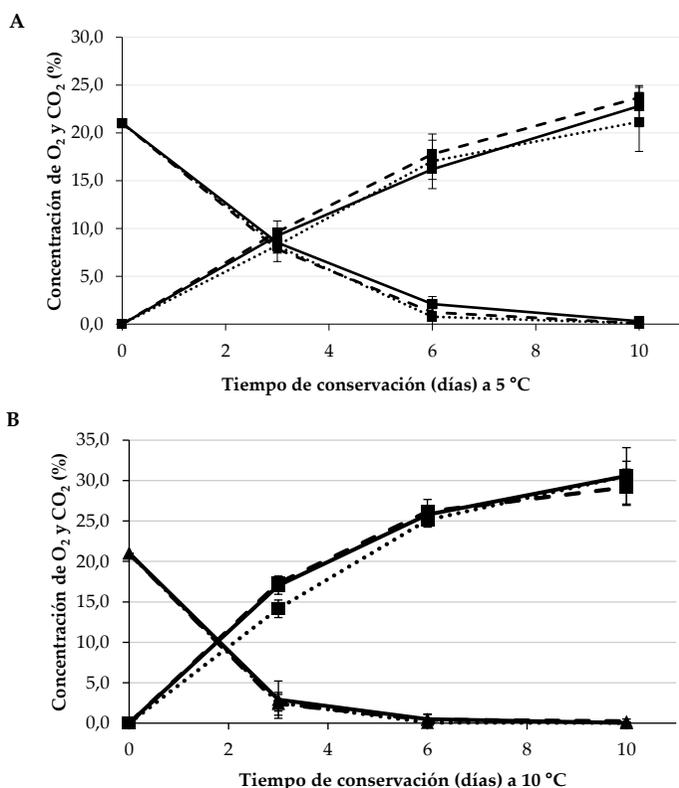


Figura 25. Concentración (%) O₂ y CO₂ en el espacio de cabeza de los envases de pera mínimamente procesada almacenada a 5 (A) y 10 (B) °C. Los resultados son la media de 6 valores y las barras verticales indican la desviación estándar de la media. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos en el mismo día aplicando el test de Tukey ($P < 0,05$).

Resultados

3.8. Evaluación del efecto de la combinación de dos agentes de biocontrol sobre patógenos de transmisión alimentaria en pera mínimamente procesada.

Los resultados obtenidos demostraron que *P. graminis* CPA-7 fue más efectiva frente a *S. enterica* que a *L. monocytogenes* y *L. rhamnosus* GG fue más efectivo frente a *L. monocytogenes*. Es por ello que se evaluó la posibilidad de combinarlas.

A 5 °C la población de *S. enterica* fue de 4,0-4,1 log ufc/g y se mantuvo constante durante todo el ensayo, no observándose, por tanto, efecto ni de *P. graminis* CPA-7 ni de *L. rhamnosus* GG ni de la combinación de ambos sobre la población de *S. enterica* (Fig. 26A). La población inicial de *L. monocytogenes* se situó entre 3,7 y 4,1 log ufc/g aumentando más de 1,5 unidades logarítmicas cuando se inoculó sola y conjuntamente con *P. graminis* CPA-7 tras 9 días de conservación de la pera a 5 °C (Fig. 26B). Sin embargo, el efecto del probiótico controló el crecimiento del patógeno observándose aproximadamente 1,5 unidades logarítmicas de reducción con respecto del control a los 9 días. Resultados similares se observaron cuando el patógeno fue inoculado conjuntamente con ambos antagonistas.

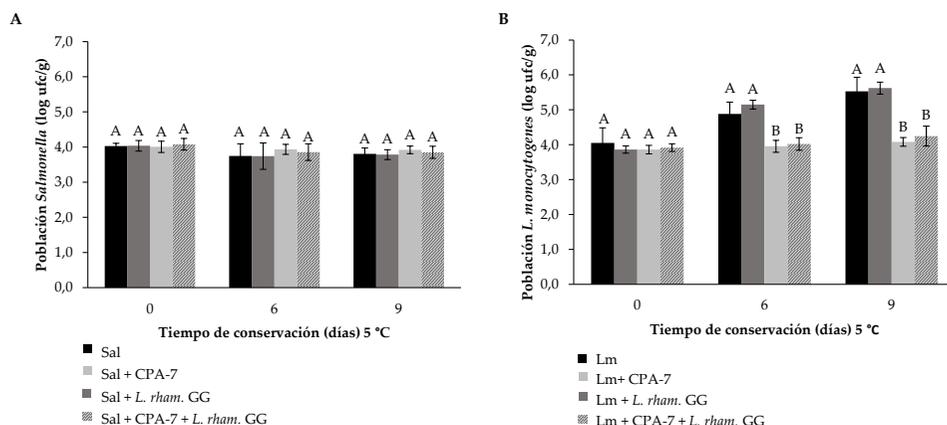


Figura 26. Población (log ufc/g) de *S. enterica* (A) y *L. monocytogenes* (B) en pera mínimamente procesada almacenada a 5 °C. Los resultados son la media de 6 valores y las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Para cada tiempo muestral, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con el test de Tukey ($P < 0,05$).

A 10 °C, la población de *S. enterica* (Fig. 27A) aumentó durante el ensayo, pero experimentó una reducción de 2,1 unidades logarítmicas cuando se inoculó conjuntamente con *P. graminis* CPA-7, de, aproximadamente, 1 unidad

logarítmica cuando fue inoculada con el probiótico y de 1,1 al inocularla conjuntamente con ambos antagonistas al final del período de conservación. En el caso de *L. monocytogenes* (Fig. 27B) también se vio aumentada su población a lo largo del ensayo alcanzando valores finales cuando se inoculó sola de 6,4 log ufc/g. Sin embargo cuando se inoculó junto con *P. graminis* CPA-7 se redujo su población con respecto del control en 0,7 unidades logarítmicas, aunque en presencia de *L. rhamnosus* GG su población se redujo 2,4 y 2,2 unidades logarítmicas inoculada con ambos microorganismos.

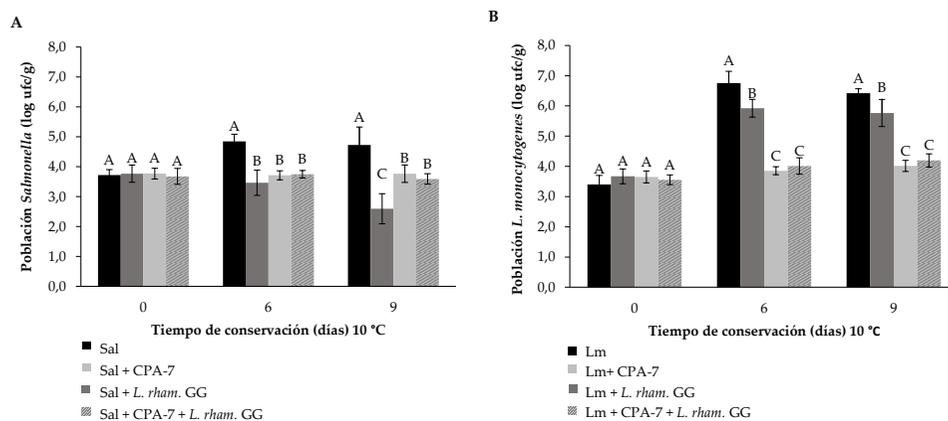


Figura 27. Población (log ufc/g) de *S. enterica* (A) y *L. monocytogenes* (B) en pera mínimamente procesada almacenada a 10 °C. Los resultados son la media de 6 valores y las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Para cada tiempo de muestreo, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con el test de Tukey ($P < 0,05$).

4. Determinación del comportamiento de *L. monocytogenes* CECT 4032 después de un período de adaptación en pera mínimamente procesada en presencia de *L. rhamnosus* GG

Los probióticos, por lo general, pueden modificar la capacidad de virulencia de los patógenos de transmisión alimentaria afectando a la capacidad de adhesión e invasión en las células del epitelio intestinal. En este estudio se empleó *L. monocytogenes* CECT 4032 para determinar dicha capacidad en presencia de *L. rhamnosus* GG y, además, se evaluó cómo le afectó, también, la matriz

Resultados

alimentaria (pera), la cual presenta un pH de entre 4,5-5,0, un CSS de, aproximadamente, 15 % y una AT de alrededor de 1,4 g ácido málico/L.

4.1. Interacción de *L. monocytogenes* y *L. rhamnosus* GG en pera mínimamente procesada a 10 °C

La población inicial de *L. rhamnosus* GG inoculado solo fue de 8,6 log ufc/g y de 8,7 cuando se inoculó conjuntamente con *L. monocytogenes* (Tabla 18). Estos valores se mantuvieron prácticamente constantes sin diferencias significativas durante todo el tiempo de almacenamiento de la pera. Por tanto, la viabilidad de *L. rhamnosus* GG se mantuvo en la pera mínimamente procesada almacenada a 10 °C durante 7 días.

Tabla 18. Población de *L. rhamnosus* GG (log ufc/g) inoculado solo en la pera mínimamente procesada (*L. rham.* GG) o conjuntamente con *L. monocytogenes* CECT 4032 (*Lm* + *L. rham.* GG) y almacenada a 10 °C durante 7 días.

Día	log ufc/g	
	<i>L. rham.</i> GG	<i>Lm</i> + <i>L. rham.</i> GG
0	8,6 ± 0,1a	8,7 ± 0,1a
7	8,7 ± 0,2a	8,6 ± 0,2a

Cada valor es la media ± la desviación estándar de 6 repeticiones.

Para cada tiempo de muestreo, las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con el test t-Student ($P < 0,05$) entre tratamientos.

La población inicial de *L. monocytogenes* CECT 4032 inoculada sola o conjuntamente con *L. rhamnosus* GG fue de 6,6 y 6,5 log ufc/g, respectivamente (Fig. 28). Tras 7 días de almacenamiento a 10 °C, la población del patógeno aumentó hasta situarse en 8,4 log ufc/g en las peras tratadas solamente con el patógeno. Por el contrario, cuando el patógeno se inoculó con el probiótico disminuyó aproximadamente 1,8 unidades logarítmicas al final del ensayo. Esto supuso una reducción de 3,7 unidades logarítmicas entre la población de *L. monocytogenes* CECT 4032 inoculada sola y conjuntamente con *L. rhamnosus* GG.

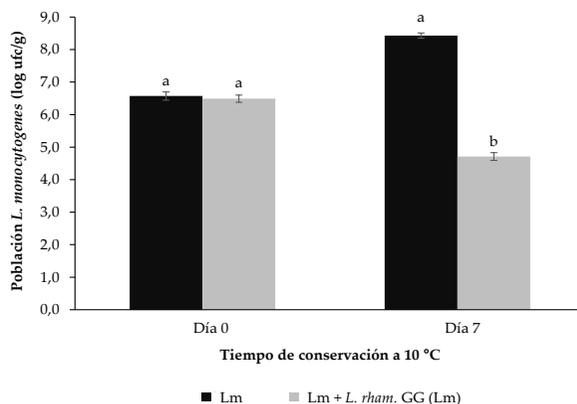


Figura 28. Población de *L. monocytogenes* CECT 4032 (log ufc/g) inoculada sola o con *L. rhamnosus* GG en pera mínimamente procesada y almacenada a 10 °C durante 7 días. Para cada tiempo de muestreo, letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos. Cada valor es la media \pm la desviación estándar de 6 repeticiones.

4.2. Tolerancia de *L. rhamnosus* GG a la simulación digestiva y su efecto en la supervivencia *L. monocytogenes* CECT 4032 tras la simulación digestiva

La simulación digestiva de la pera mínimamente procesada se llevó a cabo el día de la inoculación de la fruta (día 0) y después de 7 días de almacenamiento a 10 °C. En el día de inoculación de la pera, la población del probiótico, tanto inoculado solo como con *L. monocytogenes* CECT 4032, fluctuó ligeramente durante el proceso digestivo (Fig. 29A), observándose una reducción de 0,2 unidades logarítmicas en ambos casos al final del proceso de simulación digestiva.

A los 7 días de almacenamiento o habituación (Fig. 29B), se observaron diferencias significativas entre la población del probiótico inoculado solo antes de la digestión y la población tras la simulación digestiva, con una reducción de 0,3 unidades logarítmicas. Sin embargo, en el tratamiento conjunto con *L. monocytogenes* CECT 4032, la población se mantuvo constante.

El día 0, la población del patógeno antes de la digestión en el tratamiento control (Lm) y en el tratamiento con el probiótico (Lm + *L. rhamnosus* GG) fue, prácticamente, la misma (Fig. 29A). Tras la simulación digestiva, ambas poblaciones disminuyeron significativamente 0,3 unidades logarítmicas. En ambos tratamientos la población del patógeno siguió la misma tendencia durante

Resultados

la simulación digestiva, su supervivencia no se vio afectada en la fase oral, pero sí que se vio reducida en la fase gástrica.

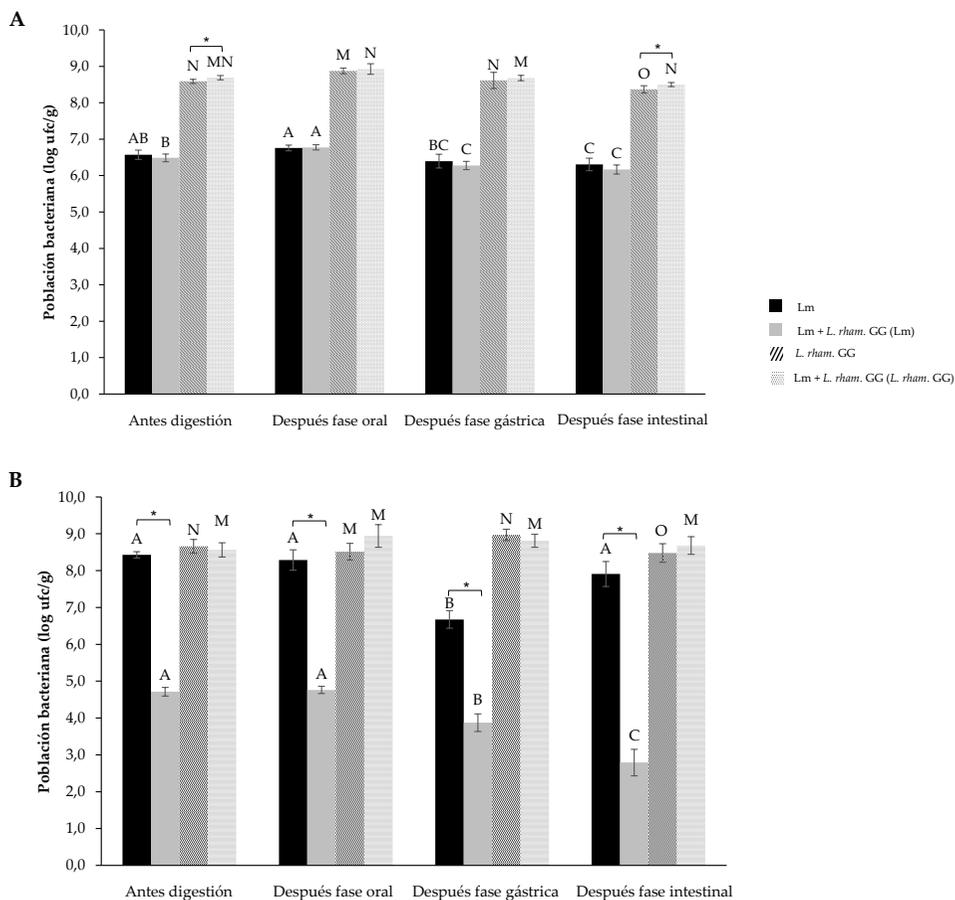


Figura 29. Población de *L. monocytogenes* CECT 4032 y *L. rhamnosus* GG (log ufc/g) durante la simulación digestiva inoculados en pera mínimamente procesada el día del inicio del ensayo (A) y tras 7 días de almacenamiento a 10 °C (B). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las distintas fases de la simulación digestiva dentro del mismo tratamiento. * Indica diferencias significativas ($P < 0,05$) entre dos tratamientos dentro de la misma fase de la digestión. Cada valor es la media \pm la desviación estándar de la media de 6 repeticiones.

Después de 7 días de almacenamiento (Fig. 29B), la población inicial de *L. monocytogenes* CECT 4032 inoculada sola en la pera mínimamente procesada fue 8,2 log ufc/g, se redujo tras la fase gástrica pero aumentó tras la fase intestinal aproximadamente 1,1 unidades logarítmicas, presentando al final del proceso el

mismo valor que al inicio. Sin embargo, la población del patógeno se redujo significativamente en la fase gástrica e intestinal cuando estaba inoculado en la fruta junto con *L. rhamnosus* GG. La población inicial de partida fue mucho menor (4,7 log ufc/g), debido al efecto bioconservante del probiótico durante el almacenamiento, y tras 4 h de simulación digestiva la población decreció de forma significativa 1,9 unidades logarítmicas. En ambos tratamientos, las células del patógeno se mantuvieron prácticamente constantes después de la fase oral, pero la fase gástrica, la población disminuyó. De esta manera, la tasa de supervivencia de *L. monocytogenes* CECT 4032 fue del 94 % cuando se inóculo sola y del 59 % cuando se inoculó conjuntamente con el probiótico.

4.3 Evaluación de la capacidad de adhesión de *L. rhamnosus* GG tras un período de adaptación en pera mínimamente procesada a 10 °C

La capacidad de adhesión del probiótico es interesante porque es una de las características que hacen que estas bacterias compitan con los patógenos de transmisión alimentaria. Esta se determinó en el momento inicial del ensayo y tras haber estado habituándose 7 días en una matriz alimentaria ácida (pH 4,5-5,0).

El día de la inoculación (sin habituación) *L. rhamnosus* GG mostró un alto índice de adhesión a las células Caco-2 después de haber estado expuesto a la simulación digestiva con valores de, aproximadamente, un 82% (Fig. 30). No se observaron diferencias significativas entre el índice de adhesión del patógeno inoculado solo en la pera mínimamente procesada e inoculado junto con el patógeno. Los valores de adhesión del probiótico permanecieron constantes después de 7 días de almacenamiento a 10 °C.

Resultados

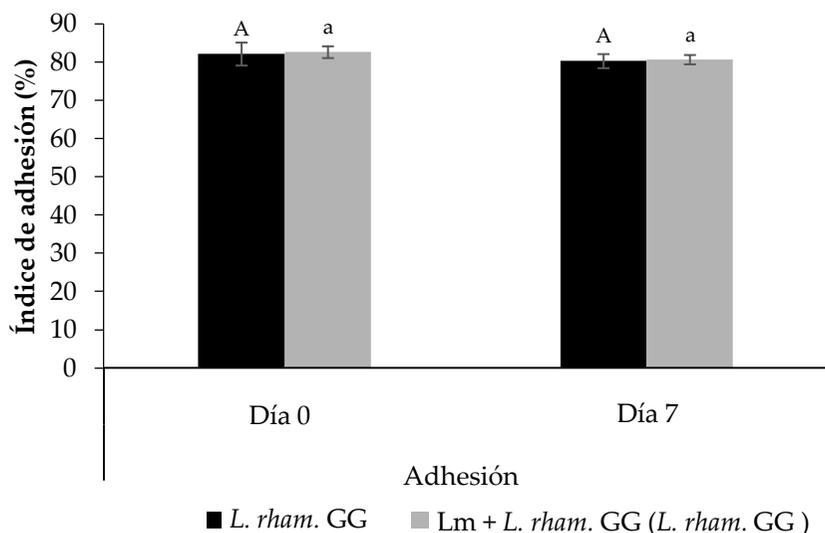


Figura 30. Índices de adhesión (% log ufc/g) de *L. rhamnosus* GG a las células Caco-2 inoculado solo en la pera mínimamente procesada (*L. rham.* GG) o conjuntamente con *L. monocytogenes* CECT 4032 (*Lm* + *L. rham.* GG) y almacenada a 10 °C durante 7 días. No existen diferencias significativas entre de *L. rhamnosus* GG inoculada solo o con *L. monocytogenes* CECT 4032. Distintas letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en el tratamiento *L. rhamnosus* GG a lo largo del tiempo de almacenamiento de la pera. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tratamiento *Lm* + *L. rhamnosus* GG a lo largo del tiempo de almacenamiento. Cada valor es la media \pm la desviación estándar de 8 repeticiones.

4.4. Evaluación de la capacidad de adhesión e invasión de *L. monocytogenes* CECT 4032 tras un período de adaptación en pera mínimamente procesada a 10 °C

En este estudio, se evaluó el efecto de *L. rhamnosus* GG en la capacidad de adhesión e invasión de *L. monocytogenes* CECT 4032 (serovar 4b) inoculados en pera mínimamente procesada, almacenada a 10 °C y después de la exposición a una simulación digestiva *in vitro* a diferentes tiempos de muestreo (0 y 7 días) (Fig. 31).

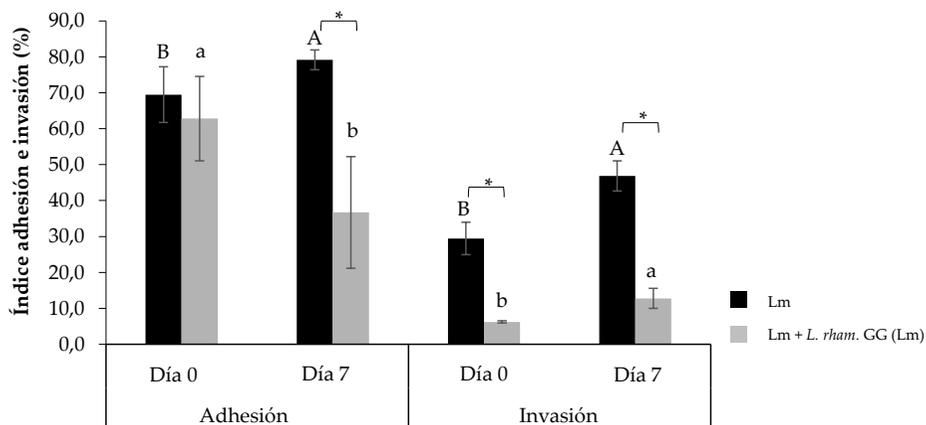


Figura 31. Índices de adhesión e invasión (% log ufc/g) de *L. monocytogenes* CECT 4032 inoculada sola o con *L. rhamnosus* GG. Distintas letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en el tratamiento Lm a lo largo del tiempo de almacenamiento de la pera. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tratamiento Lm + *L. rhamnosus* GG a lo largo del tiempo de almacenamiento. * Indica diferencias significativas entre los dos tratamientos diferentes en cada tiempo muestral. Cada valor es la media \pm la desviación estándar de 10 repeticiones.

El día del inicio del ensayo, no se observaron diferencias significativas entre los valores de adhesión de *L. monocytogenes* inoculada sola o conjuntamente con *L. rhamnosus* GG, mostrando unos índices de adhesión de 70,0 y 62,2 %, respectivamente. Tras 7 días de almacenamiento, el índice de adhesión del patógeno inoculado solo aumentó de forma significativa hasta un 79,2 % durante el período de conservación a 10 °C (habitación), pero la presencia del probiótico redujo de manera significativa la capacidad de adhesión a las células Caco-2 del patógeno hasta un 36,7 % con respecto a los valores obtenidos el día del inicio del ensayo, en el que este índice disminuyó cuando el patógeno estaba en presencia de *L. rhamnosus* GG.

Con respecto a la capacidad de invasión de *L. monocytogenes* CECT 4032 en las células Caco-2, se observaron diferencias significativas entre el día 0 y el día 7. El día del inicio del ensayo, los índices de invasión fueron de 29,5 % y 6,2 % cuando el patógeno se inoculó solo o en presencia del probiótico, respectivamente. Los valores obtenidos de la capacidad de invasión del patógeno inoculado junto con *L. rhamnosus* GG estuvieron por debajo del índice de detección del microorganismo (2,5 log ufc/g). Después de 7 días de almacenamiento el índice de invasión de *L. monocytogenes* CECT 4032 aumentó hasta un 46,9 %, pero la

Resultados

presencia del probiótico lo redujo significativamente hasta un 12,8 %, en las muestras inoculadas con el probiótico y, en las muestras inoculadas solamente con el patógeno.

5. Evaluación de la capacidad antagonista de los agentes de biocontrol y su efecto en la calidad de la pera mínimamente procesada tratada o no con CaCl₂ en poscosecha

Según se ha indicado anteriormente, el tratamiento de la fruta con CaCl₂ después de la cosecha puede mantener la calidad de la fruta durante su conservación. Además, una de las propiedades que ha de cumplir el cultivo bioconservante es que no afecte a la calidad del producto. Por tanto, el siguiente paso fue evaluar el efecto de *P. graminis* CPA-7 y *L. rhamnosus* GG en la calidad de la pera mínimamente procesada en condiciones que simulaban la aplicación comercial, es decir, con la solución antioxidante y el film seleccionados de los resultados anteriores. La conservación de la pera mínimamente procesada se llevó a cabo a 5 °C (temperatura óptima de conservación de productos de IV gama).

5.1. Efecto de *P. graminis* CPA-7

5.1.1. Población de los microorganismos en pera mínimamente procesada conservada a 5 °C

Los tratamientos realizados en pera que había sido tratada o no con CaCl₂ en poscosecha fueron los siguientes:

- (a) Control (solución antioxidante sin inocular)
- (b) Sal + Lm (a 10⁵ ufc/mL cada microorganismo)
- (c) CPA-7 (a una concentración de 10⁷ ufc/mL)
- (d) Sal + Lm + CPA-7 (los patógenos a una concentración de 10⁵ y *P. graminis* CPA-7 a 10⁷ ufc/mL)

Con respecto a la población de *S. enterica* (Fig. 32A), no se observaron diferencias significativas entre las poblaciones del patógeno en el tratamiento b (sin *P. graminis* CPA-7) en las peras no tratadas o tratadas con CaCl₂ después de la cosecha, de la misma manera que tampoco se observaron diferencias

significativas entre las poblaciones del tratamiento d (con *P. graminis* CPA-7). La población inicial del patógeno fue de 3,4 log ufc/g, independientemente de si las peras fueron tratadas con CaCl₂ y de la presencia de *P. graminis* CPA-7. En todos los tratamientos, la población del patógeno disminuyó aproximadamente 0,5 unidades logarítmicas al final del ensayo (9 días de almacenamiento a 5 °C). Se observaron diferencias significativas entre los valores de población iniciales y finales. Sin embargo, los resultados obtenidos no revelaron efecto antagonista de *P. raminis* CPA-7 frente a *S. enterica* en las condiciones ensayadas.

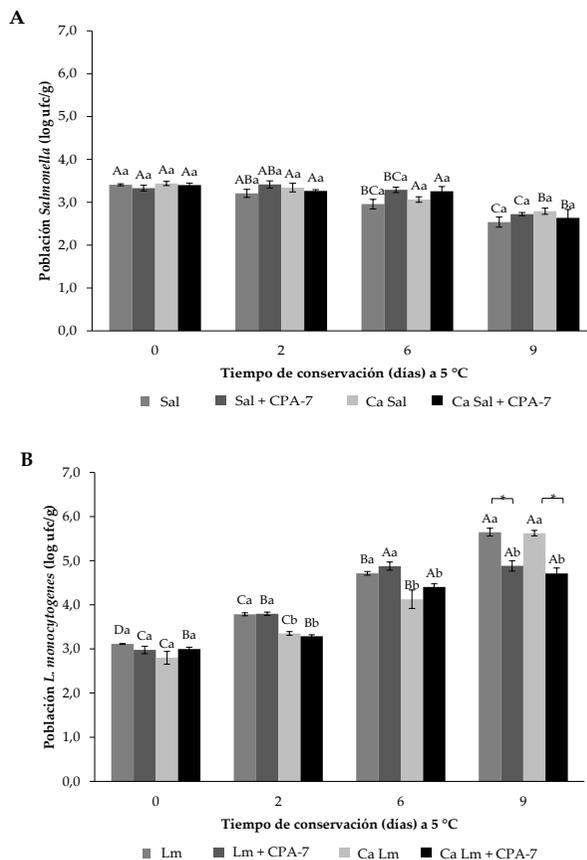


Figura 32. Población (log ufc/g) de *S. enterica* (A) y *L. monocytogenes* (B) en la pera mínimamente procesada almacenada a 5 °C. Los resultados representan la media de 3 valores. Las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Las diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas dentro del mismo tratamiento a lo largo del tiempo de almacenamiento de acuerdo con el test de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre tratamientos en las peras tratadas o no con CaCl₂ el mismo día de muestreo de acuerdo con el test de Tukey con un nivel de significación de $P < 0,05$. * indica diferencias entre el tratamiento del patógeno con o sin *P. graminis* CPA-7 de acuerdo con el test t-Student ($P < 0,05$).

Resultados

La población inicial de *L. monocytogenes* en todos los tratamientos tuvo valores de entre 2,8 y 3,0 log ufc/g (Fig. 32B). Se comparó la población de *L. monocytogenes* en los mismos tratamientos y entre peras tratadas y no tratadas con CaCl₂ en la poscosecha y no se obtuvieron diferencias significativas, excepto después de 2 y 6 días de almacenamiento en los que la población de *L. monocytogenes* fue distinta en las peras tratadas o no con CaCl₂. La población del patógeno inoculado solo (tratamientos b) aumentó hasta alcanzar, tras 9 días a 5 °C, valores similares en las frutas tratadas o no con CaCl₂ (5,6 log ufc/g en pera mínimamente procesada tratada después de la cosecha con CaCl₂ y 5,7 log ufc/g en pera no tratadas). En las peras tratadas con *P. graminis* CPA-7, la población final de *L. monocytogenes* fue de 4,7 log ufc/g en pera mínimamente procesada tratada con CaCl₂ después de la cosecha y 4,9 log ufc/g en pera no tratada. Tras 9 días de almacenamiento a 5 °C, se observaron diferencias significativas entre la población de *L. monocytogenes* inoculada sola (tratamiento b) e inoculada conjuntamente con *P. graminis* CPA-7 (tratamiento d) en ambos casos, observándose una reducción de, aproximadamente, 1 unidad logarítmica. Por tanto, el tratamiento con CaCl₂ no afectó a la efectividad del antagonista.

Las poblaciones iniciales de *P. graminis* CPA-7 en el tratamiento c (Fig. 33) fueron de 5,6 y 5,5 log ufc/g, en los gajos de pera procedentes de la pera no tratada o tratada con CaCl₂ después de la cosecha, respectivamente. Ambas poblaciones incrementaron tras 9 días de almacenamiento hasta alcanzar 6,6 y 7,1 log ufc/g, respectivamente. Sin embargo, la población en la pera mínimamente procesada tratada con CaCl₂ tras la cosecha, experimentó un incremento más rápido que la población en las peras no tratadas con CaCl₂. La población de *P. graminis* CPA-7 fue significativamente mayor en las peras tratadas con CaCl₂ y tras 2 y 9 días de almacenamiento de la pera a 5 °C. Sin embargo, esta mayor población del antagonista en las peras con CaCl₂ no se tradujo en un aumento de su efectividad.

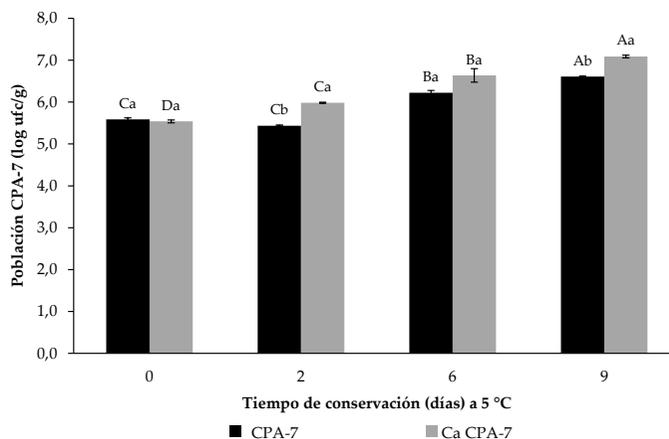


Figura 33. Población (log ufc/g) de *P. graminis* CPA-7 en la pera mínimamente procesada almacenada a 5 °C. Los resultados representan la media de 3 valores. Las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Las diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas dentro del mismo tratamiento a lo largo del tiempo de almacenamiento de acuerdo con el test de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre tratamientos el mismo día de acuerdo con el test t-Student ($P < 0,05$).

