

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y CIENCIAS DE LA SALUD

SEDE TRELEW



Seminario de Licenciatura en Ciencias Biológicas

“Evolución de la capacidad antioxidante durante la fermentación controlada de brasicáceas con bacterias ácido lácticas autóctonas seleccionadas”

Alumna: María Antonela Gentili

Directora: Lic. Romina B. Parada

Co-directora: Dra. Marisol Vallejo

Asesor: Dr. Emilio Rogelio Marguet

2023

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y pareja, por su apoyo y fe a lo largo de estos años.

A mis directoras y asesor, por su paciencia, su guía y el espacio brindado.

Al equipo del laboratorio de Hidrobiología, especialmente la Dra. María Eva Góngora, por también brindarme su espacio y consejo.

A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (PI N° 1519 “Brasicaceas y alga undaria como base de alimentos funcionales”) y al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (PICT 2019-01348 “Alimentos funcionales obtenidos mediante fermentación láctica controlada de brasicáceas”) por los financiamientos otorgados para los proyectos de investigación.

tabla de contenidos

AGRADECIMIENTOS.....	2
RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Salud y alimentación.....	7
1.1.1. Dietas alternativas.....	9
1.2. Brasicáceas.....	11
1.2.1. Efectos en la salud.....	12
1.2.2. Antioxidantes.....	14
1.3. Alimentos funcionales.....	15
1.4. Alimentos fermentados.....	16
1.5. Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	19
1.5.1. Las BAL en la elaboración de alimentos fermentados.....	19
1.5.1.1. BAL como cultivos iniciadores de la fermentación.....	20
1.5.1.2. Géneros Leuconostoc y Lactiplantibacillus.....	21
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo general.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. METODOLOGÍA.....	24
3.1 Preparación del vegetal fermentado.....	24
3.1.1 Fermentación espontánea.....	24
3.1.2 Fermentación controlada.....	25
3.2 Parámetros de la fermentación.....	25
3.3 Preparación de extractos.....	26
3.4 Medición de antioxidantes.....	27
3.4.1 Contenido Total de Fenoles (CTF).....	27
3.4.2 Actividad antioxidante según el método DPPH.....	27
3.4.3 Actividad antioxidante según el método CUPRAC.....	28
3.5. Análisis estadístico.....	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1. Parámetros de fermentación.....	29
4.1.1 Recuentos de BAL y pH.....	29
4.1.2. Análisis microbiológico.....	31
4.2. Medición de Antioxidantes.....	33
4.2.1 Contenido Total de Fenoles.....	33
4.2.2 Actividad antioxidante según el método DPPH.....	37
4.2.3 Actividad antioxidante según el método CUPRAC.....	41
5. CONCLUSIONES.....	44
6. REFERENCIAS.....	46

RESUMEN

Las brasicáceas son un grupo de plantas de gran importancia económica, entre las que se destacan numerosas especies comestibles. El género *Brassica* comprende a los vegetales más consumidos y cultivados en el mundo, tales como repollo, akusai, brócolis, coliflor, entre otros. Estos vegetales producen efectos benéficos a la salud del consumidor, debido a su alto contenido de fitoquímicos, relacionados principalmente con los glucosinolatos y compuestos fenólicos. Muchos de estos compuestos bioactivos se clasifican como antioxidantes, es decir, moléculas que previenen la acción de especies reactivas de oxígeno (ROS), productos secundarios del proceso de respiración celular que dañan las membranas de las células, provocando una variedad de enfermedades.

La fermentación láctica se utiliza desde tiempos ancestrales para la preservación de frutas y verduras, ya que no sólo promueve su conservación, sino que también contribuye con las propiedades nutritivas y sensoriales. Si bien el método tradicional es la fermentación espontánea, numerosos autores recomiendan por el contrario la inoculación con bacterias ácido lácticas (BAL), preferentemente autóctonas, para llevar a cabo un proceso controlado. A pesar de que la utilización de cultivos iniciadores en la fermentación vegetal se ha implementado recientemente, ésta garantiza la disminución de alteraciones durante el proceso de fermentación, así como características relativamente uniformes en los productos obtenidos.

El objetivo de este estudio fue la utilización de BAL autóctonas seleccionadas sobre la base de sus capacidades biotecnológicas para fermentar material de origen vegetal (brasicáceas), que den origen a productos de calidad estable, inocuos y con alto valor nutritivo y funcional.

En el presente trabajo se estudiaron los efectos de la fermentación en tres brasicáceas: akusai, repollo blanco y repollo colorado. Cada vegetal se sometió a dos tratamientos

independientes: fermentación espontánea y fermentación controlada. Esta última se realizó en dos etapas, en la primera se inoculó con las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* RCTw1.1 (MT702992) y *Ln. mesenteroides* ssp. *dextranicum* RBTw100 (MT178435); y en la segunda con *Lactiplantibacillus argenteratensis* RBTw102 (MT178436), *L. plantarum* AKTw180 (MT178440) y *L. pentosus* AKTw332 (MT178445) luego de 72 h. Todas las cepas utilizadas se aislaron y seleccionaron previamente a partir de la fermentación espontánea de vegetales *Brassica*. Los vegetales se fermentaron durante 30 días a 18°C, independientemente del tratamiento. Se monitoreó el pH y el recuento de BAL durante ambos procesos de fermentación. Adicionalmente, se evaluó la calidad microbiológica de los fermentos mediante los recuentos de aerobios, coliformes y levaduras. Se realizaron extractos acuosos y metanólicos a partir de las muestras obtenidas durante las fermentaciones de los vegetales *Brassica*. El contenido total de fenoles se evaluó mediante el ensayo Folin-Ciocalteu, mientras que la actividad antioxidante se determinó por los métodos DPPH y CUPRAC.

La población de BAL exhibió una evolución similar durante ambos tipos de fermentación; sin embargo, los valores de pH descendieron significativamente durante el primer día en el proceso controlado. Este rápido descenso garantiza la inocuidad de los alimentos. Luego, las fermentaciones controladas alcanzaron un valor de pH < 4 a los 10 días y se mantuvieron estable hasta el final del ensayo ($p > 0,05$). Esto indicaría que la mayoría de los carbohidratos se han metabolizado y en consecuencia se podría dar por terminado en ese periodo. Al finalizar las fermentaciones (día 30), los productos obtenidos a partir del proceso controlado exhibieron un menor recuento de aerobios totales que los espontáneos, en todos los casos ($p \leq 0,05$). Mientras que, a los 90 días de almacenamiento no se observaron diferencias entre los mismos (<1 log UFC/g) ($p > 0,05$). Todas las fermentaciones exhibieron una disminución en la población de coliformes totales al día 30 y estos valores se mantuvieron constante durante el

periodo de almacenamiento ($<1 \log \text{ UFC/g}$) ($p > 0,05$). En ambos procesos, los recuentos de levaduras se observaron en bajas proporciones, tanto al inicio ($<2,77 \log \text{ UFC/g}$) como al final de la fermentación ($<1 \log \text{ UFC/g}$), en todos los vegetales. Luego de la etapa de almacenamiento, los recuentos de levaduras se mantuvieron estable en todos los casos ($<1 \log \text{ UFC/g}$) ($p > 0,05$), excepto en akusai fermentado espontáneamente que exhibió valores de $3 \log \text{ UFC/g}$. El contenido total de fenoles (CTF) no exhibió una tendencia al comparar los diferentes tipos de fermentaciones (controlada y espontánea); esto dependió del tipo de extracto y vegetal utilizado. No obstante, el repollo colorado exhibió mayores valores de CTF que el resto de los vegetales, independientemente del tipo de fermentación y extracto ($p \leq 0,05$). Por otro lado, la actividad antioxidante (AA) de los vegetales inoculados aumentó significativamente durante el ensayo en todos los casos ($p \leq 0,05$), mientras que los vegetales fermentados espontáneamente mostraron resultados inconsistentes. Además, la fermentación controlada exhibió mayores valores de AA que el proceso espontáneo, en todos los casos. El repollo colorado presentó mayores valores de AA que los demás vegetales, tanto fresco como fermentado ($p \leq 0,05$). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la fermentación controlada en dos etapas con las cepas seleccionadas produce un alimento con propiedades nutritivas y funcionales superiores a las logradas mediante el proceso espontáneo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Salud y alimentación

En las últimas décadas, la sociedad ha adoptado paulatinamente dietas cada vez más hipercalóricas e insalubres. Una dieta saludable debería consistir en una alta proporción de lácteos no enteros, carnes magras, hortalizas, frutas, semillas, aceites, pastas y cereales en general e integrales en particular, y legumbres (Britos *et al.*, 2012). Sin embargo, estos productos se consumen en cantidades insuficientes, mientras que los granos refinados (harinas), azúcar, sal, grasas y alimentos de origen animal (muchas veces también ultraprocesados) se consumen en exceso (INDEC, 2019).

Las dietas hipercalóricas e insalubres están fuertemente asociadas al incremento en el riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) como infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, hipertensión arterial, diabetes tipo II, obesidad y varios tipos de cáncer. Inclusive, se las ha vinculado con enfermedades que no se suelen asociar a la alimentación, tales como el Alzheimer, ciertas enfermedades pulmonares (asma y EPOC) y patologías autoinmunes (Arrieta, González y Fernández, 2021).

Por año fallecen 41 millones de personas por ECNT, lo que equivale al 71% de las muertes que se producen en el mundo (**figura 1**) (INDEC, 2019). Se estima que, anualmente, en el mundo enferman y mueren más personas debido a la mala alimentación que por cualquier otro factor de riesgo, incluyendo el tabaquismo, la violencia y los accidentes viales (Afshin *et al.*, 2019; Arrieta, González y Fernández, 2021).

Los determinantes de los patrones y las prácticas alimentarias son múltiples y complejos: el nivel de ingresos, los precios, las tradiciones culturales, el ritmo de vida, la información disponible, los cambios en los modelos de producción, el marketing y la publicidad, entre otros. Si bien las elecciones son individuales, las características de los entornos donde se

desarrollan las personas juegan un papel fundamental en la elección de alimentos (Arrieta, González y Fernández, 2021).

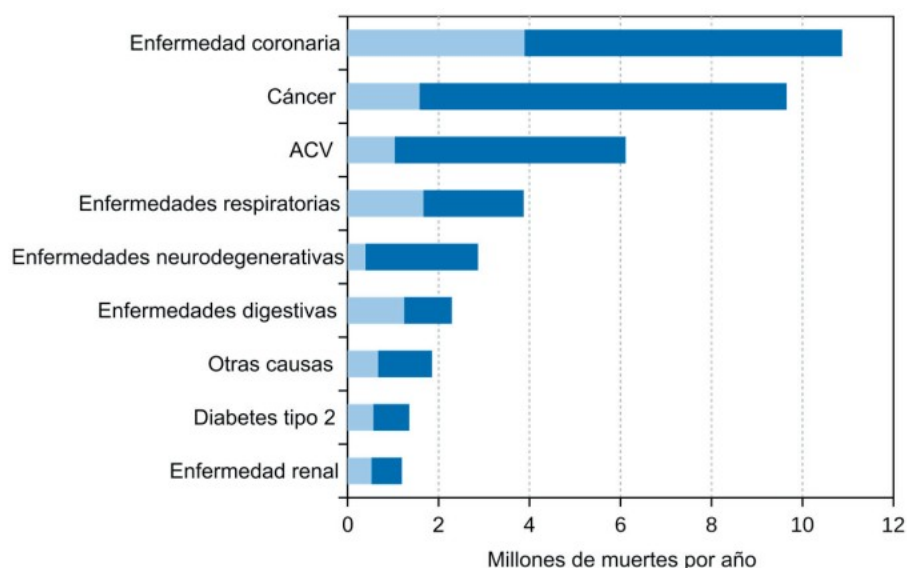


Figura 1: Muertes prematuras prevenibles en el mundo por enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) como resultado de la adopción de dietas saludables (en celeste) en relación con las muertes prematuras totales (en azul). Fuente: Arrieta, González y Fernández, 2021.

La dieta de los argentinos es monótona, a pesar de la amplia heterogeneidad en la oferta comercial de alimentos, principalmente articulada en torno al consumo de pan, carne vacuna, azúcar y cereales refinados. El consumo de verduras, frutas y agua es insuficiente, mientras que el de grasas saturadas, los azúcares y el sodio, así como de kilocalorías totales, supera los valores recomendados (Britos *et al.*, 2012). El consumo de legumbres, frutos secos y carne de pescado también está por debajo de lo ideal. Entre 1999 y 2019 se redujo un 41% el consumo de frutas y un 21% el de hortalizas, mientras que el de gaseosas y jugos en polvo se duplicó. Argentina, Chile y México lideran las ventas de alimentos ultraprocesados de la región latinoamericana. Actualmente, sólo el 6% de los argentinos consumen la cantidad recomendada de frutas y verduras (INDEC, 2019). Estos hábitos alimentarios repercuten en la salud y calidad de vida de los habitantes (**figura 2**).

