



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE
LA MICROBIOTA CULTIVABLE EN LA
FERMENTACIÓN CASERA DEL
CHUCRUT**

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF
CULTIVATABLE MICROBIOTA IN
HOMEMADE SAUERKRAUT
FERMENTATION**

Cristina Carbajo Villazala

Tutor: Francisco Javier Casqueiro Blanco

Cotutor: Yaiza Carnicero Mayo

GRADO EN BIOLOGÍA

Julio, 2022

ÍNDICE

I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1. La importancia de los alimentos fermentados	1
1.1 ¿Qué son los alimentos fermentados?	1
2. El chucrut es un alimento fermentado	2
2.1 ¿Qué es el chucrut?	2
2.2 Microbiota del chucrut	3
2.3 Proceso de fermentación del chucrut	4
II. <u>OBJETIVOS</u>	6
III. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	7
1. Muestras	7
2. Elaboración artesanal del chucrut	7
3. Medios de cultivo	7
4. Análisis químico. Medición del pH	8
5. Cultivo, identificación y cuantificación de bacterias cultivables	8
5.1 Toma de muestras y cultivo	8
5.2 Cuantificación de bacterias cultivables	9
5.3 Aislamiento de bacterias cultivables	9
5.4 Identificación de las bacterias cultivables	10
6. Análisis filogenético	11
7. Análisis estadístico	11
IV. <u>RESULTADOS</u>	11
1. La concentración de bacterias del chucrut artesanal alcanza su máximo el día 8 de la fermentación	11
2. La concentración de bacterias en el chucrut artesanal es mayor que en el chucrut comercial	13
3. No existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de bacterias del chucrut artesanal y el chucrut comercial en medio TSA, pero si en mMRS	14

4. El chucrut comercial tiene un pH más ácido que el chucrut artesanal	15
5. La diversidad bacteriana va cambiando con el tiempo de fermentación	15
6. El chucrut comercial tiene una diversidad mayor de bacterias que el chucrut artesanal de este estudio	16
7. Las especies microbianas no identificadas no pueden ser correctamente identificadas con filogramas de los espectros de masas	17
V. <u>DISCUSIÓN</u>	19
1. El chucrut artesanal presenta un pH diferente a los observados en otros estudios	19
2. La concentración de microorganismos es decisiva para un buen chucrut final	20
3. El chucrut de este estudio tiene una diversidad microbiana diferente a otros estudios similares	21
VI. <u>CONCLUSIONES</u>	23

RESUMEN

Una de las materias primas más comunes empleadas en la elaboración de los alimentos fermentados son las verduras, las cuales tienen una gran concentración de nutrientes y una microbiota autóctona abundante. El chucrut es un alimento fermentado, que se elabora con repollo blanco y sal. La fermentación del chucrut es un proceso no controlado liderado por los microorganismos presentes en el propio repollo. El objetivo de este trabajo es determinar la evolución de las poblaciones microbianas durante la fermentación artesanal del chucrut. Para ello, se aislaron, se identificaron y se cuantificaron las bacterias cultivables en los medios TSA y mMRS los días 1, 5, 8, 11 y 22 de fermentación. El mayor crecimiento microbiano se obtuvo en el octavo día de fermentación. Tras el cultivo en los diferentes días de estudio, se aislaron e identificaron las bacterias de 23 morfologías de colonias diferentes. Las bacterias heterofermentativas que dominaron el inicio de la fermentación artesanal fueron *Lentilactobacillus kefir* y *Lentilactobacillus parabucheri*. El final de la fermentación artesanal fue dominado por la bacteria homofermentativa *Lactococcus lactis*. El chucrut comercial mostró una microbiota cultivable más diversa formada por las bacterias *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis*, *Staphylococcus epidermidis* y *Paenibacillus amylolyticus* y la levadura *Kazachstania exigua*.

Palabras clave: Alimento fermentado, Bacterias del ácido láctico, chucrut, fermentación

ABSTRACT

Vegetables are one of the most common raw materials used in the production of fermented foods, as they are nutrient-rich and harbor an abundant native microbiota. Sauerkraut is a fermented food made from white cabbage and salt. The fermentation of sauerkraut is a non-controlled process led by the microorganisms naturally present in the cabbage. This work aimed to determine microbial population evolution during the artisanal fermentation of sauerkraut. For this purpose, the sauerkraut cultivable microbiota was isolated, identified and quantified on days 1, 5, 8 and 22 of fermentation, using TSA and mMRS media. Also, on day 22, artisanal sauerkraut microbiota was compared to that of a commercial sauerkraut. The highest microbial concentration was detected on the eighth day of fermentation. After microbial isolation was carried out in all time-points throughout fermentation, 23 different morphologies were detected and isolated in pure culture for further identification through MALDI TOF mass spectrometry. The heterofermentative bacteria dominating the beginning of the artisanal fermentation were *Lentilactobacillus kefir* and *Lentilactobacillus parabucheri*, while *Lactococcus lactis* prevailed at the end of fermentation. Commercial sauerkraut showed a more diverse cultivable microbiota consisting of *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis*, *Kazachstania exigua*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Paenibacillus amylolyticus*.

Keywords: Fermented food, fermentation, Lactic acid bacteria (LAB), sauerkraut

ABREVIATURAS

BAL: Bacterias del Ácido Láctico

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

NSLAB: Bacterias del Ácido Láctico no iniciadoras

NaOH: Hidróxido de sodio

BTS: Test Bacteriano Estándar

HCCA: ácido α -ciano-hidroxicinámico

PMF: huella dactilar de masa peptídica

I. INTRODUCCIÓN

1. La importancia de los alimentos fermentados

1.1 ¿Qué son los alimentos fermentados?

Los alimentos fermentados se definen como alimentos o bebidas que se obtienen gracias al crecimiento microbiano de hongos, bacterias y levaduras. Estos microorganismos que en ningún caso son patógenos, participan en la degradación enzimática de ciertos componentes de los alimentos, generando así productos que aportan unas características organolépticas deseables al producto final. Algunos de estos productos son metabolitos antimicrobianos (que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos), pero estos microorganismos también pueden secretar otros compuestos como ácidos orgánicos. Uno de los ácidos orgánicos más comunes es el ácido láctico producido por las bacterias del ácido láctico (BAL), las cuales suelen ser dominantes en los procesos fermentativos (Beena Divya *et al.*, 2012). Los alimentos fermentados son básicos en la dieta humana y se han empleado desde el comienzo de las civilizaciones como forma de conservación de los alimentos. De hecho, ocupan un lugar especial en las tradiciones de muchas culturas (Marco *et al.*, 2017). A pesar de esto, su popularidad no ha sido estable. Al comienzo de la industrialización de los alimentos, el uso de alimentos fermentados se redujo, sobre todo en Occidente. Recientemente han vuelto a ganar popularidad y son uno de los alimentos más consumidos.

Los alimentos fermentados pueden ser obtenidos por fermentación espontánea o por fermentación controlada. En la fermentación espontánea son los "fermentos autóctonos", es decir, aquellos que forman parte de la microbiota de los alimentos crudos o de su entorno, los que llevan a cabo la fermentación. La fermentación espontánea se emplea sobre todo en la obtención de los alimentos fermentados artesanales (Dimidi *et al.*, 2019). Algunos ejemplos de alimentos que se pueden obtener por fermentación espontánea son el chucrut, el kéfir y la kombucha (Dimidi *et al.*, 2019). En cambio, en los alimentos obtenidos por fermentación controlada se emplean cultivos iniciadores naturales o microorganismos seleccionados específicamente para mejorar y controlar las características organolépticas del producto final (Dimidi *et al.*, 2019). Este método está enfocado para el uso industrial de alimentos fermentados y a la producción a gran escala de estos, ya que asegura la repetibilidad del proceso y aumenta la seguridad alimentaria de los productos (Szutowska, 2020).

Está bien documentado que el consumo frecuente de alimentos fermentados aporta grandes beneficios al consumidor (Suárez, 2013; Ramirez *et al.*, 2011; Orgeron II *et al.*, 2016). Los beneficios dependerán de la concentración y de la diversidad de microorganismos de dichos productos. Es probable que los alimentos fermentados que se venden en cualquier supermercado hayan sido sometidos a procesos de pasteurización y, por lo tanto, no contengan microorganismos viables. En cambio, los alimentos fermentados de forma artesanal como el chucrut, el kimchi o el kéfir contienen células microbianas viables en grandes cantidades que oscilan entre 10^6 y 10^9 células/g o células/mL. Algunos de estos microorganismos tienen la capacidad de conferir beneficios al consumidor, de modo que si son capaces de soportar las condiciones del tracto gastrointestinal pasarán a formar parte de la microbiota intestinal. La introducción de nuevos microorganismos compensa la carencia de diversidad microbiana de los alimentos industrializados que en muchos casos están pasteurizados y desinfectados (Marco *et al.*, 2017).

2. El chucrut es un alimento fermentado

2.1 ¿Qué es el chucrut?

El chucrut es uno de los alimentos fermentados más conocidos. El chucrut preparado de forma artesanal se obtiene por la fermentación espontánea en condiciones anóxicas del repollo blanco (*Brassica oleraceae var. capitata*). Para obtener el chucrut basta con mezclar el repollo blanco con un 2-3 % de sal para inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables (Zabat *et al.*, 2018). Este es un proceso no controlado, dirigido por la propia microbiota de la col, principalmente por las BAL (Yang *et al.*, 2020). La acumulación de ácido láctico producido por las BAL da lugar a un pH muy ácido que es lo que permite la conservación del repollo (Dimidi *et al.*, 2019). El proceso de fermentación espontánea del chucrut requiere un tiempo de fermentación de dos semanas a un mes a una temperatura de entre 15 y 20 °C (Sayago y López, 1985).