5.1.2. Análisis físico-químicos

5.1.2.1. Evolución de la concentración de oxígeno y dióxido de carbono del espacio de cabeza de los envases

La concentración de O₂ descendió desde valores de 21,0 % hasta situarse en valores de entre 12,6-14,6 % tras 9 días de conservación a 5 °C (Fig. 34), si bien, el consumo más acusado se produjo durante los 2 primeros días. La concentración de CO₂ se incrementó durante el ensayo hasta alcanzar valores de entre 7,8-9,7 %. Las muestras de pera mínimamente procesada provenientes de peras tratadas con CaCl₂ después de la cosecha, registraron valores más altos de la concentración de CO₂ y valores más bajos de O₂ (9,7 % sin *P. graminis* CPA-7 y 9,3 % con *P. graminis* CPA-7; 12,6 % sin *P. graminis* CPA-7 y 13,0 % con *P. graminis* CPA-7) que las no tratadas con el CaCl₂ (7,9 % sin *P. graminis* CPA-7 y 7,8 % con *P. graminis* CPA-7; 14,6 % sin *P. graminis* CPA-7 y 14,3 % sin *P. graminis* CPA-7). Sin embargo, solo se observaron diferencias significativas en la concentración de CO₂ y tras 2 días de almacenamiento a 5°C. La aplicación de la cepa *P. graminis* CPA-7 no causó diferencias en la concentración de O₂ y CO₂ en el interior de los envases.

Resultados

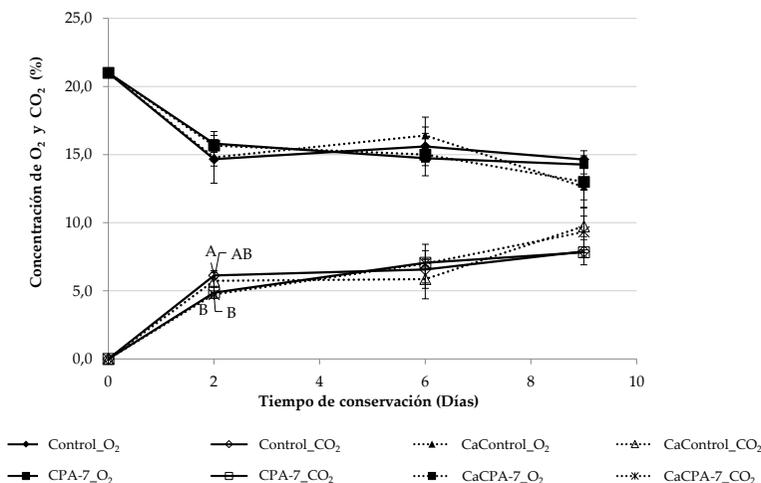


Figura 34. Concentración (%) de O₂ y CO₂ dentro de las barquetas de pera mínimamente procesada almacenadas a 5 °C. Los resultados son la media de 3 valores y las barras verticales indican la desviación estándar de dicha media. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a ese tiempo de muestreo de acuerdo con el test de Tukey ($P < 0,05$). En el caso de haber letras no se observaron diferencias significativas.

5.1.2.2. Contenido en sólidos solubles y acidez titulable

Para determinar si la aplicación de *P. graminis* CPA-7 influía en la calidad físico-química de la pera mínimamente procesada, se comparó el tratamiento control (sin *P. graminis* CPA-7) y el de *P. graminis* CPA-7. El contenido en sólidos solubles (CSS) fluctuó entre 13,0 y 14,8 °Brix durante el ensayo (Fig. 35A). En las muestras de pera tratada con CaCl₂ después de la cosecha, los valores de este parámetro fueron más altos, excepto el día del inicio del ensayo. El CSS de la pera mínimamente procesada del tratamiento control tratadas con CaCl₂ tras la cosecha (Ca Control) fue significativamente mayor que el del resto de tratamientos a cualquier tiempo de muestreo, excepto el día 6. El CSS aumentó durante el ensayo excepto en las peras tratadas con *P. graminis* CPA-7 y no tratadas con CaCl₂ (CPA-7), en el que este parámetro comenzó a descender transcurridos 6 días desde el inicio del ensayo.

Con respecto a la acidez titulable (AT) no se observaron diferencias significativas el día del ensayo entre los tratamientos, con valores de acidez de 1,8-2,0 g ácido málico/L (Fig. 35B). Los valores de AT de las muestras tratadas con CaCl₂ fueron bastante similares entre ellos a los 2, 6 y 9 días, independientemente de la presencia o no de *P. graminis* CPA-7. A los 6 y 9 días, la AT de las muestras varió ligeramente, excepto en las peras tratadas con *P. graminis* CPA-7 y no tratadas con CaCl₂ (CPA-7) tras la cosecha, en las cuales este valor disminuyó de manera significativa. Al final del ensayo (9 días) los valores de AT en cada uno de los tratamientos fue menor que el obtenido inicialmente.

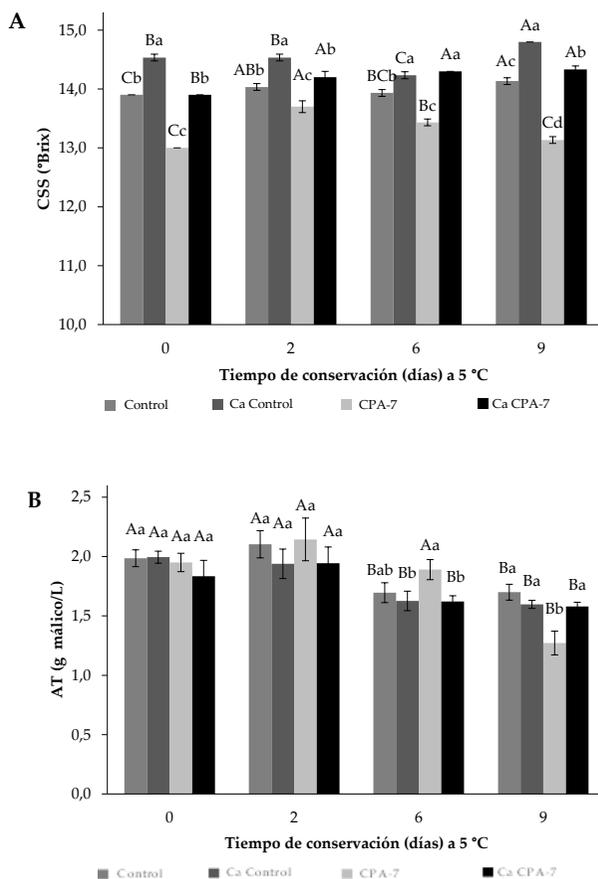


Figura 35. Contenido en sólidos solubles (°Brix) (A) y acidez titulable (g/L) (B) de la pera mínimamente procesada almacenada a 5 °C. Los valores mostrados son la media de 3 repeticiones ± la desviación estándar de la media. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias dentro del mismo tratamiento a lo largo del ensayo aplicando el test de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a cada tiempo analizado aplicando el test de Tukey ($P < 0,05$).

Resultados

5.1.2.3. Concentración de etanol y acetaldehído

La concentración inicial de etanol fue aproximadamente de entre 67-70 ppm en la pera mínimamente procesada tratada con CaCl₂ en la poscosecha, independientemente de la presencia de *P. graminis* CPA-7 y de entre 40-48 ppm en las muestras no tratadas con CaCl₂, aunque no se observaron diferencias significativas entre los 4 valores (Fig. 36A). A los 6 días de almacenamiento, la concentración de etanol de las peras control tratadas con CaCl₂ y sin *P. graminis* CPA-7 fue de 175 ppm, significativamente mayor que la del resto de los tratamientos. La concentración etanol fue aumentando progresivamente a medida que avanzaba el tiempo de conservación de la pera hasta situarse entre 149-180 ppm en la pera tratada con CaCl₂ en la poscosecha independientemente de la presencia de *P. graminis* CPA-7 y de entre 95-192 ppm en las muestras no tratadas con CaCl₂.

La concentración inicial de acetaldehído fue de entre 3-4 ppm sin observarse diferencias significativas entre los 4 tratamientos en el mismo día de análisis, ni en los valores del mismo tratamiento a lo largo del ensayo. Tras 9 días de conservación de la pera mínimamente procesada a 5 °C, las concentraciones se mantuvieron sin diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 36B). Por tanto, la aplicación de *P. graminis* CPA-7 en pera cortada no afectó a la concentración de etanol y acetaldehído.

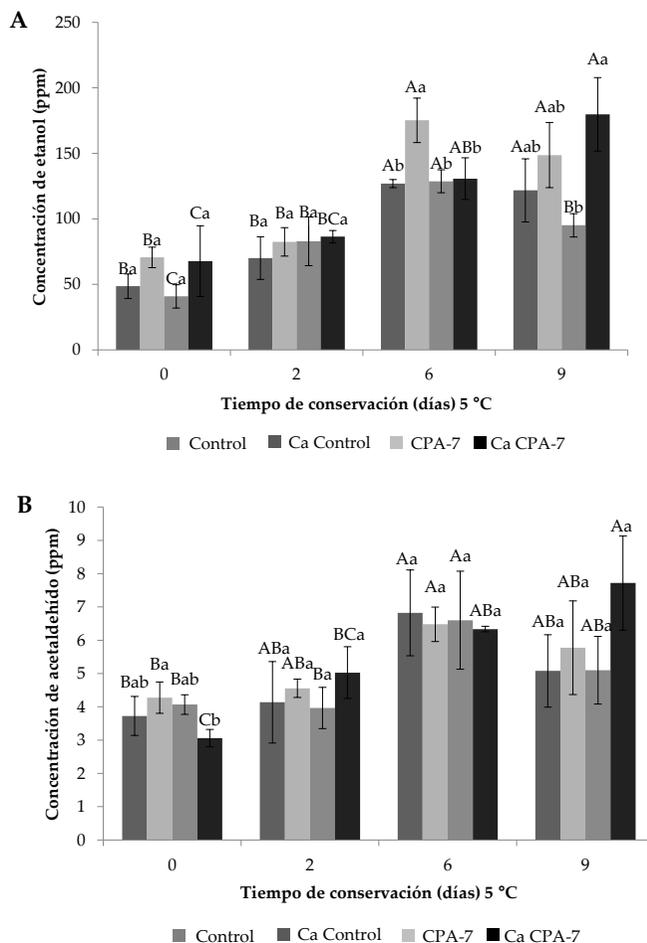


Figura 36. Concentración (ppm) de etanol (A) y acetaldehído (B) producidos en la pera mínimamente procesada almacenada a 5 °C. Los resultados son la media de 3 valores y las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas dentro del mismo tratamiento a lo largo del tiempo de almacenamiento de acuerdo con el test de Tukey ($P < 0,05$). Cuando las letras minúsculas son diferentes, significa que se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en el tiempo de muestreo aplicando el test de Tukey ($P < 0,05$).

5.1.2.4. Efecto de *P. graminis* CPA-7 en las emisiones de compuestos volátiles en pera mínimamente procesada

Las Tablas 19 y 20 muestran las concentraciones medias de los compuestos volátiles en pera “Conference” mínimamente procesada tratada o no con CaCl_2 , respectivamente, antes de su conservación (0 d) y después de 2 y 6 días a 5 °C. Se

Resultados

identificaron y cuantificaron un total de 43 compuestos en la fracción volátil emitida en las barquetas con la fruta mínimamente procesada (25 ésteres, 10 alcoholes, 4 aldehídos, 1 terpenos, 2 cetonas y 1 ácido). Cabe destacar que, en general, a los 6 días de conservación de la pera mínimamente procesada a 5 °C, las muestras del tratamiento de *P. graminis* CPA-7 tratadas con CaCl₂ en la poscosecha presentaron valores significativamente menores de alcoholes (excepto el 3-metil-2-butanol, que en su caso presentó valores más altos) y, por lo general, las no tratadas con CaCl₂ en poscosecha presentaron valores mayores de alcoholes en presencia de la bacteria (excepto de etanol, 3-metil-2-butanol y 1-pentanol). Con los aldehídos ocurrió algo similar, en las peras tratadas con CaCl₂ en la poscosecha y con *P. graminis* CPA-7 la concentración fue menor que en las no tratadas con *P. graminis* CPA-7. Por el contrario, en las muestras no tratadas con CaCl₂ en la poscosecha y con *P. graminis* CPA-7 la concentración de aldehídos fue mayor, excepto la de el acetaldehído, la cual fue más baja en las muestras con *P. graminis* CPA-7. El ácido acético disminuyó en las peras tratadas con CaCl₂ y en presencia de *P. graminis* CPA-7 al final del ensayo, sin embargo, en las peras no tratadas con CaCl₂ y en la presencia de *P. graminis* CPA-7 este compuesto fue significativamente mayor que en las peras tratadas con la bacteria al final del ensayo. Aunque al inicio del ensayo el α -farneseno fue significativamente mayor en las peras tratadas con *P. graminis* CPA-7, independientemente de si fueron tratadas o no con CaCl₂ en la poscosecha, al final del ensayo se observó que la concentración en las peras tratadas con la bacteria y con CaCl₂ fue significativamente menor que en las no tratadas con *P. graminis* CPA-7 y significativamente mayor en las peras tratadas con la bacteria my en ausencia del tratamiento de CaCl₂ en la poscosecha. En cuanto a los ésteres, se pudo observar que, al final del ensayo, el acetato de butilo, presentó valores más altos en la pera mínimamente procesada tratada con la bacteria y con CaCl₂ en la poscosecha. Sin embargo, se detectaron concentraciones más bajas de otros ésteres como son el acetato de hexilo y el acetato de propilo en las peras tratadas con *P. graminis* CPA-7 y con CaCl₂ en la poscosecha.

Como existen múltiples variables y gran cantidad de compuestos analizados, para explorar la influencia de la cepa antagonista de *P. graminis* CPA-7, así como del tratamiento con CaCl₂ y el período de conservación a 5 °C, una vez la pera fue mínimamente procesada, se realizó un análisis de componentes principales sobre los compuestos volátiles emitidos por esta. Con el objetivo de evaluar posibles relaciones entre la población de cepa *P. graminis* CPA-7 (variable Y) y un conjunto de variables potencialmente explicativas (variables X) que incluyeron la concentración de los compuestos volátiles emitidos por las peras, se desarrolló un

modelo de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR). Para mejorar la diferenciación entre las muestras control y las tratadas con *P. graminis* CPA-7, las muestras del día 0 (inicio del ensayo) se excluyeron del análisis, pues el antagonista acababa de aplicarse en la fruta y no había iniciado su metabolismo. En el análisis se incluyeron todas las muestras, aquellas tratadas (Ca) o no con CaCl_2 (CK), además de las muestras con (CPA7) y sin tratamiento con *P. graminis* CPA-7 (No CPA7) mantenidas durante 2 y 6 días a 5 °C una vez procesadas. En consecuencia, se realizó un análisis PLSR que incluía 8 muestras y 43 compuestos volátiles (Fig. 37). La validación mostró que dos factores PLS fueron relevantes en el modelo. Según este modelo, hasta el 98 % de la variabilidad en las muestras fue explicada por las emisiones de compuestos volátiles (Fig. 37). Este análisis permitió dividir las muestras en dos grupos claramente diferenciados. Por un lado, aquellas tratadas con *P. graminis* CPA-7 se situaron más en el lado derecho de PC1, que explicó por sí solo el 95 % de la varianza total, en comparación con las muestras control que se situaron en el lado izquierdo del PC1 (Fig. 37A). La figura de *loadings* (Fig. 37B), correspondiente a la distribución de las variables analizadas, mostró que las muestras tratadas con *P. graminis* CPA-7, se asociaron principalmente con mayores concentraciones de 1-hexanol, como alcohol y de acetato de (Z)-2-hexenil acetato, como éster. No se observó una clara influencia de los compuestos volátiles sobre la diferenciación de las muestras tratadas con calcio y las no tratadas.

La Figura 38 muestra los coeficientes de regresión entre la población de *P. graminis* CPA-7 y los compuestos volátiles analizados. En esta figura se observan los compuestos volátiles que tienen más relación con *P. graminis* CPA-7. Así, por ejemplo, se observa que la aplicación de *P. graminis* CPA-7 influyó positivamente en la concentración de ésteres como el acetato de metilo, el acetato de 3-metilbutilo, el acetato de pentilo, el acetato de (Z)-2-hexenilo, el butanoato de 2-metilpropilo y el hexanoato de butilo, con alcoholes entre los que se encuentran el 3-metil-2-butanol, el 1-butanol, el 2-metil-1-butanol, el 1-hexanol y el(E)-2-hexen-1-ol, un aldehído (hexanal) y con la acetona.

Tabla 19. Compuestos volátiles emitidos por la pera mínimamente procesada tratada con CaCl₂ en la poscosecha y con o sin *P. graminis* CPA-7 durante el tiempo de almacenamiento a 5 °C.

Compuestos volátiles	Tratada con CaCl ₂					
	0 días		2 días		6 días	
	CPA-7	no CPA-7	CPA-7	no CPA-7	CPA-7	no CPA-7
ACETATES						
Methyl acetate	899,9 A	106,74 B	107,63 A	0,02 B	1379,17 A	0,02 B
Ethyl acetate	2813,82 A	1388,46 B	2488,73 A	2122,82 B	1172,72 A	707,45 B
Propyl acetate	127,65 B	296,76 A	251,83 B	449,02 A	492,42 B	3538,64 A
Butyl acetate	4745,97 B	13545,4 A	10425,07 B	22699,3 A	9860,32 A	4634,97 B
3-Methylbutyl acetate	0 B	417,31 A	144,28 B	211,79 A	168,74 B	1589,36 A
Pentyl acetate	226 B	356,79 A	156,84 A	0 B	538,44 B	10044,71 A
Hexyl acetate	6266,25 B	6414,32 A	4872,86 B	7838,32 A	8269,79 B	13127,64 A
(Z)-2-hexenyl acetate	271,81 A	0,02 B	188,75 A	0,02 B	87,42 B	1943,05 A
Octyl acetate	532,3 A	46,32 B	619,03 A	64,71 B	164,59 B	1166,76 A
BUTANOATES						
Methyl butanoate	433,05 A	89,21 B	372,79 A	0 B	131,87 B	2742,45 A
Ethyl 2-methylbutanoate	58,43 B	83,57 A	84,98 A	0 B	8789,82 A	1931,72 B
2-Methylpropyl butanoate	246,52 B	525,84 A	664,88 A	662,14 A	595,97 B	2105,93 A
Butyl 2-methylbutanoate	0 A	0 A	0 A	0 A	158,53 B	1558,19 A
Butyl butanoate	70,09 A	71,55 A	154,13 B	241,99 A	207,12 A	134,45 B
2-Methylbutyl-2-methylbutanoate	149,63 B	357,12 A	0 B	416,77 A	0 B	5884,36 A
Pentyl 3-methylbutanoate	0 B	179,21 A	0 B	236,78 A	0 B	1800,11 A
Hexyl butanoate	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
Hexyl 2-methylbutanoate	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
HEXANOATES						
Ethyl hexanoate	0 A	0 A	0 A	0 A	782,08 B	2791,04 A
Butyl hexanoate	475,21 A	0 B	1235,32 B	1471,11 A	604,4 B	7734,58 A
Pentyl hexanoate	116,55 A	0 B	190,39 A	0 B	0 B	1097,62 A
Hexyl hexanoate	392,85 A	334,73 A	280,32 A	0 B	188,83 B	2696,4 A
PROPANOATES						
tert-Butyl propionate	137,47 A	97,73 B	94,51 A	0 B	256,7 B	2198,53 A
Butyl propanoate	148,19 A	45,87 B	238,58 A	0 B	89,85 B	1759,6 A

Distintas letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos el mismo día de almacenamiento de acuerdo con el test t-Student ($P < 0,05$).

Tabla 19 (continuación). Compuestos volátiles emitidos por la pera mínimamente procesada tratada con CaCl_2 en la poscosecha y con o sin *P. graminis* CPA-7 durante el tiempo de almacenamiento a 5 °C.

	Tratada con CaCl_2					
	0 días		2 días		6 días	
	CPA-7	no CPA-7	CPA-7	no CPA-7	CPA-7	no CPA-7
Compuestos volátiles						
OCTANOATES						
Ethyl octanoate	956,64 A	0 B	287,44 A	67 B	0 B	815,07 A
ALCOHOLS						
Ethanol	24582,28 B	61475,74 A	6170,27 B	8099,07 A	2971,83 B	11412,8 A
3-Methyl-2-butanol	11972,92 B	14742,84 A	11672,92 A	0 B	12480,36 A	4561,17 B
1-Butanol	59,06 B	81,63 A	75,43 A	0 B	105,36 B	2729,81 A
2-Methyl-1-butanol	0 B	73,12 A	0 A	0 A	204,99 B	731,91 A
1-Pentanol	166,53 B	277,96 A	0 B	109,25 A	60,63 B	1588,347 A
1-Hexanol	233,02 A	0 B	304,5 A	0 B	261,26 B	1122,45 A
(E)-2-Hexen-1-ol	0,01 B	396,12 A	0,01 A	0,01 A	0,01 A	0,01 A
2-Ethyl-1-hexanol	3674,82 A	1197,03 B	3439,37 A	723,73 B	793,4 B	9456,43 A
1-Octanol	94,78 A	59,01 B	181,13 A	75,38 B	0 B	170,73 A
Benzyl alcohol	2809,13 A	329,71 B	6167,29 A	663,99 B	304,33 B	10877,92 A
ALDEHYDES						
Acetaldehyde	1139,83 A	985,52 B	673,44 A	0 B	0 B	693,41 A
Hexanal	713,95 A	594,08 B	37316,8 A	2546,77 B	1713,89 B	4962,62 A
2-Ethylhexanal	52,41 B	260,19 A	77,97 B	1126,97 A	69,25 B	1048,33 A
Benzaldehyde	352,72 A	0 B	489,07 A	202,76 B	201,23 B	1402,19 A
TERPENES						
a-Farnesene	577,41 A	50,59 B	583,29 A	135,93 B	776,93 B	1188,21 A
KETONES						
Acetone	531,4 A	0,03 B	0,03 A	0,03 A	0,03 A	0,03 A
6-Methyl-5-hepten-2-one	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
ACIDS						
Acetic acid	252,46 A	0 B	583,75 A	90,11 B	0 B	2905,28 A

Distintas letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos el mismo día de almacenamiento de acuerdo con el test *t*-Student ($P < 0,05$).

Tabla 20. Compuestos volátiles emitidos por la pera mínimamente procesada no tratada con CaCl_2 en la poscosecha y con o sin P. graminis CPA-7 durante el tiempo de almacenamiento a 5 °C.

Compuestos volátiles	No tratada con CaCl_2											
	0 días		2 días		6 días							
	CPA-7	no CPA-7	CPA-7	no CPA-7	CPA-7	no CPA-7						
ACETATES												
Methyl acetate	258,04	A	107,03	B	0,02	A	0,02	A				
Ethyl acetate	609,33	B	1347,29	A	1520,5	B	1649,04	A	782,01	B	2628,75	A
Propyl acetate	315,85	A	395,74	A	556,45	A	503,14	A	484,81	A	288,98	B
Butyl acetate	9768,79	A	5127,15	B	18653,68	A	18972,41	A	13518,77	B	14022,11	A
3-Methylbutyl acetate	237,72	A	0	B	274,21	A	0	B	187,45	A	0	B
Pentyl acetate	0	B	17,75	A	0	A	0	A	0	A	0	A
Hexyl acetate	8301,65	A	5043,22	B	11384,55	A	6844,12	B	5776,07	B	7945,72	A
(Z)-2-hexenyl acetate	351,54	A	0,02	B	292,75	A	0,02	B	245,92	A	0,02	B
Octyl acetate	1348,64	A	332,66	B	173,05	A	0	B	259,48	A	0	B
BUTANOATES												
Methyl butanoate	187,31	A	0	B	68,58	B	224,38	A	132,13	A	0	B
Ethyl 2-methylbutanoate	0	A	0	A	367,78	A	0	B	0	B	185,09	A
2-Methylpropyl butanoate	704,39	A	115,41	B	824,5	A	753,94	B	933,88	A	487,3	B
Butyl 2-methylbutanoate	0	A	0	A	0	A	0	A	0	A	0	A
Butyl butanoate	230,92	A	0,03	B	385,14	A	0,02	B	558,92	A	407,16	B
2-Methylbutyl-2-methylbutanoate	0	A	0	A	0	B	303,12	A	0	A	0	A
Pentyl 3-methylbutanoate	0	A	0	A	87,91	A	0	B	0	B	406,35	A
Hexyl butanoate	373,58	A	0	B	0	A	0	A	0	A	0	A
Hexyl 2-methylbutanoate	577,33	A	0	B	0	A	0	A	0	A	0	A
HEXANOATES												
Ethyl hexanoate	0	A	0	A	123,39	A	0	B	0	A	0	A
Butyl hexanoate	334,84	A	0	B	1125,88	A	0	B	920,85	A	0	B
Pentyl hexanoate	478,32	A	0	B	0	A	0	A	0	A	0	A
Hexyl hexanoate	1006,38	A	599,71	B	466,79	A	253,95	B	296,52	A	0	B
PROPANOATES												
tert-Butyl propionate	0	B	115,67	A	0	A	0	A	0	A	0	A
Butyl propanoate	222,05	A	0	B	116,77	A	0	B	331,38	A	0	B

Distintas letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos el mismo día de almacenamiento de acuerdo con el test t-Student ($P < 0,05$).

Tabla 20 (continuación). Compuestos volátiles emitidos por la pera mínimamente procesada no tratada con CaCl_2 en la poscosecha y con o sin *P. graminis* CPA-7 durante el tiempo de almacenamiento a 5 °C.

Compuestos volátiles	No tratada con CaCl_2						
	0 días		2 días		6 días		
	CPA-7	no CPA-7	CPA-7	no CPA-7	CPA-7	no CPA-7	
OCTANOATES							
Ethyl octanoate	437,07	A	0 B	119,63	A	50,95	A
ALCOHOLS							
Ethanol	188734,4	A	3676,92	B	13305,78	A	0 B
3-Methyl-2-butanol	221,31	B	15256,36	A	391,17	A	0 B
1-Butanol	0	B	118,91	A	0 A	0 A	0 A
2-Methyl-1-butanol	0	A	0 A	0 A	114,19	A	0 B
1-Pentanol	0	A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A
1-Hexanol	290,95	A	0 B	406,82	A	0 B	368,71
(E)-2-Hexen-1-ol	0,01	A	0,01	A	0,01	A	767,03
2-Ethyl-1-hexanol	5575,71	A	2445,72	B	1141,15	A	1133,36
1-Octanol	506,37	A	104,35	B	182,42	A	105,97
Benzyl alcohol	7283,43	A	172,5	B	2685,94	A	4129,76
ALDHYDES							
Acetaldehyde	2122,5	A	780,35	B	401,37	B	0 B
Hexanal	1521,87	A	0 B	2812,96	A	1380,97	B
2-Ethylhexanal	56,31	A	59,27	A	156,05	A	88,9
Benzaldehyde	1122,99	A	649,42	B	399,81	A	0 B
TERPENES							
α -Farnesene	3658,46	A	931,71	B	264,6	A	531,87
KETONES							
Acetone	0,03	B	62,89	A	0,03	A	0,03
6-Methyl-5-hepten-2-one	405,31	A	0 B	119,31	A	0 A	0 A
ACIDS							
Acetic acid	775,93	A	0 B	0 A	0 A	164,88	A

Distintas letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos el mismo día de almacenamiento de acuerdo con el test *t*-Student ($P < 0,05$).

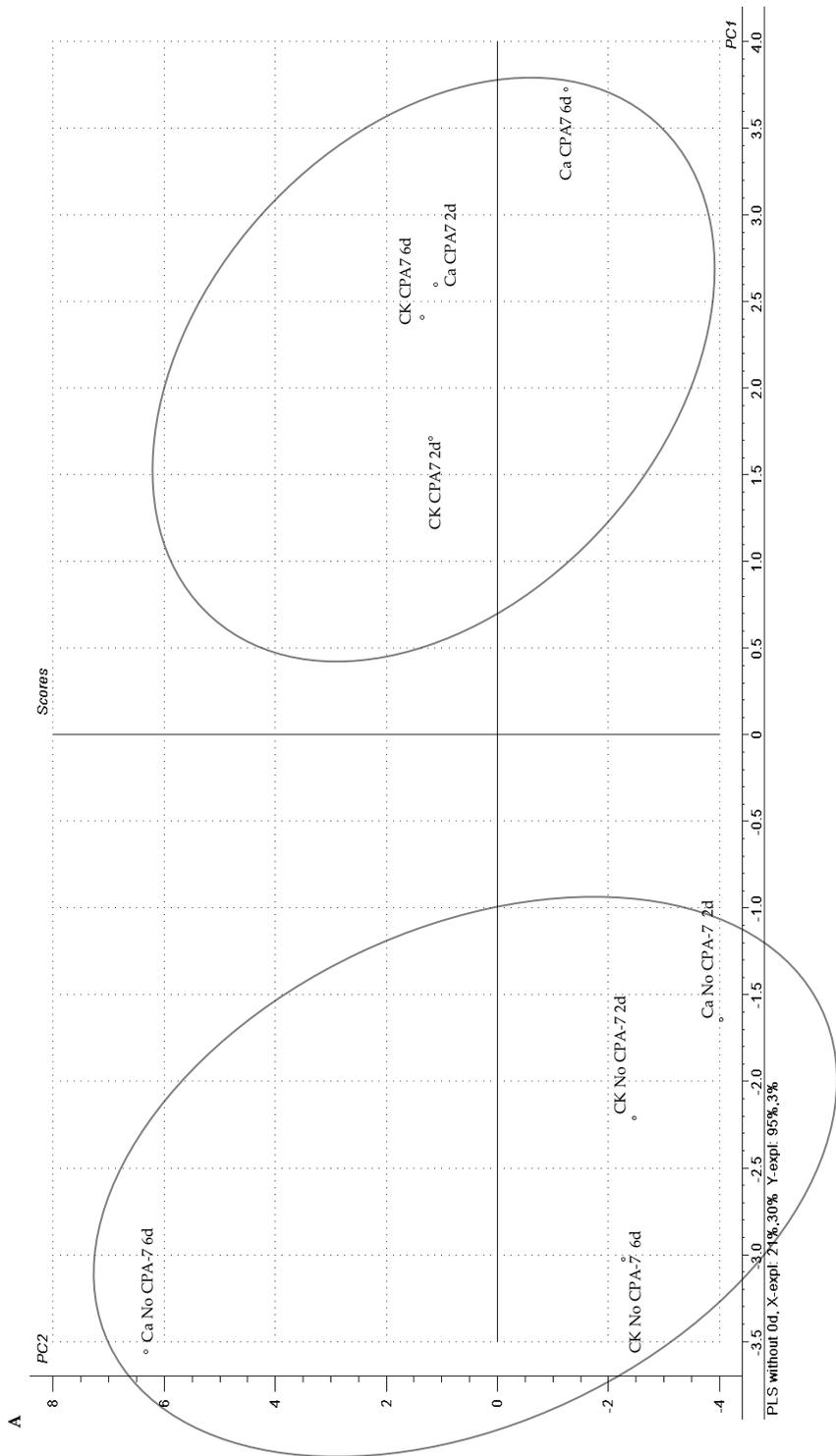


Figura 37. Diagrama de scores (A) y loadings (B) de PC1 vs. PC2 correspondiente a un modelo PLSR para muestras de pera tratadas con *P. graminis* CPA-7 vs. los compuestos volátiles emitidos por ellas durante su conservación una vez procesadas.