En Argentina, las ECNT son responsables del 73,4% de las muertes, del 52% de los años de vida perdidos por muerte prematura y del 76% de los años de vida ajustados por discapacidad, acompañando la tendencia mundial (INDEC, 2019).

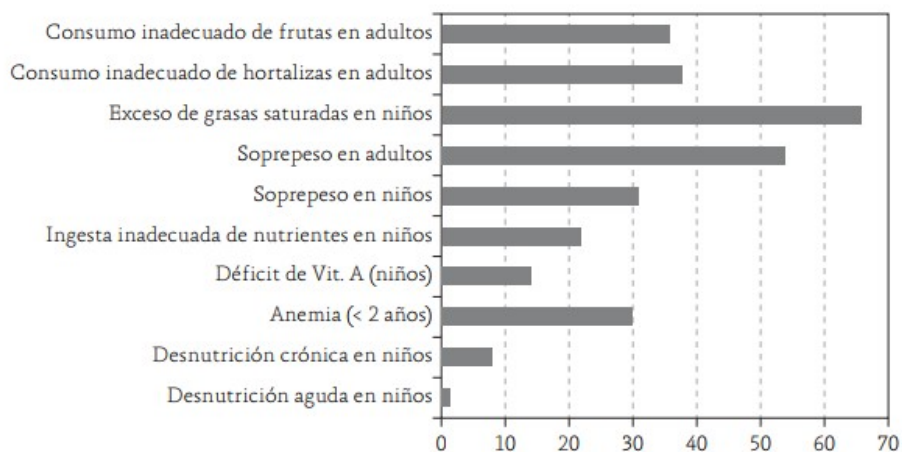


Figura 2. Dimensión de los principales problemas alimentario-nutricionales (porcentaje). Fuente: Britos et al., 2012.

Mejorar la calidad de la dieta podría ser capaz de prevenir el 29% de las muertes prematuras en la Argentina. La transición hacia una dieta más saludable podría interpretarse como una invasión cultural propensa a homogeneizar la dieta y perder la identidad cultural. No obstante, la adopción de lineamientos dietarios saludables y sostenibles permitirían revalorizar productos locales que han sido desplazados por la oferta de la industria alimentaria, y al mismo tiempo promovería el surgimiento de combinaciones novedosas inspiradas en la naturaleza multicultural del país. No sería necesario abandonar las prácticas culturales, sino adaptarlas para incluir una mayor diversidad y calidad de alimentos (Arrieta, González y Fernández, 2021).

1.1.1. Dietas alternativas

El vegetarianismo y el veganismo son tendencias crecientes en los últimos años. Opciones sin carne están disponibles con cada vez más frecuencia en restaurantes y servicios

de comida de establecimientos educativos, al tiempo que han proliferado las publicaciones dedicadas a la cocina vegetariana (Gallo *et al.*, 2014). La proporción de población vegetariana difiere mucho entre los diferentes países; en Argentina la población vegana o vegetariana representa el 12%, con un aumento de 3% entre los años 2019 y 2020 (UVA, 2020). Las personas adoptan este estilo de vida por diferentes razones. Algunos son forzados a ello por factores socioeconómicos: los países de menores ingresos tienden a tener una mayor proporción de población vegetariana (Leahy, Lyons y Tol, 2010). Otros lo hacen por decisión propia fundada en razones personales, tales como inquietudes con respecto a la ética de criar y matar animales no humanos, el impacto ambiental de estas prácticas, el efecto del consumo de carne en la salud, la pureza espiritual y el desagrado frente a las propiedades sensoriales de la carne (Ruby, 2012).

Las dietas vegetarianas y veganas son a menudo vistas con sospecha y señaladas como culpables del déficit de ciertos nutrientes como vitamina B12, hierro, zinc y otros. Sin embargo, esto ocurre sólo en dietas restrictivas y mal planificadas (Mendoza, 2000; Gallo *et al.*, 2014). La creciente demanda de alimentos aptos para veganos y vegetarianos presenta una oportunidad para el desarrollo de nuevos y novedosos productos basados en materias primas de origen vegetal. En Argentina, los lanzamientos de alimentos sin contenido de ingredientes cárnicos se han incrementado, en el período 2007-2012 se obtuvo un 68% de los nuevos lanzamientos totales; mientras que se registró un crecimiento del 12% para esta categoría entre 2008 y 2012 (Gallo *et al.*, 2014).

Otro sector de la población interesado en alimentos alternativos lo constituyen las personas con intolerancia a la lactosa. Esta condición consiste en una mala absorción de la lactosa a nivel del intestino, lo que produce dolor abdominal, hinchazón, diarrea y flatulencia excesiva (Swagerty, Walling y Klein, 2002). Su severidad es variable: algunos individuos son

capaces de consumir productos lácteos sin experimentar síntomas mayores, mientras que para otros resulta un problema grave.

La hidrólisis de la lactosa está mediada por la enzima lactasa, una β -galactosidasa que se ubica a nivel de las microvellosidades de las células intestinales, principalmente a nivel del yeyuno. Además de ser una condición genética hereditaria (hipolactasia primaria), también existen casos agudos (hipolactasia secundaria) como consecuencia de lesiones en el epitelio intestinal, ya sea por enfermedades o cirugías (Vesa, Korpela y Marteau, 2000; Swagerty, Walling y Klein, 2002). Cuando la lactasa está ausente o es deficiente, ocurre una acumulación de azúcares en el colon que tiene dos consecuencias principales: la atracción osmótica provoca un movimiento de fluido hacia la cavidad intestinal, la fermentación de la lactosa por parte de bacterias produce gases y monosacáridos que incrementan aún más la presión osmótica. Además, incrementa la movilidad intestinal, lo que disminuye aún más la hidrólisis de la lactosa, ya que permanece menos tiempo en contacto con la mucosa intestinal y esto empeora los síntomas (Vesa, Korpela y Marteau, 2000). La pérdida de lactasa es una condición fisiológica normal: todos los mamíferos terrestres experimentan un descenso en los niveles de esta enzima después del destete, y en humanos un 90-95% de la misma se pierde durante la infancia temprana, con un descenso continuo en el transcurso de la vida. Sin embargo, la prevalencia de la hipolactasia varía ampliamente entre diferentes grupos étnicos, desde 2% de europeos del Norte hasta casi 100% en asiáticos y nativos americanos; mientras que en los latinos y judíos Ashkenazi se estima una prevalencia de 50-80% (Swagerty, Walling y Klein, 2002).

1.2. Brassicáceas

La familia Brassicaceae corresponde a un grupo de plantas monofilético, altamente diversificado, compuesto por aproximadamente distribuidas en todo el mundo (Al-Shehbaz,

2011; Šamec y Salopek-Sondi, 2018). Son plantas principalmente herbáceas, y casi dos tercios de sus especies son perennes (Al-Shehbaz, 2011). Estas son fácilmente reconocibles por sus frutos y sus características flores de cuatro pétalos en forma de cruz. Los integrantes de este grupo se caracterizan por presentar compuestos glucosinolatos y la presencia de la enzima mirosinasa. Cuando los tejidos de estas plantas son lesionados, la mirosinasa hidroliza los glucosinolatos produciendo isotiocianatos, tiocianatos y nitrilos. Estas moléculas contribuyen a la defensa de las plantas frente a insectos y patógenos, además de exhibir propiedades beneficiosas para la salud. Sus semillas son ricas en aceites, alcanzando valores de hasta 40% (Al-Shehbaz, 2011).

Esta familia comprende numerosas especies de gran importancia económica que han sido utilizadas como vegetales frescos, condimentos y oleaginosas, desde la antigüedad hasta hoy (Al-Shehbaz, 2011; Šamec y Salopek-Sondi, 2018). Entre los géneros de mayor interés económico se encuentra *Brassica*. Este género incluye un gran número de especies, entre las cuales se encuentra *B. oleracea* (repollo, brócoli, repollito de Bruselas, coliflor, kale) y *B. rapa* (nabo, bok choy, akusai o repollo chino), representando los vegetales más consumidos en el mundo (Taiyan *et al.*, 2001; Šamec y Salopek-Sondi, 2018).

1.2.1. Efectos en la salud

Numerosos estudios epidemiológicos sugieren que las dietas ricas en brasicáceas están asociadas a una reducción en el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer (Podsedeck, 2007; Kusznierewicz *et al.*, 2008; Šamec y Salopek-Sondi, 2018). Si bien los mecanismos no se conocen por completo, la evidencia sugiere que los efectos anticarcinógenos de las brasicáceas se deben a los glucosinolatos y sus metabolitos (Šamec y Salopek-Sondi, 2018), que serían capaces de modular la actividad de enzimas de fase I y fase II, inhibir el crecimiento de células tumorales y estimular la apoptosis (Kusznierewicz *et al.*, 2008).

Cada variedad de vegetal posee un perfil de glucosinolatos característico. Normalmente, estos compuestos se encuentran inactivos hasta que son hidrolizados por la mirosinasa derivando en diferentes metabolitos, algunos de gran interés como agentes anticancerígenos. El indol-3-carbinol y su derivado, el 3,3' diindolmetano, afectan a la supervivencia y regulación de las células cancerígenas, incluyendo el metabolismo y los receptores de estrógeno y la expresión de genes involucrados en el cáncer de mama. La evidencia sugiere que podrían ser efectivos en la prevención de ciertos cánceres vulvares y cervicales (Šamec y Salopek-Sondi, 2018). Particularmente en las brassicáceas fermentadas, el indol-3-carbinol es el principal metabolito de los glucosinolatos. Este compuesto, a medida que incrementa la acidez en la matriz, reacciona con el ácido ascórbico para producir ascorbígeno, una molécula con propiedades anticancerígenas (figura 3) (Šamec y Salopek-Sondi, 2018).

Diferentes variedades de *Brassica* se han utilizado tradicionalmente para tratar diversas inflamaciones. Estudios recientes han determinado que los fitoquímicos de los vegetales *Brassica* reducen las vías inflamatorias y antioxidante mediante la inhibición de la actividad del factor nuclear kappa B (NF-kB), que ha sido consistentemente relacionado al control de enfermedades inflamatorias en modelos animales (Baenas *et al.*, 2017).

Las brassicáceas han mostrado también efectos benéficos en el sistema digestivo. El jugo de repollo se ha utilizado ampliamente para tratar úlceras pépticas. El extracto de brotes

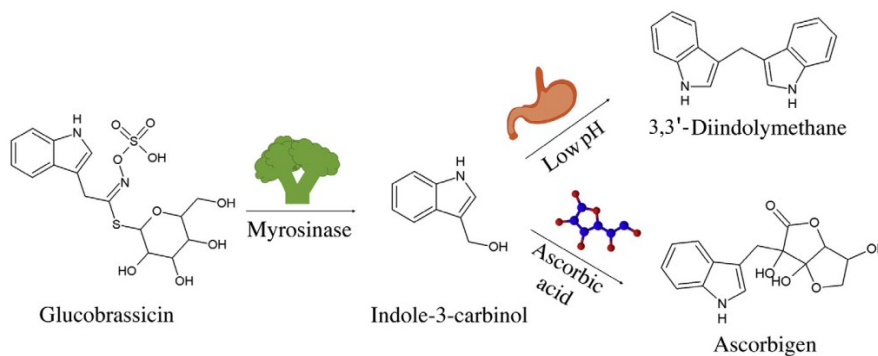


Figura 3. Glucobrassicina y sus derivados. Fuente: Šamec y Salopek-Sondi (2018).

frescos de brócoli ha mostrado actividad contra *Helicobacter pylori*, una bacteria asociada a diversas enfermedades estomacales como gastritis, úlceras y ciertos tipos de cáncer (Šamec y Salopek-Sondi, 2018). Además, el sulforafano, uno de los isotiocianatos presentes en el brócoli, estimula la actividad de las enzimas dependientes del gen Nrf-2, protegiendo a las células de la mucosa gástrica de la inflamación y las lesiones oxidativas (Baenas *et al.*, 2017; Šamec y Salopek-Sondi, 2018).

Algunas brassicáceas, como el repollo, se suelen fermentar con bacterias ácido lácticas (BAL). Estos alimentos funcionales se convierten en una alternativa para los consumidores veganos e intolerantes a la lactosa. Según la evidencia, los beneficios de las brassicáceas podrían extenderse a la prevención de desórdenes metabólicos, asma y enfermedad de Alzheimer (Šamec y Salopek-Sondi, 2018).