Se cree que el origen del chucrut se remonta al siglo IV a.C durante el Imperio Romano. En invierno los alimentos frescos escaseaban. Los romanos descubrieron que la fermentación del repollo les permitía conservarlo durante más tiempo, así como mantener sus características nutritivas y organolépticas (Zabat *et al.*, 2018). A partir de la década de 1930 la popularidad del chucrut cayó en picado debido al auge de los alimentos industriales, y con ello, el cambio de preferencias de los consumidores (Zabat *et al.*, 2018). Actualmente, el chucrut ha recuperado su popularidad en los países de Europa Central, Europa del Este,

Europa Occidental y Estados Unidos gracias a las recientes investigaciones que demuestran sus beneficios sobre la salud (Zabat *et al.*, 2018).

Una característica fundamental del chucrut es que todos los nutrientes del alimento están más biodisponibles que en el repollo sin fermentar (Orgeron II *et al.*, 2016). A este respecto, la Dra. Natasha Campbell-McBride afirma que “la cantidad de vitamina C biodisponible en el chucrut es 20 veces mayor que en la misma porción de repollo crudo” (Campbell-McBride, 2004). Además de una mayor biodisponibilidad de vitamina C, el chucrut es un alimento con numerosas propiedades positivas para la salud del consumidor, las cuales se deben a su microbiota (Touret *et al.*, 2018).

2.2 Microbiota del chucrut

Los vegetales constituyen un medio de cultivo ideal para el crecimiento microbiano porque son una gran fuente de nutrientes (Ramirez *et al.*, 2011). Los diferentes vegetales fermentados tienen una microbiota específica y según la concentración y la diversidad de dicha microbiota tendrán características diferentes (Rodríguez y Zumba, 2021). El repollo blanco tiene una microbiota autóctona extremadamente compleja, que incluye levaduras, hongos y bacterias. Entre las bacterias se encuentran las BAL y numerosos géneros como *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter* y *Proteus* (Szutowska, 2020).

Uno de los primeros estudios que se realizaron para conocer la microbiota del chucrut fue el de Pederson y Albury (1969). Estos autores encontraron una diversidad baja de especies de bacterias lácticas, como *Leuconostoc mesenteroides*, *Levilactobacillus brevis* y *Lactiplantibacillus plantarum*. Tras 50 años de investigaciones se tiene un conocimiento más profundo del tema y numerosos estudios respaldan que cada fermentación es diferente y que el chucrut puede contener una gran variedad de microorganismos, siendo las especies más comúnmente identificadas en el mismo *Leuconostoc mesenteroides*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Bifidobacterium dentium*, *Enterococcus faecalis*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Latilactobacillus curvatus*, *Weissella confusa*, *Lactococcus lactis* y *Enterobacteriace* (Dimidi *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020)

Sin lugar a duda, los microorganismos que más importancia tienen en la fermentación del chucrut son las bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales se encuentran en numerosos nichos ecológicos como plantas, leche cruda o el tracto digestivo de humanos y animales

(Szutowaska, 2020). Las BAL son cocos o bacilos Gram positivos no esporulados, no móviles, anaeróbicos o aerotolerantes. Son microorganismos quimiorganotrofos que requieren varios factores de crecimiento como aminoácidos y vitaminas. Estas bacterias poseen un metabolismo fermentativo en el que usan azúcares como fuente de carbono y energía y generan principalmente ácido láctico (Ramirez *et al.*, 2011). Otros posibles productos secundarios de la fermentación son CO₂, manitol, ácido acético y etanol (Rodríguez y Zumba, 2021). Debido a que son productores de ácidos orgánicos, las BAL son ácido tolerantes, que pueden llegar a soportar valores de pH tan bajos como 3,2, aunque también pueden sobrevivir a valores altos de pH como 9,6. El pH óptimo de la mayoría de las BAL se encuentra entre 4 y 4,5, permitiéndoles sobrevivir en ambientes con unas condiciones de pH que otras bacterias no soportan. Los géneros más importantes de este grupo son *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacilli*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Weissella* (Beena Divya *et al.*, 2012).

En la microbiota del chucrut también puede haber otros tipos de BAL que aparecen en menor medida, que también son importantes o incluso pueden ser probióticos (Touret *et al.*, 2018). Se denominan bacterias del ácido láctico no iniciadoras (NSLAB) que se desarrollan como una biota secundaria durante la maduración y son los encargados de intensificar el sabor.

Las bacterias dominantes en la fermentación del chucrut son las BAL y en función del tipo de microorganismos que intervengan los productos que se generan serán característicos (Orgeron II *et al.*, 2016).

2.3 Proceso de fermentación del chucrut

El proceso de fermentación del chucrut se puede dividir en función de las BAL que intervengan y en función de los productos finales que se formen tras la fermentación de los carbohidratos (Ramirez *et al.*, 2011). Podemos encontrar dos tipos de fermentación: fermentación heterofermentativa y fermentación homofermentativa (**Figura 1**). Las BAL heterofermentativas utilizan la vía de las pentosas fosfato para convertir las hexosas a pentosas gracias a la enzima fosfoacetolasa. El 50 % de los productos que se generan es ácido láctico y el resto son otros compuestos como acetato, etanol y dióxido de carbono (Parra Huertas, 2016). En este grupo se incluyen géneros como *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* y algunos *Lactobacilli* (Ramírez *et al.*, 2011). Las BAL homofermentativas poseen las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa las cuales forman parte

de la vía de Embden-Meyerhof para degradar la glucosa formando aproximadamente un 85 % de ácido láctico como producto final (por cada mol de glucosa, se forman dos moles de ácido láctico) (Parra Huertas, 2016). En este grupo se incluyen géneros como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pedococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacilli* (Ramirez *et al.*, 2011).

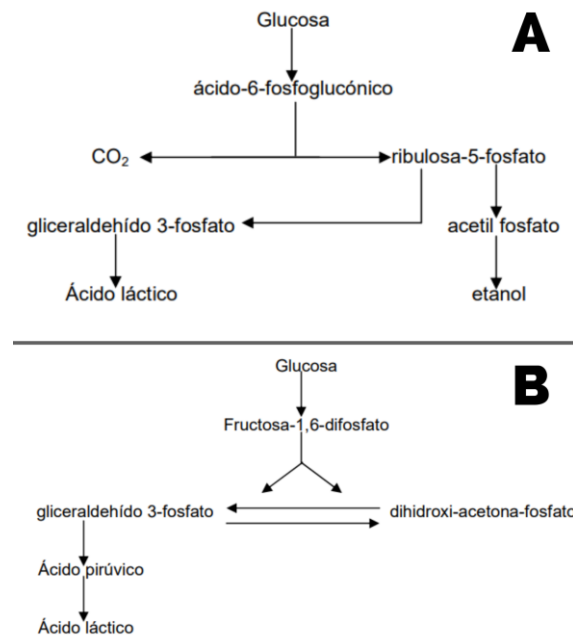


Figura 1. La figura muestra la ruta fermentativa llevada a cabo por las BAL heterofermentativas (A) y la ruta que emplean las BAL homofermentativas (B) (Cabeza, 2011).

Desde 1969, se sabe que la fermentación del chucrut comienza con especies heterofermentativas de bacterias ácido lácticas y finaliza con la acción de bacterias homofermentativas, lo cual ha sido confirmado por estudios más recientes (Yang *et al.*, 2020). En la fermentación del chucrut se producen etapas sucesivas en las que se van sustituyendo rápidamente las especies de BAL. Las especies que dominan en una determinada etapa crean un ambiente favorable para el crecimiento de las bacterias que van a predominar en la siguiente etapa de la fermentación. De este modo, la especie que domina en la fermentación cambia cada 2 o 3 días (Plengvidhya *et al.*, 2007). La fermentación del chucrut comienza con el crecimiento inicial de bacterias heterofermentativas como *Leuconostoc mesenteroides*, que produce rápidamente lactato, acetato y etanol reduciendo rápidamente el pH (Zabat *et al.*, 2018). El ambiente ácido generado por estas BAL heterofermentativas inhibe el crecimiento de microorganismos indeseables que estropeen la fermentación y favorece el crecimiento de poblaciones microbianas de BAL homofermentativas como *Levilactobacillus brevis* y *Lactiplantibacillus plantarum* productoras de ácido láctico y por tanto más resistentes a este, alcanzando concentraciones de 10^8 a 10^9 UFC/g (Plengvidhya *et al.*, 2007).

El tiempo de la fermentación para la obtención del chucrut es variable. El tiempo mínimo de fermentación es de 2 semanas y puede llegar a un mes aproximadamente. Durante el tiempo fermentativo, las bacterias implicadas en el proceso producen metabolitos como ácidos orgánicos o compuestos aromáticos que afectan las cualidades organolépticas del chucrut (Zabat *et al.*, 2018). Las características finales del chucrut van a depender de muchos factores como la comunidad microbiana presente en las diferentes etapas de la fermentación, el valor del pH, y la concentración de sal, la cual está estrechamente relacionada con el crecimiento microbiano (Yang *et al.*, 2019). Otro factor que afecta en gran medida a la fermentación es la temperatura. Según el estudio realizado por Sayago y López (1985) una temperatura de fermentación de entre 0 y 2 °C genera un producto con una acidez baja ya que *Leuconostoc mesenteroides* no es capaz de crecer a temperaturas menores de 7 °C. Sin embargo, tras 15 días de fermentación con una temperatura media entre 24 y 26 °C la acidez del chucrut era adecuada y el olor agradable, pero se oscurecía muy rápido. Por tanto, estos autores concluyeron que la temperatura óptima para realizar la fermentación del chucrut estaba entre 18 y 20 °C, por ser la temperatura de crecimiento óptima de las bacterias que inician el proceso fermentativo (Sayago y López, 1985). Si las condiciones de fermentación no son las adecuadas y la temperatura o la salinidad son elevadas, se cree que *Enterococcus faecalis* y *Pediococcus cerevisiae* dominan la fermentación produciendo un chucrut defectuoso (Zabat *et al.*, 2018).