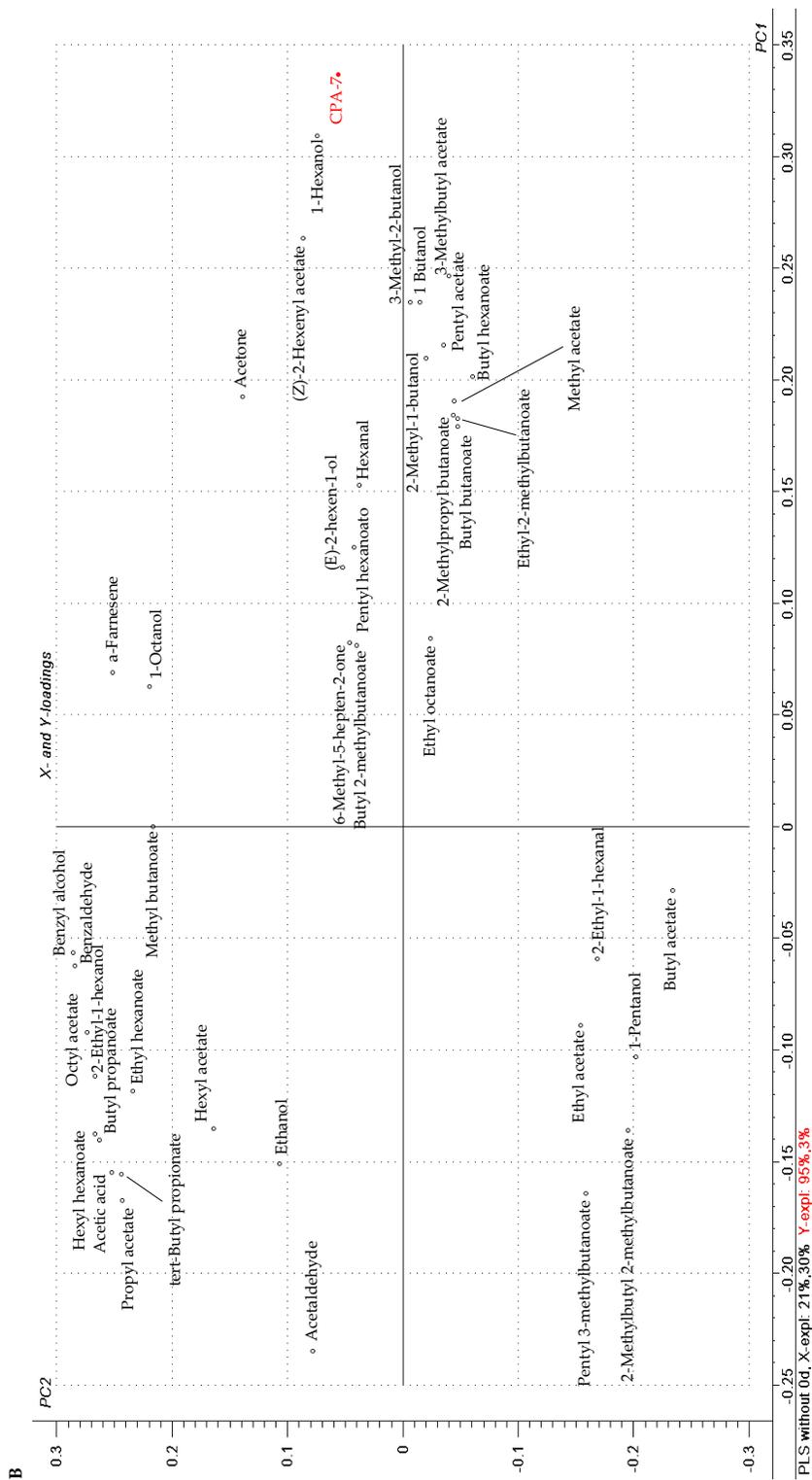


Figura 37 (continuación). Diagrama de scores (A) y loadings (B) de PC1 vs. PC2 correspondiente a un modelo PLSR para muestras de pera tratadas con P. graminis CPA-7 vs. los compuestos volátiles emitidos por ellas durante su conservación una vez procesadas.

Resultados

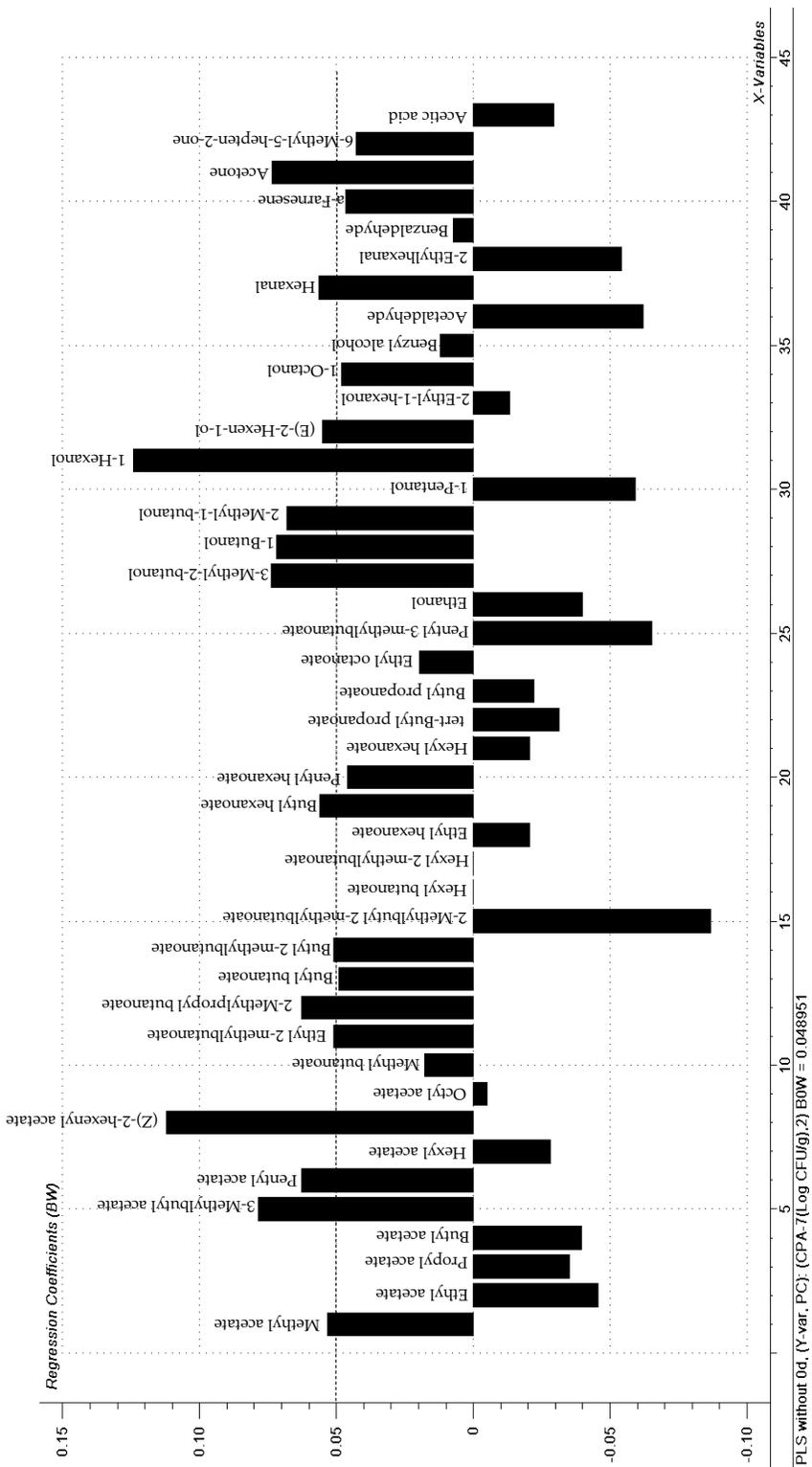


Figura 38. Coeficientes de correspondientes al modelo PLSR para la población de *P. graminis* CPA-7 comparando con la emisión de compuestos volátiles.

5.2. Efecto de *L. rhamnosus* GG

5.2.1. Población de los microorganismos en pera mínimamente procesada conservada a 5 °C

De forma similar a lo que se hizo con *P. graminis* CPA-7, se determinó el efecto de *L. rhamnosus* GG sobre la calidad de la pera mínimamente procesada que, previamente, había sido tratada o no con CaCl₂ en poscosecha. Los tratamientos utilizados fueron los siguientes:

- (a) Control (solución antioxidante sin inocular)
- (b) Sal + Lm (a 10⁵ ufc/mL cada microorganismo)
- (c) *L. rhamnosus* GG (a una concentración de 10⁸ ufc/mL)
- (d) Sal + Lm + *L. rhamnosus* GG (a una concentración de 10⁵ los microorganismos patógenos y 10⁸ ufc/mL el probiótico)

Al analizar los resultados, se observó que no existían diferencias significativas entre las poblaciones de los microorganismos (*S. enterica*, *L. monocytogenes* y *L. rhamnosus* GG) en la pera mínimamente procesada tratada o no con CaCl₂ después de la cosecha. Por tanto, los resultados se combinaron.

La población inicial de *S. enterica* en la pera mínimamente procesada fue de 3,8 log ufc/g tanto en el tratamiento sin el probiótico, como en el tratamiento con el probiótico (Fig. 39A). Tras los 9 días de almacenamiento a 5 °C, la población del patógeno se mantuvo prácticamente constante. Debido a que no se observaron diferencias significativas entre la población de *S. enterica* del tratamiento control (Sal) y el tratamiento con el probiótico (Sal + *L. rhamnosus* GG), se demostró que *L. rhamnosus* GG no tiene efecto bioconservante frente a *S. enterica* en las condiciones del ensayo.

Como ya se había demostrado anteriormente, *L. monocytogenes* aumentó su población a 5 °C (Fig. 39B) en la pera mínimamente procesada en las condiciones ensayadas. Tras la inoculación de la fruta, la población del patógeno fue de 3,5 log ufc/g, tanto inoculado con el probiótico como no inoculado conjuntamente. Tras 2 días de almacenamiento, la población de *L. monocytogenes* inoculada sin *L. rhamnosus* GG comenzó a aumentar hasta alcanzar 5,8 log ufc/g al final del ensayo. Sin embargo, la población de *L. monocytogenes* del tratamiento con el probiótico solo aumentó 0,5 unidades logarítmicas, aproximadamente. No se observó el efecto de *L. rhamnosus* GG sobre *L. monocytogenes* a los 2 días de

Resultados

almacenamiento, pero sí se observaron diferencias significativas entre los dos tratamientos a los 6 y 9 días de almacenamiento, con una reducción de la población de 1,1 y 1,8 unidades logarítmicas, respectivamente.

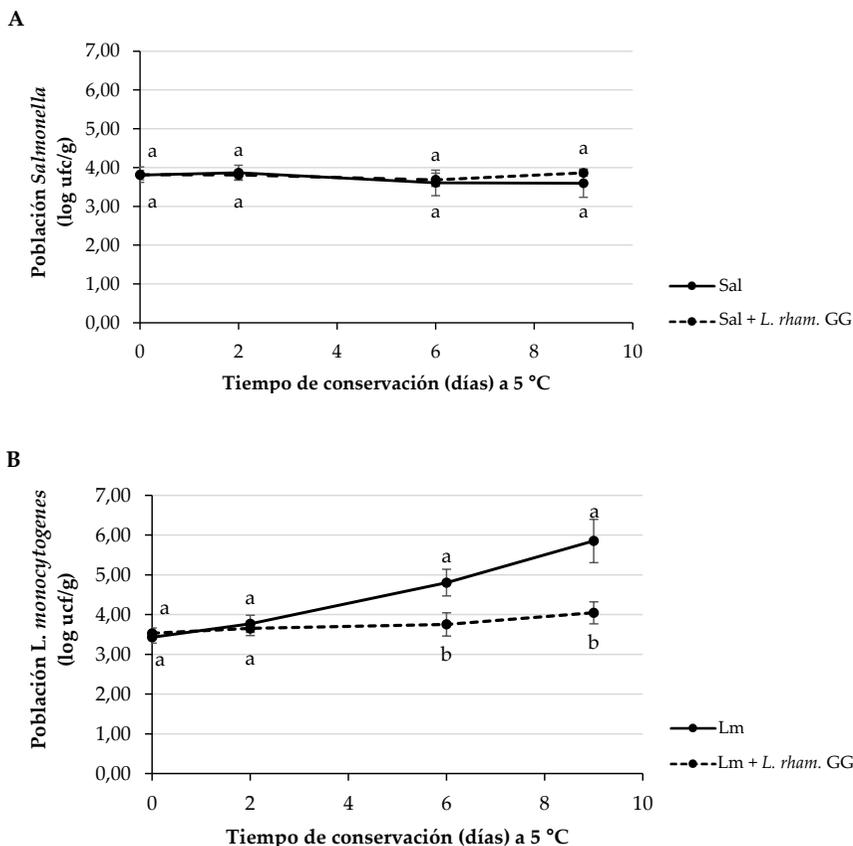


Figura 39. Población (log ufc/g) de *S. enterica* (A) y *L. monocytogenes* (B) inoculadas solas o inoculadas conjuntamente con *L. rhamnosus* GG en pera mínimamente procesada almacenada a 5 °C. Los resultados muestran la media de 12 valores. Las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Para cada tiempo de muestreo, diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con el test *t*-Student ($P < 0,05$).

La población inicial de *L. rhamnosus* GG cuando se inoculó solo en la pera mínimamente procesada fue de 7,6 log ufc/g, y en caso de estar inoculado con los patógenos de 7,7 log ufc/g (Fig. 40). Al final del ensayo (9 días), la población del probiótico inoculado solo permaneció prácticamente constante, sin embargo,

cuando se inoculó con los patógenos aunque su población aumentó 0,2 unidades logarítmicas no fue estadísticamente significativo.

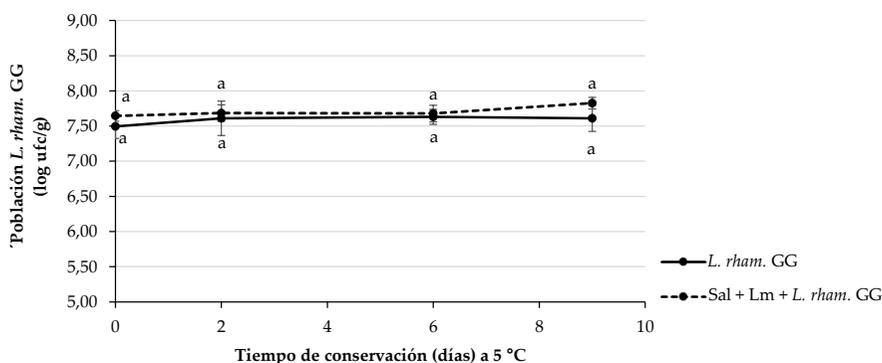


Figura 40. Población de *L. rhamnosus* GG (log UFC/g) inoculado solo o inoculado junto con los patógenos en pera mínimamente procesada y almacenada a 5 °C. Los resultados muestran la media de 12 valores. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media. Para cada tiempo de muestreo, las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con el test t-Student ($P < 0,05$).

5.2.2. Análisis físico-químicos

5.2.2.1. Evolución de la concentración de oxígeno y dióxido de carbono del espacio de cabeza de los envases

La concentración de O₂ descendió drásticamente de 21,0 % a, aproximadamente, 10,0 % en los 2 primeros días de almacenamiento y alcanzó valores de 0,0 % tras 6 días de almacenamiento, manteniéndose este valor hasta el final del ensayo (Fig. 41). No se observaron diferencias significativas entre las barquetas con pera tratada con *L. rhamnosus* GG y las barquetas con pera no tratada con el probiótico. La concentración de CO₂ se incrementó rápidamente hasta 19,5 % en las peras no tratadas con el probiótico y hasta 22,0 % en las peras tratadas con *L. rhamnosus* GG al final del ensayo, observándose diferencias significativas entre ambos tratamientos.

Resultados

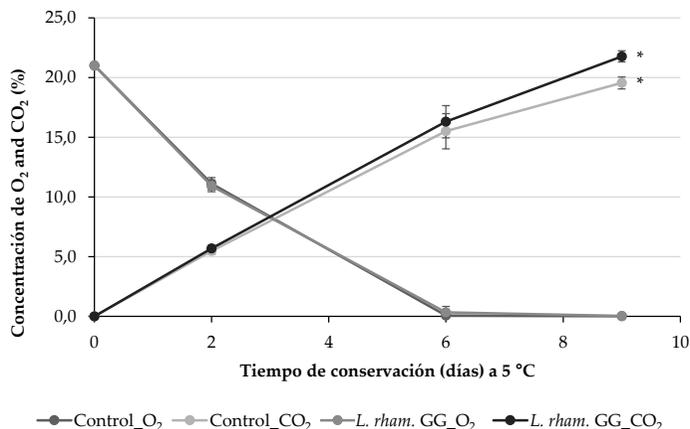


Figura 41. Concentración (%) de O₂ y CO₂ del espacio de cabeza de los envases a lo largo del tiempo de almacenamiento a 5 °C. Los resultados expresan la media de 12 valores. Las barras verticales muestran la desviación estándar de la media.* Indica diferencias significativas entre tratamiento para cada tiempo muestral de acuerdo con el test t-Student ($P < 0,05$).

5.2.2.2. Contenido de sólidos solubles y acidez titulable

El CSS y la AT de los gajos de pera se determinaron en el tratamiento control (sin microorganismos) y en el tratamiento con *L. rhamnosus* GG (Fig. 42). Los valores iniciales de CSS se situaron entre 13,1 y 13,4 °Brix, y prácticamente se mantuvieron constantes durante el ensayo. En cuanto a la AT, los valores se encuadraron entre 1,7 y 2,1 g ácido málico/L, también permanecieron, prácticamente, constantes durante el almacenamiento, aunque no siguieron una tendencia clara.

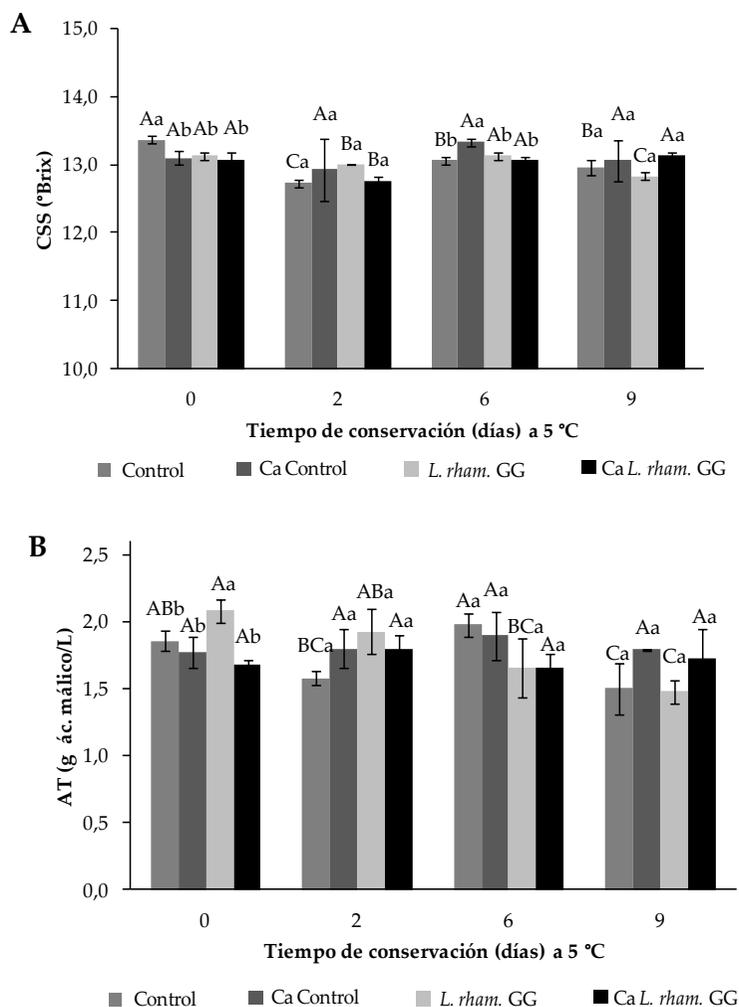


Figura 42. Contenido en sólidos solubles (°Brix) (A) y acidez titulable (g/L) (B) de la pera mínimamente procesada almacenada a 5 °C. Los valores mostrados son la media de 6 repeticiones \pm la desviación estándar de la media. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas dentro del mismo tratamiento a lo largo del ensayo aplicando el test de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a cada tiempo analizado aplicando el test de Tukey ($P < 0,05$).

5.2.2.3. Concentración de etanol y acetaldehído

La determinación de estos dos compuestos es importante desde el punto de vista de calidad, ya que pueden aportar sabores y olores indeseables. Como además el probiótico puede tener metabolismo fermentativo, es clave determinarlos durante la conservación.

Resultados

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de etanol y acetaldehído entre las peras mínimamente procesadas tratadas o no con CaCl_2 después de la cosecha, de forma que los datos se combinaron para ser representados. La concentración inicial de etanol fue, aproximadamente, de 109 ppm en la pera mínimamente procesada no tratada con el probiótico y de 77 ppm en las muestras tratadas, aunque sin diferencias significativas entre ambos valores (Fig. 43A). La concentración de etanol aumentó de forma muy significativa durante la conservación. Así, en la pera mínimamente procesada no tratada con *L. rhamnosus* GG, la concentración de etanol al final del ensayo se situó en 600 ppm, aproximadamente, y en la pera tratada con el probiótico alcanzó 740 ppm, sin diferencias significativas entre ambos tratamientos.

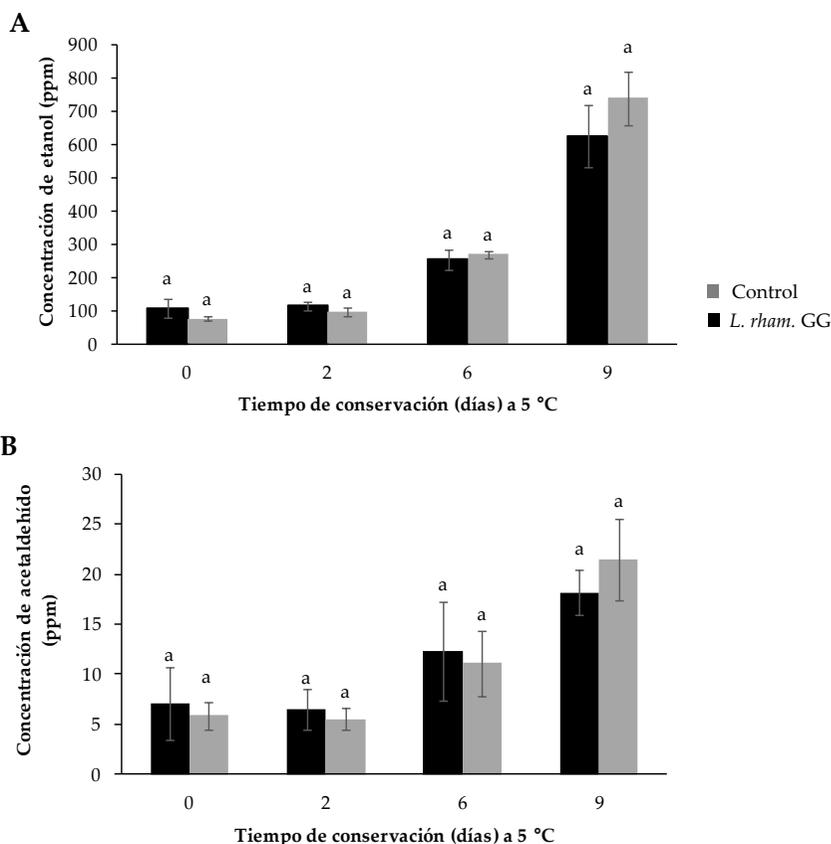


Figura 43. Concentración (ppm) de etanol (A) y acetaldehído (B) producidos en la pera mínimamente procesada almacenada a 5 °C en presencia o no de *L. rhamnosus* GG. Los resultados representados son la media de 6 valores. Las barras verticales indican la desviación estándar de la media. Las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con el test *t*-Student ($P < 0,05$).

La concentración inicial de acetaldehído fue de 7 y 6 ppm en peras no tratadas y tratadas con *L. rhamnosus* GG, respectivamente (Fig. 43B). Tras los 9 días de almacenamiento de la pera mínimamente procesada a 5 °C, la concentración aumentó hasta 18 ppm en las muestras no tratadas con el probiótico y hasta 21 ppm en las tratadas. No se observaron diferencias significativas entre los dos tratamientos.

Por tanto, el incremento en ambos compuestos no pudo atribuirse a la aplicación del probiótico.

5.2.2.4. Efecto de *L. rhamnosus* GG en las emisiones de compuestos volátiles en pera mínimamente procesada

Se analizó el efecto de la cepa probiótica en los compuestos volátiles emitidos en la pera mínimamente procesada. Se identificaron y cuantificaron un total de 46 compuestos en la fracción volátil emitida en las barquetas con la fruta mínimamente procesada (27 ésteres, 10 alcoholes, 4 aldehídos, 2 terpenos, 2 cetonas y 1 ácido) (Tablas 21 y 22).

Con el objetivo de evaluar la posible relación entre la población de *L. rhamnosus* GG (*Variable Y*) y el conjunto de las variables potencialmente explicativas (*Variables X*), entre las que se incluyeron los compuestos volátiles emitidos, se realizó un modelo de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR). Para mejorar la diferenciación entre las muestras control y las tratadas con *L. rhamnosus* GG, las muestras del día 0 (inicio del ensayo) se excluyeron del análisis, ya que el probiótico acababa de aplicarse en la fruta y no habría iniciado su metabolismo. Consecuentemente, el PLSR se desarrolló incluyendo 12 muestras y 57 variables (46 compuestos volátiles y el total de la emisión de las diferentes familias de acetatos, propanoatos, butanoatos, pentanoatos, hexanoatos, octanoatos, alcoholes, aldehídos, terpenos, cetonas y ácidos) (Fig. 44). La etapa de validación indicó que dos factores PLS fueron relevantes en el modelo. De acuerdo con este modelo, el 70 % de la variabilidad en las muestras se explicó por la emisión de los compuestos volátiles (Fig. 44). Las muestras tratadas con *L. rhamnosus* GG se localizaron más hacia la derecha del PC1, el cual explica un 56 % de la variabilidad, si se compara son las muestras control que se localizan en la parte izquierda del PC1 (Fig. 44A). La figura de *loadings* (Fig. 44B) mostró que las muestras tratadas con el probiótico estaban asociadas con concentraciones más elevadas de algunos alcoholes y ésteres característicos en el perfil de volátiles de pera "Conference", lo que podría indicar una mejor

Resultados

conservación del sabor típico de esta variedad de pera que las muestras control. No se observó una clara influencia de si el tratamiento con CaCl_2 de las peras después de la cosecha influye en el perfil de compuestos volátiles, al igual que el tiempo de almacenamiento a 5 °C tras el procesamiento de la pera.

La Figura 45 muestra los coeficientes de regresión entre la población de *L. rhamnosus* GG y las emisiones de compuestos volátiles individuales y sus familias. Esta figura permite identificar aquellos volátiles que tienen más relación con el probiótico. Se puede observar que la población del microorganismo se relacionó positivamente con las emisiones más altas de ciertos ésteres (acetato de metilo, acetato de propilo, acetato de hexilo, acetato de (E)-2-hexenilo, 2-metilbutanoato de etilo, 2-metilbutanoato de 2-metilbutilo y 3-metilbutanoato de pentilo), algunos alcoholes (etanol, 3-metil-2-butanol, 1-hexanol y benzil alcohol) y un aldehído (benzaldehído).

Tabla 21. Compuestos volátiles emitidos por la pera mínimamente procesada tratada con CaCl₂ en la poscosecha y con o sin *L. rhamnosus* GG durante el tiempo de almacenamiento a 5 °C.

Compuestos volátiles	Tratada con CaCl ₂															
	0 días				2 días				6 días				9 días			
	<i>L. rham.</i>	GG	no <i>L. rham.</i>	GG	<i>L. rham.</i>	GG	no <i>L. rham.</i>	GG	<i>L. rham.</i>	GG	no <i>L. rham.</i>	GG	<i>L. rham.</i>	GG	no <i>L. rham.</i>	GG
ACETATES																
Methyl acetate	145,55	B	241,85	A	1120,12	A	0,02	B	248,14	A	293,08	A	0,02	A	106,49	A
Ethyl acetate	3258,34	A	198,17	B	685,72	A	353,35	B	3690,18	A	2473,73	B	3065,84	A	2989,68	A
Propyl acetate	573,09	A	162,76	B	216,63	A	0	B	652,86	A	437,06	B	494,35	A	476,73	A
2-Methylpropyl acetate	0	A	0	A	0	B	3493,56	A	0	A	0	A	0	A	0	A
Butyl acetate	17238,23	A	3886,5	B	6752,55	A	93,78	B	20641,19	A	14727,61	B	11765,73	A	21970,4	A
3-Methylbutyl acetate	379,77	A	0	B	98,26	A	0	B	532,66	A	166,44	B	63,87	B	3279,41	A
Pentyl acetate	792,92	A	0	B	259,84	A	0	B	0	A	0	A	0	B	1193,09	A
Hexyl acetate	17962,06	A	5559,21	B	5419,88	A	85,48	B	11990,37	A	6196,11	B	5915,91	A	10776,91	A
(Z)-2-hexenyl acetate	11784,58	A	225,13	B	264,46	A	0,02	B	522,49	A	0,01	B	89,65	A	278,04	A
Octyl acetate	1431,177	A	172	B	229,33	A	213,18	A	836,74	A	230,15	B	108,8	A	364,83	A
BUTANOATES																
Methyl butanoate	0	B	74,34	A	0	A	0	A	0	A	0	A	0	A	136,13	A
Ethyl 2-methylbutanoate	0	B	54,82	A	67,47	A	0	B	0	A	0	A	9108,61	A	3168,73	A
2-Methylpropyl butanoate	632,94	A	470,35	B	258,15	A	93,55	B	926,03	A	795,03	B	778,59	A	1951,18	A
Butyl 2-methylbutanoate	209,48	A	0	B	0	A	0	A	0	A	0	A	244,38	A	394,55	A
Butyl butanoate	292,63	B	435,06	A	284,97	A	25,24	B	550,58	A	0,02	B	0	A	806,09	A
2-Methylbutyl 2-methylbutanoate	568,41	A	0	B	0	A	0	A	226,83	A	0	B	0	A	0	A
Pentyl 3-methylbutanoate	988,56	A	144,47	B	0	A	0	A	320,21	A	0	B	84,1	A	0	A
Hexyl butanoate	4782,58	A	0	B	175,63	A	0	B	2276,72	A	0	B	128,5	A	354,31	A
Hexyl 2-methylbutanoate	5128,17	A	0	B	140,45	A	0	B	1309,52	A	0	B	315,94	A	117,92	A
HEXANOATES																
Ethyl hexanoate	258,97	A	0	B	0	A	0	A	217,83	A	0	B	4137,42	A	304,24	B
Butyl hexanoate	344,47	A	268,57	B	598,93	A	162,47	B	6991,37	A	0	B	0	A	617,64	A
Pentyl hexanoate	0	A	0	A	0	A	0	A	3078,14	A	0	B	0	A	0	A
Hexyl hexanoate	115,7	B	337,67	A	449,49	A	104,55	B	1431,34	A	354,81	B	239,25	A	194,79	A
PROPANOATES																
tert-Butyl propanoate	0	B	99,49	A	236,49	A	0	B	0	A	0	A	0	A	0	A
Butyl propanoate	278,55	A	192,74	B	77,91	A	0	B	243,41	A	0	B	155,93	A	1000,14	A
Hexyl propanoate	8256,13	A	0	B	0	A	0	A	106,08	A	0	B	0	A	0	A

Distintas letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos el mismo día de almacenamiento de acuerdo con el test *t*-Student ($P < 0.05$).

Tabla 21 (continuación). Compuestos volátiles emitidos por la pera mínimamente procesada tratada con CaCl₂ en la poscosecha y con o sin *L. rhamnosus* GG durante el tiempo de almacenamiento a 5 °C.