1.2.2. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que, cuando están presentes en concentraciones relativamente bajas con respecto a las de un sustrato, inhiben o retrasan significativamente la oxidación del mismo (Diplock, Aggott y Ashwell, 1999). Pueden encontrarse naturalmente en plantas, animales y microorganismos o ser sintetizados por medios químicos (Shahidi y Zhong, 2015). Las células de los organismos aeróbicos están expuestas continuamente a la acción de especies reactivas de oxígeno (ROS, “reactive oxygen species”) (Diplock, Aggott y Ashwell, 1999), tales como el peróxido de hidrógeno y el radical superóxido (Lee, Koo y Min, 2004). Las ROS oxidan diversas macromoléculas, como fosfolípidos de membrana y ácidos nucleicos. Este fenómeno se considera responsable del envejecimiento celular y de numerosas enfermedades: aterosclerosis, Alzheimer, degeneración macular, artritis reumatoidea, Parkinson, cataratas y cáncer, entre otras (Diplock, Aggott y Ashwell, 1999; Kusznierevicz *et al.*, 2008).

Los organismos poseen una variedad de sistemas antioxidantes naturales, que pueden ser reforzados mediante el consumo de antioxidantes por vía oral. Sin embargo, los antioxidantes artificiales no son completamente seguros, ya que su utilización por períodos prolongados conlleva un riesgo de desarrollar cáncer, por lo que las fuentes naturales han adquirido mayor interés en los últimos tiempos (Aires *et al.*, 2011).

Las brassicáceas son una de las mejores fuentes de antioxidantes (Podsdek, 2007; Šamec y Salopek-Sondi, 2018). Contienen vitaminas C (ácido ascórbico y su producto de oxidación, ácido dehidroascórbico) y E, carotenoides, glucosinolatos, isotiocianatos (Šamec y Salopek-Sondi, 2018), fenoles y flavonoides (Podsdek, 2007). Por este motivo, son consideradas alimentos funcionales.

1.3. Alimentos funcionales

El término “alimento funcional” fue introducido por el gobierno del Japón a mediados de 1980 y se define como productos utilizados como parte de una dieta normal con efectos más allá de sus funciones nutricionales básicas, tales como proporcionar beneficios fisiológicos y reducir el riesgo de enfermedades crónicas (Kaur y Das, 2011); debe ser un alimento propiamente dicho, no una píldora ni un suplemento (Diplock, Aggott y Ashwell, 1999).

Los alimentos funcionales se clasifican en las siguientes categorías:

1. Productos alimenticios fortificados con ingredientes que producen efectos positivos en la salud.
2. Alimentos de los que se han eliminados factores anti-nutricionales durante el procesamiento.
3. Materias primas mejoradas por el incremento de componentes específicos mediante diferentes tratamientos.
4. Alimentos novedosos con beneficios para la salud, logrados a través de ingeniería genética o selección de variedades no consumidas hasta el momento.

No obstante, nuestro país aún no cuenta con una definición formal, ya que los alimentos funcionales no están contemplados en el Código Alimentario Argentino, y en consecuencia existe un vacío legal al respecto. Para subsanarlo, el Instituto Nacional de Alimentos ha organizado un grupo de trabajo destinado a proponer normativa al respecto (A.N.M.A.T., 2002).

En vista a los desafíos sanitarios del mundo actual, a la creciente educación de la población en temas de alimentación y salud, el interés en consumir alimentos saludables, el avance de la tecnología (Diplock, Aggott y Ashwell, 1999; Hasler y Brown, 2009), el mercado de los alimentos funcionales es un nicho fértil para la explotación comercial y una interesante área para la innovación.

1.4. Alimentos fermentados

La mayor parte de las frutas y verduras se consumen en estado fresco o con un procesamiento industrial mínimo. En estas condiciones están expuestas al rápido deterioro por causa de microorganismos, y en algunos casos a la contaminación por patógenos. Para prevenir estos procesos se recurre a técnicas tales como la cocción, congelamiento, pasteurización y el uso de aditivos químicos. Estas opciones garantizan la seguridad de los alimentos, pero pueden ocasionar cambios indeseables en sus características sensoriales y nutricionales (Rehman, Islam y Shah, 2003; Zhang y Hamazu, 2004). El contenido, actividad, composición y biodisponibilidad de antioxidantes se ven afectados por estos procedimientos (Podsdek, 2007).

La fermentación es una de las técnicas más antiguas utilizadas para preservar alimentos, especialmente importante antes de la refrigeración (Swain *et al.*, 2014). Es una técnica simple, poco costosa y efectiva no sólo para preservar la vida útil de frutas y verduras por largo tiempo, sino que incrementa el contenido de nutrientes tales como antioxidantes, vitaminas y

minerales, elimina toxinas presentes naturalmente en las plantas, mejora la digestibilidad, incorpora sabores y aromas agradables al alimento (Montet, Ray y Zakhia-Rozis, 2014; Swain *et al.*, 2014; Urbonaviciene *et al.*, 2015). Otro de sus beneficios es que los convierte en vehículos de BAL beneficiosas, que se incorporan a la microbiota intestinal mejorando el estado de salud. Los jugos de tomate, zanahoria, repollo, alcaucil son especialmente efectivos como sustratos no lácteos para la proliferación de bacterias probióticas (Di Cagno *et al.*, 2013).

La mayoría de los vegetales pueden ser fermentados por BAL (Wiander y Korhonen, 2011). Los alimentos fermentados forman parte de la herencia cultural de múltiples comunidades alrededor del mundo (Di Cagno *et al.*, 2013). Algunos ejemplos de alimentos tradicionales elaboradas con esta técnica se pueden encontrar en la **tabla 1**.

Producto	Ingredientes principales	Principales bacterias ácido lácticas involucradas	País
Chucrut	Repollo, sal	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Europa, EEUU
Pepinos	Pepinos, vinagre, sal	<i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>L. plantarum</i>	EEUU, Asia
Alcaparras	Alcaparras, agua, sal	<i>L. plantarum</i> , <i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Lactobacillus paraplantarum</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>P. pentosaceus</i>	Países mediterráneos
Kimchi	Repollo, rabanito, sal, especias y otros vegetales (jengibre, pimiento, ajo, cebolla)	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc kimchii</i> , <i>Leuconostoc citreum</i> , <i>Leuconostoc gasicomitatum</i> , <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus maltaromicus</i> , <i>Lactobacillus bavaricus</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Weissella confusa</i>	Korea
Dhamuoi	Repollo y otros vegetales	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>L. plantarum</i>	Vietnam
Burong mustala	Mostaza	<i>L. brevis</i> , <i>Pediococcus</i> sp.	Filipinas
Dakguadong	Hoja de mostaza, sal	<i>L. plantarum</i>	Tailandia
Gundruk	Repollos locales, hojas de mostaza, hojas de coliflor	<i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> , <i>Leuc. pseudoplantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>P. pentosaceus</i>	Himalaya oriental
Sinki	Raíces de rabanito	<i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuconostoc fallax</i>	Himalaya oriental
Khalpi	Pepinos	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuc. fallax</i> , <i>Pediococcus</i> sp.	Himalaya oriental
Pak-Gard-Dong	Hojas de mostaza	<i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i>	Tailandia
Turşu	Pepinos, repollo, tomates verdes, pimientos verdes y otros vegetales	<i>L. plantarum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>L. brevis</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>E. faecalis</i>	Turquía
Şalgam	Zanahorias negras/violetas, nabo, harina de bulgur, masa fermentada, sal y agua	<i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i>	Turquía
Hardaliye	Jugo de uvas rojas, semillas de mostaza negra	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>L. caseipseudoplantarum</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. acetotolerans</i> , <i>L. sanfranciscensis</i>	Turquía
Jiang-gua	Pepinos, sal, azúcar, vinagre, salsa de soja	<i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Weissella hellenica</i> , <i>Weissella cibaria</i>	República de China

Tabla 1. Productos fermentados tradicionales y emergentes a base de vegetales y frutas, producidos alrededor del mundo. Fuente: Di Cagno et al. (2013).

1.5. Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Las BAL son un grupo de microorganismos que fermentan carbohidratos principalmente obteniendo como producto ácido láctico. Son microorganismos Gram (+), con forma de cocos o bacilos de longitudes variables e inmóviles, no esporulantes, anaerobios facultativos y catalasa negativos. Se pueden dividir en dos grupos principales: las homofermentativas, que fermentan todo el azúcar a ácido láctico por la vía glucolítica, y las heterofermentativas, que fermentan la glucosa por la vía del 6-fosfogluconato/fosfocetosa dando, además del ácido láctico, etanol, acetato y CO₂. Son generalmente reconocidas como seguras (GRAS, del inglés “generally recognized as safe”), y algunas cepas son consideradas probióticos, debido a sus efectos beneficiosos en el organismo luego de ser consumidas (Montet, Ray y Zakhia-Rozis, 2014; Urbonaviciene *et al.*, 2015; Bintsis, 2018). Entre sus efectos se cuentan la reducción del nivel de colesterol en sangre, estimular la respuesta inmune y la prevención de la formación de tumores (Montet, Ray y Zakhia-Rozis, 2014).

1.5.1. Las BAL en la elaboración de alimentos fermentados

La población microbiana presente en frutas y vegetales oscila entre 5 y 7 log UFC g⁻¹, de las cuales 2-4 log UFC g⁻¹ son BAL. Las principales especies pertenecen a los géneros *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Weisella*. En la **tabla 2** se observan algunos alimentos fermentados tradicionales y las especies de BAL relacionadas con su producción (Di Cagno *et al.*, 2013).

La fermentación láctica de la matriz ocurre cuando se dan las condiciones favorables de temperatura, actividad de agua, concentración de sales y anaerobiosis. Normalmente, las bacterias Gram negativas son inhibidas durante la etapa inicial de la fermentación (Di Cagno *et al.*, 2013).

Microorganismo	Matriz alimenticia	Actividad funcional
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Pickles japoneses	Efecto inmunoestimulante
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MP12; <i>Lactobacillus plantarum</i> LAP6	Repollo encurtido	Adhesión en células epiteliales de ratón; inhibición de bacterias patógenas (<i>Salmonella</i>)
<i>L. plantarum</i> IB2	Vegetales fermentados étnicos de Asia	Actividad antimicrobiana contra <i>S. aureus</i>
<i>L. plantarum</i>	Frutas y vegetales crudos varios	Estimulación de inmunomediadores, adhesión a células intestinales humanas Caco-2, inhibición de <i>Escherichia coli</i> y <i>Bacillus megaterium</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Frutas y vegetales crudos y fermentados varios	Crecimiento en presencia de sales biliares, eliminación de colesterol del medio de cultivo
<i>L. plantarum</i> c16, c19	Aceitunas	Crecimiento en presencia de sales biliares, adhesión a células IPEC-J2, inhibición de <i>E. coli</i>

Tabla 2. Actividades funcionales de BAL autóctonas, aisladas de vegetales crudos y fermentados.
Fuente: Di Cagno et al., 2013.

Además de los beneficios mencionados anteriormente, la fermentación por BAL mejora la seguridad del alimento inhibiendo el crecimiento y la producción de toxinas de microorganismos patógenos. Esto se debe a una variedad de factores: competencia por los nutrientes disponibles, producción de ácidos orgánicos y el subsecuente descenso de pH, disminución del potencial redox y la secreción de otros metabolitos (dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno y diacetil), compuestos antifúngicos como ácidos grasos y ácido feniláctico, bacteriocinas y antibióticos (Karovičová y Kohajdová, 2003; Fan & Hansen, 2012).

1.5.1.1. BAL como cultivos iniciadores de la fermentación

La fermentación espontánea resulta de la competencia entre microorganismos autóctonos y contaminantes, y presenta desventajas como un elevado riesgo de fermentaciones anómalas, inadecuada inhibición de los microorganismos patógenos y deteriorantes, y alteraciones en características físicas, organolépticas y nutricionales del alimento (Di Cagno et al., 2011; Urbonaviciene et al., 2015). Una alternativa es el “back

slopping”, donde el vegetal a fermentar se inocula con una porción del alimento ya fermentado (salmuera), en el cual han proliferado las BAL. No obstante, la práctica más recomendada para la fermentación es la inoculación con bacterias seleccionadas (“cultivos iniciadores” o “starters”); ya que se inhiben rápidamente los microorganismos no deseados y se alcanza una mayor consistencia en las propiedades del alimento (Urbonaviciene *et al.*, 2015).

Los cultivos iniciadores para la fermentación controlada pueden ser autóctonos, aislados a partir del mismo material que se desea fermentar, o alóctonos, provenientes de diversos orígenes y utilizados para fermentar cualquier tipo de matriz. Los starters disponibles comercialmente son un ejemplo de cultivos alóctonos (Di Cagno *et al.*, 2013). No obstante, la inoculación con cepas autóctonas es recomendada por sobre el uso de cepas comerciales, ya que se adaptan rápidamente a la matriz a fermentar, mejorando el tiempo de preservación, las propiedades sensoriales y nutricionales del alimento (Urbonaviciene *et al.*, 2015). Las BAL autóctonas explotan al máximo el potencial de frutas y vegetales durante la fermentación, ya que están adaptadas a las condiciones específicas de dicha matriz (Di Cagno *et al.*, 2013).