II. OBJETIVOS

El chucrut es un alimento fermentado que se elabora habitualmente de forma artesanal en diversas partes de Europa. El consumo de chucrut tiene varios beneficios para la salud derivados de su microbiota. El objetivo principal de este TFG es el estudio de la microbiota cultivable presente en el chucrut artesanal.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la concentración de la microbiota cultivable a lo largo de la fermentación del chucrut artesanal.
2. Evaluar la evolución de las poblaciones microbianas cultivables a lo largo de la fermentación del chucrut artesanal.
3. Evaluar las diferencias entre la microbiota cultivable del chucrut artesanal y la microbiota cultivable del chucrut comercial.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras

Para la elaboración artesanal del chucrut se recogieron dos coles blancas (*Brassica oleraceae var. capitata*) de un huerto privado, las cuales habían sido cultivadas en el mismo lugar y bajo las mismas condiciones. Los repollos se mantuvieron en oscuridad y en un ambiente fresco hasta su uso. Para estudiar la microbiota del chucrut comercial se empleó Chucrut Fresco sin pasteurizar (Kramer).

2. Elaboración artesanal del chucrut

Para la elaboración del chucrut, se siguió una receta tradicional. Primero, se cortó el repollo en juliana, haciendo tiras muy finas, ya que esto favorece la fermentación. Posteriormente, se pesó el repollo y se añadieron 20 gramos de sal por cada kilo de verdura. Tras añadir la sal se amasó el repollo con las manos, previamente lavadas. Se dejó reposar la mezcla durante 30 minutos, tras este tiempo se repitió el proceso para que el repollo soltara su jugo (Cayré *et al.*, 2011). Tras ello, se llenaron 10 tarros de cristal previamente esterilizados (5 para cada repollo) con la mezcla, intentando compactar las tiras de repollo en el fondo del tarro para eliminar el aire entre las mismas. Posteriormente, se añadió el líquido que se obtuvo al amasar la mezcla, hasta que cubrió por completo las tiras del repollo. Los tarros no se cerraron con fuerza, para permitir que los gases de la fermentación se escapen del recipiente. Cuando la salmuera del repollo no fue suficiente para rellenar todos los tarros, se empleó solución salina (NaCl 0,9 %).

Para una buena conservación del chucrut, así como de un buen inicio de la fermentación, los tarros se colocaron en una sala oscura que tenía una temperatura controlada de entre 15 y 20 °C.

3. Medios de cultivo

- **Agar mMRS (VWR Chemicals):** Medio empleado para el recuento de las bacterias del ácido láctico (De Man y Rogosa, 1960). Este medio se suplementó con maltosa monohidrato (Merck Millipore) al 2 % (v/v). Para su preparación, se pesaron 67,3 gramos del medio mMRS y se disolvieron en 900 mL de agua destilada. Por otro lado, se pesaron 20 gramos de maltosa y se disolvieron en 100 mL de agua destilada. Ambas disoluciones se esterilizaron por separado en el autoclave a 121 °C durante 15 minutos y luego se mezclaron. La composición del medio mMRS es: peptona (10

g/L), extracto de carne (10 g/L), extracto de levadura (4 g/L), glucosa (20 g/L), fosfato dipotásico (2 g/L), acetato sódico (5 g/L), citrato de triamonio (2 g/L), sulfato de magnesio (0,2 g/L), sulfato de manganeso (0,05 g/L), agar (13 g/L) y polisorbato 80 (1,08 g/L).

- **Agar TSA:** Medio empleado para el crecimiento general de microorganismos, tengan o no requerimientos especiales para su desarrollo. Este medio se compone de tripticaseína de soja (30 g/L) y agar (20 g/L). El pH del medio se ajustó a un valor de 7,2 y, a continuación, se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos.

4. Análisis químicos. Medición del pH

Para medir el pH, se cogieron 10 mL de la salmuera del chucrut y se midió el pH con un pHmetro digital modelo GLP 21 (Crison).

5. Cultivo, identificación y cuantificación de bacterias cultivables

5.1 Toma de muestras y cultivo

El procedimiento seguido para realizar el análisis microbiológico fue el descrito por Xiong *et al.* (2012), con algunas modificaciones. En nuestro experimento se tomó muestra de la salmuera de tres zonas diferentes del tarro: arriba (U), del medio (M) y de abajo (D), con el objetivo de tener 3 réplicas de cada punto temporal y/o evaluar si la zona de la que tomaba la muestra era determinante.

Para el aislamiento, la identificación y la cuantificación de las bacterias cultivables se tomaron muestra los días 1, 5, 8, 11 y 22. Cada día se abrió un solo tarro del que se tomaron las muestras y para evitar posibles contaminaciones ese tarro se deshechó. Se tomaron 100 µL de salmuera en cada punto de medición. Se prepararon diluciones decimales seriadas, hasta la dilución 10^{-4} , con solución salina estéril 0,9 % NaCl. Se sembraron 15 µL de las diferentes diluciones y en placas del medio TSA y mMRS. Las placas se incubaron en anoxia en una estufa a 30 °C durante 48-72 horas. Para generar un ambiente anóxico, las placas se colocaron en una jarra de anaerobios de 2,5 L (Oxoid) con un sobre de ácido ascórbico (Anaerogen).

El día 22 de fermentación, además de estudiar la microbiota de la salmuera del chucrut, se realizó un análisis de la microbiota del repollo fermentado triturado. Para ello se pesaron 30 gramos de chucrut y se trituraron junto con 30 mL de solución salina con ayuda de una batidora desinfectada previamente con lejía. Partiendo de esa mezcla se realizaron

diluciones decimales seriadas y se sembraron 15 μ L en los medios TSA y mMRS. Las placas se incubaron en las condiciones anteriormente mencionadas.

5.2 Cuantificación de bacterias cultivables

Tras la incubación de las placas de TSA y mMRS se seleccionaron aquellas placas que tuvieran entre 30 y 300 colonias. Se contaron las colonias y se calcularon las UFCs/mL. Estas placas se emplearon también para estudiar la diversidad de morfologías de las colonias.

5.3 Aislamiento de bacterias cultivables

Para estudiar la diversidad de bacterias cultivables. Se observó la diversidad de morfologías de colonia presentes en cada medio de cultivo (TSA y mMRS). A cada una de las morfologías identificadas se le asignó un código y se anotaron sus características. Con el objetivo de obtener un cultivo puro de cada una de estas morfologías se hicieron siembras en aislamiento por agotamiento en estrías en placas nuevas del mismo medio del que se habían aislado. Este procedimiento se repitió 4 veces para asegurar que la colonia elegida estaba libre de contaminaciones y es un cultivo puro (Xiong *et al.*, 2012). La última de las siembras se hizo por duplicado para poder conservarlas por una parte en glicerol 40 % a - 80 °C y, por otro lado, en cultivos sólidos a 4 °C.

5.4 Identificación de las bacterias cultivables

La identificación de las bacterias aisladas se llevó a cabo empleando la espectrometría de masas MALDI-TOF. Esta técnica se está convirtiendo en un método de identificación bacteriana muy usado actualmente debido a que es sencillo, rápido y reproducible (Bloise *et al.*, 2022). Además, no requiere personal altamente cualificadas y permite identificar una gran cantidad de microorganismos diferentes (Ashfaq *et al.*, 2022).

En la técnica MALDI-TOF MS se usa la ionización suave de moléculas, en este caso de las proteínas de las bacterias, para medir la relación masa/carga (m/z) (Singhal *et al.*, 2015). El flujo de trabajo de MALDI-TOF se muestra en la **Figura 2**. Previo a su identificación se reactivaron los cultivos puros de las bacterias que se habían almacenado en glicerol 40 % a -80 °C, para ello, se sembraron mediante la técnica en estría y se dejaron crecer 48 horas a 30 °C. Posteriormente, se extienden en una placa de 96 pocillos las diferentes muestras. Primero se colocó con una punta de pipeta estéril 1 μ L de Test Bacteriano Estándar (BTS) Brunner que actúa como blanco. Luego, se cogió una colonia

aislada de cada una de las muestras bacterianas que se quiere identificar y se realizó un frotis en la posición correspondiente de la placa. Sobre la muestra se aplicó 1 μL de ácido fórmico y se dejó secar. Cuando se secó por completo, se añadió 1 μL de matriz ácido α -ciano-hidroxicinámico (HCCA) y se dejó secar. Esta matriz, es muy importante en el proceso, ya que es un compuesto orgánico absorbente de energía y su función es facilitar la ionización (Mandal y Paul, 2022). Cuando la matriz se seca, cristaliza junto con la muestra, de modo que, al recibir el rayo láser, la matriz proporcionará los protones necesarios para este proceso, formándose una nube de iones que provienen de las bacterias que nos interesan. Esta nube de iones es dirigida hacia un detector de iones acoplado a un analizador de tiempo de vuelo (TOF) que calcula la relación m/z (Bloise *et al.*, 2022). La ionización genera un espectro de masas único de las proteínas de cada bacteria, en el cual hay diferentes picos de iones (Ashfaq *et al.*, 2022). Este espectro de masas forma una “huella digital” de las bacterias denominada huella dactilar de masa peptídica (PMF) (Singhal *et al.*, 2015) , de modo que si lo comparamos con una base de datos de espectros conocidos, podremos identificar nuestra muestra en cuestión de segundos (Ashfaq *et al.*, 2022).

En este estudio se utilizaron los programas *Flexcontrol Software* para controlar el ajuste del MALDI TOF y *MALDI TOF BioTyper Complex* para la identificación de la microbiota del chucrut, mediante la comparación del espectro de masas obtenido del procesamiento de las muestras con una base de datos. Además, este *software* también aporta una puntuación de seguridad, de modo que si tiene una puntuación por encima de 2.000 indica que la identificación es muy probable, una puntuación entre 1.700-1.999 será probable y una puntuación por debajo de 1.700 se considera no fiable (Fong *et al.*, 2018).