Compuestos volátiles	Tratada con CaCl ₂															
	0 días				2 días				6 días				9 días			
	<i>L. rham.</i>	GG	no <i>L. rham.</i>	GG	<i>L. rham.</i>	GG	no <i>L. rham.</i>	GG	<i>L. rham.</i>	GG	no <i>L. rham.</i>	GG	<i>L. rham.</i>	GG	no <i>L. rham.</i>	GG
OCTANOATES																
Ethyl octanoate	4455,06	A	0	B	213,22	A	0	B	670,24	A	0	B	96,44	A	285,24	A
ALCOHOLS																
Ethanol	63004,96	A	29885,84	B	10940,02	B	13273,35	A	15982,18	B	24741,21	A	9017,06	B	37785,4	A
3-Methyl-2-butanol	246,24	B	12422,5	A	16182,86	A	0	B	0	A	0	A	0	B	5397,79	A
1-Butanol	169,54	A	0	B	0	A	0	A	0	A	0	A	0	B	3879,08	A
2-Methyl-1-butanol	108,14	A	0	B	0	B	389,28	A	0	A	0	A	0	B	1563,13	A
1-Pentanol	0	A	0	A	125,32	A	0	B	364,78	A	0	B	75,18	A	497,97	A
1-Hexanol	16290,64	A	106,44	B	375,69	A	0	B	579,96	A	347,35	B	278,88	A	540,12	A
(E)-2-Hexen-1-ol	0,01	A	0,01	A	0,01	B	608,86	A	4405,7	A	0,01	B	0,01	B	1061,79	A
2-Ethyl-1-hexanol	7022,17	A	733,43	B	1513,53	A	558,43	B	3251,57	A	1072,68	B	514,92	A	1171,22	A
1-Octanol	177,27	A	0	B	158,42	A	61,97	B	1488,78	A	159,04	B	86,47	A	354,13	A
Benzyl alcohol	2365,72	B	2759,96	A	1198,04	B	1487,92	A	1594,72	A	425,88	B	524,05	B	2537,6	A
ALDEHYDES																
Acetaldehyde	899,88	A	375,82	B	546,99	A	0	B	0	A	0	A	0	B	123885,07	A
Hexanal	482,89	B	532,79	A	1847,99	A	0	B	4469,34	A	3740,5	B	9857,12	B	39570,45	A
2-Ethylhexanal	485,78	A	72,17	B	46,42	B	108,84	A	111,74	A	0,03	B	108,83	A	767,61	A
Benzaldehyde	353,76	A	190,85	B	431,3	A	228,5	B	1964,07	A	207,16	B	236,48	A	275,91	A
TERPENES																
D-limonene	657,81	A	0	B	0	A	0	A	0	A	0	A	0	A	0	A
α-Farnesene	1060,32	A	995,65	A	896,47	A	844,17	A	843,29	B	1271,55	A	1079,73	A	1443,82	A
KETONES																
Acetone	116,15	A	111,96	A	0,03	A	0,03	A	0,02	A	0,02	A	0,03	A	0,03	A
6-Methyl-5-hepten-2-one	6718,02	A	0	B	0	B	117,7	A	746,83	A	0	B	0	A	138,33	A
ACIDS																
Acetic acid	1384,83	A	0	B	178,41	A	0	B	1016,93	A	0	B	132,24	A	346,36	A

Distintas letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos el mismo día de almacenamiento de acuerdo con el test *t*-Student ($P < 0.05$).

Tabla 22. Compuestos volátiles emitidos por la pera mínimamente procesada sin tratar con CaCl₂ en la poscosecha y con o sin *L. rhamnosus* GG durante el tiempo de almacenamiento a 5 °C.

Compuestos volátiles	No tratada con CaCl ₂													
	0 días				2 días				6 días				9 días	
	<i>L. rham.</i> GG	no <i>L. rham.</i> GG	<i>L. rham.</i> GG	no <i>L. rham.</i> GG	<i>L. rham.</i> GG	no <i>L. rham.</i> GG	<i>L. rham.</i> GG	no <i>L. rham.</i> GG	<i>L. rham.</i> GG	no <i>L. rham.</i> GG	<i>L. rham.</i> GG	no <i>L. rham.</i> GG		
ACETATES														
Methyl acetate	0,02 B		156,55 A	359,72 A	112,38 B		0,02 B		2033,68 A			0,02 B		
Ethyl acetate	1312,77 B		1669,48 A	1669,65 A	711,91 B		2697,92 A		3098,15 B			31298,30 A		
Propyl acetate	430,79 A		375,14 B	414,93 A	159,67 B		362,08 A		473,58 A			468,94 A		
2-Methylpropyl acetate	0 A		0 A	0 A	0 B		0 A		0 A			77,31 A		
Butyl acetate	14243,22 A		8862,39 B	9208,7 A	4796,55 B		8554,67 A		11305,65 A			7934,97 B		
3-Methylbutyl acetate	271,17 B		407,91 A	0 B	126,22 A		144,77 A		248,48 A			0,00 B		
Pentyl acetate	0 B		92,37 A	0 B	290,58 A		251,06 A		156,65 A			0,00 B		
Hexyl acetate	9273,6 A		8315,86 B	5780,54 A	2213,99 B		2582,42 A		5681,04 A			2269,98 A		
(Z)-2-hexenyl acetate	462,87 A		226,28 B	153,21 B	230,13 A		349,52 A		108,34 A			151,21 A		
Octyl acetate	908,8 A		535,02 B	296,32 A	252,29 A		239,6 A		160,06 A			905,26 A		
BUTANOATES														
Methyl butanoate	0 A		234,09 B	143,24 A	0 B		224,63 A		312,54 A			200,30 A		
Ethyl 2-methylbutanoate	0 B		517,33 A	0 A	0 A		441,19 A		0 B			81,90 A		
2-Methylpropyl butanoate	694,7 A		436,48 B	500,85 A	758,84 B		481,47 A		633,68 A			429,46 A		
Butyl 2-methylbutanoate	0 A		0 A	0 B	378,24 A		170,2 A		0 B			394,68 A		
Butyl butanoate	644,68 A		221,45 B	397,26 A	256,13 B		462,09 A		0,01 B			632,64 A		
2-Methylbutyl-2-methylbutanoate	0 A		0 A	57,72 A	0 B		240,59 A		0,00 A			0,00 A		
Pentyl 3-methylbutanoate	0 A		0 A	0 A	0 A		223,24 A		0 B			0,00 A		
Hexyl butanoate	689,76 A		152,23 B	0 B	99,96 A		822,77 A		0 B			0,00 A		
Hexyl 2-methylbutanoate	172,98 B		219,87 A	0 B	166,96 A		394,24 A		0 B			949,30 A		
HEXANOATES														
Ethyl hexanoate	0 A		0 A	0 B	2280,92 A		213,92 A		0 B			0,00 A		
Butyl hexanoate	591,46 A		0 B	846,07 B	1273,32 A		2062,49 A		0 B			5929,78 A		
Pentyl hexanoate	561,83 A		0 B	73,94 A	806,29 A		806,29 A		0 B			0,00 A		
Hexyl hexanoate	611,67 A		172,19 B	146,26 B	272,59 A		1057,41 A		0 B			890,15 A		
PROPANOATES														
tert-Butyl propionate	0 B		80,78 A	319,06 B	454,09 A		175,37 A		0 B			214,11 A		
Butyl propanoate	209,94 A		38,17 B	114,49 A	82,73 B		148,21 A		56,86 B			113,77 A		
Hexyl propanoate	0 A		0 A	0 A	0 A		125,35 A		0 B			0,00 A		

Distintas letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos el mismo día de almacenamiento de acuerdo con el test *t*-Student ($P < 0,05$).

Tabla 22 (continuación). Compuestos volátiles emitidos por la pera mínimamente procesada sin tratar con CaCl₂ en la poscosecha y con o sin *L. rhamnosus* GG durante el tiempo de almacenamiento a 5 °C.

Compuestos volátiles	No tratada con CaCl ₂												
	0 días			2 días			6 días			9 días			
	<i>L. rham.</i> GG	no <i>L. rham.</i> GG		<i>L. rham.</i> GG	no <i>L. rham.</i> GG		<i>L. rham.</i> GG	no <i>L. rham.</i> GG		<i>L. rham.</i> GG	no <i>L. rham.</i> GG		
OCTANOATES													
Ethyl octanoate	374,43 A	155,28 B	171,09 A	130,28 A	406,385 A	0 B	0 B	0,00 B	1729,79 A				
ALCOHOLS													
Ethanol	32637,81 B	68653,01 A	133554,4 A	12867,12 B	68864,64 A	0 B	0 B	17921,97 A	15751,56 A				
3-Methyl-2-butanol	0 B	346,95 A	9730,51 B	13815,84 A	16174,07 A	0 B	0 B	9195,25 A	1007,34 A				
1-Butanol	0 B	99,39 A	0 A	0 A	154,4 A	0 A	0 A	0,00 A	1224,00 A				
2-Methyl-1-butanol	0 A	0 A	0 A	0 A	97,91 B	0 A	0 A	0,00 A	0,00 A				
1-Pentanol	0 A	0 A	91,39 A	0 B	366,32 A	0 B	0 B	120,89 A	174,95 A				
1-Hexanol	503,5 A	96,55 B	206,95 A	255,87 A	343,86 A	0 B	0 B	344,50 A	92,72 A				
(E)-2-Hexen-1-ol	1714,52 A	0,01 B	267,86 A	0,01 B	1436,68 A	0 B	0 B	0,01 B	7472,27 A				
2-Ethyl-1-hexanol	1835,79 A	992,36 B	1590,58 A	859,68 B	2091,49 A	288,09 B	288,09 B	1222,46 A	5378,38 A				
1-Octanol	641,76 A	132,73 B	166,18 A	125,71 A	113,53 A	0 B	0 B	299,92 A	0,00 B				
Benzyl alcohol	4001,53 A	680,55 B	3670,67 A	2019,05 B	6577,2 A	0 B	0 B	2283,70 A	1417,30 A				
ALDEHYDES													
Acetaldehyde	729,95 B	1741,45 A	1479,83 A	946,27 B	733,97 A	0 B	0 B	276,44 A	1027,98 A				
Hexanal	4067,56 A	3875,62 B	2377,43 A	413,8 B	2165,58 A	0 B	0 B	1168,75 A	1473,63 A				
2-Ethylhexanal	188,3 A	49,12 B	82,19 A	67,77 B	94,39 A	77,45 B	77,45 B	152,65 A	95,23 A				
Benzaldehyde	553,47 A	264,5 B	591,34 A	229,87 B	782,65 A	0 B	0 B	347,98 A	431,96 A				
TERPENES													
D-limonene	0 A	0 A	0 A	0 A	0 B	0 A	0 A	45,1 A	65,93 A				
α -Farnesene	256,65 B	718,35 A	279,47 B	700,22 A	345,77 A	0,02 B	0,02 B	542,47 A	941,90 A				
KETONES													
Acetone	0 A	0 A	172,09 A	95,82 B	0,03 B	100,27 A	100,27 A	0,03 B	1108,70 A				
6-Methyl-5-hepten-2-one	250,22 A	135,61 B	0 B	149,35 A	227,21 A	0 B	0 B	143,30 A	107,22 A				
ACIDS													
Acetic acid	815,03 A	326,01 B	218,31 A	169,37 B	607,14 A	0 B	0 B	133,94 A	1843,73 A				

Distintas letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos el mismo día de almacenamiento de acuerdo con el test *t*-Student ($P < 0.05$).

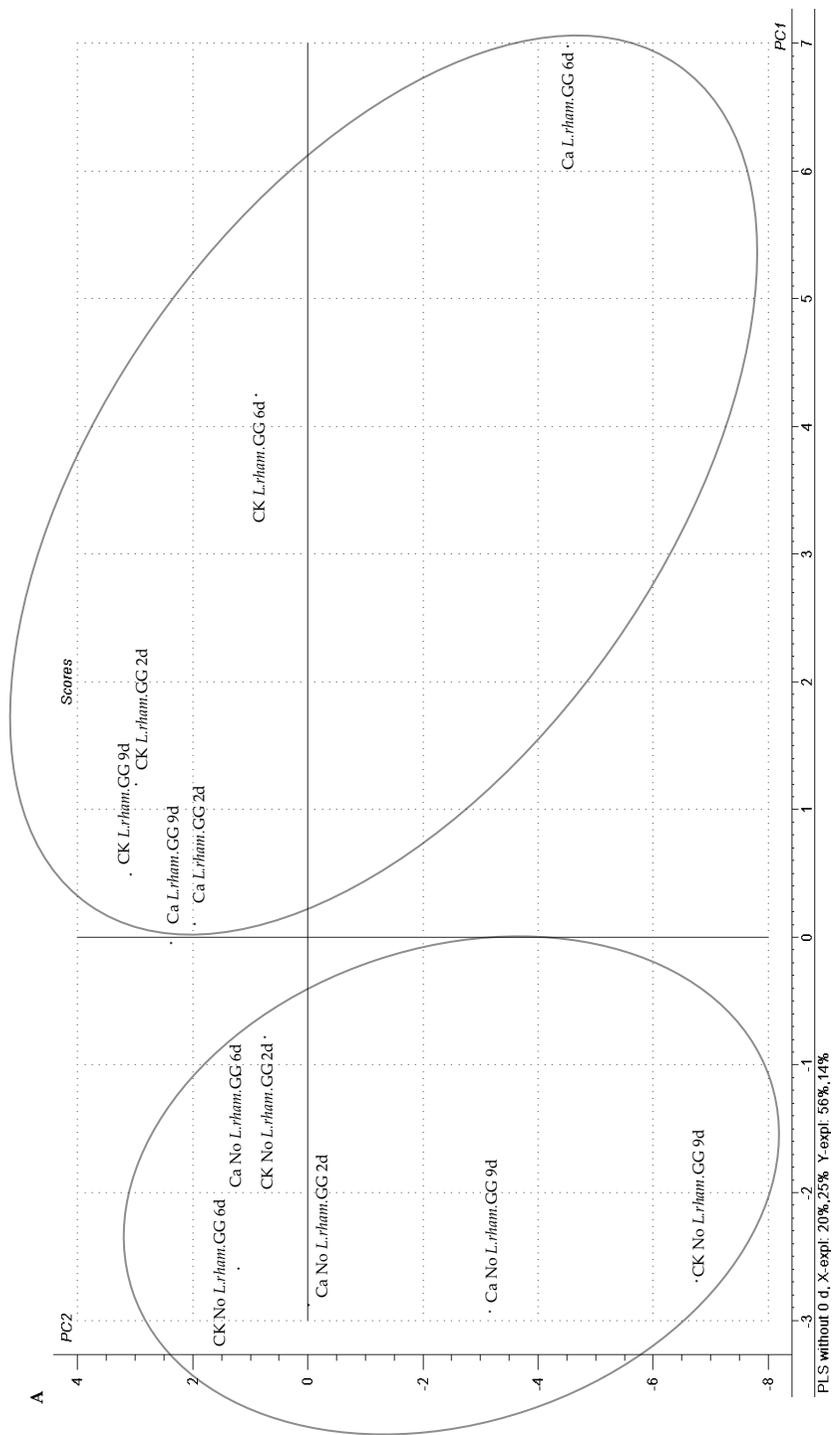


Figura 44. Diagrama de scores (A) y loadings (B) de PC1 vs. PC2 correspondiente a un modelo PLSR para muestras de pera tratadas con *L. rhamnosus* GG vs. los compuestos volátiles emitidos por ellas durante su conservación una vez procesadas.

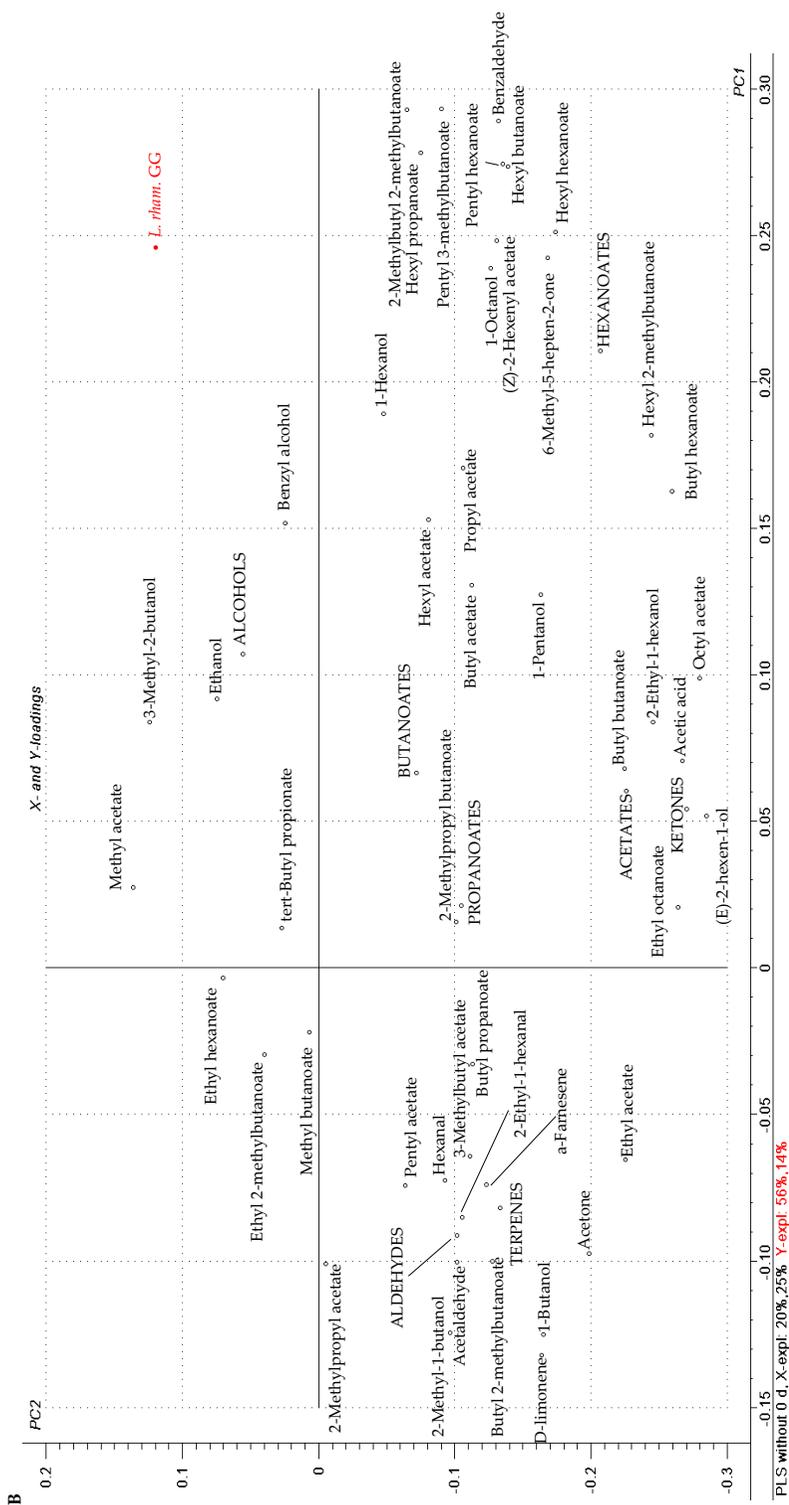


Figura 44 (continuación). Diagrama de scores (A) y loadings (B) de PC1 vs. PC2 correspondiente a un modelo PLSR para muestras de pera tratadas con L. rhamnosus GG vs. los compuestos volátiles emitidos por ellas durante su conservación una vez procesadas.

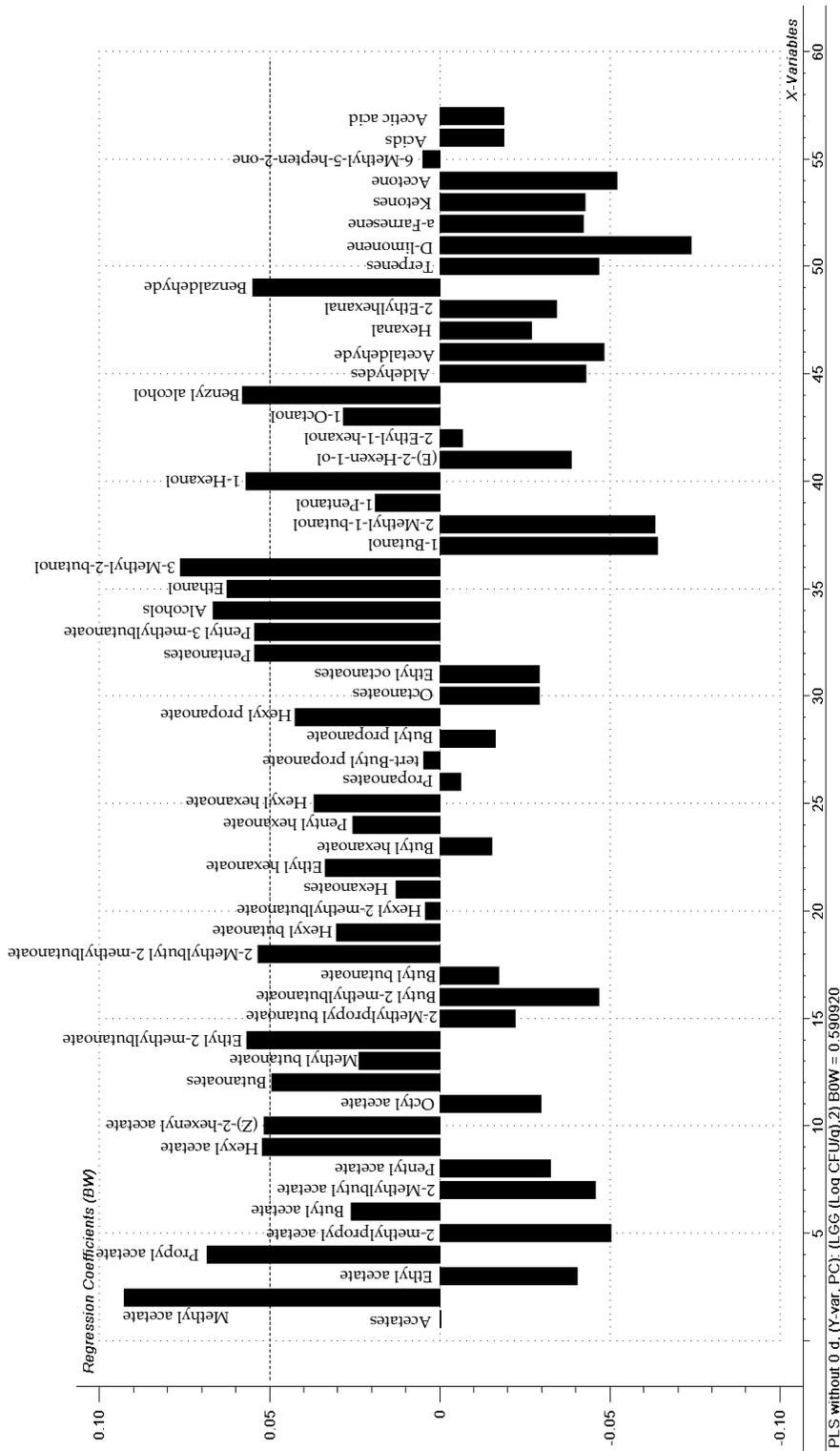


Figura 45. Coeficientes de correspondientes al modelo PLSR para la población de *L. rhamnosus* GG comparando con la emisión de compuestos volátiles.

DISCUSIÓN

1. Evaluación la capacidad antagonista de la cepa *Pseudomonas graminis* CPA-7 en el control de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* y *Listeria monocytogenes* en pera mínimamente procesada

Para que los cultivos bioconservantes sean productos comerciales factibles, deberían ser efectivos al aplicarse en un amplio rango de productos, y cuando se apliquen en condiciones comerciales. En trabajos previos, se evaluó la efectividad de *P. graminis* CPA-7 frente a patógenos de transmisión alimentaria en manzana, melocotón (Alegre *et al.*, 2013b) y melón mínimamente procesados (Abadias *et al.*, 2014). Sin embargo, la efectividad de *P. graminis* CPA-7 se redujo cuando la fruta se envasó en atmósfera modificada simulando su aplicación comercial. Así, el primer objetivo de este estudio fue confirmar que *P. graminis* CPA-7 era también efectivo frente a *S. enterica* y *L. monocytogenes* en pera mínimamente procesada y evaluar si factores como el uso de agentes antioxidantes y atmósfera modificada pasiva simulando condiciones comerciales a temperatura de refrigeración (5 °C) y simulando una ruptura de la cadena de frío (10 y 20 °C) afectan a su efectividad.

Se demostró que cuando la pera se conservó en aire y los tratamientos se aplicaron sin la solución antioxidante, *P. graminis* CPA-7 también fue efectivo frente a un cóctel de 5 cepas de cada uno de los dos patógenos estudiados, *S. enterica* y *L. monocytogenes*, en pera mínimamente procesada a cualquiera de las temperaturas evaluadas, aunque se observaron valores de reducción mayores para *L. monocytogenes*. Por el contrario, Abadias *et al.* (2014) obtuvieron mayores reducciones en la población de *S. enterica* en melón mínimamente procesado. Se han obtenido resultados similares al evaluar otros microorganismos como agentes de biocontrol. Pujato *et al.* (2014) demostraron que *Leuconostoc citreum* MB1 controlaba el crecimiento de *L. monocytogenes* en leche debido a la producción de dos bacteriocinas. En los resultados obtenidos en un estudio de Olanya *et al.* (2015), dos cepas de *Pseudomonas* resultaron ser efectivas frente a *S. enterica* en tomate.

Al evaluar la efectividad de *P. graminis* CPA-7 simulando su aplicación comercial, es decir, usando una solución antioxidante y atmósfera modificada pasiva, se observó que disminuía la capacidad de controlar el crecimiento de los microorganismos patógenos de transmisión alimentaria evaluados. Probablemente, esto pudo ser debido a la ausencia de O₂ y a la alta concentración de CO₂ que se alcanzó dentro de los envases de pera mínimamente procesada durante el período de almacenamiento, pues *P. graminis* CPA-7 es un

Discusión

microorganismo aerobio estricto y la ausencia de O₂ dentro de los envases podría afectar a su crecimiento y a su fisiología, y, por tanto, a su efectividad. Por otro lado, la solución antioxidante utilizada podría haber tenido efecto antimicrobiano sobre el antagonista y sesgar, de esta manera, su efecto sobre los patógenos (Alegre *et al.*, 2013a). Así, se observó que la población de *P. graminis* CPA-7 en pera mínimamente procesada envasada en atmósfera modificada pasiva, en general, se mantuvo 1 unidad logarítmica más baja que la población del microorganismo en la pera cuando se envasó en aire. Además, los patógenos evaluados mostraron un crecimiento más rápido bajo atmósfera modificada pasiva que en aire, al contrario de lo que sucedió con *P. graminis* CPA-7. De esta forma, la reducción de la población de *P. graminis* CPA-7 podría explicar la reducción de su efectividad frente a *S. enterica* y *L. monocytogenes*.

Por tanto, en relación a los resultados obtenidos en el primer ensayo, se planteó la evaluación del efecto de distintas soluciones antioxidantes para prevenir el pardeamiento de la pera y optimizar las condiciones de envasado mediante el uso de films con distinta permeabilidad.

Para seleccionar la solución antioxidante más adecuada, el principal factor que se tuvo cuenta fue la supervivencia de *P. graminis* CPA-7 en ella. Si los componentes utilizados como antioxidantes tuvieron efecto antimicrobiano, la población de *P. graminis* CPA-7 podría verse afectada y, por tanto, su actividad antagonista frente a patógenos de transmisión alimentaria se reduciría. En este ensayo se evaluaron distintos compuestos a distintas concentraciones y diferentes combinaciones de ellos. El ensayo *in vitro* mostró que muchos de los compuestos antioxidantes utilizados causaron una disminución de la población de *P. graminis* CPA-7 después de 1 y 2 h de contacto y, por tanto, se descartaron. Sin embargo, dos de las combinaciones evaluadas (ácido ascórbico 2 % + citrato de sodio 2 % + CaCl₂ 1 % y ácido ascórbico 2 % + CaCl₂ 1 %) no tuvieron efecto negativo en la supervivencia de *P. graminis* CPA-7, por lo que se evaluaron *in vivo* sobre pera mínimamente procesada. De los resultados obtenidos se dedujo que ninguna de las dos soluciones evaluadas *in vivo* afectó a la viabilidad de *P. graminis* CPA-7, pues, aunque se observaron reducciones, estas fueron las mismas que las obtenidas en pera mínimamente procesada sin aplicar la solución antioxidante. El ácido ascórbico es ampliamente utilizado como agente antioxidante debido a su acción reductora sobre las quinonas y difenoles, produciendo derivados sin coloración (Arias *et al.*, 2008). En este estudio se observó que la población de *P. graminis* CPA-7 se redujo en contacto con la solución de ácido ascórbico solo y en combinación con otras sustancias, lo que concuerda con los resultados

obtenidos por Alegre *et al.* (2013a). Los resultados también concuerdan con otros estudios que revelan actividad antimicrobiana de este compuesto (Tajkarimi y Ibrahim, 2011). Se sabe que el citrato de sodio es un agente quelante de iones y podría, por ello, tener acción antimicrobiana al no permitir que los microorganismos los empleen en sus procesos fisiológicos (Blaszyk y Holley, 1998). Aunque se observó una reducción en la población de *P. graminis* CPA-7 en contacto con el citrato de sodio cuando se evaluó solo, al combinarlo con otros, no se detectó reducción en la población bacteriana. Por otra parte, las sales de calcio como el CaCl_2 y el lactato de calcio se emplean ampliamente para mantener la firmeza y la textura crujiente de las frutas mínimamente procesadas (Oms-Oliu *et al.*, 2010), además, el CaCl_2 es una sustancia que reduce el pardeamiento en los cortes superficiales de las peras (Gorny *et al.*, 1998).

Por tanto, la solución antioxidante utilizada en el ensayo que simulaba la aplicación comercial no fue la causa del descenso de la efectividad y, por ello, se siguió utilizando en los ensayos posteriores.

El siguiente factor a estudiar fue la atmósfera modificada. Existen numerosos estudios que afirman que el uso de atmósferas modificadas pasivas prolonga la vida útil y reduce el número de microorganismos alterantes y patógenos en los productos mínimamente procesados. Uno de los objetivos de este estudio fue seleccionar el film de envasado más adecuado para mantener la calidad de la pera mínimamente procesada y, simultáneamente, mantener la efectividad de *P. graminis* CPA-7 frente a *S. enterica* y *L. monocytogenes*. Se evaluaron tres atmósferas modificadas distintas para almacenar la pera mínimamente procesada durante 5 días a 10 °C. Estas atmósferas se compararon con el control (envasado en aire, 21,0 % O_2 y 0,0 % CO_2). Con respecto a la concentración de CO_2 y O_2 que se detectó dentro de las barquetas, el film 1 fue el más permeable (similar al aire), seguido por el film 2 y el film 3, el cual fue el más impermeable. Bajo estas condiciones, se observó que el crecimiento de ambos patógenos cuando se inocularon sin *P. graminis* CPA-7 fue el mismo en cualquiera de las atmósferas evaluadas, sin diferencias significativas, por tanto, entre las poblaciones de los diferentes envases tras 5 días de almacenamiento a 10 °C, lo cual concuerda con los resultados de Alegre *et al.* (2013a) en manzana mínimamente procesada. Sin embargo, la población de *P. graminis* CPA-7 fue menor en la pera mínimamente procesada envasada con el film 3, en cuyos envases la concentración de O_2 alcanzó 0,0 % y la de CO_2 alcanzó aproximadamente 20,0 % después de 5 días de conservación, lo cual afectó negativamente a la efectividad de *P. graminis* CPA-7. Se sabe que un aumento en la concentración de CO_2 podría reducir el crecimiento

Discusión

de *Pseudomonas* sp. (Nguyen-the y Carlin, 1994), lo que, junto con la baja concentración de CO₂ podría explicar la disminución de su efectividad. En el estudio, se observó que la efectividad del agente de biocontrol *P. graminis* CPA-7 fue mayor cuando dentro de los envases la concentración de O₂ no alcanzó valores de 0,0 % (aire, film 1 y film 2). A estas condiciones, sí que se observaron reducciones de más de 2 unidades logarítmicas en la población de los patógenos cuando se inocularon conjuntamente con *P. graminis* CPA-7. Sin embargo, no se obtuvieron reducciones en las poblaciones de ambos patógenos cuando se utilizó el film 3, por lo que este film no podría ser utilizado para la conservación de la pera mínimamente procesada si *P. graminis* CPA-7 se aplica como un agente de biocontrol, aunque fue el film que mostró los mejores valores en los distintos parámetros de la calidad de la fruta analizados. Por el contrario, las condiciones de envasado que proporcionaron las mayores reducciones en la población de los patógenos (aire y film 1) no fueron lo suficiente adecuadas para mantener la calidad de la pera mínimamente procesada, pues esta pera no tuvo buena aceptación entre los panelistas, tuvo el mayor índice de pardeamiento y valores de firmeza menores que el film 2 y 3. Teniendo en cuenta tanto la efectividad de *P. graminis* CPA-7 frente a los patógenos y la calidad de la fruta tras el período de conservación a 10 °C, se seleccionó el film 2 para futuros ensayos. No existen estudios similares en otros bioconservantes utilizados en frutas y hortalizas mínimamente procesadas.