1.5.1.2. Géneros *Leuconostoc* y *Lactiplantibacillus*

Los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* conforman una pequeña parte de la microbiota autóctona de frutas y vegetales, no obstante, predominan durante la fermentación espontánea de los mismos (Di Cagno *et al.*, 2013). *Lactobacillus plantarum* es la especie más utilizada en la fermentación de productos alimenticios de origen vegetal (Hur *et al.*, 2014), mientras que *Leuconostoc mesenteroides* es la especie heterofermentativa más utilizada en la fermentación de productos lácteos (Endo, Maeno y Liu, 2022). Recientemente, *Lactobacillus* fue reclasificado en 25 nuevos géneros, que entre estos se encuentra a *Lactiplantibacillus* (Zheng *et al.*, 2020).

Las especies de *Lactiplantibacillus* son bacilos Gram positivos, no esporulantes, homofermentativos/heterofermentativos facultativos y sésiles (Zheng *et al.*, 2020). Fermentan un amplio rango de carbohidratos y metabolizan ácidos fenólicos a través de actividades esterasa, decarboxilasa y reductasa. Este género está presente en numerosos alimentos fermentados, pero también se encuentran en hábitats asociados a insectos o como residentes temporarios de la microbiota intestinal de vertebrados (Zheng *et al.*, 2020).

Por otro lado, las especies del género *Leuconostoc* se caracterizan por presentar forma de cocos o cocobacilos dispuestos en pares o cadenas, son mesófilos (temperatura óptima: 25°C), sésiles, aerotolerantes y heterofermentativos obligados. Se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente, se han aislado a partir de materia vegetal, muestras clínicas humanas y alimentos lácteos fermentados. Este género es altamente heterogéneo, actualmente comprende 13 especies (Endo, Maeno y Liu, 2022).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

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

2.2. Objetivos específicos

- Establecer protocolos de fermentación controlada, combinaciones de cepas y condiciones físico-químicas que logren la producción de un alimento funcional.
- Evaluar la viabilidad de las cepas de BAL seleccionadas como cultivo iniciador.
- Evaluar la calidad microbiológica de los vegetales fermentados.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los vegetales fermentados.

3. METODOLOGÍA

Se utilizaron los siguientes microorganismos, pertenecientes al Cepario del Laboratorio de Biotecnología Bacteriana: *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* RCTw1.1 (MT702992), *Ln. mesenteroides* ssp. *dextranicum* RBTw100 (MT178435), *Lactiplantibacillus argentoratensis* RBTw102 (MT178436), *L. plantarum* AKTw180 (MT178440) y *L. pentosus* AKTw332 (MT178445). Los números entre paréntesis corresponden al número de acceso al GenBank.

Previamente, estas cepas se aislaron a partir de la fermentación espontánea de brasicáceas y se seleccionaron por sus propiedades funcionales y tecnológicas, tales como: tolerancia a la acidez y salinidad, tolerancia a polifenoles, producción de exopolisacáridos, actividad pectinasa y tanasa (Parada *et al.*, 2023). Si bien estas bacterias son consideradas GRAS, se determinó la ausencia de factores de virulencia y rasgos negativos, evaluando la actividad gelatinasa y hemolítica, además de la producción de aminas biógenas (cadaverina y tiramina).

3.1 Preparación del vegetal fermentado

3.1.1 Fermentación espontánea

Se utilizaron tres vegetales: repollo blanco, repollo morado (*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata* (L.) Metz.) y akusai (*Brassica rapa* L. var. *glabra* Regel). Se cortó cada vegetal en tiras finas de aprox. 2 mm de ancho. El vegetal procesado se mezcló uniformemente con sal de mesa (NaCl, 3% m/m) y se presionó con pilón para facilitar la liberación de líquidos de los tejidos vegetales y favorecer el desarrollo de microorganismos. Luego se incubó a 18 °C durante 30 días. Los vegetales se fermentaron de forma individual y por duplicado.

3.1.2 Fermentación controlada

El material vegetal se procesó y mezcló con NaCl como se indicó en el punto anterior. Previo a la inoculación, se calentó a 120 °C durante 3 min para reducir la carga microbiana epífita del vegetal, luego se lo dejó enfriar a temperatura ambiente.

La inoculación con los microorganismos seleccionados se realizó en dos etapas. La primera inoculación se realizó al inicio del ensayo, utilizando las especies pertenecientes al género *Leuconostoc* (5 log UFC/g de cada cepa). La segunda inoculación se realizó en el día 3, cuando el pH del vegetal alcanzó valores próximos a 4, utilizando las cepas de *Lactiplantibacillus* en la misma concentración, según lo sugerido por Jagannath, Raju y Bawa (2012). Después de cada inoculación, el material vegetal se homogenizó utilizando una varilla de vidrio. El proceso se llevó a cabo a 18 °C durante 30 días. Los vegetales se fermentaron de forma individual y por duplicado.

3.2 Parámetros de la fermentación

El pH de cada una de las muestras se midió con pH-metro modelo Orion 410 al inicio del ensayo y en los días 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30. Antes de la lectura, se homogeneizó el material dentro del frasco con varilla de vidrio.

Al inicio del ensayo y en los días 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 se realizó el recuento de BAL en todos los vegetales en ambos tipos de fermentación. Además, se realizó un recuento de aerobios totales, coliformes totales y levaduras al inicio del ensayo, al día 30 y luego de 90 días de conservación a 4 °C. Se prepararon diluciones seriadas de cada vegetal en ambos tipos de fermentación y se sembraron en los medios de cultivo correspondientes. Luego, las placas se incubaron a 30 °C durante 24-48 h. Los resultados se expresaron en Unidades Formadoras de Colonias por gramo de la muestra (UFC/g).

A continuación, se describen los medios de cultivo utilizados en este ensayo:

- Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) para recuento de BAL. Se le adicionó nistatina (10 µg/ml) y ácido nalidíxico (20 µg/ml) para inhibir el crecimiento de levaduras y hongos, y de bacterias Gram negativas, respectivamente.
- Agar tripticasa de soja (TS) para recuento de aerobios totales.
- Agar Infusión Cerebro Corazón (Brain Heart Infusion, BHI) para recuento de levaduras. Se le adicionó vancomicina (30 µg/ml), cefalotina (10 µg/ml) y ceftazidima (10 µg/ml) para inhibir el crecimiento de bacterias.
- Agar Levine para recuento de coliformes totales. Se suplementó con nistatina (10 µg/ml).

3.3 Preparación de extractos

Se tomaron muestras de cada frasco al inicio del ensayo y en los días 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30. Previamente a la toma de muestras, se homogeneizó el contenido de cada frasco. Las muestras de los vegetales se llevaron a estufa por 72 h a 37 °C para su secado. Luego, se trituró el material utilizando un mortero. Se prepararon dos tipos de extractos: acuosos y metanólicos.

Extractos acuosos: se prepararon utilizando como solvente agua destilada estéril (dilución 1:10 p/v). Las mezclas se homogeneizaron en vórtex durante 60 s y se llevaron a autoclave durante 15 min a 105 °C. Luego los extractos se centrifugaron por 10 min a 13.000 x g y los sobrenadantes se conservaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

Extractos metanólicos: se prepararon utilizando como solvente metanol (dilución 1:10 p/v). Las mezclas se homogeneizaron en vórtex durante 60 s y se mantuvieron durante 3 h a 37 °C, agitando cada 15 min. Posteriormente, se centrifugaron durante 10 min a 13.000 x g y se conservaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

3.4 Medición de antioxidantes

3.4.1 Contenido Total de Fenoles (CTF)

El CTF se determinó utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu según el método descrito por Agbor, Vinson y Donnelly (2014), con algunas modificaciones. Se mezcló 50 μ l de la muestra con 1 ml de Na_2CO_3 (1% m/v) y se dejó reposar durante 10 min. Además, en un tubo se colocó Na_2CO_3 para utilizar como blanco. Transcurrido el tiempo necesario, se agregó 100 μ l de reactivo de Folin-Ciocalteu y se homogeneizó en vórtex durante 1 min. Luego, se dejó reposar durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente y finalmente se determinó la absorbancia en espectrofotómetro a 750 nm. Los resultados se compararon con una curva de calibración construida con ácido gálico (concentración mínima: 25 μ g/ml; concentración máxima: 800 μ g/ml) y expresados en mg equivalentes a ácido gálico por cada 100 g de peso seco del vegetal (mg EAG/100 g PS).

3.4.2 Actividad antioxidante según el método DPPH

La capacidad de captar radicales libres se evaluó mediante DPPH (1, 1-difenil-2-picrilhidracil) según el método descrito por Chen *et al.* (2005) con algunas modificaciones. En primer lugar, se construyó una curva de calibración con ácido ascórbico (concentración mínima: 0,0106 mg/ml; concentración máxima: 0,176 mg/ml) para utilizar como estándar. Luego se llevó a cabo la reacción con los extractos de brasicáceas. Se tomó 100 μ l de la muestra y se mezcló con 900 μ l de una solución de DPPH (100 μ M). Las mezclas se homogeneizaron y se mantuvieron en oscuridad durante 30 min. Finalmente se determinó la absorbancia a 515 nm y los resultados se expresaron en mg equivalente a ácido ascórbico por cada 100 g de peso seco del vegetal (mg EAA/100 g PS).

3.4.3 Actividad antioxidante según el método CUPRAC

La capacidad antioxidante total se evaluó mediante el método descrito por Gouda y Amin (2010), con algunas modificaciones. Se preparó una curva de calibración con ácido ascórbico (concentración mínima: 0,0106 mg/ml; concentración máxima: 0,176 mg/ml) para utilizar como estándar. Una alícuota de 100 µl de muestra se mezcló con 900 µl de la mezcla de reacción, compuesta por 2 ml de una solución de neocuproína (5 mM), 3 ml de buffer acetato de sodio (0,05 M, pH 5,0) y 1 ml de CuCl₂ (0,01 M). Las mezclas se homogeneizaron y se incubaron en oscuridad durante 1 h. Luego, se midió la absorbancia a 450 nm y los resultados se expresaron en mg equivalente a ácido ascórbico por cada 100 g de peso seco del vegetal (mg EAA/100 g PS).

3.5. Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Para establecer diferencias significativas entre las medias se empleó el análisis de la varianza (ANOVA), comparaciones subsecuentes se realizaron empleando el test de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el software estadístico InfoStat para Windows.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Parámetros de fermentación

4.1.1 Recuentos de BAL y pH

Los recuentos de BAL y la variación de pH a lo largo del ensayo se encuentran en la **figura 4**

4. La fermentación espontánea y controlada exhibieron un comportamiento similar en los diferentes vegetales con algunas diferencias. En la fermentación espontánea, se determinaron recuentos de BAL de $\approx 3,5$ log UFC/g al inicio del proceso. Estos valores concuerdan con los mencionados por Di Cagno *et al.* (2013), los cuales describen que las BAL conforman una pequeña parte de la microbiota autóctona de los vegetales y frutas, entre 2 a

4 log UFC/g. Posteriormente, en los tres vegetales, el recuento de BAL se incrementó rápidamente y después de tres días alcanzó un nivel máximo de $\approx 7,8$ log UFC/g. Luego, se observa una declinación gradual de la población de BAL hasta el final del ensayo, a medida que los sustratos fermentables se agotan. El pH se reduce y los metabolitos inhibidores se

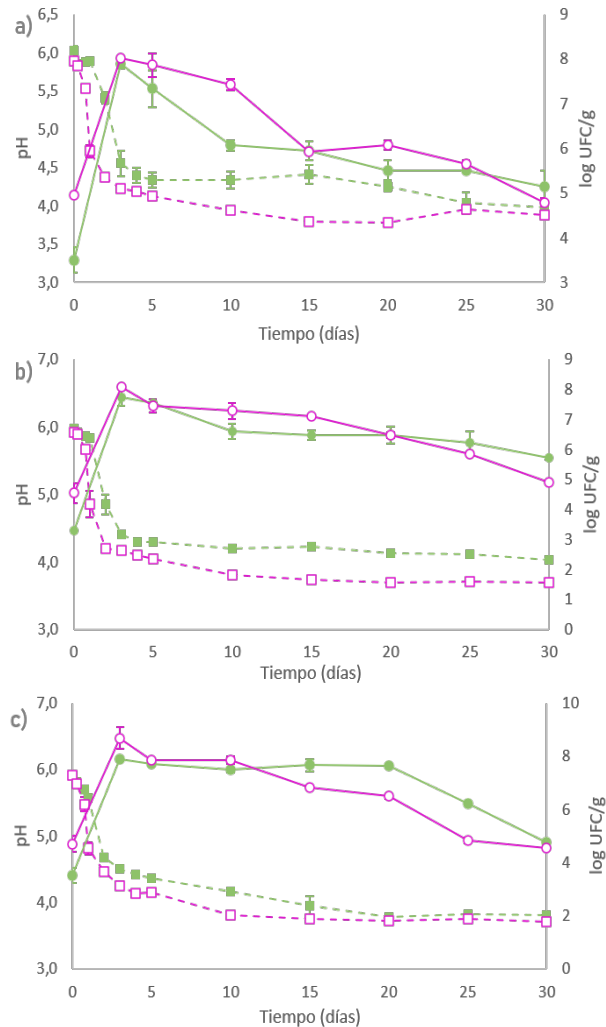


Figura 4. Variación de pH (cuadrados) y recuentos de BAL (círculos) a lo largo del ensayo para las muestras de akusai (a), repollo blanco (b) y repollo colorado (c), durante la fermentación espontánea (verde) y controlada (rosa). Las barras representan el error estándar.

acumulan, provocando que la tasa de reproducción de las bacterias sea menor que la tasa de muerte. Estos resultados son compatibles con los obtenidos por Hunaefi, Akumo y Smetanska (2013).