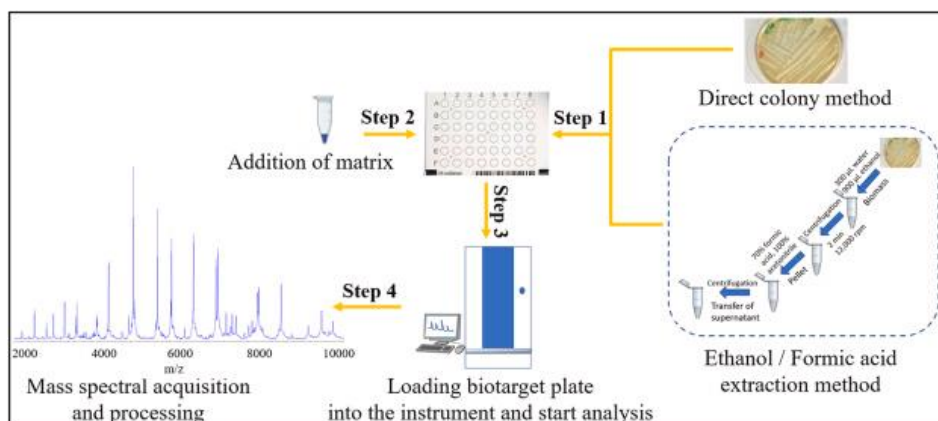


Figura 2. Flujo de trabajo para la identificación bacteriana utilizando MALDI-TOF MS. El primer paso señala la extensión de la colonia en la placa de 96 pocillos. Luego, se añade la matriz. En el tercer paso se introduce la placa en el MALDI-TOF y comenzar el análisis. Por último el cuarto paso se basa en la obtención y procesamiento del espectro de masas (Ashfaq *et al.*, 2022).

6. Análisis filogenético

Partiendo de los espectros de masas de cada una de las colonias analizadas se realizaron filogramas con el programa *MALDI TOF BioTyper Complex* usando su opción de realizar dendrogramas. Este programa compara las similitudes entre los espectros de masas para deducir que bacterias son parecidas entre sí.

7. Análisis estadístico

Con el objetivo de comprobar si existían diferencias significativas entre las UFC/mL del día 22 de la fermentación artesanal y de las UFC/mL del chucrut comercial se realizó un análisis estadístico con el programa *R Studio* (Allair, 2011). Primero se comprobó si los datos se ajustaban a una distribución normal, para ello se realizó la prueba de Shapiro-Wilks. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), donde se estableció un valor de $\alpha=0,05$ para conocer si las diferencias observadas entre las muestras eran significativas.

IV. RESULTADOS

El chucrut es un alimento fermentado que se produce gracias a la fermentación espontánea del repollo blanco junto con un 2 % de sal. El objetivo principal de este TFG es el estudio de la microbiota cultivable presente en el chucrut artesanal. Para ello se realizó un chucrut de forma tradicional partiendo de dos repollos de col blanca. Durante la fermentación se tomaron muestras de la salmuera y se cultivaron en dos medios de cultivo (TSA y mMRS) para evaluar la concentración y la diversidad de bacterias presentes en el chucrut artesanal.

Con cada repollo se prepararon 5 botes para hacer chucrut. El objetivo era poder tener botes suficientes para analizar la microbiota al menos en 5 puntos, pero cada toma de muestra suponía abrir un bote y estropear esa fermentación, por lo que ya no se podía volver a usar. Por otro lado, más botes de los esperados se contaminaron visiblemente, por lo que al final se emplearon fermentaciones procedentes de distintos repollos en los diferentes puntos temporales. Los días 1 y 22 se tomó muestra de las fermentaciones realizadas con el “repollo 1” y los días 5, 8 y 11 se realizaron los cultivos con la salmuera procedente de la fermentación del “repollo 2”.

1. La concentración de bacterias del chucrut artesanal alcanza su máximo el día 8 de la fermentación

La fermentación del chucrut comienza con BAL heterofermentativas que tienen como objetivo formar un ambiente favorable para las bacterias de las siguientes etapas. La última etapa de la fermentación es dominada por bacterias homofermentativas. Las BAL

homofermentativas producen grandes cantidades de ácido láctico, produciendo una acidificación del medio, en el que no van a poder sobrevivir la mayoría de los microorganismos.

Para cuantificar las UFC/mL de la microbiota cultivable del chucrut a lo largo de la fermentación se tomaron muestras de la salmuera de la parte superior (SU), de la parte central (SM) y de la parte inferior (SD) de la fermentación en los días 1, 5, 8, 11 y 22. Además, el día 22 se realizaron siembras del repollo triturado. Las muestras se sembraron en TSA y mMRS para calcular el número de UFCs/mL en cada día del proceso fermentativo (**Figura 3**).

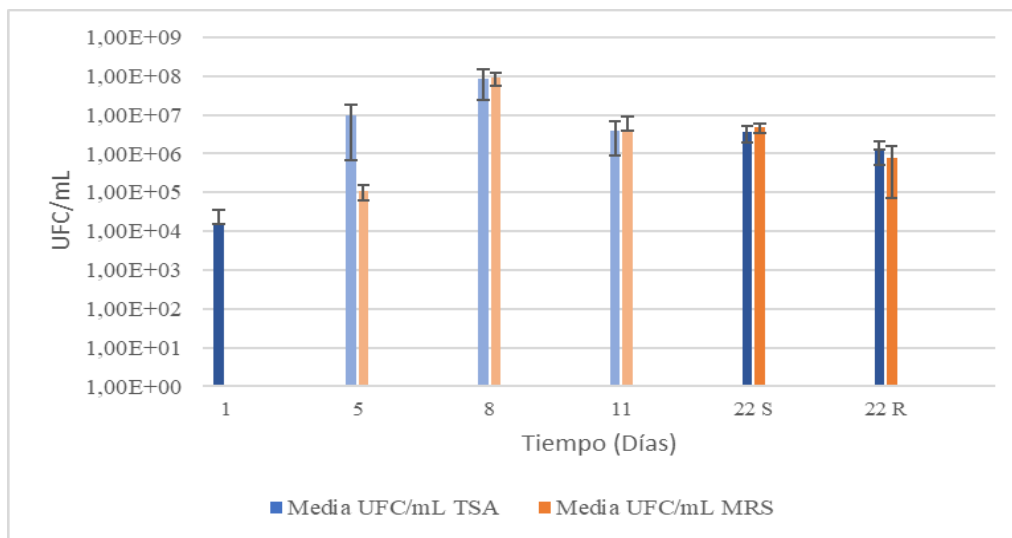


Figura 3: En el eje de ordenadas se representa el logaritmo en base 10 de las UFC/mL frente al tiempo en días representado en el eje de las abcisas. El crecimiento microbiano se evaluó en dos medios de cultivo diferentes TSA (representado en color azul) y mMRS (representado en color naranja). Los días 1 y 22 se realizó la fermentación con el “Repollo 1”, representado de un tono oscuro. En cambio, los días 5, 8 y 11 se realizó el aislamiento con la fermentación del “Repollo 2”, representado de un tono más claro. En el día 22 se analizó la carga microbiana tanto de la salmuera (22 S) como del repollo fermentado (22 R).

En la **Figura 3** se observa cómo el crecimiento en el medio de cultivo mMRS el primer día de la fermentación fue nulo, mientras que en el TSA se detectó una media de $1,55 \times 10^4 \pm 2,12 \times 10^4$. A medida que pasan los días se fue incrementando la concentración de BAL que alcanzó su máximo el día 8 de la fermentación en ambos medios de cultivo. Los días 11 y 22 la concentración microbiana disminuye, pero con valores similares entre ambos medios de cultivo.

El día 22 de la fermentación se tomaron muestras de la salmuera y del repollo. Se observan valores más altos de UFC/mL en las muestras de salmuera tanto en las muestras cultivadas en mMRS como en TSA. Sin embargo, tras la realización de pruebas t-student se determinó que las diferencias observadas entre las UFC/mL de la salmuera y del repollo resultaron no ser significativas en ninguno de los medios de cultivo ($p > 0,05$)

2. La concentración de bacterias en el chucrut artesanal es mayor que en el chucrut comercial

Los beneficios que aporta el chucrut en la salud dependen directamente de la concentración de microorganismos presentes en el momento de su consumo. La FDA (*Food and Drug Administration*) recomienda que la concentración de BAL en las fermentaciones de chucrut debería de estar entre 10^6 y 10^{10} UFCs/mL para proporcionar beneficios al consumidor (Orgeron II *et al.*, 2016).

Tras 22 días de fermentación, el chucrut ya estaría listo para consumir, por lo que lo tomamos como punto final de la fermentación. Por ello, en este estudio, se comparó la concentración microbiana (UFC/mL) presente en el punto final de la fermentación del chucrut preparado artesanalmente y del chucrut comercial (**Figura 4**).