2. Ampliación del espectro de acción de *P. graminis* CPA-7

Se sabe que muchas frutas y productos obtenidos a partir de ellas tienen unos valores de pH por debajo de 4,0. Aunque los ácidos orgánicos varían dependiendo del tipo de fruta, los mayoritarios son el cítrico, el málico y el tartárico. Además, el cultivar, la madurez del fruto, el clima y la composición del suelo influyen en la cantidad de ácido y en el pH que presenta la fruta. Así, por ejemplo, la manzana, la pera y la nectarina presentan como ácido mayoritario el ácido málico mientras que en el melón “Cantaloupe”, la sandía, la piña, el mango, la fresa, el kiwi y la naranja el ácido predominante es el cítrico (del Campo *et al.*, 2006; Worobo y Splittstoesser, 2005).

En nuestro estudio, *P. graminis* CPA-7 fue capaz de ejercer control biológico frente a *S. enterica* y *L. monocytogenes* en pera, manzana y nectarina cuyo ácido mayoritario es el málico, aunque también en melón “Galia”, en sandía y en mandarina en las que el ácido cítrico es el mayoritario. Sin embargo, en kiwi

(9,4 g/L), mango (2,8 g/L), piña (2,2 g/L), naranja (8,3 g/L) y fresa (6,0 g/L), frutas en las que el ácido mayoritario también es el cítrico no se observó su efecto antagonista. El hecho de que en melón “Galia” y en sandía si tuviera efecto antagonista, podría ser debido, a que éste no solo depende del tipo de ácido de la fruta, sino también del pH, pues aunque en melón “Galia” y en sandía el ácido mayoritario es el cítrico, la acidez titulable es menor (1,1-1,2 g/l) y el pH es mayor (alrededor de 6,0) que en las otras frutas.

Por su parte, la población de *S. enterica* y *L. monocytogenes* permanecieron constantes durante el ensayo o incluso disminuyeron su población en aquellas frutas con un pH más ácido y, por lo general, en las que el ácido mayoritario era el cítrico. Este hecho concuerda con los resultados obtenidos por Ma *et al.*, (2016), en los que no se observó crecimiento de *S. enterica* ni en piña ni en mango mínimamente procesados (pH 3,2-5,2). Sin embargo, el melón y la sandía son matrices muy apropiadas para que se dé el crecimiento de ambos microorganismos patógenos a pesar de que el ácido predominante es el cítrico (Penteado y Leitão, 2004a; Penteado y Leitão, 2004b).

Para entender la pérdida de efectividad de *P. graminis* CPA-7, en algunas de las frutas analizadas se evaluó el crecimiento de *P. graminis* CPA-7 *in vitro* a distintos valores de pH y ajustando el medio con ácido málico o ácido cítrico. Por lo general, se observó que *P. graminis* CPA-7 alcanzó la fase estacionaria en un período más corto cuando el pH del medio estaba ajustado con ácido málico que cuando estaba ajustado con ácido cítrico. Esto podría ser debido a que el microorganismo se comportó de forma distinta dependiendo del tipo de ácido aplicado. Samara y Koutsoumanis (2009) observaron como distintos ácidos orgánicos (láctico, acético, propiónico y cítrico) aplicados en lechuga mínimamente procesada tuvieron diferente efecto sobre *L. monocytogenes*, siendo el ácido láctico el más efectivo en el control de la bacteria. En nuestro estudio, además, se observó que a medida que el pH del medio aumentaba, el crecimiento de *P. graminis* CPA-7 también se incrementaba. No se observó crecimiento en medio líquido a pH menor de 5,0, si bien, sí hubo crecimiento a estos valores de pH en fruta (por ejemplo en manzana). Resultados similares obtuvieron Oliveira *et al.* (2014), donde observaron que *L. monocytogenes* fue capaz de crecer sobre gajos de pera y manzana almacenados a 10 °C, sin embargo, no observaron crecimiento del patógeno en zumo de pera y manzana, incluso en este último llegó a descender la población al final del estudio. De manera que, el hecho de que la bacteria pueda crecer en los gajos de fruta pero no en el zumo podría ser

Discusión

debido a que es capaz de cambiar el microambiente donde se desarrolla (Conway *et al.*, 2000).

Se observó que durante el crecimiento de *P. graminis* CPA-7 se produjo un aumento notable en el pH del medio. Este aumento de pH, que no permitió la solución tamponada, hizo que *P. graminis* CPA-7 no creciera a pH 5,5 en medio preparado con tampón y sí cuando creció en medio sin esa solución tamponada, ya que fue capaz de modificar el pH del medio. Esto podría explicar el hecho que *P. graminis* quizás es capaz de modificar el pH del microambiente donde se localiza en fruta y crecer, mientras que no puede hacerlo cuando no puede modificar el pH.

3. Estudio del uso de microorganismos probióticos como cultivos bioconservantes sobre S. enterica y L. monocytogenes en pera mínimamente procesada

El efecto positivo del consumo de fruta y de una ingesta regular de microorganismos probióticos viables sobre algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares está ampliamente estudiado (Cross, 2002; McCann *et al.* 2007; Nguyen *et al.* 2007). Este hecho ha ocasionado el creciente interés por los productos derivados de fruta enriquecidos con estos microorganismos (Röbke *et al.*, 2010b). Cada vez son más numerosos los estudios sobre el desarrollo de productos no derivados de la leche como vehículo de probióticos como pueden ser las frutas y hortalizas mínimamente procesadas debido al aumento en su demanda (de Oliveira *et al.*, 2014; Luckow y Delahunty, 2004; McFarland, 2015; Rivera-Espinoza y Gallardo-Navarro, 2010). Aun así, es bastante reducido el número de estudios centrados en el control biológico o bioconservación de microorganismos patógenos de transmisión alimentaria en fruta mínimamente procesada utilizando cultivos de microorganismos probióticos (Alegre *et al.*, 2011; Russo *et al.*, 2014; Russo *et al.*, 2015). Para ejercer su efecto beneficioso, el probiótico debe llegar al intestino. Se sabe que la viabilidad de un probiótico depende fundamentalmente de la matriz alimentaria (Shori, 2016), de las condiciones y del tiempo de almacenamiento (Pimentel *et al.*, 2015) y de la cepa en cuestión (Champagne y Gardner, 2008).

La cepa probiótica *Lactobacillus acidophilus* LA-5 no causó ninguna reducción sobre *S. enterica* y *L. monocytogenes* en pera mínimamente procesada en las condiciones ensayadas. El hecho de que la población de ambos patógenos

aumentara en presencia de *L. acidophilus* LA-5 podría ser debido a que los microorganismos patógenos podrían hacer uso de los metabolitos producidos por la bacteria probiótica como nutrientes y, por tanto, aumentar su población (Fernandes *et al.*, 2013; Rosa *et al.*, 2016). Además, otra razón podría ser que la actividad antagonista se viera afectada también por las condiciones del medio, ya que el microorganismo probiótico mantuvo constante su población durante todo el tiempo de conservación de la pera, independientemente de la temperatura evaluada (Annuk *et al.*, 2003; Jacobsen *et al.*, 1999).

Por el contrario, los resultados obtenidos del análisis de la capacidad antagonista de *L. rhamnosus* GG revelaron su efectividad frente a los microorganismos patógenos evaluados en pera mínimamente procesada. La población de *S. enterica* aumentó en la pera mínimamente procesada almacenada a 10 y 20 °C, mientras que a 5 °C la población permaneció constante. Sin embargo, *L. monocytogenes* fue capaz de crecer a 5, 10 y 20 °C. Este comportamiento fue demostrado previamente por Abadias *et al.* (2014) en melón y Alegre *et al.* (2011) en manzana. Se sabe además, que las bajas temperaturas retrasan el crecimiento de esos microorganismos (Leverentz *et al.*, 2001), sin embargo, el incremento de CO₂ y el descenso del O₂ dentro de los envases no afectó al crecimiento de los mismos.

La inoculación junto con *L. rhamnosus* GG produjo una reducción significativa de la población de *S. enterica* de, aproximadamente, 2 unidades logarítmicas tanto a 10 como a 20 °C. Por su parte, el crecimiento de *L. monocytogenes* se redujo más de 3 unidades logarítmicas al final del ensayo a todas las temperaturas estudiadas cuando se inoculó conjuntamente con el probiótico. De forma que, en las condiciones ensayadas, *L. rhamnosus* GG tuvo un mayor efecto en el control del crecimiento de *L. monocytogenes* que en el de *S. enterica*. Francis y O'Beirne (1998) observaron que un aumento en los niveles de CO₂ potenció el crecimiento de bacterias ácido lácticas e inhibió el crecimiento de *L. monocytogenes*, probablemente debido a compuestos anti-listerianos producidos por las bacterias ácido lácticas. Diversos estudios han demostrado que metabolitos producidos por probióticos, como puede ser el ácido láctico, están relacionados con la capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos (Van Coillie *et al.*, 2007). Hay también evidencias que los lactobacilos tienen un mayor efecto en el control del crecimiento de bacterias Gram-positivas que de las Gram-negativas (Coman *et al.*, 2014). Alegre *et al.* (2011) también observaron el efecto antagonista de *L. rhamnosus* GG en manzana mínimamente procesada frente a *L. monocytogenes* a 10 °C. Russo *et al.* (2014; 2015) estudiaron el efecto de *Lactobacillus plantarum* B2 y *Lactobacillus fermentum* PBCC11.5 frente a

Discusión

L. monocytogenes en piña y melón mínimamente procesados y lo que observaron fue un control en el crecimiento del patógeno durante el almacenamiento. De forma similar, Siroli *et al.* (2015) mostraron una reducción de la población de *L. monocytogenes* en manzana mínimamente procesada aplicando el probiótico *L. plantarum* CIT3.

La población de *L. rhamnosus* GG experimentó un ligero incremento durante el ensayo, pero prácticamente permaneció a los mismos valores que el inicial a todas las temperaturas ensayadas. Resultados similares obtuvieron Alegre *et al.* (2011) y Rößle *et al.* (2010a) en manzana mínimamente procesada. Russo *et al.* (2014; 2015) demostraron que *L. plantarum* B2 y *L. fermentum* PBCC11.5 mantuvieron su población constante por encima de 10^6 ufc/g en piña mínimamente procesada durante 8 días y en melón mínimamente procesado tras 11 de almacenamiento a temperatura de refrigeración. De Oliveira *et al.* (2014) y Martins *et al.* (2016) observaron como *L. rhamnosus* HN001 permaneció a una concentración superior a 10^8 ufc/g en melón mínimamente procesado almacenado a 6 y 15 °C y en ensalada de fruta almacenada a 8 °C, respectivamente. Por el contrario, Sheehan *et al.* (2007) demostraron que *L. rhamnosus* GG fue capaz de sobrevivir en zumo de naranja y de piña (pH 3,65 y 3,40, respectivamente) durante 12 días a valores de pH muy bajos, aunque cuando el pH del medio fue más ácido, los autores reportaron una pérdida en la viabilidad de la bacteria. Champagne *et al.* (2008) también observaron que el incremento del tiempo de almacenamiento producía una reducción de la viabilidad en el zumo de fruta a temperatura de refrigeración.

Aunque en la bibliografía existente no está muy clara cuál es la concentración mínima de la ingesta de probióticos para que se produzcan efectos beneficiosos en la salud, el rango varía de 10^6 hasta 10^9 ufc/mL (Prado *et al.*, 2008). Por lo general, en la industria alimentaria se aplica la cantidad de probióticos mínima recomendada al tiempo del consumo del alimento de 10^6 ufc/g (Boylston *et al.*, 2004). De esta manera, sería necesario ingerir al día la cantidad suficiente de alimento para tener una ingesta total de 10^8 - 10^{10} ufc/día para que los probióticos ejerzan un efecto positivo para la salud (Champagne *et al.*, 2011; Karimi *et al.*, 2011). En nuestro caso, la población se mantuvo a 10^7 ufc/g durante todo el ensayo, por lo que la pera podría ser un producto utilizado como aporte de probióticos.

El hecho de que *L. rhamnosus* GG fuera más efectivo frente a *L. monocytogenes* y la cepa *P. graminis* CPA-7 fuera efectiva frente a *S. enterica* hizo que se planteara el

estudio en el que se combinaron los 2 microorganismos antagonistas *P. graminis* CPA-7 y *L. rhamnosus* GG para intentar lograr un efecto sinérgico, de forma que se mejorara el control biológico de patógenos de transmisión alimentaria en la pera mínimamente procesada. Tras la obtención de los resultados, se observó que no se optimizó el control biológico para ninguno de los patógenos, además de un dato bastante relevante, y es que a 10 °C la reducción en la población de *S. enterica* fue menor cuando se inoculó conjuntamente con ambos antagonistas que cuando se inoculó solamente con *P. graminis* CPA-7. Este hecho podría significar que el probiótico ejerció también efecto antagonista sobre *P. graminis* CPA-7, reduciendo, por tanto, la capacidad antagonista de este.

De este estudio, se concluyó que *L. acidophilus* LA-5 no tiene efecto bioconservante en pera mínimamente procesada, de forma que no sería un buen candidato para emplearse como cultivo de bioconservación, pero por el contrario, *L. rhamnosus* GG ejerce un satisfactorio efecto antagonista sobre *S. enterica* y *L. monocytogenes* y además podría ser una buena opción para hacer de la pera un alimento portador de microorganismos probióticos.

4. Determinación del comportamiento de L. monocytogenes CECT 4032 después de un período de adaptación en pera mínimamente procesada en presencia de L. rhamnosus GG

Para que los microorganismos probióticos puedan desempeñar sus funciones positivas en el hospedador, es indispensable que se mantengan viables en el alimento hasta el momento de su consumo y además tienen que mantener esa viabilidad a través del tracto gastrointestinal, es decir, sobrevivir a los niveles bajos de pH del estómago y a las altas concentraciones de sales biliares con las que se encuentran al llegar al intestino. Esta es una de las razones por las que se han realizado numerosas investigaciones enfocadas al estudio de estas características en el género *Lactobacillus*. En este estudio se trabajó con una única cepa de *L. monocytogenes* (CECT 4032) perteneciente al serovar 4b, ya que es uno de los serovares más virulentos. Además para poder llegar al fin del ensayo de adhesión e invasión con una concentración por encima del límite de detección para su recuento en placa, se inocularon a dosis más elevadas tanto el probiótico (10^{10} ufc/mL) como el patógeno (10^7 ufc/mL), manteniendo la proporción empleada en los otros ensayos (10^8 : 10^5).

Discusión

Además, se utilizó pera mínimamente procesada como vehículo para *L. rhamnosus* GG, y se observó que su población se mantuvo entre 8,6 y 8,7 ufc/g a 10 °C hasta el final del ensayo, al igual que lo ya discutido en el apartado 2 de la presente discusión.

En este estudio, se observó que la viabilidad de *L. rhamnosus* GG se mantuvo por encima de 10⁸ ufc/g en la pera mínimamente procesada, este hecho confirmaría que la pera mínimamente procesada podría ser un alimento apropiado para su uso como aporte de probióticos.

Se ha propuesto el uso de algunas bacterias ácido lácticas en fruta mínimamente procesada y en lechuga para controlar el crecimiento de patógenos de transmisión alimentaria (Trias *et al.*, 2008b). En este estudio, se observó cómo la población de *L. monocytogenes* CECT 4032 inoculada sin el probiótico se incrementó aproximadamente 2 unidades logarítmicas tras 7 días de almacenamiento a 10 °C. Sin embargo, cuando se inoculó conjuntamente con *L. rhamnosus* GG, la población del patógeno disminuyó significativamente al final del tiempo de almacenamiento, por tanto, el probiótico ejerció su capacidad antagonista contra *L. monocytogenes* CECT 4032. Estos resultados confirmarían lo obtenido en estudios anteriores para el cóctel de las 5 cepas.

Se sabe que existe una pérdida de viabilidad entre las especies de *Lactobacillus* a bajos valores de pH, pero, también se sabe que la viabilidad para sobrevivir a pH bajo depende de la cepa bacteriana (Argyri *et al.*, 2013; Tuo *et al.*, 2013) y de la matriz alimentaria utilizada como vehículo (Casarotti *et al.*, 2015; Matias *et al.*, 2016). Aunque el género *Lactobacillus* en general se ve afectado por bajos valores de pH, se ha observado que muestran una alta tolerancia a las sales biliares (Maragkoudakis *et al.*, 2006). En el presente estudio, los resultados obtenidos tras la simulación digestiva revelaron que *L. rhamnosus* GG sobrevivió al todo el proceso de digestión. Se observó que la población de *L. rhamnosus* GG se redujo al final del proceso digestivo, encontrando diferencias significativas entre la población al iniciar y al finalizar la simulación digestiva. Sin embargo, y a pesar de esta reducción, la tasa de supervivencia del probiótico se mantuvo en todo el proceso por encima del 97 %, tanto el día de la inoculación como después de 7 días de almacenamiento de la pera mínimamente procesada a 10 °C. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Monteagudo-Mera *et al.* (2012), quienes también observaron que *L. rhamnosus* GG mantuvo su viabilidad tras 90 min en presencia de una solución que simulaba el ácido del estómago. De forma que, el hecho de haber estado habituándose a una matriz ácida (pera con un pH

de 4,5-5,0) no afectó ni positiva ni negativamente a la viabilidad de *L. rhamnosus* GG tras el proceso digestivo.

Con respecto al comportamiento de *L. monocytogenes* CECT 4032, el día de la inoculación de la fruta no se observaron diferencias significativas al comparar la población del patógeno en el tratamiento Lm con la población en el tratamiento Lm + *L. rhamnosus* GG en cada fase del proceso, sugiriendo estos resultados, por tanto, que el primer día del ensayo la presencia del probiótico no afectó al comportamiento de *L. monocytogenes* CECT 4032 en el tracto gastrointestinal. Al comparar la población del patógeno de ambos tratamientos al iniciar la simulación digestiva y al terminarla, y aunque encontramos diferencias significativas entre las poblaciones iniciales y finales dentro del mismo tratamiento, la tasa de supervivencia de la bacteria se mantuvo alrededor del 96 %, independientemente de si estaba o no en presencia de *L. rhamnosus* GG. De forma que, *L. monocytogenes* CECT 4032 sobrevivió al proceso de digestión, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Melo *et al.* (2013a) y Colás-Medá *et al.* (2017a). Además, Werbrouck *et al.* (2008) mostraron una reducción en la capacidad de supervivencia en diferentes cepas de *L. monocytogenes* del serotipo 4b cuando estas no habían estado expuestas a valores de pH subletales (pH 5,5), siendo más tolerantes a valores de pH más bajos (3,5) aquellas que habían sufrido un período de adaptación a pH 5,5. En los estudios llevados a cabo por Peterson *et al.* (2007) en carne de pavo, Barmpalia-Davis *et al.* (2009) en salchichas de ternera y Melo *et al.* (2013b) utilizando matrices simulando queso, observaron una alta tasa de supervivencia de *L. monocytogenes* a la simulación digestiva. Por el contrario, Peterson *et al.* (2007), Barbosa *et al.* (2012) y Cunha *et al.* (2016) mostraron en sus estudios, los cuales se llevaron a cabo en medio de cultivo líquido, que *L. monocytogenes* no sobrevivió al proceso de simulación digestiva. Esto podría significar que la matriz alimentaria aporta la protección necesaria al patógeno para sobrevivir a condiciones adversas, como podría ser una adaptación a pH bajo y, así, resistir después al proceso de digestión.

Tras 7 días de almacenamiento de la pera mínimamente procesada, la población de *L. monocytogenes* CECT 4032 inoculada conjuntamente con el probiótico con la que se comenzó el proceso digestivo (4,7 log ufc/g) fue menor que la población del patógeno inoculado solo (8,4 log ufc/g) debido al efecto antagonista de *L. rhamnosus* GG durante el almacenamiento de la fruta. Además, durante el proceso de simulación digestiva, la tasa de supervivencia de *L. monocytogenes* CECT 4032 fue menor en presencia del probiótico (una reducción de 1,9 unidades logarítmicas). Estos resultados podrían sugerir que la presencia de ácido láctico y

Discusión

otras sustancias antimicrobianas producidas por *L. rhamnosus* GG durante el período de almacenamiento no solo afectaron a la supervivencia del patógeno en la matriz alimentaria, sino que también influyeron en su viabilidad durante el proceso de digestión. Previamente, Samara y Koutsoumanis (2009) observaron que la exposición de lechuga inoculada con *L. monocytogenes* a tratamientos con ácido láctico, debilitaron a *L. monocytogenes* frente a las condiciones simuladas del ácido del estómago.

Otra característica de los probióticos es la adhesión al epitelio intestinal. En este estudio, se observó una alta capacidad de adhesión de *L. rhamnosus* GG a las células Caco-2 (aproximadamente 80 %). El índice de adhesión observado fue comparable con el que obtuvieron Jacobsen *et al.* (1999) y Elo *et al.* (1991). Tuomola y Salminen (1998) demostraron que *L. rhamnosus* GG fue una de las 4 cepas más adhesivas que analizaron en su estudio, no existiendo diferencias significativas de adherencia entre *L. rhamnosus* GG y una cepa control positiva (*E. coli* bovina enterotoxigénica). El índice de adhesión de *L. rhamnosus* GG tampoco se vio afectado por el hecho de estar en una matriz ácida durante 7 días a 10 °C.

La patogénesis de *L. monocytogenes* se debe a su capacidad de adherirse a las células del epitelio intestinal. Se sabe que los perfiles de adhesión e invasión dependen de la cepa de *L. monocytogenes* (Jaradat y Bhunia, 2003). Además, algunas bacterias probióticas tienen la capacidad para inhibir la adhesión de los patógenos al epitelio intestinal por inmunomodulación, antagonismo directo o por competición exclusiva (Corr *et al.*, 2009). Thirabunyanon y Thongwittaya (2012) mostraron que al adherirse los probióticos al epitelio intestinal bloquean la adhesión, y por tanto, la invasión de los patógenos en las células epiteliales del intestino, a esto es a lo que se le llama exclusión competitiva. Gueimonde *et al.* (2007) y Sriuathong *et al.* (2014) sugirieron que la inhibición de la adhesión se debe a metabolitos secretados por probióticos, los cuales compiten con los mismos receptores en el intestino que las moléculas liberadas por los propios patógenos. Lim y Im (2012) demostraron que los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de probióticos y que estaban libres de células bacterianas podían inhibir la adhesión de *L. monocytogenes* a las células intestinales. En el presente estudio, el día de la inoculación, no se observaron diferencias significativas entre la adhesión de *L. monocytogenes* CECT 4032 inoculada sola o con *L. rhamnosus* GG. Además, se observó un índice de invasión de *L. monocytogenes* menor cuando el patógeno fue inoculado conjuntamente con *L. rhamnosus* GG, independientemente del tiempo de muestreo, observándose diferencias significativas entre el patógeno inoculado

solo o conjuntamente con *L. rhamnosus* GG. Por el contrario, tras 7 días de almacenamiento, la capacidad de adhesión de *L. monocytogenes* CECT 4032 inoculada sola en la pera mínimamente procesada fue mayor (79,2 %) que en el día de la inoculación (69,5 %). Sin embargo, *L. rhamnosus* GG afectó a la adhesión del patógeno, la cual se redujo significativamente hasta un 36,7 %. Esto podría estar relacionado con la producción de metabolitos del probiótico en la pera mínimamente procesada durante el almacenamiento, lo que podría modificar la posterior adhesión del patógeno a las células intestinales. También podría deberse a la exclusión competitiva, ya que después de 7 días de almacenamiento la proporción *L. monocytogenes*:*L. rhamnosus* GG fue, aproximadamente, 1:1000000, en lugar de 1:300 como ocurrió el día de la inoculación.

La capacidad de invasión de *L. monocytogenes* CECT 4032 se redujo también de forma significativa de 46,9 % a 12,8 % en presencia de *L. rhamnosus* GG tras 7 días de almacenamiento, sin embargo, este valor fue mayor que el día de la inoculación (6,2 %). Estos resultados concuerdan con Corr *et al.* (2007), quienes demostraron que algunas cepas de *Lactobacillus* inhibieron la adhesión *L. monocytogenes* en las células intestinales debido a la secreción de sustancias de carácter proteico y no debido a la interacción física entre *Lactobacilli* y el patógeno. Estos autores sugirieron que podría ser debido al hecho de que estas moléculas podrían potenciar la secreción de mucina. Bo Andersen *et al.* (2007) observaron que la capacidad invasiva de *L. monocytogenes* Scott A, cultivada bajo restricción de O₂ (en tubos de ensayo con el aire del espacio de cabeza intercambiado por nitrógeno y sellados), incrementó. Sin embargo, Colás-Medà *et al.* (2017b) demostraron una disminución de la capacidad de adhesión de una cepa de *L. monocytogenes* serovar 1/2a, inoculada en pera mínimamente procesada y almacenada durante 7 días en aire. En este estudio, la concentración de O₂ dentro de los envases de fruta al final del almacenamiento fue de 0,0 %, por lo que, además, estos resultados sugirieron que la ausencia de O₂ dentro de las barquetas podría potenciar el potencial patogénico de *L. monocytogenes*. Sin embargo, se debería realizar estudios para confirmar tal hipótesis. Finalmente, Carey *et al.* (2008) observaron que *L. rhamnosus* GG fue capaz de reducir la expresión de genes que codifican para la toxina Shiga en *E. coli* O157:H7, la cual es fundamental para que se produzca la invasión del patógeno, este hecho probablemente sea debido al ácido láctico producido por *L. rhamnosus* GG y la creación de un ambiente ácido. De esta manera, se podría sugerir que *L. rhamnosus* GG podría haber modificado la expresión de genes relacionados con la virulencia de *L. monocytogenes* CECT 4032, sin embargo, se necesitarían estudios más exhaustivos para probarlo.

5. Evaluación de la capacidad antagonista de *P. graminis* CPA-7 y su efecto en la calidad de la pera mínimamente procesada tratada o no con CaCl_2 en poscosecha

Este estudio se centró en la evaluación de la actividad antagonista de *P. graminis* CPA-7 frente a patógenos de transmisión alimentaria y en cómo podría afectar a la calidad físico-química de la pera mínimamente procesada tratada o no con CaCl_2 en la poscosecha, principalmente, en el perfil de compuestos volátiles. Este ensayo se realizó en condiciones que simulan la aplicación comercial a 5 °C, es decir, con la solución antioxidante y el film que mostraron los mejores resultados en estudios anteriores.

Después de la cosecha de la fruta, el almacenamiento en frío y las atmósferas controladas son esenciales para retrasar el proceso de maduración. Además, el tratamiento poscosecha con CaCl_2 antes del almacenamiento contribuye a extender la vida comercial tanto en la fruta entera como en la mínimamente procesada (Ortiz *et al.*, 2009; Trentham *et al.*, 2008). Para este ensayo, las peras se cosecharon, se trataron con 1 % CaCl_2 y se conservaron en atmósfera controlada (2 % O_2 y 1 % CO_2) a 0 °C. Tras el período de almacenamiento, las peras se procesaron y se llevó a cabo el ensayo. Se observó que *P. graminis* CPA-7 creció en pera cortada tras 9 días de conservación a 5 °C. Sin embargo, su crecimiento fue mayor en la pera mínimamente procesada que había sido tratada con CaCl_2 después de la cosecha. Esto se podría explicar porque en cierta manera, los microorganismos necesitan calcio para su desarrollo, supervivencia y procesos fisiológicos (Corbin *et al.*, 2008). Tiwari *et al.* (1992) observaron que un aumento en el calcio extracelular provocó un incremento en la tasa de crecimiento de *Rhizobium meliloti*. Por otra parte, Onoda *et al.* (2000) demostraron que *E. coli* detuvo su crecimiento y las células adquirieron una forma anormal, incluso, las células podían llegar a lisarse y morir en ausencia de calcio. Sin embargo, se ha demostrado que los requerimientos de calcio por parte de la bacteria dependen de las condiciones de crecimiento (Youatt, 1993).

En concordancia a estudios previos de esta tesis y con Alegre *et al.* (2013a), no se observó efecto antagonista de *P. graminis* CPA-7 frente a *S. enterica* en atmósfera modificada pasiva a 5 °C, al igual que tampoco se registró crecimiento del patógeno a esta temperatura. Sin embargo, sí que se observó capacidad antagonista de *P. graminis* CPA-7 frente a *L. monocytogenes* después de 9 días de almacenamiento a 5 °C, con aproximadamente 1 unidad logarítmica de reducción. Alegre *et al.* (2013a) también demostraron efecto antagonista de *P. graminis* CPA-7

frente a *L. monocytogenes* en manzana mínimamente procesada, aunque el efecto fue mayor en aire que bajo atmósfera modificada pasiva. Resultados similares obtuvieron Abadias *et al.* (2014) en melón mínimamente procesado. *P. graminis* CPA-7 es un microorganismo aerobio estricto, como se ha indicado anteriormente, y esta podría haber sido la razón de porqué su actividad antimicrobiana pudo verse mermada por la baja concentración de O₂ dentro de los envases. También podría haberse debido a que la temperatura ensayada fue menor (5 °C).

En cuanto a los parámetros de calidad se observaron algunas diferencias entre las peras tratadas y las no tratadas con CaCl₂ en la poscosecha. Con respecto al contenido en sólidos solubles (CSS), se observaron diferencias significativas entre las peras no tratadas y tratadas con *P. graminis* CPA-7, independientemente del tratamiento poscosecha con CaCl₂, excepto en el día 6 en el caso de las peras tratadas con CaCl₂. Los valores de CSS obtenidos en las muestras tratadas con *P. graminis* CPA-7 fueron, por lo general, menores que en la pera no tratada con *P. graminis* CPA-7. En relación a los valores de acidez titulable (AT), no se observaron diferencias significativas entre las peras sin tratar y las tratadas con *P. graminis* CPA-7 ni al inicio del ensayo ni tras 2 días de almacenamiento, sin embargo, tras 6 y 9 días las peras tratadas con CaCl₂ en la poscosecha sí mostraron diferencias significativas en la AT entre las peras sin *P. graminis* CPA-7 y las que fueron tratadas con él. Estos resultados discrepan de los obtenidos por Alegre *et al.* (2013a) y Abadias *et al.* (2014) que no observaron diferencias significativas en los valores de CSS y de AT entre las peras tratadas con *P. graminis* CPA-7 y las no tratadas ni en manzana ni en melón mínimamente procesados, respectivamente. El hecho de que los valores de CSS en la pera tratada con *P. graminis* CPA-7 estuvieran por debajo de 1 °Brix con respecto de las peras no tratadas con el microorganismo, podría hacer posible que el consumidor perciba las peras tratadas con *P. graminis* CPA-7 como menos dulces que las no tratadas ya que diversos autores han evidenciado que diferencias en °Brix iguales o superiores a 1 °Brix son percibidas por un panelista entrenado medio (Harker *et al.*, 2002). Por otra parte, las diferencias significativas en cuanto a la AT tanto a los 6 como a los 9 días de almacenamiento de la pera, prácticamente serían imperceptibles por el consumidor ya que para que eso ocurra tendría que haber variaciones superiores a 0,08 % (0,8 g ácido málico/L entre el tratamiento control y el tratado con el microorganismo (Harker *et al.*, 2002), las cuales en nuestro caso fueron menores.

Discusión

Los resultados obtenidos han demostrado que el hecho de añadir el cultivo antagonista no afectó a la producción de etanol y acetaldehído. Así, se observó que la concentración de etanol aumentó a lo largo del ensayo hasta valores finales de entre 95-179 ppm, independientemente del tratamiento. Por su parte, el acetaldehído solo se vio aumentado en el tratamiento que contenía *P. graminis* CPA-7 y en el que las peras fueron tratadas con CaCl₂ tras la cosecha. El hecho de que aumentaran ambos metabolitos durante el ensayo en todos los tratamientos podría indicar que la presencia del microorganismo no interviene en las rutas metabólicas causantes de su biosíntesis y que, por tanto, se producen en la fruta independientemente de si esta ha sido o no tratada por el microorganismo.