En la fermentación controlada, los microorganismos epífitos se redujeron previamente a través de un tratamiento térmico. Luego se realizó una inoculación en dos etapas (≈ 5 log UFC/g), primero con bacterias seleccionadas pertenecientes al género *Leuconostoc* (día 0) y luego con cepas de *Lactiplantibacillus* spp. (día 3). Al igual que la fermentación espontánea, en el día 3 del proceso controlado se observó un incremento de BAL $> 8,0$ log UFC/g. Luego, se observaron disminuciones graduales de las BAL en los tres vegetales a medida que avanzó el proceso.

Una de las desventajas de la fermentación espontánea es la prolongada etapa de iniciación, en la cual implica una producción baja de ácidos orgánicos por parte de las BAL. El pH es uno de los factores más importantes en la fermentación de alimentos, que influye tanto en el crecimiento de microorganismos como en la estabilidad de ciertos fitoquímicos como las antocianinas (Hur *et al.*, 2014). En el presente trabajo se puede observar que el pH inicial no exhibió diferencias significativas en los dos tipos de fermentación para cada vegetal ($p > 0,05$). Mientras que, en el día 1 del proceso el pH descendió significativamente solo en la fermentación controlada ($p \leq 0,05$). Esto es consistente con los resultados de otros autores (Jagannath, Raju y Bawa, 2012; Di Cagno *et al.*, 2013; Hur *et al.*, 2014) y contribuye a la seguridad y preservación del alimento. En la fermentación controlada, como se mencionó anteriormente, se añadió un primer cultivo iniciador conformado por cepas pertenecientes al género *Leuconostoc* en el día 0. Estudios previos mencionan un descenso significativo del pH cuando *Ln. mesenteroides* se utilizó como cultivo iniciador en fermentaciones vegetales (Gardner *et al.*, 2001; Jagannath, Raju y Bawa, 2012). En la fermentación espontánea, por el contrario, los resultados son inconsistentes (Jagannath, Raju y Bawa, 2012). A diferencia del

proceso espontáneo, las fermentaciones controladas alcanzaron un valor de pH < 4 a los 10 días y se mantuvieron estable hasta el final del ensayo ($p > 0,05$). Esto indicaría que la mayoría de los carbohidratos se han metabolizado y en consecuencia se podría dar por terminado en ese periodo.

Al final de las fermentaciones espontánea y controlada, los valores de pH obtenidos en akusai y repollo colorado no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) (**figura 4a y 4c**). Mientras que, en repollo blanco se determinaron diferencias entre los mismos, alcanzando un menor valor del pH en el proceso controlado ($p \leq 0,05$) (**figura 4b**).

4.1.2. Análisis microbiológico

Matriz y tipo de fermentación	Día 0	Día 30	Día 90
	(log UFC/g)		
AK espontánea	6,69 ± 0,11	6,49 ± 0,07	<1
AK controlada	6,24 ± 0,68	<1	<1
RB espontánea	3,65 ± 0,07	6,49 ± 0,02	<1
RB controlada	4,65 ± 0,11	4,37 ± 0,17	<1
RC espontánea	4,03 ± 0,11	5,42 ± 0,03	<1
RC controlada	4,64 ± 0,20	<1	<1

Tabla 3. Recuentos de aerobios para las fermentaciones de akusai (AK), repollo blanco (RB) y repollo colorado (RC) a los días 0, 30 y 90 del ensayo. Los valores están expresados en UFC/g.

En las fermentaciones espontáneas de repollo blanco y colorado se observó un incremento en la población de aerobios totales desde el día 0 al 30, mientras que se observó un comportamiento opuesto en akusai, así como en las fermentaciones controladas de los tres vegetales. Luego de 90 días de conservación a 4 °C, se determinó un crecimiento de aerobios despreciable en todos los productos fermentados por ambos tipos de procesos (<1 log UFC/g) (**tabla 3**). Estos resultados contrastan con lo obtenido por Seseña Prieto (2007), quien observó una evolución paralela de los aerobios totales y de BAL durante la fermentación controlada de berenjenas. Los recuentos de aerobios totales tienden a ser mayores que los de coliformes y

levaduras (**tablas 4 y 5**), y descienden más lentamente durante los periodos estudiados. Las BAL son aerobios facultativos, por lo tanto, también formarían parte de las poblaciones de aerobios totales observadas.

En el caso de los recuentos de coliformes totales, se observaron valores más elevados al inicio de ambos tipos de procesos (**tabla 4**). Luego, la población disminuye al finalizar el ensayo y estos se mantienen estables durante el periodo de almacenamiento a 5 °C (< 1 log UFC/g). Estudios previos han demostrado que un rápido descenso de pH en la matriz favorece a la inhibición de estos microorganismos (Di Cagno *et al.*, 2013). Los recuentos de este grupo de microorganismos en los alimentos se utilizan como indicador de una higiene inadecuada, condiciones insalubres o contaminación posterior a las etapas del proceso (Ghosh, 2021).

Matriz y tipo de fermentación	Día 0	Día 30	Día 90
	(log UFC/g)		
AK espontánea	5,65 ± 0,06	<1	<1
AK controlada	5,51 ± 0,03	<1	<1
RB espontánea	3,46 ± 0,09	<1	<1
RB controlada	4,51 ± 0,07	<1	<1
RC espontánea	3,85±0,03	<1	<1
RC controlada	4,77±0,11	<1	<1

Tabla 4. Recuentos de coliformes para las fermentaciones de akusai (AK), repollo blanco (RB) y repollo colorado (RC) a los días 0, 30 y 90 del ensayo. Los valores están expresados en UFC/g.

Por otro lado, se evaluó el recuento de levaduras en los fermentos durante los tres periodos estudiados (**tabla 5**). En los vegetales fermentados de manera controlada se detectó un desarrollo despreciable de levaduras en los tres tiempos de muestreo (<1 log UFC/g). Mientras que, en el proceso espontáneo del repollo colorado se detectó 2,77 log UFC/g al inicio de la fermentación (día 0), y en los restantes muestreos los valores de recuentos se redujeron notablemente (<1 log UFC/g). Con respecto al akusai, se determinó un desarrollo despreciable de levaduras antes y después de finalizar el proceso espontáneo (<1 log UFC/g),

no obstante, las mismas proliferaron durante el período de almacenamiento alcanzando valores de 3 log UFC/g. Por último, en el repollo blanco fermentado espontáneamente se detectaron recuentos de levaduras despreciable en los tres tiempos evaluados (<1 log UFC/g). Las levaduras proliferan principalmente durante la fermentación secundaria y son capaces de utilizar el ácido láctico formado en las etapas anteriores, lo que ocasiona un aumento del pH de la matriz, favoreciéndose el desarrollo de otros microorganismos también indeseables (Di Cagno *et al.*, 2016). Prachyakij *et al.* (2008) determinaron que al utilizar la especie *L. plantarum* para la fermentación de vegetales disminuía la probabilidad que se produzca un deterioro por hongos y levaduras en el mismo. Sin bien, en el segundo cultivo iniciador estaban presente tres cepas del género *Lactiplantibacillus*, aun sería necesario realizar más investigaciones para determinar por qué este inóculo exhibió un mayor efecto inhibitor sobre las levaduras.

Matriz y tipo de fermentación	Día 0	Día 30	Día 90
	(log UFC/g)		
AK espontánea	<1	<1	3,00 ± 0,00
AK controlada	<1	<1	<1
RB espontánea	<1	<1	<1
RB controlada	<1	<1	<1
RC espontánea	2,77 ± 0,10	<1	<1
RC controlada	<1	<1	<1

Tabla 5. Recuentos de levaduras para las fermentaciones de akusai (AK), repollo blanco (RB) y repollo colorado (RC) a los días 0, 30 y 90 del ensayo. Los valores están expresados en UFC/g.

4.2. Medición de Antioxidantes

4.2.1 Contenido Total de Fenoles

Los fenoles son uno de los principales grupos de compuestos antioxidantes en los extractos vegetales, y deben su actividad antioxidante a sus propiedades como donadores de electrones, que les permiten secuestrar ROS, produciendo radicales estables. En estudios *in*

in vitro, los compuestos fenólicos demostraron mayor actividad antioxidante que las vitaminas y carotenoides (Podsdek, 2007). La variación en el CTF de las muestras a lo largo del ensayo se puede observar en la **figura 5**.

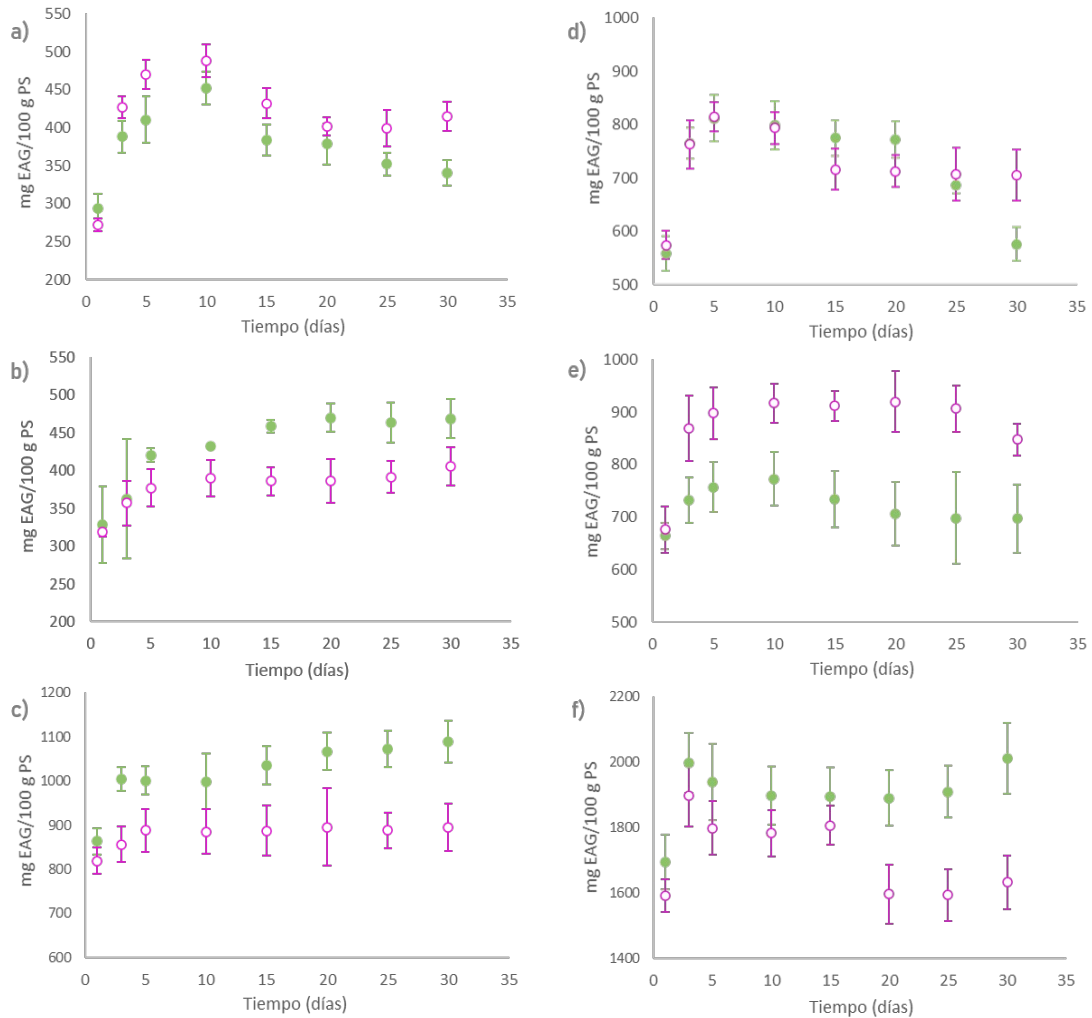


Figura 5. Contenido de fenoles totales en extractos metanólicos (a, b, c) y acuosos (d, e, f) de akusai (a, d), repollo blanco (b, e) y repollo colorado (c, f) durante fermentación espontánea (●) y controlada (○). Las barras representan el error estándar.