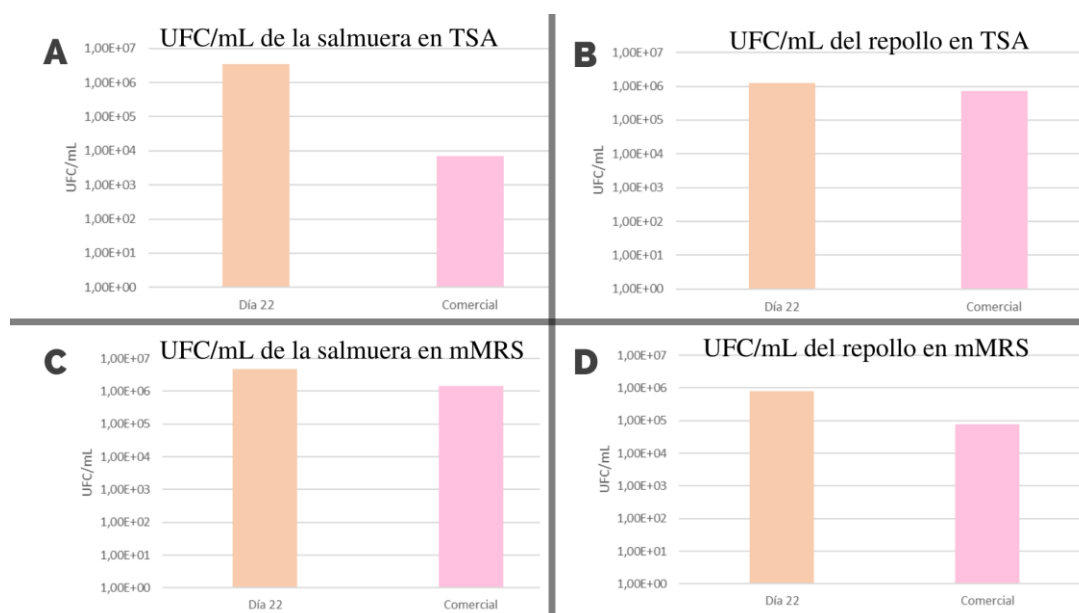


Figura 4. En el eje de las abscisas se representa el logaritmo decimal de las UFC/mL en diferentes fermentaciones y en el eje de las ordenadas se representa el día 22 de la fermentación artesanal de chucrut (representado por el color naranja) y el chucrut comercial (representado por el color rosa). En los gráficos A y C se observan los resultados de las UFC/mL de la salmuera cultivada en los medios TSA y mMRS, respectivamente. En cambio, en los gráficos B y D se observan los resultados del recuento de bacterias cultivables del repollo triturado y cultivado en los medios TSA y mMRS respectivamente.

Los resultados de concentración de bacterias cultivables obtenidos en el medio TSA (**Figura 4 A y B**) muestran una gran diferencia entre la concentración de bacterias en la salmuera de la fermentación artesanal ($3,53 \times 10^6$ UFC/mL) y en la salmuera del chucrut comercial ($6,87 \times 10^3$ UFC/mL).

Para el medio mMRS, la concentración de bacterias en la salmuera del chucrut artesanal y en la salmuera del chucrut comercial es bastante similar, siendo ambas próximas a 10^6 UFC/mL (**Figura 4 C**). En cambio, la concentración de bacterias cultivables del repollo triturado en mMRS es menor en el chucrut comercial ($7,53 \times 10^4$ UFC/mL) que en el chucrut artesanal ($7,98 \times 10^5$ UFC/mL) (**Figura 4 D**).

Los valores de UFC/mL calculados en cada día y en cada punto de muestreo, en los medios TSA y mMRS están recogidos en la **Tabla 5** del **Anexo 1**.

3. No existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de bacterias del chucrut artesanal y del chucrut comercial en el medio TSA, pero si en mMRS

Con el objetivo de comparar los datos de la concentración bacteriana del chucrut artesanal al final de su fermentación (día 22) y del chucrut comercial calculadas a partir de las colonias crecidas en los medios de cultivo TSA y mMRS, se realizó un análisis estadístico. Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para comprobar si los datos del estudio seguían una distribución normal o no. La hipótesis nula será que los datos pertenecen a una distribución normal. El resultado de esta prueba en ambos medios fue $p > 0.05$. Por tanto, aceptamos la hipótesis nula y asumimos que los datos siguen una distribución normal.

Medio	Valor de p
TSA	0.4486
mMRS	0.9316

Tabla 5. Resultado de la prueba de Shapiro-Wilk

El siguiente paso fue comprobar si las diferencias entre los valores UFC/mL del chucrut artesanal y del chucrut comercial eran significativas.

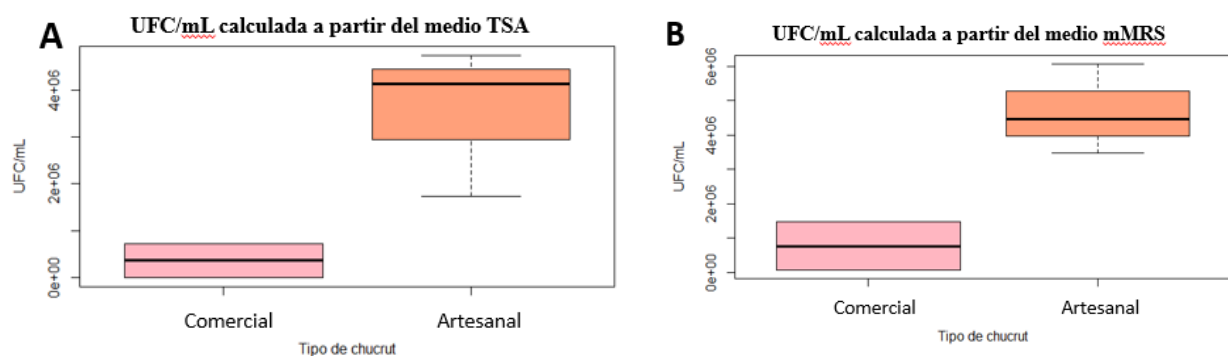


Figura 7: Se representan las UFC/mL para el chucrut comercial (representado en rosa) y el chucrut artesanal, (representado en naranja) para el medio TSA (A) y para el medio mMRS (B).

Los *boxplot* de la **figura 7** muestran las diferencias en la concentración bacteriana calculada a partir del medio de cultivo TSA (**Figura 7 A**) como del medio de cultivo mMRS (**Figura 7 B**). Para comprobar si esas diferencias son significativas o no, como los datos siguen una distribución normal, se realizó un ANOVA de una vía. Los resultados indicaron que las diferencias en la concentración microbiana en el chucrut artesanal y el chucrut comercial calculada a partir de los datos obtenidos del medio de cultivo TSA no son significativas ($p>0.05$). En cambio, las diferencias en la concentración de microorganismos calculada a partir de los datos obtenidos del medio de cultivo mMRS entre el chucrut artesanal y el chucrut comercial son estadísticamente significativas ($p<0.05$).

Medio	Valor de p
TSA	0.08
mMRS	0.0391

Tabla 4. Resultado del ANOVA

4. El chucrut comercial tiene un pH más ácido que el chucrut artesanal

En este estudio, se preparó chucrut siguiendo una receta para su elaboración artesanal y se determinaron el pH, que es un parámetro químico importante en la fermentación. El chucrut artesanal mostró un valor de pH de 4,27, mientras que el chucrut comercial es mucho más ácido y su valor de pH fue 3,35.

5. La diversidad bacteriana va cambiando con el tiempo de fermentación

Para estudiar la diversidad de la microbiota cultivable del chucrut y la evolución de las poblaciones bacterianas del chucrut, se analizó la diversidad de morfologías de colonia presentes en la placas cultivadas de los medios mMRS y TSA. De la fermentación artesanal se aislaron un total de 23 bacterias para su identificación por MALDI-TOF. En la **Tabla 2** se recoge el día de aislamiento de cada morfología y la especie bacteriana a la que pertenece. Dos de las morfologías aisladas del chucrut fermentado artesanalmente (D1 TSA6 y D11 mMRS2) no pudieron ser identificadas.

Los resultados muestran que la diversidad bacteriana fue mayor al inicio de la fermentación del chucrut artesanal. Se observa que la diversidad de bacterias que creció en el medio TSA fue mayor que en el medio mMRS. En los días 1, 5, 8 y 11 de la fermentación se identificaron las siguientes especies a partir de las colonias crecidas en el medio TSA: *Staphylococcus epidermidis*, *Pantoea agglomerans*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Leclercia adenocaryolata*, *Lactococcus lactis*, *Lentilactobacillus parabucheri*

y *Lelliottia amnigena*. El medio de cultivo mMRS es un medio de enriquecimiento que favorece el crecimiento de BAL. El primer día de fermentación no creció nada en el medio mMRS. Las muestras cultivadas en mMRS de los días 5, 8, 11 y 22 permitió identificar varias BAL como *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lentilactobacillus kefir*, *Lentilactobacillus parabucheri* y sobre todo la que parece dominar la parte final de la fermentación *Lactococcus lactis*. El último día de la fermentación, la diversidad bacteriana disminuyó y tan sólo se identificó a *Lactococcus lactis*, que fue la única especie aislada tanto en el medio mMRS como en el TSA.

Día	MEDIO TSA		MEDIO mMRS	
	Código	Especie bacteriana	Código	Especie bacteriana
1	TSA1, TSA2, TSA3 y TSA4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-
	TSA5	<i>Pantoea agglomerans</i>	-	-
	TSA6	No identificado	-	-
	TSA7	<i>Stenotrophomonas sp</i>	-	-
5	TSA2	<i>Serratia marcescens</i>	MRS1, MRS2 y MRS3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
	TSA6	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-
	TSA8	<i>Leclercia adenocarboxylata</i>	-	-
	TSA9, TSA9p y TSA10	<i>Pantoea agglomerans</i>	-	-
8	TSA1 y TSA12	<i>Lactococcus lactis</i>	MRS4 y MRS5	<i>Lactococcus lactis</i>
	TSA2, TSA8 y TSA11	<i>Serratia marcescens</i>	-	-
11	TSA6	<i>Lentilactobacillus parabucheri</i>	MRS2	No identificado
	TSA11 y TSA14	<i>Serratia marcescens</i>	MRS3	<i>Lentilactobacillus kefir</i>
	TSA13	<i>Lelliottia amnigena</i>	-	-
22	TSA18	<i>Lactococcus lactis</i>	MRS6 y MRS7	<i>Lactococcus lactis</i>

Tabla 3. Bacterias aisladas e identificadas a partir de muestras del chucrut artesanal

6. El chucrut comercial tiene una diversidad mayor de bacterias que el chucrut artesanal elaborado en este estudio

Para estudiar la microbiota cultivable del chucrut comercial se tomaron muestras de la salmuera y del repollo y se cultivaron en los medios de cultivo TSA y mMRS. Se observó la diversidad de morfologías de colonias y se aislaron un total de 12 microorganismos que se analizaron con MALDI-TOF. De los 12 microorganismos aislados 8 se pudieron identificar

correctamente. Se identificó la presencia 4 especies bacterianas diferentes (*Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis*, *Staphylococcus epidermidis* y *Paenibacillus amylolyticus*) y de una levadura (*Kazachstania exigua*).