En general, no se observó un efecto claro del período en la emisión de compuestos volátiles. En la mayoría de compuestos, el período de permanencia a 5 °C no tuvo un efecto claro, ya que este fue debido al tratamiento a que había sido sometida la muestra.

El perfil volátil estuvo constituido por 43 compuestos (25 ésteres, 10 alcoholes, 4 aldehídos, 1 terpeno, 2 cetonas y 1 ácido). Los compuestos volátiles más importantes detectados en este estudio fueron tipo éster. Los ésteres se desarrollan durante la maduración de la pera, alcanzando una concentración máxima en el pico climaterio (López *et al.*, 2001). Los ésteres principales fueron los acetatos de butilo y de hexilo. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Rizzolo *et al.*, (2005) con esta misma variedad conservada en atmósferas bajas en O₂ durante 5 meses. En otras variedades de peras europeas, también se ha encontrado que el acetato de butilo y de hexilo son los principales ésteres emitidos (Rapparini y Predieri, 2002). Se observó también la producción de α -farneseno, otro compuesto común en el perfil de compuestos volátiles de la pera (Rapparini y Predieri, 2002), aunque en casi todos los tiempos de muestreo fue significativamente mayor en aquellas muestras con *P. graminis* CPA-7, lo cual podría indicar que la presencia del microorganismo aumentó la síntesis de este compuesto. Se observó una disminución en la concentración de etanol (volátil) debida al período, excepto en muestras no tratadas ni CaCl₂ ni con *P. graminis* CPA-7 para las cuales la concentración de etanol (volátil) aumentó con el tiempo. Aun así, la concentración de este compuesto fue significativamente menor tras 6 días de almacenamiento de la pera en aquellas muestras tratadas con la bacteria, independientemente de si fueron tratadas o no con CaCl₂ en la poscosecha.

Los principales compuestos volátiles que hicieron posible que las muestras tratadas con *P. graminis* CPA-7 se pudieran diferenciar claramente de las sin tratar

con fueron: acetato de metilo (notas afrutadas, a maduro y florales), acetato de 3-metilbutilo (notas afrutadas con un matiz a plátano), acetato de pentilo (notas afrutadas, plátano, pera y manzana), acetato de (Z)-2-hexenilo (notas a dulce, verde, fresco y afrutado con un fondo de manzana cerosa), butanoato de 2-metilpropilo (notas a dulce, afrutado, piña, manzana y tutti-frutti), hexanoato de butilo (notas a afrutado, piña con un fondo a fruta madura), 3-metil-2-butanol (notas a alcohólico, picante, etéreo, coñac, afrutado, banano y melaza), 1-butanol (notas a afrutado, dulce, plátano, zumo de fruta y tutti-frutti), 2-metil-1-butanol (notas a vino, cebolla, afrutado, alcohólico y whisky), 1-hexanol (notas herbal, graso y afrutado), (E)-2-hexen-1-ol (notas a verde, afrutado, vegetativo, con matices frondosos y herbales), hexanal (matiz afrutado, manzana, cítricos y fresco) y acetona (notas afrutadas, arándano, frambuesa y bayas). De estos compuestos mencionados, hay algunos de ellos que son propios del perfil de volátiles de la pera (acetato de metilo, acetato 3-metilbutilo, 1-butanol, 1-hexanol y hexanal), con lo que su aumento podrían ser positivo en la percepción del consumidor.

Mantener la calidad sensorial de la fruta mínimamente procesada después del procesamiento y a lo largo de la cadena de distribución es un reto importante al que se enfrenta la industria. Su vida útil es muy limitada debido a un rápido oscurecimiento de la pulpa y a la pérdida de sabor (Gorny *et al.*, 2002; Toivonen, 2006; Toivonen y Delaquis, 2006). Hay varios factores que afectan la vida útil de la fruta mínimamente procesada, incluyendo la variedad, el estado de madurez de la fruta durante el procesamiento y la atmósfera y la temperatura de almacenamiento. Estos factores tienen una influencia especialmente importante sobre la firmeza y la supervivencia y crecimiento de diferentes microorganismos peligrosos para la salud humana. Algunos autores han evaluado el efecto de estos factores sobre la calidad comercial, especialmente la firmeza (Roversi y Piazza, 2016) y crecimiento de microorganismos (Colás-Medà *et al.*, 2015) de fruta mínimamente procesada. En general, la combinación de inmersiones de calcio (0,5-4 %), el envasado en atmósferas modificadas o controladas y el almacenamiento a bajas temperaturas (< 5 °C) es ventajosa para incrementar la vida útil de frutas y hortalizas mínimamente procesadas. La firmeza del mesocarpio de las frutas mínimamente procesadas puede ser preservada por aplicación de tratamientos con sales de calcio (Pérez *et al.*, 2003). Inmersiones en soluciones de 0,5 a 1 % de CaCl₂ resultan ser muy eficaces en el mantenimiento de la firmeza en productos mínimamente procesados (Ponting *et al.*, 1971; Ponting *et al.*, 1972). Sin embargo, el CaCl₂ puede conferir sabor amargo o disminución del sabor característico en algunos productos (Luna-Guzmán y Barrett, 2000).

Discusión

Nuestros resultados respecto a la aplicación de CaCl₂ no están en concordancia con lo expuesto por Luna-Guzmán y Barrett (2000), ya que solo se observa una disminución de acetato de butilo y esta no es consistente en todos los períodos evaluados. Sin embargo, sí estarían en concordancia con los obtenidos por Ortiz *et al.* (2009), los cuales indican que las aplicaciones de calcio, en manzanas de la variedad “Golden Reinders” permiten mejorar la calidad aromática preservando al mismo tiempo niveles adecuados de los principales parámetros de calidad estándar (firmeza, contenido en sólidos solubles...)

6. Evaluación de la capacidad antagonista de *L. rhamnosus* GG y su efecto en la calidad de la pera mínimamente procesada tratada o no con CaCl₂ en poscosecha

Según nuestro conocimiento, existen pocos estudios que analicen la influencia de los probióticos en la calidad de la pera y, más específicamente, en el sabor. De forma similar al estudio con *P. graminis* CPA-7, este estudio se centró en la evaluación de la actividad antagonista de *L. rhamnosus* GG frente a *S. enterica* y *L. monocytogenes* en pera mínimamente procesada y cómo podría afectar a la calidad físico-química de la pera mínimamente procesada tratada o no con CaCl₂ en la poscosecha, y en concreto, en el perfil de compuestos volátiles, muy relacionados con las propiedades organolépticas y, más concretamente, con el sabor característico de especie y/o variedad.

Se confirmó que *L. rhamnosus* GG es capaz de controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* y que además sobrevivió a 5 °C en atmósfera modificada pasiva. No se observaron diferencias significativas en el CSS entre las peras tratadas con *L. rhamnosus* GG y las no tratadas. Resultados similares obtuvieron Alegre *et al.* (2011) y Rößle *et al.* (2010a) en manzana mínimamente procesada y de Oliveira *et al.* (2014) en melón. Tampoco se observaron diferencias significativas en los valores de AT entre los dos tratamientos a lo largo del tiempo de almacenamiento, hecho que concuerda con lo observado por Rößle *et al.* (2010a) en manzana. Sin embargo, Alegre *et al.* (2011) encontraron diferencias significativas en la AT en manzana tras 7 días de almacenamiento a 10 °C, pero no a 5 °C. La aplicación de *L. rhamnosus* GG, por tanto, no afectó al CSS y a la AT en la pera mínimamente procesada después de 9 días de almacenamiento a 5 °C. Resultados similares obtuvieron Russo *et al.* (2015) y Siroli *et al.* (2015) quienes

demonstraron que una alta dosis de probiótico no afectó a la mayoría de características sensoriales tras 11 días de almacenamiento en melón y 9 días en manzana mínimamente procesados, respectivamente. Sin embargo, en el estudio llevado a cabo con *P. graminis* CPA-7, sí que se observaron diferencias significativas en los valores de CCS y AT.

Se sabe que en presencia de bajas concentraciones de O₂ y altas de CO₂ *L. rhamnosus* GG puede fermentar azúcares como la glucosa, fructosa, lactosa y sacarosa produciendo metabolitos entre los que se incluyen el etanol y el acetaldehído (Hedberg *et al.*, 2008). En pera “Conference”, la fructosa es el azúcar mayoritario seguido de la glucosa y la sacarosa (Soliva-Fortuny y Martín-Belloso, 2003). Además, bajas concentraciones de O₂ en los envases podría activar la fermentación alcohólica en los tejidos de la fruta y, como consecuencia, la liberación de etanol y acetaldehído. El acetaldehído es transformado en etanol mediante la enzima alcohol deshidrogenasa, por lo que el producto final de la fermentación alcohólica es el etanol (Ke *et al.*, 1994). En este estudio, se observó que la concentración de ambos metabolitos aumentó a lo largo del ensayo (valores finales de etanol de 628-740 ppm y de acetaldehído de 18-21 ppm), aunque no se encontraron diferencias significativas entre las peras tratadas y las no tratadas con el probiótico. Esto podría indicar que el etanol y el acetaldehído producidos fueron productos de fermentación de las rutas metabólicas que se producen en los tejidos de la fruta y que no provenían de las reacciones de fermentación producidas por el probiótico. En el caso del estudio llevado a cabo con *P. graminis* CPA-7, los valores de etanol y acetaldehído también aumentaron alcanzando valores mucho menores (95-119 ppm de etanol y 5-8 ppm de acetaldehído). Este hecho podría haberse debido a que las concentraciones de O₂ dentro de los envases fueron más altas ya que se utilizó un film con una mayor permeabilidad que el usado en este estudio.

En pera, se han identificado más de 100 compuestos volátiles en pera, incluyendo aldehídos, alcoholes, ésteres y cetonas (Qin *et al.*, 2012). Entre ellos se han detectado algunos volátiles tipo ésteres, por ejemplo, acetato de butilo, acetato de (Z)-3-hexenilo, acetato de pentilo, acetato de isobutilo o acetato de 2-metilpropilo, acetato de hexilo, propionato de butilo, acetato de (E)-2-hexenilo como los principales volátiles característicos del sabor de la pera (Aprea *et al.*, 2012). El octanoato de etilo y el (E)-2-octenoato de etilo contribuyen a los olores dulces o afrutados en la pera “Pasacrana” (Rizzolo *et al.*, 1991). El acetato de 2-metilpropilo fue el principal volátil producido por la pera “Conference” tras 5 meses de almacenamiento en atmósfera controlada produciendo notas de olor

Discusión

“penetrantes” y el butanoato de etilo se consideró responsable del aroma a “pera madura” (Rizzolo *et al.*, 2005). En nuestro estudio, de los 46 compuestos volátiles identificados y utilizados en el modelo de regresión de mínimos cuadrados parciales, se detectaron 12 compuestos que fueron clave para la separación de las muestras en dos grupos (control y muestras tratadas con *L. rhamnosus* GG). Estos compuestos volátiles fueron: acetato de metilo, acetato de propilo, acetato de hexilo, acetato de (Z)-2-hexenilo, 2-metilbutanoato de etilo, 2-metilbutanoato de 2-metilbutilo, 3-metilbutanoato de pentilo, etanol, 3-metil-2-butanol, 1-hexanol, benzil alcohol y benzaldehído. La concentración más alta de estos 12 volátiles se detectó en las muestras tratadas con *L. rhamnosus* GG. Desde un punto de vista sensorial, el efecto positivo o negativo de un compuesto volátil se debe principalmente a su abundancia cuantitativa, a sus umbrales olfatorios y, por supuesto, a su descriptor de olor (Schieberle *et al.* 1990; Wyllie *et al.* 1995). Los descriptores de olor de estos 12 compuestos volátiles son: pera-frambuesa (acetato de propilo), afrutado (acetato de hexilo y acetato de metilo), potente y verde-fresco, dulce y afrutado (acetato de (Z)-hexenilo), manzana madura (2-metilbutanoato de etilo), afrutado (2-metilbutanoato de 2-metilbutilo), manzana fresca afrutado (3-metilbutanoato de pentilo), herbal, graso y aroma frutal (1-hexanol), semillas de girasol, herbal y mohoso (benzil alcohol) y almendra amarga y aroma fresco de ciruela (benzaldehído). Considerando estos descriptores, se puede destacar que un aumento de estos compuestos volátiles en las muestras tratadas con *L. rhamnosus* GG podrían tener efecto positivo en el sabor percibido por los consumidores. Resultados similares obtuvieron Rößle *et al.* (2010b), quienes detectaron altas concentraciones de acetato de hexilo en las manzanas tratadas con *L. rhamnosus* GG. Pogacic *et al.* (2016) observaron que *L. rhamnosus* GG también produjo ésteres en queso. Con respecto a la alta emisión de distintos ésteres tipo acetato detectada en las muestras tratadas con el probiótico, no fue posible determinar si se produjo debido a la interacción del probiótico con la fruta, o bien por su propia producción de estos compuestos. Diversos estudios han detectado la producción de compuestos volátiles que proporcionan aroma y sabor, incluyendo ésteres, aldehídos y alcoholes, por bacterias, levaduras y mohos (Amaral *et al.* 2010; Pandey *et al.* 2000).

Como visión general de los estudios llevados a cabo se podría concluir que la pera mínimamente procesada es un matriz apta para el crecimiento de microorganismos patógenos de transmisión alimentaria. En esta tesis también se ha observado que el uso de microorganismos antagonistas como *P. graminis* CPA-

7 y *L. rhamnosus* GG pueden ser efectivos para controlar concentraciones elevadas de patógenos inoculados artificialmente a 10^3 - 10^4 ufc/g. Sin embargo, el hecho de añadir estos bioconservantes o antagonistas no implica la eliminación del proceso de desinfección, ya que el efecto se produce a partir de los 2 o 3 días de almacenamiento y no eliminan totalmente a los patógenos estudiados, ni el uso de buenas prácticas de higiene durante el proceso. Además, la efectividad se podría ver reducida por el uso de atmósferas modificadas o del tratamiento antioxidante. *L. rhamnosus* GG, además de ejercer un efecto de control biológico sobre los *S. enterica* y *L. monocytogenes*, se observó que también modificó el potencial patogénico de *L. monocytogenes* CECT 4032 disminuyendo su capacidad de adhesión e invasión en las células Caco-2. El uso de ambos bioconservantes no afectó significativamente a parámetros de calidad (CSS y AT) y en el caso de los volátiles, incluso se produjeron volátiles que podrían tener un efecto positivo a nivel sensorial.

L. rhamnosus GG es un microorganismo que está incluido en la lista QPS (Qualified Presumption of Safety) elaborada por la EFSA, por lo que ya podría aplicarse en la pera mínimamente procesada. Sin embargo, para poder aplicar *P. graminis* CPA-7 sería imprescindible solicitar la inclusión en dicha lista. Así, *L. rhamnosus* GG tiene más fácil la implementación industrial que *P. graminis* CPA-7. Por otra parte, el hecho de que *L. rhamnosus* GG sea un probiótico, probablemente tendría una mejor aceptación por los consumidores.

CONCLUSIONES

Del estudio de la evaluación de la efectividad de *Pseudomonas graminis* CPA-7 sobre *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes*, se concluyó:

1. *P. graminis* CPA-7 controló el crecimiento de *S. enterica* y *L. monocytogenes* en pera mínimamente procesada envasada en aire (21,0 % O₂ y 0,0 % de CO₂). Este reveló una reducción de 1,6 unidades logarítmicas en la población *S. enterica* y de 2,4 unidades logarítmicas en la de *L. monocytogenes* tras 10 días de conservación a 5 °C. A 10 °C también se observó una reducción en las poblaciones de *S. enterica* y *L. monocytogenes* de 2,2 y 4,1 unidades logarítmicas, respectivamente tras 10 días de almacenamiento. A 20 °C, la población de *S. enterica* se redujo 2,5 unidades logarítmicas en presencia de *P. graminis* CPA-7 y la de *L. monocytogenes* experimentó una reducción de 2,6 unidades logarítmicas. La población de *P. graminis* CPA-7 aumentó aproximadamente 3 unidades logarítmicas al final del almacenamiento independientemente de la temperatura evaluada.

2. La capacidad antagonista de *P. graminis* CPA-7 se vio afectada negativamente por el envasado en atmósfera modificada pasiva, observándose únicamente el efecto antagonista sobre la población de *L. monocytogenes* tras 10 días de almacenamiento de la pera a 5 °C, y a 20 °C sobre los dos microorganismos, con reducciones de menos de 0,5 unidades logarítmicas. El hecho de que dentro de los envases se alcanzaran valores de concentración de O₂ del 0,0 % podría ser el hecho causante de la disminución de la actividad antagonista de *P. graminis* CPA-7. En este caso, *P. graminis* CPA-7 solamente creció 2 unidades logarítmicas independientemente de la temperatura evaluada.

3. El tratamiento antioxidante puede afectar la viabilidad de *P. graminis* CPA-7, sin embargo, la solución antioxidante compuesta por ácido ascórbico 2 %, citrato de sodio 2 % y CaCl₂ 1 % no afectó al crecimiento de ninguno de los microorganismos estudiados (*S. enterica*, *L. monocytogenes* y *P. graminis* CPA-7).

4. Tras estudiar la efectividad de *P. graminis* CPA-7 en distintas atmósferas modificadas pasivas, se observó que *P. graminis* CPA-7 controló el crecimiento de ambos patógenos en todas las atmósferas evaluadas excepto en la que los envases alcanzaban concentraciones de O₂ de 0,0 %. La calidad de la pera se vio afectada dependiendo de la atmósfera analizada. Se seleccionó el film 2 (compuesto por una película de poliéster antivaho (OLAF) de 14 µm de grosor y por una película de polipropileno mono-orientado (OPP) de 20 µm de grosor, con una permeabilidad al O₂ de 180 cm³/(m²día¹atm¹) a 23 °C) para el envasado de la pera mínimamente considerando el efecto antagonista de *P. graminis* CPA-7 y la

Conclusiones

calidad de la fruta. En este film, tras 5 días de almacenamiento, se alcanzaron concentraciones de CO₂ de entre 14,0 y 14,6 % y de O₂ de 4,8 a 6,2 %.

En el estudio de la ampliación del espectro de acción de *P. graminis* CPA-7, se concluyó:

5. La efectividad de *P. graminis* CPA-7 en el control de *S. enterica* y *L. monocytogenes* se vio influida por la fruta estudiada. Demostró ser efectivo en mandarina, manzana "Fuji", manzana "Pink Lady", sandía, melón "Galia" y nectarina. Los mejores resultados se obtuvieron en aquellas frutas en las que el ácido mayoritario es el ácido málico (manzana y nectarina), o bien, en aquellas que aunque siendo el ácido mayoritario el cítrico, su pH es más alto (melón y sandía).

6. En medio líquido con pH modificado utilizando ácido málico o cítrico, *P. graminis* CPA-7 presentó crecimiento a partir de pH 5,0, siendo este más rápido en el medio líquido acidificado con ácido málico que con ácido cítrico. En frutas, *P. graminis* CPA-7 fue capaz de crecer a pH más bajos que en medio líquido.

En el estudio del uso de microorganismos probióticos como agentes de biocontrol en pera mínimamente procesada, se concluyó:

7. *Lactobacillus acidophilus* LA-5 no controló el crecimiento de *S. enterica* ni de *L. monocytogenes* en las condiciones ensayadas a ninguna de las temperaturas testadas.

8. Se observó el efecto antagonista de *L. rhamnosus* GG sobre *S. enterica* y *L. monocytogenes* en pera mínimamente procesada en las condiciones ensayadas. A 5 °C la población de *L. monocytogenes* disminuyó aproximadamente 3 unidades logarítmicas tras 10 días de conservación de la pera, sin embargo, no se observó el efecto sobre la población de *S. enterica*. A 10 y 20 °C, tanto *S. enterica* como *L. monocytogenes* experimentaron una reducción de aproximadamente 2 y 3 unidades, respectivamente, al final del almacenamiento.

9. La población de ambos microorganismos probióticos se mantuvo dentro del límite mínimo considerado (10^6 ufc/g o mL) para que lleguen al intestino del consumidor y cumplan su función como probióticos.

10. La combinación de *P. graminis* CPA-7 junto con *L. rhamnosus* GG no mejoró el control biológico de los patógenos de transmisión alimentaria en las condiciones ensayadas.

Del estudio del comportamiento de *L. monocytogenes* CECT 4032 serovar 4b después de un período de habituación de 7 días en pera mínimamente procesada a 10 °C y en presencia de *L. rham.* GG, se determinó:

11. En las condiciones ensayadas, *L. rhamnosus* GG controló el crecimiento del patógeno con una reducción de 3,7 unidades logarítmicas tras 7 días.

12. La presencia del probiótico provocó una reducción de la población de *L. monocytogenes* CECT 4032 de 1,9 unidades logarítmicas con respecto a la población inicial al final del proceso de simulación digestiva tras 7 días de almacenamiento de la pera mínimamente procesada a 10 °C.

13. *L. rhamnosus* GG modificó el potencial patogénico de *L. monocytogenes* CECT 4032 reduciendo en un 42,3 % el índice de adhesión tras 7 días de conservación de la pera, y el índice de invasión en un 23,2 % el día del inicio del ensayo y en un 34,1 % tras 7 de habituación en pera mínimamente procesada.

14. La pera mínimamente procesada es una matriz adecuada para albergar a *L. rhamnosus* GG, ya que su población se mantuvo constante durante el tiempo de conservación del producto. La tasa de supervivencia del probiótico tras el proceso de simulación digestiva fue mayor del 96 %, independientemente de la presencia del patógeno y del día de muestreo. La capacidad de adhesión de *L. rhamnosus* GG fue de aproximadamente un 82 % el día del inicio del ensayo y de un 80 % tras 7 días de almacenamiento a 10 °C, sin observarse diferencias significativas, por lo que el período de habituación en pera mínimamente procesada no afectó a la supervivencia del probiótico.

Conclusiones

De la evaluación de la capacidad antagonista de los agentes de biocontrol y su efecto en la calidad de la pera mínimamente procesada tratada o no con CaCl₂ en poscosecha, se concluyó:

15. El CaCl₂ no tuvo efecto en la población de *L. rhamnosus* GG, sin embargo, *P. graminis* CPA-7 experimentó mayor crecimiento en las peras que fueron tratadas con CaCl₂ en la poscosecha. *L. rhamnosus* GG controló el crecimiento de *L. monocytogenes*, independientemente del tratamiento con CaCl₂, a partir de 6 días de almacenamiento de la pera mínimamente procesada con una reducción final de 1,8 unidades logarítmicas, al igual que *P. graminis* CPA-7 el cual controló a *L. monocytogenes* a los 9 días de conservación con unos valores de reducción de entre 0,8 y 0,9 unidades logarítmicas en las peras no tratadas y tratadas con CaCl₂, respectivamente.

16. La calidad de la pera mínimamente procesada no se vio afectada por el tratamiento con CaCl₂ en la poscosecha, ni por la presencia de *L. rhamnosus* GG. Sin embargo, las peras inoculadas con *P. graminis* CPA-7 mostraron valores más bajos en el contenido en sólidos solubles que las no tratadas por la bacteria.

17. El CaCl₂ no tuvo efecto claro en el perfil de compuestos volátiles, sin embargo, aquellas peras tratadas con ambos microorganismos mostraron un perfil de compuestos volátiles que podrían proporcionar buen sabor al producto mínimamente procesado.

18. *L. rhamnosus* GG podría ser utilizado como agente para controlar el crecimiento de los microorganismos patógenos de transmisión alimentaria *S. enterica* y *L. monocytogenes* en pera mínimamente procesada para obtener así un producto más seguro desde el punto de vista microbiológico, y al mismo tiempo, esta pera podría ser un alimento funcional actuando como un vehículo de probióticos.

PERSPECTIVAS DE FUTURO

1. Profundizar en los estudios del efecto de la concentración de O₂ y CO₂ en la efectividad de *P. graminis* CPA-7 utilizando atmósferas modificadas activas.
2. Mejorar la calidad visual de las peras tratadas con *P. graminis* CPA-7, para alargar su vida útil, por ejemplo, mediante cambios en el tratamiento antioxidante o aplicación de recubrimientos.
3. Mejorar la efectividad de *P. graminis* CPA-7 mediante mecanismos de adaptación a pH ácido que mejoren el crecimiento en condiciones de bajo pH, para así poder aplicarlo en frutas en las que no ha sido efectivo.
4. Determinar la calidad organoléptica de la fruta tratada con *L. ramosus* GG y *P. graminis* CPA-7 mediante un panel de cata.
5. Llevar a cabo análisis moleculares a nivel genómico de *L. monocytogenes* CECT 4032 serovar 4b para conocer porqué se modifica su comportamiento frente al tracto gastrointestinal y la capacidad patogénica (adhesión e invasión) en presencia del microorganismo probiótico.

REFERENCIAS

-A-

- Abadias, M., Altisent, R., Usall, J., Torres, R., Oliveira, M., Viñas, I., 2014. Biopreservation of fresh-cut melon using the strain *Pseudomonas graminis* CPA-7. *Postharvest Biology and Technology* 96, 69-77.
- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., Viñas, I., 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology* 123, 121-129.
- Adams, M.R., 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology* 68, 171-178.
- Adams, M.R., Moss, M.O., 2008. Bacterial agents of foodborne illness. En: Food microbiology, 3ª edn. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 182-269.
- Alandes, L., Hernando, I., Quiles, A., Pérez-Munuera, I., Lluch, M.A., 2006. Cell wall stability of fresh-cut Fuji apples treated with calcium lactate. *Journal of Food Science* 71, S615-S620.
- Alegre, I., Abadias, M., Anguera, M., Oliveira, M., Viñas, I., 2010. Factors affecting growth of foodborne pathogens on minimally processed apples. *Food Microbiology* 27, 70-76.
- Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M., Abadias, M., 2011. Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Microbiology* 28, 59-66.
- Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M., Altisent, R., Abadias, M., 2013a. Antagonistic effect of *Pseudomonas graminis* CPA-7 against foodborne pathogens in fresh-cut apples under simulated commercial conditions. *Food Microbiology* 33, 139-148.
- Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Figge, M.J., Abadias, M., 2013b. Control of foodborne pathogens on fresh-cut fruit by a novel strain of *Pseudomonas graminis*. *Food Microbiology* 34, 390-399.
- Altisent, R., Plaza, L., Alegre, I., Viñas, I., Abadias, M., 2014. Comparative study of improved vs. traditional apple cultivars and their aptitude to be minimally processed as 'ready to eat' apple wedges. *Lwt-Food Science and Technology* 58, 541-549.

Referencias

- Amaral, P.F.F, Rocha-Leão, M.H.M., Coelho, M.A.Z., 2010. Bioconversion of flavors. En: Hui, Y.H. (Ed.), Handbook of fruit and vegetable flavors. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 115-128.
- Amiot, M.J., Tacchini, M., Aubert, S.Y., Oleszek, W., 1995. Influence of cultivar, maturity stage, and storage-conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 1132-1137.
- Annuk, H., Shchepetova, J., Kullisaar, T., Songisepp, E., Zilmer, M., Mikelsaar, M., 2003. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. *Journal of Applied Microbiology* 94, 403-412.
- Aprèa, E., Corollaro, M.L., Betta, E., Endrizzi, I., Demattè, M.L., Biasioli, F., Gasperi, F., 2012. Sensory and instrumental profiling of 18 apple cultivars to investigate the relation between perceived quality and odour and flavour. *Food Research International* 49, 677-686.
- Argyri, A.A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.-A.G., Tsakalidou, E., Nychas, G.-J.E., Panagou, E.Z., Tassou, C.C., 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiology* 33, 282-291.
- Arias, E., Gonzalez, J., Lopez-Buesa, P., Oria, R., 2008. Optimization of processing of fresh-cut pear. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 1755-1763.
- Arques, J.L., Rodriguez, E., Langa, S., Landete, J.M., Medina, M., 2015. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens. *BioMed Research International* 2015,1-9.
- Asahara, T., Shimizu, K., Nomoto, K., Hamabata, T., Ozawa, A., Takeda, Y., 2004. Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity* 72, 2240-2247.
- Axelsson, L.T., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J., Lindgren, S.E., 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2, 131-136.
- Ayala-Zavala, J.F., Del-Toro-Sanchez, L., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G.A., 2008. High relative humidity in-package of fresh-cut fruits and vegetables: advantage or disadvantage considering microbiological problems and antimicrobial delivering systems? *Journal of Food Science* 73, R41-R47.

-B-

- Bai, J.H., Wu, P., Manthey, J., Goodner, K., Baldwin, E., 2009. Effect of harvest maturity on quality of fresh-cut pear salad. *Postharvest Biology and Technology* 51, 250-256.
- Baldwin, E.A., Burns, J.K., Kazokas, W., Brecht, J.K., Hagenmaier, R.D., Bender, R.J., Pesis, E., 1999a. Effect of two edible coatings with different permeability characteristics on mango (*Mangifera indica* L.) ripening during storage. *Postharvest Biology and Technology* 17, 215-226.
- Baldwin, E.A., Malundo, T.M.M., Bender, R., Brecht, J.K., 1999b. Interactive effects of harvestmaturity, controlled atmosphere and surface coatings on mango (*Mangifera indica* L.) flavor quality. *HortScience* 34, 514.
- Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O., Moshonas, M.G., 1991. Quantitative analysis of flavorparameters in six Florida tomato varieties (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39, 1135-1140.
- Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O., Scott, J.W., 1992. Levels of flavor volatiles in a normalcultivar, ripening inhibitor and their hybrid. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 104, 86-89.
- Baldwin, E.A., Plotto, A., Goodner, K., 2007. Shelf-life versus flavour-life for fruits and vegetables: how to evaluate this complex trait. *Stewart Postharvest Reviews* 3, 1-10.
- Bansal, V., Siddiqui, M.W., Rahman, M.S., 2015. Minimally processed foods: Overview. En: Siddiqui, M.W., Rahman, M.S. (Eds.), *Minimally processed foods: technologies for safety, quality, and convenience*. Springer International Publishing Switzerland, pp. 1-16.
- Barbosa, J., Borges, S., Magalhães, R., Ferreira, V., Santos, I., Silva, J., Almeida, G., Gibbs, P., Teixeira, P., 2012. Behaviour of *Listeria monocytogenes* isolates through gastrointestinal tract passage simulation, before and after two sub-lethal stresses. *Food Microbiology* 30, 24-28.
- Barmpalia-Davis, I.M., Geornaras, I., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2009. Effect of fat content on survival of *Listeria monocytogenes* during simulated digestion of inoculated beef frankfurters stored at 7 °C. *Food Microbiology* 26, 483-490.

Referencias

- Barroca, M.J., Guiné, R.P.F., Pinto, A., Gonçalves, F.M., Ferreira, D.M.S., 2006. Chemical and microbiological characterization of portuguese varieties of pears. *Food and Bioproducts Processing* 84, 109-113.
- Barth, M., Hankinson, T.R., Zhuang, H., Breidt, F., 2009. Microbiological spoilage of fruits and vegetables. En: Sperber, W.H., Doyle, M.P. (Eds.), *Compendium of the microbial spoilage of foods and beverages, food microbiology and food safety*. Springer, New York, NY, USA, pp. 135-183.
- Batt, C.A., 2014. *Listeria*. En: Batt, C.A., Tortorello, M.L. (Eds.), *Encyclopedia of food microbiology*, Vol. 2, 2^a edn. Academic Press (Elsevier), Oxford, UK, pp. 466-500.
- Beales, N., 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3, 1-20.
- BEDCA (Base de Datos Española de Composición de Alimentos), 2007. Información de la composición de la pera. <http://www.bedca.net/bdpub/>. Acceso: 15/03/17.
- Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Erler, W., Burghardt, J., Seyfarth, W., 1999. A taxonomic study of bacteria isolated from grasses: a proposed new species *Pseudomonas graminis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49, 297-308.
- Bennik, M.H.J., Peppelenbos, H.W., Nguyen-the, C., Carlin, F., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., 1996. Microbiology of minimally processed, modified-atmosphere packaged chicory endive. *Postharvest Biology and Technology* 9, 209-221.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S., Gomez-Llorente, C., Gil, A., 2012. Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism* 61, 160-174.
- Beshkova, D.M., Simova, E.D., Frengova, G.I., Simov, Z.I., Dimitrov, Z.P., 2003. Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. *International Dairy Journal* 13, 529-535.
- Beuchat, L.R., 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/64435/1/WHO_FSF_FOS_98.2.pdf. Acceso: 24/01/2017.