En general se observó un patrón inconsistente de comportamientos entre los diferentes vegetales, tipo de fermentación y extractos. No obstante, en todos los casos se observa un rápido incremento en el CTF en los primeros días, alcanzando mayores valores entre el día 5 y 10 (**figura 5**), coincidiendo con el periodo donde se determinó una mayor población de BAL

(**figura 4**). Posteriormente, en la última etapa de la fermentación los valores de CTF disminuyeron o se estabilizaron, dependiendo cada caso particular.

Se determinó mayor CTF en los extractos acuosos que en los metanólicos, prácticamente duplicando los valores alcanzados en éstos últimos, independientemente del vegetal y tipo de fermentación. Los compuestos fenólicos son polares y su extracción depende de la polaridad del solvente. Esto explica la mayor eficiencia del agua para la extracción de estos compuestos (Hosseini *et al.*, 2016). Resultados similares fueron reportados por Sun, Chou y Yu (2009).

En la fermentación espontánea, los extractos de akusai exhibieron un incremento significativo del CTF hasta el día 10 del ensayo ($p \leq 0,05$), luego los valores descendieron gradualmente hasta el día 30 (figura 5a y 5b). En este proceso, los valores de CTF de akusai iniciales y finales no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$). Por el contrario, en la fermentación controlada, ambos extractos de akusai mostraron un aumento significativo del CTF al comparar los resultados del inicio y final del ensayo ($p \leq 0,05$). No obstante, todas las muestras obtenidas durante la fermentación controlada, luego del incremento inicial significativo de los valores de CTF, también exhibieron un descenso en el día 15 y luego se mantuvieron estables hasta el final del ensayo (**figuras 5a y 5d**). En ambos extractos se observó un CTF significativamente mayor ($p < 0,05$) en la fermentación controlada que en la espontánea.

En la fermentación espontánea de repollo blanco, los extractos metanólicos exhibieron un aumento significativo del CTF hasta el día 15 del ensayo ($p \leq 0,05$), luego los valores se mantuvieron constante hasta finalizar la experiencia. Mientras que, en la fermentación controlada, los extractos metanólicos mostraron un aumento de CTF al principio del ensayo (día 5) y luego se mantienen estables hasta el día 30 ($p > 0,05$). En los extractos metanólicos se obtuvieron valores de CTF significativamente mayores en la fermentación espontánea que el proceso controlado ($p \leq 0,05$) (**figura 5b**). Por otro lado, en los extractos acuosos de repollo

blanco se determinó un incremento inicial de los valores de CTF en el proceso controlado y espontáneo. Luego, los valores de CTF se mantienen constante hasta finalizar el proceso controlado, mientras que se observa un leve descenso en la fermentación natural ($p \leq 0,05$). En los extractos acuosos, la fermentación controlada alcanzó mayores valores del CTF que el proceso espontáneo ($p \leq 0,05$) (**figura 5e**).

En general, los extractos de repollo colorado duplicaron el valor del CTF en comparación con el repollo blanco y akusai. Algunos autores han reportado una proporción hasta seis veces mayor de fenoles en repollo colorado comparado con el repollo blanco (Podsdek *et al.*, 2006; Hur *et al.*, 2014). Parte de estos compuestos están representados por las antocianinas, un grupo de compuestos dentro de los flavonoides que le dan al repollo su color violáceo. El contenido total de antocianinas en el repollo colorado alcanza los 25 mg/100 g o hasta 51,2 mg/100 g para las antocianinas liberadas luego de la hidrólisis ácida (Podsdek, 2007). Los extractos metanólicos de repollo colorado mostraron un leve incremento del CTF durante el primer día ($p \leq 0,05$) y luego se mantuvieron relativamente estables hasta el final del proceso en la fermentación espontánea. Mientras que, en la fermentación controlada los valores de CTF mostraron una tendencia ascendente pero no significativa ($p > 0,05$) (**figura 5c**). Sólo en la fermentación espontánea, los extractos metanólicos mostraron un aumento significativo ($p < 0,05$) de los valores de CTF al comparar el inicio y el final del ensayo. Luego, los extractos acuosos exhibieron un comportamiento diferente entre ambas fermentaciones (**figura 5f**). Si bien, en la fermentación controlada y espontánea se observó un incremento inicial del CTF, luego se determinó un descenso significativo de los valores a partir del día 15 en el primer caso, mientras que en el segundo los valores se mantuvieron relativamente estable hasta el final del ensayo. En la fermentación espontánea, ambos extractos exhibieron mayor valor del CTF que el proceso controlado (**figuras 5e y 5f**). Hunaefi, Akumo y Smetanska (2013) observaron una tendencia similar, donde el CTF de las muestras sometidas a fermentación

espontánea resultó mayor que el de las muestras inoculadas. Según estos autores, el superior número de bacterias en la fermentación controlada habría resultado en una degradación mayor de los compuestos fenólicos del medio. Sin embargo, en el presente trabajo las diferencias en la población de BAL fueron menores que las reportadas por estos autores. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que el aumento de ácidos orgánicos e hidrólisis enzimática de las BAL durante la fermentación podría estar involucrada en la degradación de los compuestos fenólicos. La extensión del proceso depende del tipo de fermentación y vegetal utilizado. Los compuestos fenólicos vegetales presentan una gran diversidad estructural; sin embargo, se unen principalmente a otras moléculas como los azúcares formando glucósidos. En las plantas, los fenoles se encuentran tanto en forma soluble como asociados a la pared celular (Hur *et al.*, 2014). Estos polifenoles se pueden transformar durante la fermentación por la acción de las enzimas microbianas dando lugar a agliconas que poseen mayor capacidad antioxidante (Hur *et al.*, 2014). Los cultivos iniciadores utilizados en este trabajo se seleccionaron por la actividad tanasa y pectinasa, entre otras propiedades tecnológicas. Las cepas de *L. plantarum* poseen actividad tanasa capaz de hidrolizar los enlaces éster presentes en los taninos hidrolizables, liberando poderosos compuestos antioxidantes como el ácido gálico y el pirogalol (Hur *et al.*, 2014). Además, las enzimas pectinolíticas pueden cambiar la textura de la col durante la fermentación (Seong *et al.*, 2016), lo que permite la liberación de compuestos fenólicos.

4.2.2 Actividad antioxidante según el método DPPH

La actividad antioxidante (AA) es la capacidad total de los antioxidantes para eliminar radicales libres de la célula y del alimento (Hur *et al.*, 2014). Los valores de la AA determinados por el método DPPH a lo largo del ensayo se pueden observar en la **figura 6**.

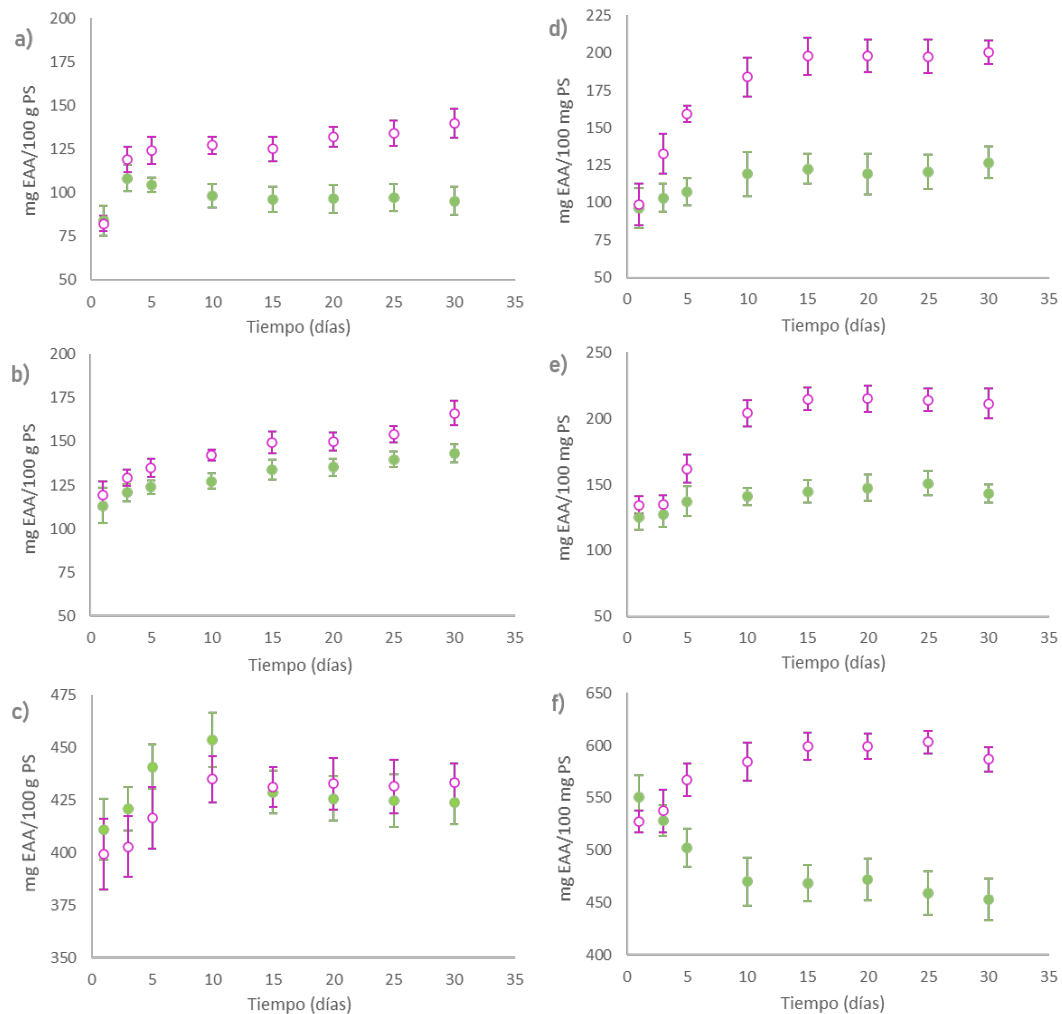


Figura 6. Actividad antioxidante según ensayo DPPH en extractos metanólicos (a, b, c) y acuosos (d, e, f) de akusai (a, d), repollo blanco (b, e) y repollo colorado (c, f) durante fermentación espontánea (●) y controlada (○). Las barras representan el error estándar.

En este ensayo los extractos acuosos mostraron valores de AA levemente mayores que los metanólicos, este comportamiento se observó en akusai, repollo blanco y colorado, independiente del tipo de fermentación.

En la fermentación controlada, los extractos metanólicos y acuosos de akusai exhibieron un incremento significativo de la AA durante los primeros cinco y diez días del ensayo, respectivamente ($p \leq 0,05$). Luego, los valores se mantuvieron estables en el extracto acuoso (**figura 6d**), mientras que se observó un leve incremento al final del ensayo en el extracto metanólico (**figura 6a**). En la fermentación espontánea de akusai, ambos extractos exhibieron un leve incremento no significativo durante el inicio del proceso, luego los valores se

mantuvieron estables hasta los 30 días ($p > 0,05$). En ambos extractos, sólo la fermentación controlada mostró un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de AA al comparar los valores iniciales y finales del ensayo. Por consiguiente, la fermentación controlada exhibió un mayor valor de la AA que la espontánea en ambos extractos ($p \leq 0,05$).

En el caso del repollo blanco, los extractos metanólicos mostraron un aumento significativo de la AA en ambos tipos de fermentación, al comparar los valores obtenidos al inicio y al final del ensayo ($p \leq 0,05$) (**figura 6b**). Mientras que, en los extractos acuosos de repollo blanco sólo se observó un incremento significativo de la AA durante la fermentación controlada ($p \leq 0,05$) (**figura 6e**). En ambos extractos, la AA alcanzada exhibió diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$), siendo mayor los valores en la fermentación controlada. Zubaidah *et al.* (2020), trabajaron con cepas de *L. plantarum* y *Ln. mesenteroides* y observaron un aumento en la AA de repollo blanco sometido a fermentación controlada.

En el repollo colorado se observó que la AA aproximadamente duplicó los valores correspondientes a akusai y repollo blanco. Esto se corresponde con los valores de CTF previamente mencionados. Upadhyay, Sehwaq y Singh (2016) observaron una actividad antioxidante mayor en repollo colorado que en repollo blanco. Sin embargo, no se observa un patrón consistente en la evolución de la AA durante los procesos de fermentación para ambos extractos (**figuras 6c vs 6f**). Los extractos metanólicos muestran un incremento rápido de los valores de AA hasta el día 10 ($p \leq 0,05$); luego, se observa un descenso en la fermentación espontánea, mientras que en la fermentación controlada los valores se mantienen estables hasta finalizar el proceso ($p > 0,05$) (**figura 6c**). No obstante, los extractos metanólicos no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0,05$). En el caso de los extractos acuosos, se observa un descenso significativo de la AA durante la fermentación espontánea ($p \leq 0,05$); mientras que en el proceso controlado se alcanzó un incremento relativamente constante hasta los 10 días ($p \leq 0,05$), luego los valores se mantienen constante (**figura 6f**). La

AA obtenida en los extractos acuosos de repollo colorado exhibieron diferencias significativas entre ambas fermentaciones, alcanzando mayores valores durante el proceso controlado ($p \leq 0,05$).