Los resultados muestran que la diversidad microbiana cultivable del chucrut comercial estudiado es mayor que diversidad microbiana cultivable del chucrut artesanal elaborado para este trabajo.

MEDIO TSA		MEDIO mMRS	
Código	Especie bacteriana	Código	Especie bacteriana
SC TSA1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	SC MRS1 y RC MRS1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
SC TSA2 y RC TSA2	<i>Levilactobacillus brevis</i>	SC MRS2 y RC MRS 2	No identificado
SC TSA4	<i>Kazachstania exigua</i>	SC MRS3 y RC MRS 3	No identificado
RC TSA1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-
RC TSA3	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	-	-

Tabla 4. Microorganismos aislados e identificados a partir de muestras del chucrut comercial

7. Las especies microbianas no identificadas no pueden ser correctamente identificadas con filogramas de los espectros de masas

Tras la identificación molecular con MALDI-TOF, se realizaron filogramas mediante el programa *MALDI TOF BioTyper Complex*. Este programa utiliza los espectros de masas generados durante la identificación para compararlos entre sí y agrupar aquellos espectros que son similares. De este modo, los espectros de masas de las especies que no se pudieron identificar correctamente se podrían comparar con los espectros de masas de aquellas bacterias que sean similares y que si se identificaron correctamente.

En la **Figura 5** se muestra el árbol filogenético generado a partir de los espectros de masas obtenidos de cada una de las colonias aisladas del chucrut artesanal y del chucrut comercial. Se aprecian diferentes grupos distribuidos en función de su similitud. Por ejemplo, el grupo formado por las cepas bacterianas numeradas desde el 29 hasta el 35 corresponden a *Lactococcus lactis*. De este modo, aunque algunas colonias aisladas del chucrut no hayan podido ser identificadas con éxito, podemos conocer a qué especies se encuentran próximas, ya que serán aquellas a las que se encuentren más cercanas en el árbol.

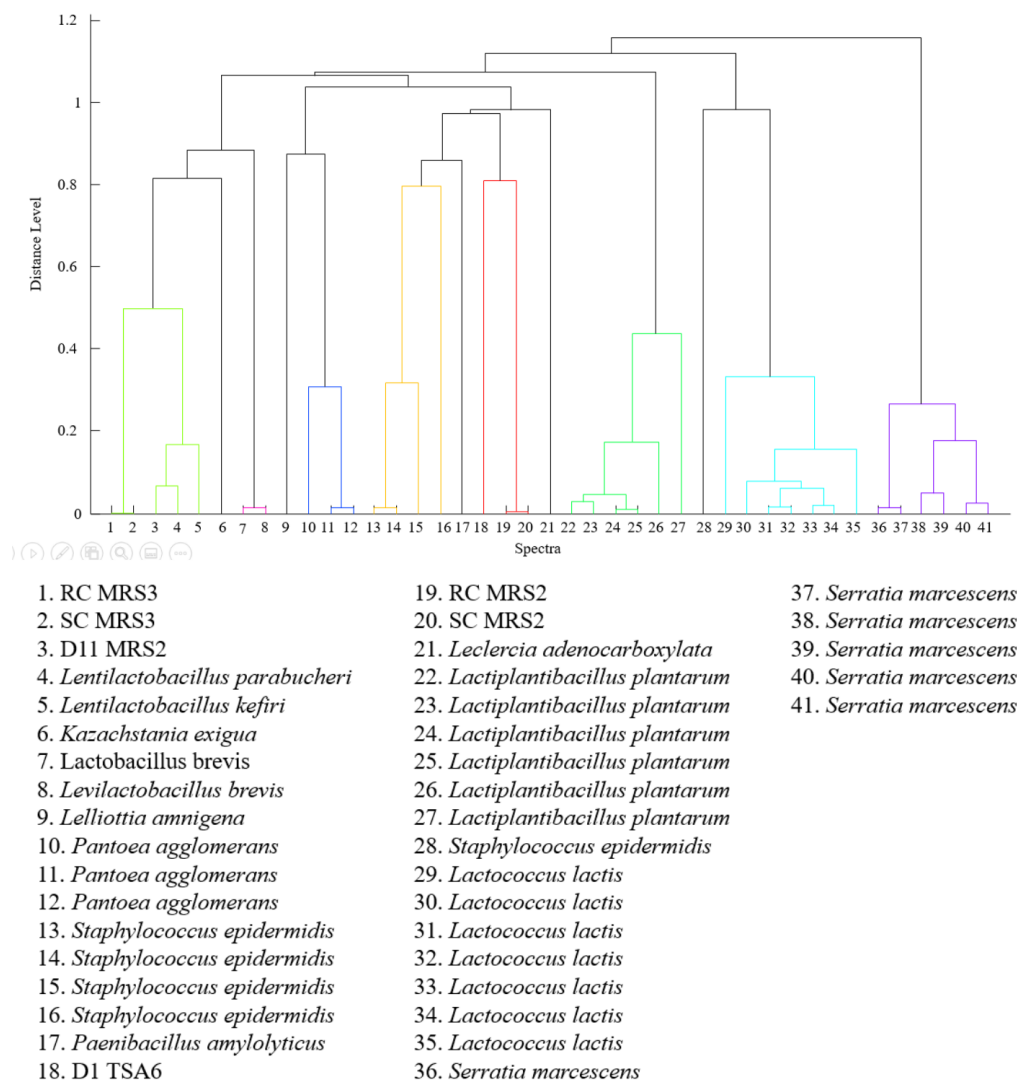


Figura 5. Árbol filogenético elaborado a partir de los espectros de masas de las especies microbianas aisladas del chucrut artesanal y del chucrut comercial. En la parte inferior de la figura se puede ver una leyenda de que especie corresponde a cada número. Las especies no identificadas se identifican con su código.

En la **Figura 5** podemos ver cómo las colonias identificadas como “RC MRS3” (1) y “SC MRS3” (2) provenientes del chucrut comercial se parecen mucho entre ellas. Por otro lado, la colonia “D11 MRS2” (3) proveniente del chucrut tradicional es similar a *Lentilactobacillus parabucheri* y en menor medida a *Lentilactobacillus kefir*, por lo que “D11 MRS2” (3) podría ser una especie del grupo de las bacterias lácticas. Cabe destacar que las colonias más cercanas a “RC MRS3” (1) y “SC MRS3” (2) son *Lentilactobacillus parabucheri*, *Lentilactobacillus kefir* y “D11 MRS2” (3) por lo que podría tener alguna similitud con ellas.

Por otro lado, se encontró un grupo sin identificar formado por las colonias “D1 TSA6” (18) “RC MRS2” (19) y “SC MRS2” (20). Dentro de este grupo se puede concluir que “RC MRS2” (19) y “SC MRS2” (20) podrían ser la misma especie o la misma especie, pero de cepas diferentes ya que tienen una distancia muy pequeña entre ellas, menor que las colonias 22 y 23 que están identificadas como la misma especie. Por otro lado, “D1 TSA6” (18) no guarda ninguna similitud con otras colonias que estén identificadas por lo que es imposible su identificación mediante este método.

V. DISCUSIÓN

1. El chucrut artesanal presenta un pH diferente a los observados en otros estudios

Los cambios en el pH son uno de los factores más importantes en una buena fermentación del repollo para la elaboración del chucrut. Las bacterias involucradas en la fermentación aumentan la concentración de ácido láctico y esto favorece la disminución del pH. Esta situación inhibe el crecimiento de microorganismos que dañen la fermentación de los alimentos y al mismo tiempo preserva las características del repollo (Zabat *et al.*, 2018). La importancia del pH en la fermentación del chucrut no radica solamente en la calidad y en la conservación del repollo, sino también en que es un factor clave para determinar el grado de fermentación.

El valor del pH del chucrut elaborado para este TFG mostró un valor de 4,27 al final de la fermentación, el cual es superior a los valores descritos en la literatura. El estudio realizado por Cayré *et al.* (2011) resalta la rápida acidificación del chucrut en la primera semana de fermentación. Sus valores descendieron desde 5,67 hasta 3,38. En otros estudios, los valores del pH final de la fermentación también giran en torno a 3,8-3,2 (Xiong *et al.*, 2012; Halász *et al.*, 1999). El pH del chucrut comercial (Kramer) es de 3,35 que si se ajusta a valores descritos en la literatura. El chucrut comercial empleado en este trabajo lleva como aditivos ácido ascórbico y ácido láctico, añadidos para acidificar el pH y para evitar el oscurecimiento del repollo.

Las diferencias en el pH podrán deberse a la composición química de cada repollo, puesto que ésta es diferente y esto también puede afectar en la concentración final de microorganismos, debido a una menor concentración de azúcar que conlleva menos producción de ácido (Sayago y López, 1985). Otra posibilidad es que el chucrut elaborado para este TFG no se haya elaborado correctamente puesto que el pH no es suficientemente ácido.

2. La concentración de microorganismos es decisiva para un buen chucrut final

El proceso de fermentación del chucrut se divide en dos etapas con diferente diversidad y concentración de microorganismos (Yang *et al.*, 2019). Estos microorganismos son los que confieren parte de sus propiedades beneficiosas al chucrut (Orgeron II *et al.*, 2016).

Por ello, en este estudio se cuantificaron las bacterias cultivables presentes en el chucrut usando dos medios de cultivo durante todo el proceso fermentativo. El proceso de fermentación del chucrut elaborado en este estudio comenzó con una baja concentración de microorganismos (aproximadamente $1,55 \times 10^4$ en el caso de las bacterias cultivables en el medio TSA y 0 en el caso de las bacterias cultivables en medio mMRS). Los valores de UFC/mL alcanzaron su máximo el octavo día de fermentación con un valor de $8,73 \times 10^7$ UFCs en el medio TSA/mL y $9,16 \times 10^7$ UFCs en el medio mMRS/mL. Tras el octavo día de fermentación, la concentración de bacterias disminuyó. Los valores de concentración de bacterias pudieron verse disminuidos por el ambiente ácido. Esta tendencia también se observa en el estudio de Yang *et al.* (2019) y en el realizado por Cayré *et al.* (2011).