- Blaszyk, M., Holley, R.A., 1998. Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. *International Journal of Food Microbiology* 39, 175-183.
- Bo Andersen, J., Roldgaard, B.B., Christensen, B.B., Licht, T.R., 2007. Oxygen restriction increases the infective potential of *Listeria monocytogenes in vitro* in Caco-2 cells and *in vivo* in guinea pigs. *Bmc Microbiology* 7, 55.
- Boylston, T.D., Vinderola, C.G., Ghoddusi, H.B., Reinheimer, J.A., 2004. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal* 14, 375-387.
- Brecht, J.K., 1995. Physiology of lightly processed fruits and vegetables. *Hortscience* 30, 18-22.
- Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J., Abram, M., 2011. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry* 127, 1821-1827.
- Buchanan, R.L., Gorris, L.G.M., Hayman, M.M., Jackson, T.C., Whiting, R.C., 2017. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control* 75, 1-13.

-C-

- Caleb, O.J., Mahajan, P.V., Al-Said, F.A., Opara, U.L., 2013. Modified atmosphere packaging technology of fresh and fresh-cut produce and the microbial consequences-A review. *Food and Bioprocess Technology* 6, 303-329.
- Callejón, R.M., Rodríguez-Naranjo, M.I., Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., Garcia-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M., 2015. Reported Foodborne Outbreaks Due to Fresh Produce in the United States and European Union: Trends and Causes. *Foodborne Pathogens and Disease* 12, 32-38.
- CAMO ASA, 2004. Unscrambler Users Guide, ver. 9.1.2. Programme Package for Multivariate Calibration. Trondheim, Norway.
- Carey, C.M., Kostrzynska, M., Ojha, S., Thompson, S., 2008. The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Microbiological Methods* 73, 125-132.

Referencias

- Casarotti, S.N., Todorov, S.D., Penna, A.L.B., 2015. Effect of different matrices on probiotic resistance to invitro simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Dairy Technology* 68, 595-601.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2012. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of listeriosis linked to whole cantaloupes from Jensen Farms, Colorado. <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html>. Acceso: 26/01/2017.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2014a. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2011, Annual Report.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2014b. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2012, Annual Report.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2015a. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2013, Annual Report.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2015b. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of listeriosis linked to commercially produced, prepackaged caramel apples made from Bidart Bros. Apples <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/caramel-apples-12-14/index.html>. Acceso: 26/01/2017.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2016. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2014, Annual Report.
- Chaikham, P., Apichartsrangkoon, A., Jirattanasri, W., Van de Wiele, T., 2012. Influence of encapsulated probiotics combined with pressurized longan juice on colon microflora and their metabolic activities on the exposure to simulated dynamic gastrointestinal tract. *Food Research International* 49, 133-142.
- Champagne, C.P., Gardner, N.J., 2008. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Research International* 41, 539-543.
- Champagne, C.P., Ross, R.P., Saarela, M., Hansen, K.F., Charalampopoulos, D., 2011. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated

- cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology* 149, 185-193.
- Charles, F., Sanchez, J., Gontard, N., 2003. Active modified atmosphere packaging of fresh fruits and vegetables: Modeling with tomatoes and oxygen absorber. *Journal of Food Science* 68, 1736-1742.
- Chen, J., Wang, Z., Wu, J., Wang, Q., Hu, X., 2007. Chemical compositional characterization of eight pear cultivars grown in China. *Food Chemistry* 104, 268-275.
- Chukwu, C.O.C., Chukwu, I.D., Onyimba, I.A., Umoh, E.G., Olarubofin, F., Olabode, A.O., 2010. Microbiological quality of pre-cut fruits on sale in retail outlets in Nigeria. *African Journal of Agricultural Research* 5, 2272-2275.
- Cliffe-Byrnes, V., O'Beirne, D., 2008. Effects of washing treatment on microbial and sensory quality of modified atmosphere (MA) packaged fresh sliced mushroom (*Agaricus bisporus*). *Postharvest Biology and Technology* 48, 283-294.
- Colás-Medà, P., Abadias, M., Alegre, I., Usall, J., Viñas, I., 2015. Effect of ripeness stage during processing on *Listeria monocytogenes* growth on fresh-cut 'Conference' pears. *Food Microbiology* 49, 116-122.
- Colás-Medà, P., Abadias, M., Altisent, R., Alegre, I., Plaza, L., Gilabert, V., Lacomba, R., Viñas, I., 2016. Development of a fresh-cut product based on pears and the subsequent evaluation of its shelf life under commercial conditions and after a cold chain break. *Journal of Food and Nutrition Research* 4, 582-591.
- Colás-Medà, P., Abadias, M., Oliveira, M., Usall, J., Viñas, I., 2017a. Influence of fruit matrix and storage temperature on the survival of *Listeria monocytogenes* in a gastrointestinal simulation. *Food Control* 73, Part B, 1045-1052.
- Colás-Medà, P., Viñas, I., Oliveira, M., Anguera, M., Serrano, J.C.E., Abadias, M., 2017b. Exposure to minimally processed pear and melon during shelf life could modify the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* 62, 275-281.
- Collazo, C., Abadias, M., Aguiló-Aguayo, I., Alegre, I., Chenoll, E., Viñas, I., In Press. Studies on the biocontrol mechanisms of *Pseudomonas graminis* strain CPA-7 against food-borne pathogens in vitro and on fresh-cut melon. *LWT - Food Science and Technology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.029>.

Referencias

- Coman, M.M., Verdenelli, M.C., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., Boyko, N., Cresci, A., 2014. In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501, *Lactobacillus paracasei* IMC 502 and SYN BIO against pathogens. *Journal of Applied Microbiology* 117, 518-527.
- Conte, M.P., Petrone, G., Di Biase, A.M., Ammendolia, M.G., Superti, F., Seganti, L., 2000. Acid tolerance in *Listeria monocytogenes* influences invasiveness of enterocyte-like cells and macrophage-like cells. *Microbial Pathogenesis* 29, 137-144.
- Conway, W.S., Leverentz, B., Saftner, R.A., Janisiewicz, W.J., Sams, C.E., Leblanc, E., 2000. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut apple slices and its interaction with *Glomerella cingulata* and *Penicillium expansum*. *Plant Disease* 84, 177-181.
- Conway, W.S., Sams, C.E., Hickey, K.D., 2002. Pre- and postharvest calcium treatment of apple fruit and its effect on quality. *Acta Horticulturae* 594, 413-419.
- Corbin, B.D., Seeley, E.H., Raab, A., Feldmann, J., Miller, M.R., Torres, V.J., Anderson, K.L., Dattilo, B.M., Dunman, P.M., Gerads, R., Caprioli, R.M., Nacken, W., Chazin, W.J., Skaar, E.P., 2008. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science* 319, 962-965.
- Corr, S.C., Gahan, C.G.M., Hill, C., 2007a. Impact of selected *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species on *Listeria monocytogenes* infection and the mucosal immune response. *FEMS immunology and medical microbiology* 50, 380-388.
- Corr, S.C., Hill, C., Gahan, C.G.M., 2009. Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Advances in food and nutrition research* 56, 1-15.
- Corr, S.C., Li, Y., Riedel, C.U., O'Toole, P.W., Hill, C., Gahan, C.G., 2007b. Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 7617-7621.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews: Microbiology* 3, 777-788.

- Cox, J.M., Pavic, A., 2014. *Salmonella*. En: Batt, C.A., Tortorello, M.L. (Eds.), *Encyclopedia of food microbiology*, Vol. 3, 2^a ed. Academic Press (Elsevier), Oxford, UK, pp. 322-352.
- Cross, M.L., 2002. Immunoregulation by probiotic lactobacilli: Pro-Th1 signals and their relevance to human health. *Clinical and Applied Immunological Reviews* 3, 115-125.
- Cunha, S., Komora, N., Magalhães, R., Almeida, G., Ferreira, V., Teixeira, P., 2016. Characterization of clinical and food *Listeria monocytogenes* isolates with different antibiotic resistance patterns through simulated gastrointestinal tract conditions and environmental stresses. *Microbial Risk Analysis* 1, 40-46.
- Cunningham, D.G., Acree, T.E., Barnard, J., Butts, R.M., Braell, P.A., 1985. Charm analysis of apple volatiles. *Food Chemistry*. 19, 137-147.

-D-

- DARPA (Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació), 2015. Previsió de collita 2015 i producció 2014 de poma i pera, a Europa 2015. http://agricultura.gencat.cat/web/.content/de_departament/de02_estadistiques_observatoris/08_observatoris_sectorials/03_observatori_de_la_fruta_fresca/a2/fitxers_estatics/A2_2015/2015.08-Prev-collita-i-produccio-poma-i-pera-_Cat_EU_.pdf. Acceso: 23/01/2017.
- Davis, M.J., Coote, P.J., Obyrne, C.P., 1996. Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: The adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiology-Uk* 142, 2975-2982.
- de Oliveira, P.M., Leite, B.R., Martins, M.L., Martins, E.M.F., Ramos, A.M., 2014. Minimally processed yellow melon enriched with probiotic bacteria. *Semina-Ciencias Agrarias* 35, 2415-2425.
- del Campo, G., Berregi, I., Caracena, R., Santos, J.I., 2006. Quantitative analysis of malic and citric acids in fruit juices using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* 556, 462-468.
- Del Rosario, B.A., Beuchat, L.R., 1995. Survival and growth of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cantaloupe and watermelon. *Journal of Food Protection* 58, 105-107.

Referencias

- DeRovira, D., 1997. Manual Flavor nomenclature workshop: An odor description and sensory evaluation workshop. Flavor Dynamics, Inc., Somerset NJ.
- Diakogiannis, I., Berberi, A., Siapi, E., Arkoudi-Vafea, A., Giannopoulou, L., Mastronicolis, S.K., 2013. Growth and membrane fluidity of food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* in the presence of weak acid preservatives and hydrochloric acid. *Frontiers in Microbiology* 4, 152.
- Dingman, D.W., 2000. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in bruised apple (*Malus domestica*) tissue as influenced by cultivar, date of harvest, and source. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1077-1083.
- Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornef, F., Fern, E.B., Roberfroid, M.B., 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document. *British Journal of Nutrition* 81, s1-s27.
- Dong, X., Wrolstad, R.E., Sugar, D., 2000. Extending shelf life of fresh-cut pears. *Journal of Food Science* 65, 181-186.
- Duary, R., Rajput, Y., Batish, V., Grover, S., 2011. Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *Indian Journal Medical Research* 134, 664-671.
- Dumas, Y., Dadomo, M., Lucca, G.D., Grolier, P., 2003. Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83, 369-382.
- E-
- EFSA (European Food Safety Authority), 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 11.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 12.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2015a. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 13.

- EFSA (European Food Safety Authority), 2015b. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 13.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal* 14.
- Elo, S., Saxelin, M., Salminen, S., 1991. Attachment of *Lactobacillus casei* strain GG to human colon carcinoma cell line Caco-2: comparison with other dairy strains. *Letters in Applied Microbiology* 13, 154-156.
- Endo, A., Terasjarvi, J., Salminen, S., 2014. Food matrices and cell conditions influence survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG under-heat stresses and during storage. *International Journal of Food Microbiology* 174, 110-112.
- ex Kauffmann, F., Edwards, P.R., 1952. Classification and nomenclature of Enterobacteriaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2, 2-8.

-F-

- Faleiro, M.L., 2010. The mode of antibacterial action of essential oils. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* 2, 1143-1156.
- FAO/WHO, 2001. Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>. Acceso: 15/02/17.
- Farber, J.N., Harris, L.J., Parish, M.E., Beuchat, L.R., Suslow, T.V., Gorney, J.R., Garrett, E.H., Busta, F.F., 2003. Microbiological safety of controlled and modified atmosphere packaging of fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2, 142-160.
- FDA (U.S. Food and Drugs Administration), 2008. Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Fresh-cut Fruits and Vegetables. <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ProducePlantProducts/ucm064458.htm>. Acceso: 25/01/2017.

Referencias

- FDA (U.S. Food and Drugs Administration), 2016. CFR Code of Federal Regulations Title 21. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=101.95>. Acceso: 24/01/2017
- Fellman, J.K., Mattheis, J.P., Patterson, M.E., Mattinson, D.S., Bostick, B.C., 1993. Study of ester biosynthesis in relation to harvest maturity and controlled-atmosphere storage of apples (*Malus domestica* Borkh.). Proceedings of the 6th International Controlled Atmosphere Research Conference. Cornell University, Ithaca, NY, USA, pp. 500-507.
- Feng, K., Hu, W., Jiang, A., Xu, Y., Sarengaowa, Li, X., Bai, X., 2015. Growth potential of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on fresh-cut tropical fruits. *Journal of Food Science* 80, M2548-M2554.
- Fernandes, M.S., Cruz, A.G., Arroyo, D.M.D., Faria, J.D.F., Cristianini, M., St'Ana, A.S., 2013. On the behavior of *Listeria innocua* and *Lactobacillus acidophilus* co-inoculated in a dairy dessert and the potential impacts on food safety and product's functionality. *Food Control* 34, 331-335.
- Ferreira, A., Sue, D., O'Byrne, C.P., Boor, K.J., 2003. Role of *Listeria monocytogenes* sigma σ^B in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2692-2698.
- Fliss, I., Hammami, R., Le Lay, C., 2011. Biological control of human digestive microbiota using antimicrobial cultures and bacteriocins, En: Lacroix, C. (Ed), Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation. Woodhead Publishing, Cambridge, UK, pp. 240-263
- Francis, G.A., O'Beirne, D., 1998. Effects of the indigenous microflora of minimally processed lettuce on the survival and growth of *Listeria innocua*. *International Journal of Food Science and Technology* 33, 477-488.
- FSIS (Food Safety and Inspection Service), 2013. Foodborne Illness: What Consumers Need to Know. https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/foodborne-illness-and-disease/foodborne-illness-what-consumers-need-to-know/CT_Index. Acceso: 26/01/2017.

Fukushima, Y., Kawata, Y., Hara, H., Terada, A., Mitsuoka, T., 1998. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *International Journal of Food Microbiology* 42, 39-44.

-G-

Gahan, C.G.M., Odriscoll, B., Hill, C., 1996. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3128-3132.

Gaillard, J.L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S., Sansonetti, P., 1987. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infection and Immunity* 55, 2822-2829.

Gálvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Ben Omar, N., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 120, 51-70.

Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Ben Omar, N., 2011. Biological control of pathogens and post-processing spoilage microorganisms in fresh and processed fruit and vegetables. En: Lacroix, C. (Ed), Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation. Woodhead Publishing, Cambridge, UK, pp. 403-432.

Gálvez, A., Pérez, R., Abriouel, H., Ben Omar, N., Grande, M. J., 2012. Protective cultures. En: Gómez-López, V. L. (Ed.), Decontamination of fresh and minimally processed produce. Wiley-Blackwell (John Wiley & Sons), Oxford, UK, pp. 296-316.

Galvis-Sánchez, A.C., Gil-Izquierdo, A., Gil, M.I., 2003. Comparative study of six pear cultivars in terms of their phenolic and vitamin C contents and antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83, 995-1003.

Galvis-Sánchez, A.C., Fonseca, S.C., Gil-Izquierdo, Á., Gil, M.I., Malcata, F.X., 2006. Effect of different levels of CO₂ on the antioxidant content and the polyphenol oxidase activity of 'Rocha' pears during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 509-517.

Ganzle, M.G., Holtzel, A., Walter, J., Jung, G., Hammes, W.P., 2000. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4325-4333.

Referencias

- Garcia, E., Barrett, D.M., 2005. Fresh-cut fruits. En: Barrett, D.M., Somogyi, L., Ramaswamy, H. (Eds.), *Processing fruits-science and technology*, 2^a edn. CRC Press (Taylor & Francis Group), Boca Raton, FL, USA pp. 53-72.
- Gareau, M.G., Sherman, P.M., Walker, W.A., 2010. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology* 7, 503-514.
- Garner, M.R., James, K.E., Callahan, M.C., Wiedmann, M., Boor, K.J., 2006. Exposure to salt and organic acids increases the ability of *Listeria monocytogenes* to invade Caco-2 cells but decreases its ability to survive gastric stress. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5384-5395.
- Gerasopoulos, D., Richardson, D.G., 1996. Effects of exogenous propylene and fruit calcium on ripening of non-chilled and chilled Anjou pears. *Postharvest Biology and Technology* 8, 111-120.
- Ghidelli, C., Perez-Gago, M.B., 2016. Recent advances in modified atmosphere packaging and edible coatings to maintain quality of fresh-cut fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <http://doi.org/10.1080/10408398.2016.1211087>.
- Gil, M.I., Gorny, J.R., Kader, A.A., 1998. Responses of 'Fuji' apple slices to ascorbic acid treatments and low-oxygen atmospheres. *Hortscience* 33, 305-309.
- Gil, M.I., Selma, M.V., López-Gálvez, F., Allende, A., 2009. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology* 134, 37-45.
- Gill, H.S., Rutherford, K.J., Prasad, J., Gopal, P.K., 2000. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *British Journal of Nutrition* 83, 167-176.
- Giménez, M., Olarte, C., Sanz, S., Lomas, C., Echávarri, J.F., Ayala, F., 2003. Relation between spoilage and microbiological quality in minimally processed artichoke packaged with different films. *Food Microbiology* 20, 231-242.
- Golnazarian, C.A., Donnelly, C.W., Pintauro, S.J., Howard, D.B., 1989. Comparison of infectious dose of *Listeria monocytogenes* F5817 as determined for normal versus compromised C57B1/6J mice. *Journal of Food Protection* 52, 696-701.

- Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J., Gill, H.S., 2001. *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 67, 207-216.
- Gorny, J.R., Cifuentes, R.A., Hess-Pierce, B., Kader, A.A., 2000. Quality changes in fresh-cut pear slices as affected by cultivar, ripeness stage, fruit size, and storage regime. *Journal of Food Science* 65, 541-544.
- Gorny, J.R., Gil, M.L., Kader, A.A. 1998. Postharvest physiology and quality maintenance of fresh-cut pears 10.17660/ActaHortic.1998.464.33, 464 ed. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium. 231-236.
- Gorny, J.R., Hess-Pierce, B., Cifuentes, R.A., Kader, A.A., 2002. Quality changes in fresh-cut pear slices as affected by controlled atmospheres and chemical preservatives. *Postharvest Biology and Technology* 24, 271-278.
- Grif, K., Patscheider, G., Dierich, M.P., Allerberger, F., 2003. Incidence of fecal carriage of *Listeria monocytogenes* in three healthy volunteers: A one-year prospective stool survey. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 22, 16-20.
- Gueimonde, M., Margolles, A., Reyes-Gavilan, C., Salminen, S., 2007. Competitive exclusion of enteropathogens from human intestinal mucus by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile - A preliminary study. *International Journal of Food Microbiology* 113, 228-232.
- Guo, Z., Wang, J., Yan, L., Chen, W., Liu, X.-m., Zhang, H.-p., 2009. *In vitro* comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. *LWT - Food Science and Technology* 42, 1640-1646.
- Gupta, S., Abu-Ghannam, N., 2012. Probiotic fermentation of plant based products: possibilities and opportunities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52, 183-199.
- H-
- Harker, F.R., Marsh, K.B., Young, H., Murray, S.H., Gunson, F.A., Walker, S.B., 2002. Sensory interpretation of instrumental measurements 2: sweet and acid taste of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology* 24 (3), 241-250.

Referencias

- Harris, L.J., Farber, J.N., Beuchat, L.R., Parish, M.E., Suslow, T.V., Garrett, E.H., Busta, F.F., 2003. Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2, 78-141.
- Hedberg, M., Hasslöf, P., Sjöström, I., Twetman, S., Stecksén-Blicks, C., 2008. Sugar fermentation in probiotic bacteria-an in vitro study. *Oral Microbiology and Immunology* 23, 482-485.
- Herrero, A.M., Romero de Avila, M.D., 2006. Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra* 50, 71-74.
- Hertog, M.L.A.T.M., Peppelenbos, H.W., Evelo, R.G., Tijssens, L.M.M., 1998. A dynamic and generic model of gas exchange of respiring produce: the effects of oxygen, carbon dioxide and temperature. *Postharvest Biology and Technology* 14, 335-349.
- Hidalgo, I.J., Raub, T.J., Borchardt, R.T., 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96, 736-749.
- Holzapel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U., 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24, 343-362.
- Hudson, J.A., Billington, C., Carey-Smith, G., Greening, G., 2005. Bacteriophages as biocontrol agents in food. *Journal of Food Protection* 68, 426-437.

-I-

- ICMSF (The International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1980. Vegetables, fruits, nuts and their products. En: Silliker, J.H., Elliot, R.P., Baird-Parker, A.C., Bryan, F.L., Christian, J.H.B., Clark, D.S., Olson, T.C., Roberts, T.A. (Eds.), *Microbial ecology of foods*, Vol. 2, Food commodities, 2^a edn. Academic Press, Inc., London, UK, pp. 606-642.
- IFPA (International Fresh cut Produce Association), 2002. <http://www.creativew.com/sites/ifpa/about.html>. Acceso: 23/01/2017.

-J-

- Jacobsen, C.N., Nielsen, V.R., Hayford, A.E., Moller, P.L., Michaelsen, K.F., Paerregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M., Jakobsen, M., 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4949-4956.
- James, J., 2006. Overview of microbial hazards in fresh fruit and vegetables operations. En: James, J. (Ed.), *Microbial hazards identification in fresh fruits and vegetables*. Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 1-36.
- Jaradat, Z.W., Bhunia, A.K., 2003. Adhesion, invasion, and translocation characteristics of *Listeria monocytogenes* serotypes in Caco-2 cell and mouse models. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5736-5736.
- Johnson-Henry, K.C., Donato, K.A., Shen-Tu, G., Gordanpour, M., Sherman, P.M., 2008. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG prevents enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. *Infection and Immunity* 76, 1340-1348.
- Jones, R.J., Wescombe, P.A., Tagg, J.R., 2011. Identifying new protective cultures and culture components for food biopreservation. En: Lacroix, C. (Ed), *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation*. Woodhead Publishing, Cambridge, UK, pp. 3-26.
- Jordan, K., Dalmasso, M., Zentek, J., Mader, A., Bruggeman, G., Wallace, J., De Medici, D., Fiore, A., Prukner-Radovic, E., Lukac, M., Axelsson, L., Holck, A., Ingmer, H., Malakauskas, M., 2014. Microbes versus microbes: control of pathogens in the food chain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94, 3079-3089.

-K-

- Kadlec, R., Jakubec, M., 2014. The effect of prebiotics on adherence of probiotics. *Journal of Dairy Science* 97, 1983-1990.
- Kailasapathy, K., 2006. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT - Food Science and Technology* 39, 1221-1227.

Referencias

- Kapetanakou, A.E., Gkerekou, M.A., Vitzilaiou, E.S., Skandamis, P.N., 2017. Assessing the capacity of growth, survival, and acid adaptive response of *Listeria monocytogenes* during storage of various cheeses and subsequent simulated gastric digestion. *International Journal of Food Microbiology* 246, 50-63.
- Karimi, R., Mortazavian, A.M., Da Cruz, A.G., 2011. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy Science & Technology* 91, 283-308.
- Kathariou, S., 2002. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection* 65, 1811-1829.
- Ke, D.Y., Yahia, E., Mateos, M., Kader, A.A., 1994. Ethanolic fermentation of Bartlett pears as influenced by ripening stage and atmospheric composition. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119, 976-982.
- Kerckhoffs, A.P.M., Samsom, M., Henegouwen G.P.v.B, Akkermans L.M.A., Nieuwenhuijs V.B., Visser, M. R., 2016. Sampling microbiota in the human gastrointestinal tract. En: Vaughan, E.E., Ouwehand, A.C. (Eds.), *Gastrointestinal microbiology*. Taylor & Francis Group, New York, NY, USA, pp. 25-50.
- Khaleque, A., Bari, M.L., 2016. Facts on foodborne pathogens. En: Bari, M.L., Ukuku, D.O. (Eds.), *Foodborne pathogens*. CRC Press (Taylor & Francis Group), Boca Raton, FL, USA pp. 35-81.
- King, A.M.Y., Young, G., 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association* 99, 213-218.
- Kopsahelis, N., Kanellaki, M., Bekatorou, A., 2007. Low temperature brewing using cells immobilized on brewer's spent grains. *Food Chemistry* 104, 480-488.
- L-
- Lacerda-Ramos, C., Thorsen, L., Schwan, R.F., Jespersen, L. 2015. Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products, 36. 22-29.
- Lacombe, A., Wu, V.C.H., Tyler, S., Edwards, K., 2010. Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 139, 102-107.

- Lacombe, A., Wu, V.C.H., White, J., Tadepalli, S., Andre, E.E., 2012. The antimicrobial properties of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) fractional components against foodborne pathogens and the conservation of probiotic *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Microbiology* 30, 124-131.
- Le Minor, L., Popoff, M.Y., 1987. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*: Request for an opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 37, 465-468.
- Lee, L., Arul, J., Lencki, R., Castaigne, F., 1996. A review on modified atmosphere packaging and preservation of fresh fruits and vegetables: Physiological basis and practical aspects—part II. *Packaging Technology and Science* 9, 1-17.
- Leverentz, B., Conway, W.S., Alavidze, Z., Janisiewicz, W.J., Fuchs, Y., Camp, M.J., Chighladze, E., Sulakvelidze, A., 2001. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: A model study. *Journal of Food Protection* 64, 1116-1121.
- Leverentz, B., Conway, W.S., Camp, M.J., Janisiewicz, W.J., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R., Sulakvelidze, A., 2003. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4519-4526.
- Leverentz, B., Conway, W.S., Janisiewicz, W.J., Abadias, M., Kurtzman, C.P., Camp, M.J., 2006. Biocontrol of the food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar Poona on fresh-cut apples with naturally occurring bacterial and yeast antagonists. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1135-1140.
- Lievin-Le Moal, V., Servin, A.L., 2014. Anti-infective activities of *Lactobacillus* strains in the human intestinal microbiota: From probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. *Clinical Microbiology Reviews* 27, 167-199.
- Lim, S.-M., Im, D.-S., 2012. Inhibitory effects of antagonistic compounds produced from *Lactobacillus brevis* MLK27 on adhesion of *Listeria monocytogenes* KCTC3569 to HT-29 cells. *Food Science and Biotechnology* 21, 775-784.
- Lindeman, M., Väänänen, M., 2000. Measurement of ethical food choice motives. *Appetite* 34, 55-59.

Referencias

- Lobo, M.G., González, M. (Sin fecha). Estado actual de los productos mínimamente procesados en España. <http://www.icia.es/icia/download/postcosecha/procesado%20minimo%20en%20espa%C3%B1a.pdf>. Acceso: 08/04/2017
- López, M.L., Miró, R., Graell, J., 2001. Quality and aroma production of Doyenne du Comice pears in relation to harvest date and storage atmosphere. *Food Science and Technology International* 7, 493-500.
- Lou, Y., Yousef, A.E., 1997. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1252-1255.
- Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B.C., 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal* 11, 1-17.
- Luckow, T., Delahunty, C., 2004. Which juice is 'healthier'? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. *Food Quality and Preference* 15, 751-759.
- Luna-Guzman, I., Barrett, D.M., 2000. Comparison of calcium chloride and calcium lactate effectiveness in maintaining shelf stability and quality of fresh-cut cantaloupes. *Postharvest Biology and Technology*, 19 (1), 61-72.
- Luna, M.C., 2014. Alimentos de IV gama. <https://cienciacebas.wordpress.com/2014/04/02/que-es-la-iv-gama/>. Acceso: 24/01/2017.
- M-
- Ma, C., Li, J., Zhang, Q., 2016. Behavior of *Salmonella* spp. on fresh-cut tropical fruits. *Food Microbiology* 54, 133-141.
- Mack, D.R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., Hollingsworth, M.A., 2003. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* 52, 827-833.
- Madden, J.M., 1992. Microbial pathogens in fresh produce - the regulatory perspective. *Journal of Food Protection* 55, 821-823.
- MAPAMA (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medioambiente), 2015. Su perfiles y Producciones de Cultivos. <http://www.mapama.gob.es/estadistica/pag>

s/anuario/2015/TABLAS%20PDF/CAPITULO%2013/pdfc13_9.4.3.pdf. Acceso: 15/03/2017.

MAPAMA (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medioambiente), 2016. Informe del consumo de alimentación en España 2015. <http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/panel-de-consumo-alimentario/ultimos-datos/default.aspx>. Acceso: el 23/01/2017.

Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E., 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal* 16, 189-199.

Martens, H., and Naes, T. (1989) Partial least squares regression. Multivariate calibration. Chichester: J. Wiley & Sons, Inc.

Martinez, M.V., Whitaker, J.R., 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science & Technology* 6, 195-200.

Martins, E.M.F., Ramos, A.M., Martins, M.L., Leite Júnior, B.R.d.C., 2016. Fruit salad as a new vehicle for probiotic bacteria. *Food Science and Technology (Campinas)* 36, 540-548.

Matias, N.S., Padilha, M., Bedani, R., Saad, S.M.I., 2016. In vitro gastrointestinal resistance of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 in soy and/or milk-based synbiotic apple ice creams. *International Journal of Food Microbiology* 234, 83-93.

Mattar, A.F., Teitelbaum, D.H., Drongowski, R.A., Yongyi, F., Harmon, C.M., Coran, A.G., 2002. Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatric Surgery International* 18, 586-590.

Mattheis, J.P., Fellman, J.K., Chen, P.M., Patterson, M.E., 1991. Changes in headspace volatiles during physiological development of Bisbee Delicious apple fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39, 1902-1906.

Mattheis, J.P., Buchanan, D.A., Fellman, J.K., 1995. Volatile compound production by Bisbee Delicious apples after sequential atmosphere storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 194-199.

Referencias

- Maul, F., Sargent, S.A., Balaban, M.O., Baldwin, E.A., Huber, D.J., Sims, C.A., 1998. Aroma volatile profiles from ripe tomatoes are influenced by physiological maturity at harvest: an application forelectronic nose technology. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123, 1094-1101.
- McCann, M.J., Gill, C.I.R., O'Brien, G., Rao, J.R., McRoberts, W.C., Hughes, P., McEntee, R., Rowland, I.R., 2007 Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology* 45, 1224-1230.
- McFarland, L.V., 2015. From yaks to yogurt: The history, development, and current use of probiotics. *Clinical Infectious Diseases* 60, S85-S90.
- McIlvaine, J.B.C., 1921. En: Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, W.H., Jones, K.M. (Eds.), Data for Biochemical Research, vol. 49, Oxford University Press, pp. 183.
- Melo, J., Schrama, D., Andrew, P.W., Faleiro, M.L., 2013a. Proteomic analysis shows that individual *Listeria monocytogenes* strains use different strategies in response to gastric stress. *Foodborne Pathogens and Disease* 10, 107-119.
- Melo, J., Schrama, D., Hussey, S., Andrew, P.W., Faleiro, M.L., 2013b. *Listeria monocytogenes* dairy isolates show a different proteome response to sequential exposure to gastric and intestinal fluids. *International Journal of Food Microbiology* 163, 51-63.
- Metchnikoff E. 1907. The prolongation of life: optimistic studies. Mitchell, P.C. (Ed). Heinemann, London, UK, pp. 151-183.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Menard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S., Weitschies, W., Brodkorb, A., 2014. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & function* 5, 1113-1124.
- Monje, M., 2016. Informe 2016 del sector de IV gama y otros refrigerados hortofrutícolas. <https://www.alimarket.es/informe/209443/informe-2016-del-sector-de-iv-gama-y-otros-refrigerados-hortofruticolas>. Acceso: 24/01/2017.

Monteagudo-Mera, A., Rodriguez-Aparicio, L., Rua, J., Martinez-Blanco, H., Navasa, N., Garcia-Armesto, M.R., Ferrero, M.A., 2012. *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Foods* 4, 531-541.

Murray, E.G.D., Webb, R.A., Swann, M.B.R., 1926. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology* 29, 407-439.