La AA total de los extractos vegetales no se puede atribuir únicamente al contenido de fenoles, ya que existen sinergias entre éstos y otros compuestos presentes en la matriz vegetal que pueden influir en dicha actividad. Por lo tanto, factores como el pH, la temperatura, el solvente, el contenido de agua, el tiempo de fermentación, la composición de la matriz y las condiciones de aerobiosis influyen en la AA. Las cepas de microorganismos utilizadas como cultivos iniciadores en la fermentación controlada también son un factor influyente. Además de incrementar la liberación de fenoles, las propias BAL producen mecanismos de defensa contra el daño oxidativo, que incluyen la formación de compuestos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que incrementan la neutralización de ROS. Las BAL promueven la producción de biomoléculas antioxidantes como los exopolisacáridos y exhiben actividad quelante de iones metálicos (Hur *et al.*, 2014).

Es importante tener en cuenta que, si bien el método DPPH es ampliamente utilizado en la determinación de capacidad antioxidante, una de sus limitaciones consiste en la superposición del espectro de absorbancia de este reactivo con el de compuestos tales como las antocianinas, que en el repollo colorado están presentes en abundancia. Esta característica puede interferir en el ensayo, dificultando la lectura de los resultados (Shahidi y Zhong, 2015). Por este motivo, trabajos previos recomiendan realizar las determinaciones de antioxidante en los alimentos por dos o más métodos (Apak *et al.*, 2016).

4.2.3 Actividad antioxidante según el método CUPRAC

El ensayo CUPRAC consiste en un método basado en la transferencia de electrones al igual que el ensayo DPPH (Apak *et al.*, 2016). Los valores de AA obtenidos a lo largo del ensayo mediante la técnica de CUPRAC se pueden observar en la **figura 7**. Mediante el ensayo CUPRAC se obtuvieron valores de AA superiores que con el método DPPH, en todos los casos (**figura 6 vs 7**). Estas variaciones están relacionadas con la capacidad de cada método; el CUPRAC mide simultáneamente los antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos de las muestras, mientras que el

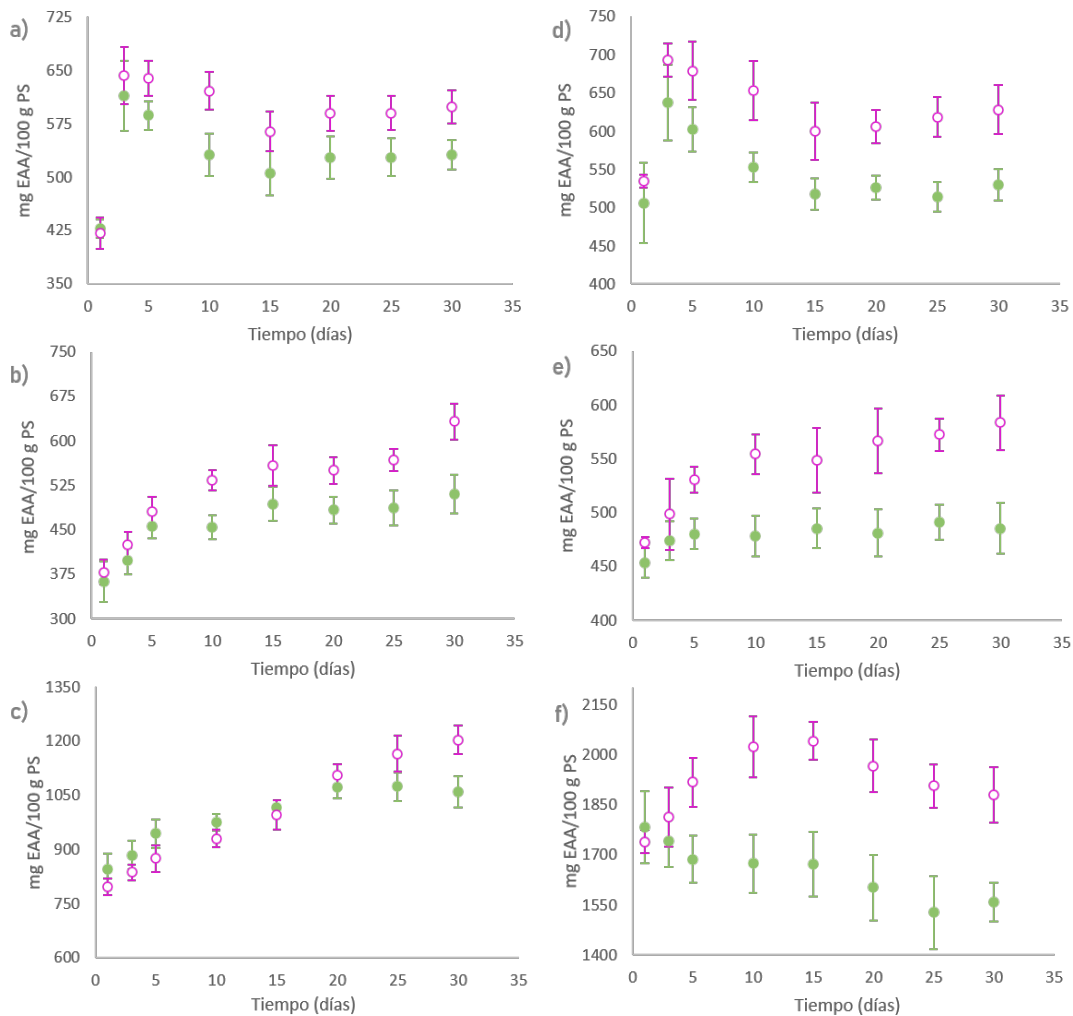


Figura 7. Actividad antioxidante según ensayo CUPRAC en extractos metanólicos (a, b, c) y acuosos (d, e, f) de akusai (a, d), repollo blanco (b, e) y repollo colorado (c, f) durante fermentación espontánea (●) y controlada (○). Las barras representan el error estándar.

ensayo DPPH solo detecta moléculas solubles en solventes orgánicos como los alcoholes (Apak *et al.*, 2016).

Se observaron variaciones de la evolución de la AA entre los distintos vegetales y extractos, no obstante, en la mayoría de los casos la fermentación controlada exhibió valores más altos que el proceso espontáneo ($p \leq 0,05$).

En ambos extractos de akusai, se exhibió un incremento significativo de AA hasta el día 3 y luego un descenso de los valores hasta el día 15 ($p \leq 0,05$). Posteriormente, los valores de AA se mantuvieron relativamente estable hasta finalizar ambos procesos. En ambos tipos de extractos, la fermentación controlada exhibió mayor AA al final del ensayo que el proceso espontáneo. En los extractos metanólicos se determinó un aumento significativo de AA, al comparar los valores obtenidos al inicio y al final del ensayo para ambos tratamientos ($p \leq 0,05$) (**figura 7a**). Mientras que, en los extractos acuosos, sólo la fermentación controlada mostró un aumento significativo de la AA ($p \leq 0,05$) (**figura 7d**).

Los extractos de repollo blanco (acuoso y metanólico) mostraron un aumento gradual de AA durante ambas fermentaciones ($p \leq 0,05$). Luego, al finalizar el ensayo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$) para ningún tipo de extracto. Kusznierewicz *et al.* (2008) reportaron un incremento de la AA durante la fermentación espontánea del repollo blanco, alcanzando una meseta luego de los 10 días. En la fermentación controlada y espontánea, los extractos metanólicos exhibieron un aumento significativo de la AA, al comparar los valores iniciales y finales obtenidos ($p \leq 0,05$) (**figura 7b**). Mientras que, en los extractos acuosos sólo la fermentación controlada mostró un aumento significativo de la AA ($p \leq 0,05$) (**figura 7e**).

En el repollo colorado se observaron comportamientos muy diferentes entre los dos tipos de extractos (**figura 7c vs 7f**). En los extractos metanólicos se observó un aumento constante de la AA durante todo el proceso controlado, mientras que en la fermentación

espontánea el incremento se produce hasta el día 20 y luego los valores se mantienen constantes (**figura 7c**). Los extractos acuosos exhibieron una evolución diferente de la AA al comparar ambos procesos. En el proceso espontáneo se determinó un descenso constante de la AA a lo largo del ensayo, mientras que en la fermentación controlada se observó un aumento hasta el día 15, a partir del cual los valores también comenzaron a disminuir levemente hasta el final del ensayo (**figura 7f**).

Los extractos metanólicos no mostraron diferencias significativas de la AA entre los tratamientos ($p > 0,05$), mientras que los extractos acuosos obtenidos a partir de la fermentación controlada exhibieron mayores valores que aquellos provenientes del proceso espontáneo ($p \leq 0,05$). Además, los extractos acuosos de RC exhibieron mayores valores de la AA que los metanólicos. Boğa *et al.* (2011) determinaron que los extractos acuosos de repollo colorado exhibieron un mayor nivel de antioxidantes que los extractos etanólicos, mediante el método CUPRAC.

El pH es un factor determinante en la AA de los compuestos fenólicos presentes en los alimentos. Se ha determinado que un pH menor induce una mayor AA de las antocianinas (Hur *et al.*, 2014). Por lo tanto, es esperable que, en el repollo colorado la AA aumente a lo largo de la fermentación y que sea más notorio durante los primeros días del ensayo donde se observó un mayor descenso del pH.

Los iones metálicos con actividad catalítica no sólo inician la peroxidación de lípidos y por lo tanto el deterioro de los alimentos, sino que se han correlacionado con la incidencia de artritis y cáncer (Sun, Chou y Yu, 2008). Por lo tanto, alimentos con una alta capacidad de secuestrar estos iones contribuyen a retrasar el envejecimiento celular y a prolongar el estado de salud.

5. CONCLUSIONES

Sobre la base de los resultados obtenidos se concluye que:

- La inoculación en dos etapas utilizando cepas autóctonas, primero con *Leuconostoc* y después con *Lactiplantibacillus*, garantiza una mejor capacidad de adaptación a la matriz a fermentar. La incorporación inicial de cepas pertenecientes al género *Leuconostoc* favoreció al descenso inicial de pH. Luego, la inoculación de las cepas de *Lactiplantibacillus* al tercer día, permitió que estas continuaran metabolizando los carbohidratos presentes en la matriz vegetal bajo condiciones de estrés elevada.
- Si bien, el proceso controlado se realizó por 30 días, el periodo de fermentación podría finalizar antes, ya que se logró un pH menor a 4 a los 10 días y se mantuvo constante hasta finalizar el proceso, en todos los vegetales. Por lo tanto, esto indicaría que las BAL metabolizaron la mayoría de los azúcares disponibles durante ese periodo, en consecuencia, el proceso controlado se podría dar por concluido.
- La fermentación controlada de los tres vegetales exhibió un descenso de pH mayor que el observado en el proceso espontáneo. Esta rápida acidificación de la matriz vegetal durante el proceso controlado reduce la aparición de alteraciones y garantiza la seguridad alimentaria.
- Los productos fermentados exhibieron una calidad microbiológica aceptable, independientemente del tipo de fermentación. Las fermentaciones controladas de los tres vegetales exhibieron menor recuento de aerobios totales que el proceso espontáneo al finalizar la fermentación. No obstante, la población de aerobios se redujo notablemente durante la etapa de almacenamiento, en todos los casos. Todos los productos mostraron valores deseables de coliformes totales y levaduras al finalizar el proceso de fermentación (espontánea y controlada), así como después de su almacenamiento.
- Los extractos acuosos mostraron una mayor eficiencia para la extracción de compuestos fenólicos de las muestras vegetales que los extractos metanólicos debido a la diferencia de temperatura y polaridad de los disolventes empleadas en cada medio.
- El CTF de las matrices vegetales no exhibió un patrón único durante el proceso de fermentación, los valores obtenidos dependieron del tipo de tratamiento (controlado o

espontáneo), vegetal (akusai, repollo blanco o colorado) y extracto (acuoso o metanólico) utilizado.

- El método CUPRAC arrojó valores mayores de AA que el método DPPH en todos los extractos, ya que el primero mide tanto antioxidantes polares como no polares de las muestras, mientras que el segundo sólo moléculas solubles en solventes orgánicos.
- En general, se observó un incremento de la AA durante el periodo de fermentación controlada en todos los vegetales, independientemente del tipo de extracto. En la matriz de akusai y repollo blanco, la fermentación controlada exhibió una mayor AA que la espontánea. Mientras que, el proceso controlado del repollo colorado alcanzó una AA igual o mayor que el espontáneo, dependiendo de las condiciones de extracción empleadas.
- El repollo colorado mostró un CTF y una AA significativamente superior al resto de los vegetales, independientemente del tipo de fermentación y condiciones de extracción empleadas.
- La fermentación controlada en dos etapas de brasicáceas demostró ser una técnica útil para la producción de alimentos con calidad estable, inocuos y con alto valor nutritivo y funcional.
- Estos alimentos funcionales se convierten en una nueva alternativa para potenciar el consumo de vegetales *Brassica* mejorando la calidad de nuestras dietas (mediterránea, vegetariana, vegana, etc). A su vez, este tipo de alimento le otorgaría un beneficio a la salud de consumidor, reduciendo el riesgo de ECNT.