La fermentación del chucrut se lleva a cabo naturalmente gracias a la microbiota autóctona del repollo. Las BAL son las bacterias que dominan esta fermentación. (Halász *et al.*, 1999). Zabat *et al.* (2018) observaron que los valores de BAL en la materia prima cruda antes de la fermentación espontánea eran extremadamente bajos, esta tendencia también puede observarse en este estudio ya que como vimos en la **Figura 3** del apartado “**2.3 Cuantificación de las bacterias**” en **Resultados** el primer día tras el inicio de la fermentación no creció ninguna colonia en el medio mMRS, lo que puede indicar que las BAL se encontraban en concentraciones muy bajas.

La concentración final de bacterias es decisiva para que el alimento beneficie al consumidor. En la **Figura 4** se ve que el día 22 de fermentación del chucrut artesanal se detectaron $3,53 \times 10^6$ UFCs en el medio TSA/mL de salmuera y $4,67 \times 10^6$ UFCs en el medio mMRS/mL de salmuera. En cambio, en el chucrut comercial los valores de UFC/mL fueron de $3,7 \times 10^5$ en el medio TSA y $7,74 \times 10^5$ en el medio mMRS. Según la FDA el rango de UFC/mL para aportar beneficios es entre 10^6 y 10^{10} UFC/mL, por lo que los resultados del chucrut artesanal están dentro de este rango, pero los valores del chucrut comercial están en el límite del valor recomendado por la FDA.

Las diferencias en la concentración de microorganismos observadas entre el chucrut artesanal y comercial podrían deberse, además del proceso de preparación a que la composición química de cada repollo es diferente y esto también puede afectar en la

concentración final de microorganismos, debido a que una menor concentración de azúcar conlleva menos producción de ácido y se alterará el proceso fermentativo (Sayago y López, 1985).

3. El chucrut de este estudio tiene una diversidad microbiana diferente a otros estudios similares

La fermentación del chucrut comienza con la acción de las bacterias heterofermentativas (Zabat *et al.*, 2018). En nuestro estudio las bacterias heterofermentativas identificadas fueron *Lentilactobacillus parabucheri* y *Lentilactobacillus kefir* las cuales sólo fueron aisladas e identificadas el día 11 de fermentación. En otros estudios, las especies bacterianas heterofermentativas aparecían entre el día 1 y 3 de la fermentación y desaparecían a partir del día 7 de la fermentación. Generalmente pertenecían a los géneros *Weissella* y *Leuconostoc* (Plengvidhya *et al.*, 2007; Touret *et al.*, 2018).

Por otra parte, está descrito que en la última etapa de la fermentación predominan las especies homofermentativas (Plengvidhya *et al.*, 2007). En este estudio la especie dominante en el punto final de la fermentación fue *Lactococcus lactis*, la cual es una bacteria homofermentativa que produce ácido láctico como producto principal de la fermentación (Samaržija *et al.*, 2001). También produce bacteriocinas que inhiben el crecimiento de los microorganismos no deseables en la fermentación (Yang *et al.*, 2020). *Lactococcus lactis* es una especie con gran importancia en la fermentación de los alimentos y se ha usado durante décadas para la producción industrial de alimentos como quesos, yogur o chucrut (Song *et al.*, 2017). En el estudio de Plengvidhya *et al.*, 2007 se vió que aproximadamente el 70 % de las muestras identificadas a partir del día 9 de fermentación se correspondían con *Lactiplantibacillus plantarum*, esta bacteria también es homofermentativa y es una de las especies históricamente importantes en la fermentación del chucrut (Zabat *et al.*, 2018). El resto de las especies identificadas fueron *L. argentinum* y *Levilactobacillus brevis*.

Lactiplantibacillus plantarum se identificó en las muestras del día 5 de fermentación en el chucrut artesanal elaborado en este trabajo. En este trabajo se llevó a cabo la detección de especies bacterianas en función de la morfología de las colonias. Varias especies bacterianas pueden tener una morfología similar. Incluso, cepas de la misma especie pueden tener una morfología diferente. Por tanto, si no se toma una muestra suficientemente grande de colonias similares, algunas especies pueden pasar desapercibidas.

Además de BAL, en este estudio también se identificaron otras especies de bacterias como *Staphylococcus epidermidis*, *Pantoea agglomerans*, *Stenotrophomonas sp.* La presencia de *Staphylococcus epidermidis* seguramente se deba a que la microbiota de la microbiota de la piel está dominada por *Staphylococcus epidermidis* y a que el proceso tradicional se realiza moviendo y apretando el repollo con las manos (Suárez, 2013). *Pantoea agglomerans* pertenece a un taxón muy diverso que tiene una gran capacidad de adaptación a muchos organismos (plantas, animales y seres humanos) (Dutkiewicz *et al.*, 2016). Recientemente, un estudio ha identificado a *Pantoea agglomerans* como un fitopatógeno que podría ser causante de la pudrición blanda bacteriana en repollo de col china (Guo *et al.*, 2020). La presencia de esta especie bacteriana podría ser una razón por la cual se pudrieron la mayor parte de los tarros que provenían del repollo 1. Por último, *Stenotrophomonas sp.* puede estar presente en la microbiota de plantas y ha sido aislada de las raíces de numerosos vegetales (Ryan *et al.*, 2009). En el estudio realizado por Rico (2015) se analizó la microbiota de algunos vegetales identificando bacterias como *Serratia marcescens*, *Pantoea agglomerans* o *Stenotrophomonas maltophilia*, las cuales coinciden con las identificadas en este estudio. Es probable que estas especies bacterianas formen parte de la microbiota del repollo empleado en este estudio.

Comparando los resultados obtenidos con la bibliografía existente, podemos concluir que las especies bacterianas que se consideran históricamente importantes en la fermentación del chucrut (*L. mesenteroides*, *L. plantarum* y *L. brevis*) no están presentes en el chucrut elaborado en este trabajo, ya que en la fermentación artesanal sólo está presente *L. plantarum* (Zabat *et al.*, 2018). Además, otros autores que han empleado el medio TSA para aislar e identificar la microbiota del chucrut han documentado la presencia de BAL como *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, aunque *L. plantarum* era la dominante, sobre todo al final de la fermentación (Cayré *et al.*, 2011).

En cuanto al chucrut comercial se aislaron 12 cepas diferentes, de las cuales se identificaron correctamente 8. Las especies microbianas identificadas fueron las bacterias *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Paenibacillus amylolyticus* y la levadura *Kazachstania exigua*. En este caso *Lactiplantibacillus plantarum* y *Lentilactobacillus brevis* son dos especies de BAL que tienen una gran importancia en el producto final aportando los beneficios probióticos (Touret *et al.*, 2018). Por otro lado *Kazachstania exigua*, es una levadura generalmente relacionada con la

microbiota de la masa madre (Sugihara *et al.*, 1971). Las levaduras están relacionadas con la formación de compuestos volátiles que dan un olor y sabor característico al chucrut, pero una alta concentración podría generar fermentaciones no deseadas (Yang *et al.*, 2019). Por último, *Paenibacillus amylolyticus* es un taxón de bacterias incluidas antiguamente en el género *Bacillus* que se encuentra en la semilla y en las hojas de algunos vegetales (Toyota, 2015).

El chucrut es un alimento indefinido desde el punto de vista microbiológico, ya que su comunidad microbiológica final depende en gran parte de la diversidad de microorganismos que haya en las materias primas, por ello la microbiota entre unas fermentaciones y otras puede ser muy variable (Vinderola y Pérez-Marc, 2021), lo cual podría justificar los resultados obtenidos en este trabajo. Otra razón posible es el pequeño tamaño de muestreo que se realizó en este trabajo. También es posible que hubiera más especies con morfologías muy similares o que alguna de ellas no creciera bien en los medios de cultivo empleados. Por ello, cabe la posibilidad de que no se haya determinado completamente la microbiota del chucrut y los resultados obtenidos puedan subestimar la diversidad bacteriana de las fermentaciones del chucrut. También es posible que el chucrut no se haya elaborado correctamente.

VI. CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo fue estudiar la microbiota cultivable a lo largo de la fermentación espontánea del repollo blanco. Se cultivó, se aisló e identificó la microbiota cultivable. Con ello, se puede concluir que:

1. La mayor concentración bacteriana del chucrut artesanal se encuentra en el día 8 de fermentación.
2. El chucrut artesanal tiene una mayor concentración de bacterias que el chucrut comercial.
3. La diversidad de especies microbianas al final de la fermentación es mayor en el chucrut comercial.
4. El pH del chucrut comercial es más ácido que en el chucrut artesanal.
5. La microbiota de la fermentación artesanal es liderada por *Lactococcus lactis*.