-N-

Nes, I.F., Kjos, M., Diep, D.B., 2012. Antimicrobial components of lactic acid bacteria En: Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., Von Wright, A. (Eds.), *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*, 4^a edn. CRC Press (Taylor & Francis Group), Boca Raton, FL, USA, pp. 285-330.

Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., der Giessen, J.v., Kruse, H., 2010. Food-borne diseases – The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology* 139, S3-S15.

Ng, S.C., Hart, A.L., Kamm, M.A., Stagg, A.J., Knight, S.C., 2009. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflammatory Bowel Diseases* 15, 300-310.

Nguyen-the, C., Carlin, F., 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34, 371-401.

Nguyen, T.D.T., Kang, J.H., and Lee, M.S., 2007. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *International Journal of Food Microbiology* 113, 358-361.

-O-

O'Connor-Shaw, R.E., Roberts, R., Ford, A.L., Nottingham, S.M., 1994. Shelf life of minimally processed honeydew, kiwifruit, papaya, pineapple and cantaloupe. *Journal of Food Science* 59, 1202-1206.

O'Driscoll, B., Gahan, C.G.M., Hill, C., 1996. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: Isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1693-1698.

Referencias

- O'Hara, A.M., O'Regan, P., Fanning, A., O'Mahony, C., Macsharry, J., Lyons, A., Bienenstock, J., O'Mahony, L., Shanahan, F., 2006. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology* 118, 202-215.
- O'Toole, P.W., Cooney, J.C., 2008. Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2008, 9.
- Oelschlaeger, T.A., 2010. Mechanisms of probiotic actions - A review. *International Journal of Medical Microbiology* 300, 57-62.
- Olaimat, A.N., Holley, R.A., 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiology* 32, 1-19.
- Olanya, O.M., Taylor, J., Ukuku, D.O., Malik, N.S.A., 2015. Inactivation of *Salmonella* serovars by *Pseudomonas chlororaphis* and *Pseudomonas fluorescens* strains on tomatoes. *Biocontrol Science and Technology* 25, 399-413.
- Oliveira, M., Viñas, I., Colás, P., Anguera, M., Usall, J., Abadias, M., 2014. Effectiveness of a bacteriophage in reducing *Listeria monocytogenes* on fresh-cut fruits and fruit juices. *Food Microbiology* 38, 137-142.
- Ölmez, H., Kretzschmar, U., 2009. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT - Food Science and Technology* 42, 686-693.
- Omac, B., Moreira, R.G., Castillo, A., Castell-Perez, E., 2015. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* on fresh baby spinach leaves: Effect of storage temperature and natural microflora. *Postharvest Biology and Technology* 100, 41-51.
- Oms-Oliu, G., Aguiló-Aguayo, I., Martín-Belloso, O., 2006. Inhibition of browning on fresh-cut pear wedges by natural compounds. *Journal of Food Science* 71, S216-S224.
- Oms-Oliu, G., Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O., 2008a. Antioxidant content of fresh-cut pears stored in high-O₂ active packages compared with conventional low-O₂ active and passive modified atmosphere packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 932-940.

- Oms-Oliu, G., Rojas-Graü, M.A., González, L.A., Varela, P., Soliva-Fortuny, R., Hernando, M.I.H., Munuera, I.P., Fiszman, S., Martín-Belloso, O., 2010. Recent approaches using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit: A review. *Postharvest Biology and Technology* 57, 139-148.
- Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O., 2008b. Edible coatings with antibrowning agents to maintain sensory quality and antioxidant properties of fresh-cut pears. *Postharvest Biology and Technology* 50, 87-94.
- Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O., 2008c. Physiological and microbiological changes in fresh-cut pears stored in high oxygen active packages compared with low oxygen active and passive modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology* 48, 295-301.
- Onoda, T., Enokizono, J., Kaya, H., Oshima, A., Freestone, P., Norris, V., 2000. Effects of calcium and calcium chelators on growth and morphology of *Escherichia coli* L-form NC-7. *J Bacteriol* 182, 1419-1422.
- Ortiz, A., Echeverría, G., Graell, J., Lara, I., 2009. Calcium dips enhance volatile emission of cold-stored 'Fuji Kiku-8' apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 4931-4938.
- Ortiz, A., Echeverría, G., Graell, J., Lara, I., 2010. The emission of flavour-contributing volatile esters by 'Golden Reinders' apples is improved after mid-term storage by postharvest calcium treatment. *Postharvest Biology and Technology* 57, 114-123.
- P-
- Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D., 2000. New developments in solid state fermentation: I-Bioprocesses and products. *Process Biochemistry* 35, 1153-1169.
- Pao, S., Brown, G.E., Schneider, K.R., 1998. Challenge studies with selected pathogenic bacteria on freshly peeled hamlin orange. *Journal of Food Science* 63, 359-362.
- Parish, M.E., Beuchat, L.R., Suslow, T.V., Harris, L.J., Garrett, E.H., Farber, J.N., Busta, F.F., 2003. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2, 161-173.
- Pasteur, L., Joubert, J.F., 1877. Charbon et septicémie. *Comptes-rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales* 85, 101-115.

Referencias

- Penteado, A.L., Leitão, M.F.F., 2004a. Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulps. *International Journal of Food Microbiology* 92, 89-94.
- Penteado, A.L., Leitão, M.F.F., 2004b. Growth of *Salmonella* Enteritidis in melon, watermelon and papaya pulp stored at different times and temperatures. *Food Control* 15, 369-373.
- Pérez, L., González, C., Chafer, M., Chiralt, A., 2003. Calidad de frutas mínimamente procesadas. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 180, 81-84.
- Peterson, L.D., Faith, N.G., Czuprynski, C.J., 2007. Resistance of *Listeria monocytogenes* F2365 cells to synthetic gastric fluid is greater following growth on ready-to-eat deli turkey meat than in brain heart infusion broth. *Journal of Food Protection* 70, 2589-2595.
- Phan-Thanh, L., Mahouin, F., Aligé, S., 2000. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 55, 121-126.
- Pimentel-González, D.J., Campos-Montiel, R.G., Lobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R., Vernon-Carter, E.J., 2009. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International* 42, 292-297.
- Pimentel, T.C., Madrona, G.S., Garcia, S., Prudencio, S.H., 2015. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* and oligofructose in different package type. *Lwt-Food Science and Technology* 63, 415-422.
- Pirie, J.H., 1940. *Listeria*: change of name for a genus bacteria. *Nature* 145, 264.
- Pizarro-Cerdá, J., Charbit, A., Enninga, J., Lafont, F., Cossart, P., 2016. Manipulation of host membranes by the bacterial pathogens *Listeria*, *Francisella*, *Shigella* and *Yersinia*. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 60, 155-167.
- Plaza, L., Altisent, R., Alegre, I., Viñas, I., Abadías, M., 2016. Changes in the quality and antioxidant properties of fresh-cut melon treated with the biopreservative culture *Pseudomonas graminis* CPA-7 during refrigerated storage. *Postharvest Biology and Technology* 111, 25-30.

- Pogacic, T., Maillard, M.B., Leclerc, A., Herve, C., Chuat, V., Valence, F., Thierry, A., 2016. *Lactobacillus* and *Leuconostoc* volatilomes in cheese conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 2335-2346.
- Ponting, J.D., Jackson, R., Watters, G., 1971. Refrigerated apple slices: effects of pH, sulfites and calcium on texture *Journal of Food Science*, 36 (2), 349-350.
- Ponting, J.D., Jackson, R., Watters, G., 1972. Refrigerated apple slices preservative effects of ascorbic acid, calcium and sulphites. *Journal of Food Science*, 37 (3), 434-436.
- Portela, S.I., Cantwell, M.I., 2001. Cutting blade sharpness affects appearance and other quality attributes of fresh-cut cantaloupe melon. *Journal of Food Science* 66, 1265-1270.
- Prado, F.C., Parada, J.L., Pandey, A., Soccol, C.R., 2008. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International* 41, 111-123.
- Pricope-Ciolacu, L., Nicolau, A.I., Wagner, M., Rychli, K., 2013. The effect of milk components and storage conditions on the virulence of *Listeria monocytogenes* as determined by a Caco-2 cell assay. *International Journal of Food Microbiology* 166, 59-64.
- Pridmore, R.D., Pittet, A.-C., Praplan, F., Cavadini, C., 2008. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-*Salmonella* activity. *Fems Microbiology Letters* 283, 210-215.
- Pujato, S.A., Quiberoni, A.D., Candiotti, M.C., Reinheimer, J.A., Guglielmotti, D.M., 2014. *Leuconostoc citreum* MB1 as biocontrol agent of *Listeria monocytogenes* in milk. *Journal of Dairy Research* 81, 137-145.

-Q-

- Qin, G., Tao, S., Cao, Y., Wu, J., Zhang, H., Huang, W., Zhang, S., 2012. Evaluation of the volatile profile of 33 *Pyrus ussuriensis* cultivars by HS-SPME with GC-MS. *Food Chemistry* 134, 2367-2382.

-R-

- Ragaert, P., Jacxsens, L., Vandekinderen, I., Baert, L., Devlieghere, F., 2011. Microbiological safety aspects of fresh-cut fruits and vegetables. En: Martín-

Referencias

- Belloso, O., Soliva-Fortuny, R. (Eds.), *Advances in fresh-cut fruits and vegetables processing*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 53-86.
- Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H.G.H.J., Molenaar, D., Kajander, K., Surakka, A., Smidt, H., Vos, W.M.D., 2009. Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environmental Microbiology* 11, 1736-1751.
- Rapparini, F., Predieri, S., 2003. Pear fruit volatiles. *Horticulturae Reviews*. 28, 237-324.
- Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., Sobrino-López, A., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O., 2007. Shelf-life extension of fresh-cut "Fuji" apples at different ripeness stages using natural substances. *Postharvest Biology and Technology* 45, 265-275.
- Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Girones, R., Koutsoumanis, K., Herman, L., Lindqvist, R., Nørrung, B., Robertson, L., Ru, G., Sanaa, M., Simmons, M., Skandamis, P., Snary, E., Speybroeck, N., Kuile, B.T., Threlfall, J., Wahlström, H., Coconcelli, P.S., Klein, G., Peixe, L., Maradona, M.P., Querol, A., Suarez, J.E., Sundh, I., Vlák, J., Correia, S., Escámez, P.S.F., 2017. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 5: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2016. *EFSA Journal* 15.
- Rivera-Espinoza, Y., Gallardo-Navarro, Y., 2010. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology* 27, 1-11.
- Rizzolo, A., Cambiaghi, P., Grassi, M., Zerbini, P.E., 2005. Influence of 1-methylcyclopropene and storage atmosphere on changes in volatile compounds and fruit quality of conference pears. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 9781-9789.
- Rizzolo, A., Sodi, C., Polesello, A., 1991. Influence of ethylene removal on the volatile development in passa crassana pears stored in a controlled atmosphere. *Food Chemistry* 42, 275-285.
- Rocourt, J., Jacquet, C., Reilly, A., 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology* 62, 197-209.

- Roche, S.M., Gracieux, P., Milohanic, E., Albert, I., Virlogeux-Payant, I., Temoin, S., Grepinet, O., Kerouanton, A., Jacquet, C., Cossart, P., Velge, P., 2005. Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 6039-6048.
- Rojas-Graü, M.A., Sobrino-López, A., Tapia, M.S., Martín-Belloso, O., 2006. Browning inhibition in fresh-cut 'Fuji' apple slices by natural antibrowning agents. *Journal of Food Science* 71, S59-S65.
- Romani, R., J. Labavitch, T. Yamashita, B. Hess, and H. Rae. 1983. Preharvest AVG treatment of 'Bartlett' pear fruit: Effects on ripening, color change, and volatiles. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 108, 1046-1049.
- Rosa, L.J.B., Esper, L.M.R., Cabral, J., Franco, R.M., Cortez, M.A.S., 2016. Viability of probiotic micro-organism *Lactobacillus acidophilus* in dairy chocolate dessert and its action against foodborne pathogens. *Ciencia Rural* 46, 368-374.
- Rosen, J.C., Kader, A.A., 1989. Postharvest physiology and quality maintenance of sliced pear and strawberry fruits. *Journal of Food Science* 54, 656-659.
- Roversi, T., Piazza, L., 2016. Changes in minimally processed apple tissue with storage time and temperature: mechanical-acoustic analysis and rheological investigation. *European Food Research and Technology* 242 (3), 421-429.
- Röfle, C., Auty, M.A.E., Brunton, N., Gormley, R.T., Butler, F., 2010a. Evaluation of fresh-cut apple slices enriched with probiotic bacteria. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11, 203-209.
- Röfle, C., Brunton, N., Gormley, R.T., Ross, P.R., Butler, F., 2010b. Development of potentially synbiotic fresh-cut apple slices. *Journal of Functional Foods* 2, 245-254.
- Russo, P., de Chiara, M.L.V., Vernile, A., Amodio, M.L., Arena, M.P., Capozzi, V., Massa, S., Spano, G., 2014. Fresh-cut pineapple as a new carrier of probiotic lactic acid bacteria. *Biomed Research International* 2014, 1-9.
- Russo, P., Pena, N., de Chiara, M.L.V., Amodio, M.L., Colelli, G., Spano, G., 2015. Probiotic lactic acid bacteria for the production of multifunctional fresh-cut cantaloupe. *Food Research International* 77, 762-772.

Referencias

- Ryan, K.J., Ray, C.J., 2014a. *Corynebacterium*, *Listeria*, and *Bacillus*. En: Sherris medical microbiology, 6^a edn. McGraw-Hill Education, London, UK, pp. 579-608.
- Ryan, K.J., Ray, C.J., 2014b. Enterobacteriaceae. En: Sherris medical microbiology, 6^a edn. McGraw-Hill Education, London, UK, pp. 473-488.
- S-
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., Mattila-Sandholm, T., 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* 84, 197-215.
- Salmeron, I., Loeza-Serrano, S., Perez-Vega, S., Pandiella, S.S., 2015. Headspace gas chromatography (HS-GC) analysis of imperative flavor compounds in *Lactobacilli*-fermented barley and malt substrates. *Food Science and Biotechnology* 24, 1363-1371.
- Salminen, S., Laine, M., Vonwright, A., Vuopio-Varkila, J., Korhonen, T., Mattila-Sandholm, T., 1996. Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods: a nordic and european approach. *Bioscience and Microflora* 15, 61-67.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Mattila-Sandholm, T., 1998. Demonstration of safety of probiotics - A review. *International Journal of Food Microbiology* 44, 93-106.
- Salta, J., Martins, A., Santos, R.G., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Justino, J., Rauter, A.P., 2010. Phenolic composition and antioxidant activity of Rocha pear and other pear cultivars – A comparative study. *Journal of Functional Foods* 2, 153-157.
- Samara, A., Koutsoumanis, K.P., 2009. Effect of treating lettuce surfaces with acidulants on the behaviour of *Listeria monocytogenes* during storage at 5 and 20 °C and subsequent exposure to simulated gastric fluid. *International Journal of Food Microbiology* 129, 1-7.
- SAS/JMP® 8 User's Guide, 2004. SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- Savage, D.C., 1992. Growth-phase, cellular hydrophobicity, and adhesion *in vitro* of lactobacilli colonizing the keratinizing gastric epithelium in the mouse. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1992-1995.

- Schieberle, P., Ofner, S., and Grosch, W. (1990) Evaluation of potent odorants in cucumbers (*Cucumis sativus*) and muskmelons (*Cucumis melo*) by aroma extract dilution analysis. *Journal of Food Science* 5, 193-195.
- Servin, A.L., 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 405-440.
- Sheehan, V.M., Ross, P., Fitzgerald, G.F., 2007. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8, 279-284.
- Shen, Q., Soni, K.A., Nannapaneni, R., 2014. Influence of temperature on acid-stress adaptation in *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease* 11, 43-49.
- Shen, Q., Soni, K.A., Nannapaneni, R., 2015. Stability of sublethal acid stress adaptation and induced cross protection against lauric arginate in *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 203, 49-54.
- Shori, A.B., 2016. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. *Food Bioscience* 13, 1-8.
- Shu, Q., Gill, H.S., 2001. A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *Medical Microbiology and Immunology* 189, 147-152.
- Siro, I., Devlieghere, F., Jacxsens, L., Uyttendaele, M., Debevere, J., 2006. The microbial safety of strawberry and raspberry fruits packaged in high-oxygen and equilibrium-modified atmospheres compared to air storage. *International Journal of Food Science & Technology* 41, 93-103.
- Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D.I., Tabanelli, G., Montanari, C., Gardini, F., Lanciotti, R., 2015. Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce. *Food Microbiology* 47, 74-84.
- Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D.I., Vannini, L., Salvetti, E., Torriani, S., Gardini, F., Lanciotti, R., 2016. Use of a nisin-producing *Lactococcus lactis* strain, combined with natural antimicrobials, to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples. *Food Microbiology* 54, 11-19.

Referencias

- Smith, J.L., 2003. The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. *Journal of Food Protection* 66, 1292-1303.
- Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P.D., Spier, M.R., Medeiros, A.B.P., Yamaguishi, C.T., Lindner, J.D., Pandey, A., Thomaz-Soccol, V., 2010. The potential of probiotics: a review. *Food Technology and Biotechnology* 48, 413-434.
- Soliva-Fortuny, R.C., Alos-Saiz, N., Espachs-Barroso, A., Martin-Belloso, O., 2004. Influence of maturity at processing on quality attributes of fresh-cut conference pears. *Journal of Food Science* 69, 290-294.
- Soliva-Fortuny, R.C., Biosca-Biosca, M., Grigelmo-Miguel, N., Martin-Belloso, O., 2002a. Browning, polyphenol oxidase activity and headspace gas composition during storage of minimally processed pears using modified atmosphere packaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 1490-1496.
- Soliva-Fortuny, R.C., Grigelmo-Miguel, N., Odriozola-Serrano, I., Gorinstein, S., Martin-Belloso, O., 2001. Browning evaluation of ready-to-eat apples as affected by modified atmosphere packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 3685-3690.
- Soliva-Fortuny, R.C., Martin-Belloso, O., 2003. Microbiological and biochemical changes in minimally processed fresh-cut Conference pears. *European Food Research and Technology* 217, 4-9.
- Soliva-Fortuny, R.C., Oms-Oliu, G., Martin-Belloso, O., 2002b. Effects of ripeness stages on the storage atmosphere, color, and textural properties of minimally processed apple slices. *Journal of Food Science* 67, 1958-1963.
- Sonnenburg, J.L., Chen, C.T., Gordon, J.I., 2006. Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host. *PLoS Biology* 4, e413.
- Soomro, A.H., Masud, T., Anwaar, K., 2002. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health - A Review. *Pakistan Journal of Nutrition* 1, 20-24.
- Sreekumar, R., Al-Attabi, Z., Deeth, H.C., Turner, M.S., 2009. Volatile sulfur compounds produced by probiotic bacteria in the presence of cysteine or methionine. *Letters in Applied Microbiology* 48, 777-782.

- Sribuathong, S., Saengprakai, J., Trevanich, S., 2014. *In vitro* anti-adherent assessment of selected lactic acid bacteria isolates against *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* to Caco-2 cells. *Journal of Food Safety* 34, 270-282.
- Stiles, M.E., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70, 331-345.
- T-
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S.A., 2011. Antimicrobial activity of ascorbic acid alone or in combination with lactic acid on *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Control* 22, 801-804.
- Tanriöven, D., Ekşi, A., 2005. Phenolic compounds in pear juice from different cultivars. *Food Chemistry* 93, 89-93.
- Tewari, G., 2002. Microbial control by packaging. En: Juneja, K.V., Sofos, J.N. (Eds.), Control of foodborne microorganisms. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA, pp. 191-233.
- Thirabunyanon, M., Thongwittaya, N., 2012. Protection activity of a novel probiotic strain of *Bacillus subtilis* against *Salmonella* Enteritidis infection. *Research in Veterinary Science* 93, 74-81.
- Ting, V.J.L., Romano, A., Soukoulis, C., Silcock, P., Bremer, P.J., Cappellin, L., Biasioli, F., 2016. Investigating the in-vitro and in-vivo flavour release from 21 fresh-cut apples. *Food Chemistry* 212, 543-551.
- Tiwari, R.P., Reeve, W.G., Glenn, A.R., 1992. Mutations conferring acid sensitivity in the acid-tolerant strains *Rhizobium meliloti* WSM419 and *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae WSM710. *FEMS Microbiology Letters* 100, 107-112.
- Todoriki, K., Mukai, T., Sato, S., Toba, T., 2001. Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. *Journal of Applied Microbiology* 91, 154-159.
- Toivonen, P.M.A., 2006. Fresh-cut apples: challenges and opportunities for multidisciplinary research. *Canadian Journal of Plant Science*. 86, 1361-1368.
- Toivonen, P.M.A., Delaquis, P., 2006. Low-volume sprays to treat fresh-sliced apples with anti-browning solution. *HortTechnology* 16, 257-261.

Referencias

- Tournas, V.H., Heeres, J., Burgess, L., 2006. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology* 23, 684-688.
- Trentham, W.R., Sams, C.E., Conway, W.S., 2008. Histological effects of calcium chloride in stored apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133, 487-491.
- Trias, R., Badosa, E., Montesinos, E., Baneras, L., 2008a. Bioprotective *Leuconostoc* strains against *Listeria monocytogenes* in fresh fruits and vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 127, 91-98.
- Trias, R., Baneras, L., Badosa, E., Montesinos, E., 2008b. Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 123, 50-60.
- Tuo, Y.F., Zhang, W.Q., Zhang, L.W., Ai, L.Z., Zhang, Y.C., Han, X., Yi, H.X., 2013. Study of probiotic potential of four wild *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Anaerobe* 21, 22-27.
- Tuomola, E.M., Salminen, S.J., 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology* 41, 45-51.
- U-
- Ukuku, D.O., Fett, W.F., Sapers, G.M., 2004. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by native microflora of whole cantaloupe. *Journal of Food Safety* 24, 129-146.
- Ukuku, D.O., Pilizota, V., Sapers, G.M., 2001. Influence of washing treatment on native microflora and escherichia coli population of inoculated cantaloupes. *Journal of Food Safety* 21, 31-47.
- V-
- Van Buren, J.P., 1979. The chemistry of texture in fruits and vegetables. *Journal of Texture Studies* 10, 1-23.
- Van Coillie, E., Goris, J., Cleenwerck, I., Grijspeerdt, K., Botteldoorn, N., Van Immerseel, F., De Buck, J., Vancanneyt, M., Swings, J., Herman, L., Heyndrickx, M., 2007. Identification of lactobacilli isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control *Salmonella enteritidis*. *Journal of Applied Microbiology* 102, 1095-1106.

- Van Schaik, W., Gahan, C.G., Hill, C., 1999. Acid-adapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance against the lantibiotics nisin and lacticin 3147. *Journal of Food Protection* 62, 536-539.
- Veltman, R.H., Kho, R.M., van Schaik, A.C.R., Sanders, M.G., Oosterhaven, J., 2000. Ascorbic acid and tissue browning in pears (*Pyrus communis* L. cvs Rocha and Conference) under controlled atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology* 19, 129-137.
- Verbeke, W., Pérez-Cueto, F.J.A., Barcellos, M.D.d., Krystallis, A., Grunert, K.G., 2010. European citizen and consumer attitudes and preferences regarding beef and pork. *Meat Science* 84, 284-292.
- Vermeulen, A., Ragaert, P., Rajkovic, A., Samapundo, S., López-Gálvez, F., Devlieghere, F., 2013. New research on modified-atmosphere packaging and pathogen behavior. En: Sofos, J. (Ed.), *Advances in microbial food safety*, Vol. 1. Woodhead Publishing, Cambridge, UK, pp. 340-354.
- Viñas, I., Abadias, M., Usall, J., Teixidó, N., Torres, R., 2014. Biological culture of a strain of the *Pseudomonas graminis* species, use of said culture as antagonist for biological control of pathogenic bacteria, and method for treating fruit that comprises the step of applying to the fruit a preparation that comprises said culture. Número concesión: US8735136 B2. Fecha de emisión: 27/05/2014. Entidades titulares: Universidad de Lleida/Institut de Recerca i Tecnologies Agroalimentaries (IRTA).
- Viñas, I., Abadias, M., Usall, J., Teixidó, N., Torres, R., 2012. Cultivo biológico de una cepa de la especie *Pseudomonas graminis*, uso de dicho cultivo como antagonista para el control biológico de bacterias patógenas, y método para tratar fruta que comprende la etapa de aplicar a la fruta una preparación que comprende dicho cultivo. Núm. de Publicación: EP__2886665. Fecha publicación concesión 01/02/2017. Entidades titulares: Universidad de Lleida/Institut de Recerca i Tecnologies Agroalimentaries (IRTA).
- Von Wright, A. and Axelsson L., 2012. Lactic acid bacteria: an introduction. En: Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., Von Wright, A. (Eds.), *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*, 4^a edn. CRC Press (Taylor & Francis Group), Boca Raton, FL, USA, pp. 1-16.

Referencias

-W-

- Wang, X., Ouyang, Y., Liu, J., Zhu, M., Zhao, G., Bao, W., Hu, F.B., 2014. Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ: British Medical Journal* 349, 1-14.
- Wells, J.G., Davis, B.R., Wachsmuth, I.K., Riley, L.W., Remis, R.S., Sokolow, R., Morris, G.K., 1983. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *Journal of Clinical Microbiology* 18, 512-520.
- Werbrouck, H., Botteldoorn, N., Ceelen, L., Decostere, A., Uyttendaele, M., Herman, L., Van Coillie, E., 2008. Characterization of virulence properties of *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains of different origins. *Zoonoses and Public Health* 55, 242-248.
- Werner, B.G., Hotchkiss, J.H., 2006. Modified atmosphere packaging. En: Sapers, G.M., Gorny, J.R., Yousef, A.E. (Eds.), *Microbiology of fruits and vegetables*. CRC Press (Taylor & Francis Group), Boca Raton, FL, USA, pp. 437-459.
- Wyllie, S.G., Leach, D.N., Wang, Y.M., Shewfelt, R.L., 1995. Key aroma compounds in melon: Their development and cultivar dependence. En: Rouseff, R.L., Leahy, M.M. (Eds.), *Fruit flavors: Biogenesis, Characterization, and Authentication*. American Chemical Society Washington, DC, USA, pp. 248-257.
- Wootton-Beard, P.C., Ryan, L., 2011. Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International* 44, 3135-3148.
- Worobo, R.W., Splittstoesser, D.F., 2005. Fresh-cut fruits. En: Barrett, D.M., Somogyi, L., Ramaswamy, H. (Eds.), *Processing fruits-science and technology*, 2nd edn. CRC Press (Taylor & Francis Group), Boca Raton, FL, USA, pp. 261-284.
- Wright, D.H., Harris, N.D., 1985. Effect of nitrogen and potassium fertilization on tomato flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 33, 355-358.

-Y-

- Youatt, J., 1993. Calcium and microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology* 19, 83-97.

-Z-

- Zagory, D., 1999. Effects of post-processing handling and packaging on microbial populations. *Postharvest Biology and Technology* 15, 313-321.
- Zagory, D., Kader, A.A., 1988. Modified atmosphere packaging of fresh produce. *Food Technology* 42, 70-74 & 76-77.
- Zhang, B.-Y., Samapundo, S., Rademaker, M., Nosedá, B., Denon, Q., de Baenst, I., Sürengil, G., De Baets, B., Devlieghere, F., 2014. Effect of initial headspace oxygen level on growth and volatile metabolite production by the specific spoilage microorganisms of fresh-cut pineapple. *LWT - Food Science and Technology* 55, 224-231.
- Zhuang, H., Barth, M.M., Hankinson, T. R., 2003. Microbial safety, quality, and sensory aspects of fresh-cut fruits and vegetables. En: Novak, J.S., Sapers, G.M., Juneja, V.K. (Eds.), *Microbial safety of minimally processed foods*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 255-278.
- Zudaire, L., Viñas, I., Abadias, M., Simó, J., Echeverría, G., Plaza, L., Aguiló-Aguayo, I., 2017. Quality and bioaccessibility of total phenols and antioxidant activity of calçots (*Allium cepa* L.) stored under controlled atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology* 129, 118-128.

AGRADECIMIENTOS

Tres años han pasado desde que comenzó esta experiencia. Tres años con muchísimos momentos buenos, pero tres años en los momentos no tan buenos, llenos de estrés y agobio, también han salido a relucir. Son todos esos momentos y todas las personas que han estado presentes en ellos los que, además de hacerme crecer profesionalmente, me han enriquecido personalmente.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi familia, en especial a mis padres, los pilares fundamentales, gracias por entenderme en los días malos, por apoyarme siempre y por enseñarme que con esfuerzo las cosas siempre se consiguen y que la recompensa aún sabe mejor. Y a ti, Raquel, gracias por tus visitas, por escucharme y por hacer que pusiera los pies en la tierra cuando era necesario. A Bea y a Juan, gracias por preocuparos siempre porque estuviera bien.

A Maribel y a Inma, gracias por haberme dado la oportunidad y haberme guiado y marcado las pautas para seguir el camino, a veces demasiado sinuoso, de la tesis, por haberme transmitido conocimientos, y, sobre todo, por haber sido pacientes y comprensivas en los últimos meses que tan estresantes han sido, muchas gracias a las dos.

A Cyrelys, Pilar, Patricia, Marina, Jordi Sabata e Isa por crear un ambiente óptimo de trabajo, de compañerismo y buen humor, por hacer los días en laboratorio menos caóticos y más divertidos, ¡estoy muy agradecida de poder haber compartido con vosotros los días en el laboratorio de microbiología! Gracias también a Gemma Echeverría por tus horas de trabajo empleadas y por los conocimientos que me has transmitido.

Muchas gracias a Charo, Neus y Josep y a todas las personas que han formado (Carlos, Lucía, Laura, Gemma Burón, Lulú, Márcia...) y forman parte del grupo de Poscosecha del IRTA, que aunque no haya trabajado con ellas directamente se han interesado por cómo iba la tesis y han sabido ofrecerme distintos puntos de vista y opiniones y pequeños momentos, detallitos que han contribuido, de una manera u otra, a alcanzar el final de este camino.

A mis chicas de la sala de becarias, a Pilar, Maria Bernat, Amparo, Lorena, Cyrelys, Anna, Núria Baró y Violeta, gracias por estar siempre en mis momentos de horror máximo pero, sobre todo, gracias por vuestros ánimos, por vuestras ideas, por las conversaciones interesantes y las no tan interesantes (que no quiere decir que no fueran divertidas) y gracias por compartir conmigo tantos momentos que han hecho que la tesis sea más liviana; además de unas compañeras más que perfectas, me llevo conmigo grandes amigas. A Andrea, Marta, Xesca, y Núria

Vall-llaura, por los ratos de risas, tanto en el Fruitcentre como fuera, muchas gracias. A Oana y a Billy, dos personas con las que coincidí en mi primer año de tesis y que me han acompañado a lo largo de estos tres años, ¡muchas gracias por vuestra amistad!

A Marta, Maleny y Mari, muchas gracias por apoyarme durante todos estos años, por los momentos preciosos que hemos vivido y gracias por esas quedadas continuas que siempre han servido para cargar las pilas de energía positiva y afrontar las cosas con otra filosofía, ¡espero que sigamos compartiendo más aventurillas! A mi Pilarica, porque desde la distancia has sabido sosegarme en los momentos de más estrés, por las largas conversaciones y los continuos ánimos y consejos, ¡muchas gracias! A José David, gracias por estar ahí, por regalarme tantos ratitos de desconexión y risas y, sobre todo, por soportar y compartir mis locuras mentales (que no son pocas...). A Cristian, gracias por transmitirme tranquilidad cuando más lo he necesitado, por tu buen humor y por hacerme ver las cosas siempre desde el lado positivo.

Así, cierro una etapa, un punto de inflexión en mi vida, en la que no han dejado de sorprenderme tanto la vida como las personas, de la que me quedo con todas las buenas experiencias y sensaciones, pero en la que, también, los malos momentos han sido cruciales para hacerme fuerte. Y de la que he aprendido que, por supuesto, hay que pensar para actuar, pero que pensar demasiado en las cosas que de verdad no tienen importancia también tiene su lado negativo, por eso siempre que sea posible es mejor “don’t think y enjoy the life” y centrarse en lo que de verdad importa, en nuevos proyectos y en perseguir sueños y ambiciones y vivir y disfrutar cada momento como si fuera el mejor de tu vida.