6. REFERENCIAS

A.N.M.A.T. (2002) *Los alimentos funcionales: ¿comida que cura?, salud para todos*. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/publicaciones/alimentos_funcionales.asp (Consultado: el 6 de marzo de 2023).

Afshin, A. *et al.* (2019) "Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017", *Lancet*, 393(10184), 1958–1972. doi: 10.1016/S0140-6736(19)30041-8

Agbor, G., Vinson, J. A. y Donnelly, P. E. (2014) "Folin-Ciocalteu reagent for polyphenolic assay", *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics*, 3(8), 147–156. doi: 10.19070/2326-3350-1400028

Aires, A. *et al.* (2011) "Seasonal effects on bioactive compounds and antioxidant capacity of six economically important brassica vegetables", *Molecules*, 16(8), 6816–6832. doi: 10.3390/molecules16086816

Al-Shehbaz, I. A. (2011) "Brassicaceae (Mustard family)", In: *eLS, John Wiley & Sons*, Ltd Chichester, 1-8. doi: 10.1002/9780470015902.a0003690.pub2

Apak R. *et al.* (2016). "Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(5), 997–1027. doi: 10.1021/acs.jafc.5b04739

Arrieta, E. M., González, A. D. y Fernández, R. J. (2021) "Dietas saludables y sustentables, ¿Son posibles en la Argentina?", *Ecología Austral*, 31(1), 148–169. doi: 10.25260/ea.21.31.1.0.1096

Baenas, N. *et al.* (2017) "Broccoli sprouts in analgesia-preclinical: In vivo studies", *Food and Function*, 8(1), 167–176. doi: 10.1039/c6fo01489e.

Bintsis, T. (2018) "Lactic acid bacteria: their applications in foods", *Journal of Bacteriology & Mycology*, 6(2), 89–94. doi: 10.15406/jbmoa.2018.06.00182

Boğa, M., Hacibekiroğlu, I. y Kolak, U. (2011) "Antioxidant and anticholinesterase activities of eleven edible plants". *Pharm Biol*, 49(3), 290–295. doi: 10.3109/13880209.2010.517539

Britos, S. *et al.* (2012) *Hacia una alimentación saludable en la mesa de los argentinos*. Orientación Gráfica Editora, Bs As. 112 pp.

Di Cagno, R. *et al.* (2011) "Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies", *Food Microbiology*, 28(5), 1062–1071. doi: 10.1016/j.fm.2011.02.011

Di Cagno, R. *et al.* (2013) "Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation", *Food Microbiology*, 33(1), 1–10. doi: 10.1016/j.fm.2012.09.003

Chen, H. y Hoover, D. G. (2003) "Bacteriocins and their food applications", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(3), 82–100. doi: 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00016.x

Chen, Y. C. *et al.* (2005) "DPPH radical-scavenging compounds from dou-chi, a soybean fermented food", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69(5), 999–1006. doi: 10.1271/bbb.69.999.

Culebras, J. M., García De Lorenzo, A. y González-Gross, M. (2004) "Alimentos funcionales", *Nutrición Hospitalaria*, 19(1), 1. doi: 10.31381/biotempo.v7i0.872.

Diplock, A. T., Aggott, P. J. y Ashwell, M. (1999) "Scientific concepts of functional foods in Europe – Consensus Document", *British Journal of Nutrition*, 81(4), S1–S27. doi: 10.1017/S0007114599000471.

Endo, A., Maeno, S. y Liu, S. Q. (2022) "Lactic acid bacteria: *Leuconostoc* spp.", In: McSweeney, P.L.H., McNamara, J. P. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, third ed. Academic Press, London, United Kingdom, 226-232. doi: 10.1016/b978-0-08-100596-5.00859-3.

Fan, L. and Hansen, L.T. (2012) "Fermentation and biopreservation of plantbased foods with lactic acid bacteria", In: *Handbook of Plantbased Fermented Food and Beverage Technology*, 2 ed. CRC Press, Boca Raton, USA, 35-48 pp. doi: 10.1201/b12055-4

Gallo, D. *et al.* (2014) "Alimentación Vegetariana", *Sociedad Argentina de Nutrición*, 1(2), 1–48.

Gänzle, M. G. (2015) "Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage", *Current Opinion in Food Science*, 2, 106–117. doi: 10.1016/j.cofs.2015.03.001.

Gardner NJ. *et al.* (2001) "Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures", *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), 261-275.

Ghosh D, (2021) "Studies on the changes of biochemical, microbiological and sensory parameters of sauerkraut and fermented mix vegetables". *Food Research*, 5(1), 78–83. doi: 10.26656/fr.2017.5(1).193

Gouda, A. A. y Amin, A. S. (2010) "Copper (II)-neocuproine reagent for spectrophotometric determination of captopril in pure form and pharmaceutical formulations", *Arabian Journal of Chemistry*, 3(3), 159–165. doi: 10.1016/j.arabjc.2010.04.004.

Hasler, C. M. y Brown, A. C. (2009) "Position of the American Dietetic Association: functional foods.", *Journal of the American Dietetic Association*, 109(4), 735–746. doi: 10.1016/j.jada.2009.02.023.

Henry, C. J. (2010) "Functional foods", *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(7), 657–659. doi: 10.1038/ejcn.2010.101.

Hosseini, S. *et al.* (2016) "Evaluation of the organic acids ability for extraction of anthocyanins and phenolic compounds from different sources and their degradation kinetics

during cold storage”, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66(4), 261–269. doi: 10.1515/pjfn-2015-0057.

Hunaefi, D., Akumo, D. N. y Smetanska, I. (2013) “Effect of fermentation on antioxidant properties of red cabbages”, *Food Biotechnology*, 27(1), 66–85. doi: 10.1080/08905436.2012.755694.

Hur, S. J. *et al.* (2014) “Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods”, *Food Chemistry*, 160, 346–356. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.112.

Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC) (2019) *4° Encuesta nacional de factores de riesgo. Resultados definitivos*. 1a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires : Instituto Nacional de Estadística y Censos. Disponible en: https://www.indec.gov.ar/ftp/cuadros/publicaciones/enfr_2018_resultados_definitivos.pdf

Jagannath, A., Raju, P. S. y Bawa, A. S. (2012) “A two-step controlled lactic fermentation of cabbage for improved chemical and microbiological qualities”, *Journal of Food Quality*, 35(1), 13–20. doi: 10.1111/j.1745-4557.2011.00427.x.

Karovičová, J. y Kohajdová, Z., 2003. “Lactic acid fermented vegetable juices”. *Horticultural Science*, 30(4), 152-158. doi: 10.17221/3878-HORTSCI

Kaur, S. y Das, M. (2011) “Functional foods: an overview”, *Food Science and Biotechnology*, 20(4), 861–875. doi: 10.1007/s10068-011-0121-7.

Kusznierewicz, B. *et al.* (2008) “Partial characterization of white cabbages (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) from different regions by glucosinolates, bioactive compounds, total antioxidant activities and proteins”, *LWT – Food Science and Technology*, 41(1), 1–9. doi: 10.1016/j.lwt.2007.02.007.

Leahy, E., Lyons, S. y Tol, R.S. (2010). “An estimate of the number of vegetarians in the world”. The Economic and Social Research Institute (ESRI) working paper. No. 340, Dublin, pp 45.

Lee, J., Koo, N. y Min, D. B. (2004) “Reactive Oxygen Species, aging, and antioxidative nutraceuticals”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), 21–33. doi: 10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x.

Mendoza, Y. P. (2000) “The position of the American Dietetic Association (ADA): vegetarian diets”, *Medicina Naturista*, 1, 28–35. doi: 10.1016/j.jada.2009.05.027.

Montet, D., Ray, R. C. y Zakhia-Rozis, N. (2014) “Lactic acid fermentation of vegetables and fruits”. In: Ramesh C. Ray, Montet Didier (Eds.), *Microorganisms and Fermentation of Traditional Foods*, 1st Edition, CRC Press, 108–140 pp. doi: 10.1201/b17307.

Podsedek, A. *et al.* (2006) “Antioxidant capacity and content of *Brassica oleracea* dietary antioxidants”, *International Journal of Food Science and Technology*, 41(s1), 49–58. doi:10.1111/j.1365-2621.2006.01260.x

Podsedek, A. (2007) “Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: A review”, *Lwt*, 40(1), 1–11. doi: 10.1016/j.lwt.2005.07.023.

Prachyakij, P. *et al.* (2008) "Selection and identification of lactic acid bacteria that inhibit yeast contaminants isolated from fermented plant beverages". *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 2, 211-218.

Rehman, Z. U., Islam, M. y Shah, W. H. (2003) "Effect of microwave and conventional cooking on insoluble dietary fibre components of vegetables", *Food Chemistry*, 80(2), 237–240. doi: 10.1016/S0308-8146(02)00259-5.

Ruby, M.B., 2012. Vegetarianism. A blossoming field of study. *Appetite*, 58(1), 141-150.

Šamec, D. y Salopek-Sondi, B. (2018) "Cruciferous (brassicaceae) vegetables", *nonvitamin and nonmineral nutritional supplements*, 195–202. doi: 10.1016/B978-0-12-812491-8.00027-8.

Seseña Prieto, S. (2007) "Caracterización tecnológica de cepas autóctonas y selección de cultivos iniciadores para la fermentación de la berenjena de Almagro". [Tesis]. Universidad de Castilla-La Mancha. 246 pp.

Seong, G. U., Hwang, I. W. y Chung, S. K. (2016) "Antioxidant capacities and polyphenolics of chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis*) leaves". *Food Chem*, 199, 612–618. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.12.066

Shahidi, F. y Zhong, Y. (2015) "Measurement of antioxidant activity", *Journal of Functional Foods*, 18, 757–781. doi: 10.1016/j.jff.2015.01.047.

Swagerty, D. L., Walling, A. D. y Klein, R. (2002) "Lactose intolerance", *American Family Physician*, 65(9), 1845–1850. doi: 10.7748/phc2006.02.16.1.41.c595.

Swain, M. R. *et al.* (2014) "Fermented fruits and vegetables of Asia: a potential source of probiotics", *Biotechnology Research International*, ID250424, 1–19. doi: 10.1155/2014/250424.

Swinbanks, D. y O'Brien, J. (1993) "Japan explores the boundary between food and medicine", *Nature*, 364(6434), 180. doi: 10.1038/364180a0

Taiyan, Z. *et al.* (2001) "Brassicaceae (Cruciferae)", *Flora of China*, (8), 1–193. doi: 10.1525/9780520355217-008.

Upadhyay, R., Sehwal, S. y Singh, S. P. (2015) "Antioxidant activity and polyphenol content of *Brassica oleracea* varieties", *International Journal of Vegetable Science*, 22(4), 353-363. doi: 10.1080/19315260.2015.1048403.

Urbonaviciene, D. *et al.* (2015) "The use of lactic acid bacteria in the fermentation of fruits and vegetables", In: Deniz Ekinci (Ed), *Technological and Functional Properties, Biotechnology*, Chapter 7. 137-164 pp. doi: 10.5772/59938.

Unión Vegana Argentina, UVA (2020) *Comunicado oficial - Medición de Población*. Buenos Aires, Argentina. Disponible en: <http://www.unionvegana.org/wp-content/uploads/2020/11/INFORME-MEDICION-POBLACION-VEGANA-Y-VEGETARIANA-2020.pdf>

Valenzuela B., A. *et al.* (2014) “Alimentos funcionales, nutraceuticos y FOSHU: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación?”, *Revista Chilena de Nutrición*, 41(2), 198–204. doi: 10.4067/S0717-75182014000200011.

Vesa, T. H., Korpela, R. y Marteau, P. (2000) “Lactose intolerance”, *Journal of the American College of Nutrition*, 19, 165S-175S. doi: 10.1080/07315724.2000.10718086.

Wiander, B. y Korhonen, H. J. T. (2011) “Preliminary studies on using LAB strains isolated from spontaneous sauerkraut fermentation in combination with mineral salt, herbs and spices in sauerkraut and sauerkraut juice fermentations”, *Agricultural and Food Science*, 20(2), 176–182. doi: 10.2137/145960611797215682.

Zhang, D. y Hamauzu, Y. (2004) “Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking”, *Food Chemistry*, 88(4), 503–509. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.01.065.

Zheng, J. *et al.* (2020) “A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. doi: 10.1099/ijsem.0.004107.

Zubaidah, E. *et al.* (2020) “Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures in lower salt concentration fermentation on the sauerkraut quality”, *Food Research*, 4, 1038–1044. doi: 10.26656/fr.2017.4(4).029