REFERENCIAS

- Allair, J. J. (2011) RStudio (Versión 1.4.1103) [Programa de ordenador]. RStudio, Inc.
- Ashfaq, M. Y., Da'na, D. A. y Al-Ghouti, M. A. (2022) "Application of MALDI-TOF MS for identification of environmental bacteria: A review", *Journal of Environmental Management*, 305: 114359. doi:10.1016/j.jenvman.2021.114359.
- Beena Divya, J., Kulangara Varsha, K., Madhavan Nampoothiri, K., Ismail, B. y Pandey, A. (2012) "Probiotic fermented foods for health benefits", *Engineering in Life Sciences*, 12(4), pp. 377-390. doi:10.1002/elsc.201100179.
- Bloise, I., Corcuera, M. T., García-Rodríguez, J. y Mingorance, J. (2022) "Microbial Identification in the Clinical Microbiology Laboratory Using MALDI-TOF-MS.", en J Corrales, F., Paradela, A., y Marcilla, M. (eds.) *Clinical Proteomics. Methods in Molecular Biology*. vol. 2420. New York, NY: Humana Press, pp. 207-216. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1936-0_16.
- Cabeza, E. (2011) *Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica*. Revisión. Universidad de Pamplona, Colombia. Disponible en: https://www.academia.edu/992789/Bacterias_ácido_lácticas_BAL_aplicaciones_como_cultivos_estárter_para_la_industria_láctea_y_cárnica.
- Campbell-McBride, D. N. (2004) *Síndrome del intestino y la psicología*. Cambridge: Medinform Publishing.
- Cayré, M., Castro, M. y Garro, O. (2011) "Elaboración de chucrut: proceso de fermentación", *Práctica de laboratorio*, Universidad Nacional del Nordeste. Disponible en: <https://kcina.files.wordpress.com/2011/05/chucrut.pdf>.
- Dimidi, E., Cox, S., Rossi, M. y Whelan, K. (2019) "Fermented Foods: Definitions and Characteristics , Gastrointestinal Health and Disease", *Nutrients*, 11: 1806, pp. 1-26. doi:<https://doi.org/10.3390/nu11081806>.
- Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M. K., Golec, M. y Milanowski, J. (2016) "*Pantoea agglomerans*: A mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects", *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(2), pp. 206-222. doi:10.5604/12321966.1203879.
- Fong, P., Francis, M. J., Hamblin, J. F., Korman, T. M. y Graham, M. (2018) "Identification and diversity of *Actinomyces* species in a clinical microbiology laboratory in the MALDI-TOF MS era", *Anaerobe*, 54, pp. 151-158. doi:10.1016/j.anaerobe.2018.09.007.
- Guo, M., Liu, Y., Liu, S. N., Qu, Q. Z., Cui, T. F. y Zhang, Y. W. (2020) "First Report of Bacterial Soft Rot Caused by *Pantoea agglomerans* on Chinese Cabbage in China", *Plant disease*, 104(1), pp. 277-278. doi:10.1094/PDIS-04-19-0746-PDN.
- Halász, A., Baráth, Á. y Holzapfel, W. H. (1999) "The influence of starter culture selection on sauerkraut fermentation", *Lebensm Unters Forsch*, 208, pp. 434-438. doi:10.1007/s002170050443.
- De Man, J. . y Rogosa, M. (1960) "A readily prepared medium for the cultivation of the *Lactobacilli*", *Journal of bacteriology*, 23(1), pp. 130-135. doi:10.1128/jb.51.4.560-561.1946.
- Mandal, S. M. y Paul, D. (2022) "MALDI-TOF MS for Bacterial Identification", en *Automatización y Técnicas Básicas en Microbiología Médica*. Nueva York, NY.: Springer, pp. 77-86. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2372-5_6.
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J. y Al, E. (2017) "Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond", *Current Opinion in Biotechnology*, 44, pp. 94-102. doi:10.1016/j.copbio.2016.11.010.
- Orgeron II, R. P., Corbin, A. y Scott, B. (2016) "Sauerkraut: A Probiotic Superfood", *Functional Foods in Health and Disease*, 6(8), pp. 536-543. doi:10.31989/ffhd.v6i8.262.
- Parra Huertas, R. (2016) "Review. bacterias acido lacticas: papel funcional en los alimentos", *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), pp. 93-105.

- Pederson, C. S. y Albury, M. N. (1969) "The Sauerkraut Fermentation", *Bulletin*, pp. 1-84. Disponible en: <https://ecommons.cornell.edu/handle/1813/4794>.
- Plengvidhya, V., Breidt, F., Lu, Z. y Fleming, H. P. (2007) "DNA fingerprinting of lactic acid bacteria in sauerkraut fermentations", *Applied and Environmental Microbiology*, 73(23), pp. 7697-7702. doi:10.1128/AEM.01342-07.
- Ramirez, J., Rosas Ulloa, P., Velazquez Gonzalez, M. Y., Ulloa, J. A. y Arce Romero, F. (2011) "Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud", *Repositorio institucional Aramara*, 9, pp. 44-51. Disponible en: [http://dspace.uan.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/436/1/Bacterias lácticas%2C Importancia en alimentos y sus efectos en la salud.pdf](http://dspace.uan.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/436/1/Bacterias%20lácticas%20Importancia%20en%20alimentos%20y%20sus%20efectos%20en%20la%20salud.pdf).
- Rico, H. (2015) "Coliform bacteria in fresh vegetables : From cultivated lands to consumers Coliform bacteria in fresh vegetables : from cultivated lands to consumers", en *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Valencia, pp. 1175-1181.
- Rodríguez, V. y Zumba, D. (2021) "Influencia de tres variedades de col (Brassica oleracea) en la elaboración de chucrut", *Ecuadorian Science Journal*, 5(3), pp. 99-111. doi:10.46480/esj.5.3.147.
- Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., Berg, G., van der Lelie, D. y Dow, J. M. (2009) "The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*", *Nature Reviews Microbiology*, 7, pp. 514-525. doi:10.1038/nrmicro2163.
- Samaržija, D., Antunac, N. y Havranek, J. L. (2001) "Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review", *Mljekarstvo*, 51(1), pp. 35-48.
- Sayago, J. y López, F. (1985) "Elaboración del chucrut", *Ciencia e Ingeniería*, 18(1), pp. 57-61.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K. y Viridi, J. S. (2015) "MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis", *Frontiers in Microbiology*, 6(791), pp. 1-16. doi:10.3389/fmicb.2015.00791.
- Song, A. A. L., In, L. L. A., Lim, S. H. E. y Rahim, R. A. (2017) "A review on *Lactococcus lactis*: From food to factory", *Microbial Cell Factories*, 16: 55. doi:10.1186/s12934-017-0669-x.
- Suárez, J. (2013) "Microbiota autóctona , probióticos y prebióticos", *Nutrición Hospitalaria*, 28, pp. 38-41. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112013000700009&lng=es&nrm=iso.
- Sugihara, T. F., Kline, L. y Miller, M. W. (1971) "Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. I. Yeasts responsible for the leavening action.", *Applied microbiology*, 21(3), pp. 456-458. doi:10.1128/aem.21.3.456-458.1971.
- Szutowska, J. (2020) "Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: a systematic literature review", *European Food Research and Technology*, 246, pp. 357-372. doi:10.1007/s00217-019-03425-7.
- Touret, T., Oliveira, M. y Semedo-Lemsaddek, T. (2018) "Putative probiotic lactic acid bacteria isolated from sauerkraut fermentations", *PLoS ONE*, 13(9), pp. 1-16. doi:10.1371/journal.pone.0203501.
- Toyota, K. (2015) "Bacillus-related spore formers: Attractive agents for plant growth promotion", *Microbes and Environments*, 30(3), pp. 205-207. doi:10.1264/jsme2.ME3003rh.
- Vinderola, G. y Pérez-Marc, G. (2021) "Alimentos fermentados y probióticos en niños. La importancia de conocer sus diferencias microbiológicas", *Archivos Argentinos de Pediatría*, 119(1), pp. 56-61. doi:10.5546/aap.2021.56.
- Xiong, T., Guan, Q., Song, S., Hao, M. y Xie, M. (2012) "Dynamic changes of lactic acid bacteria flora during Chinese sauerkraut fermentation", *Food Control*, 26(1), pp. 178-181. doi:10.1016/j.foodcont.2012.01.027.
- Yang, Xiaozhe, Hu, W., Jiang, A., Xiu, Z., Ji, Y., Guan, Y., Sarengaowa y Yang, Xiangyan (2019) "Effect of salt concentration on quality of northeast sauerkraut fermented by *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* salt effects on northeast sauerkraut fermentation", *Food Bioscience*, 30: 100421.

doi:10.1016/j.fbio.2019.100421.

Yang, Xiaozhe, Hu, W., Xiu, Z., Jiang, A., Yang, Xiangyan, Sarengaowa, Ji, Y., Guan, Y. y Feng, K. (2020) "Comparison of northeast sauerkraut fermentation between single lactic acid bacteria strains and traditional fermentation", *Food Research International*.109553. doi:10.1016/j.foodres.2020.109553.

Zabat, M. A., Sano, W. H., Wurster, J. I., Cabral, D. J. y Belenky, P. (2018) "Microbial community analysis of sauerkraut fermentation reveals a stable and rapidly established community", *Foods*, 7(77), pp. 1-8. doi:10.3390/foods7050077.

ANEXOS

ANEXO 1. Recuentos microbianos

Tabla 5. Recuento de UFC/mL en la fermentación artesanal de chucrut y en el chucrut comercial. Se muestran las UFC/mL contabilizadas en los tres puntos de muestreo (SU, SM y SD), así como la media de los tres.

TSA				mMRS			
Día	Punto	UFC/mL	Media UFC/mL	Día	Punto	UFC/mL	Media UFC/mL
1	SU	$3,47 \times 10^3$	$1,55 \times 10^4$	1	SU	0	0
	SM	4×10^4			SM	0	
	SD	$3,07 \times 10^3$			SD	0	
5	SU	$1,77 \times 10^7$	$9,49 \times 10^6$	5	SU	$1,41 \times 10^5$	$1,07 \times 10^5$
	SM	$1,41 \times 10^5$			SM	$1,23 \times 10^5$	
	SD	$1,07 \times 10^7$			SD	$5,67 \times 10^4$	
8	SU	$4,2 \times 10^7$	$8,73 \times 10^7$	8	SU	$6,53 \times 10^7$	$9,16 \times 10^7$
	SM	$1,6 \times 10^8$			SM	$1,29 \times 10^8$	
	SD	6×10^7			SD	$8,00 \times 10^7$	
11	SU	$6,6 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$	11	SU	$9,73 \times 10^5$	$3,89 \times 10^6$
	SM	$7,87 \times 10^5$			SM	$4,87 \times 10^5$	
	SD	4×10^6			SD	$1,02 \times 10^7$	
22S	SU	$1,73 \times 10^6$	$3,53 \times 10^6$	22S	SU	$3,47 \times 10^6$	$4,67 \times 10^6$
	SM	$4,13 \times 10^6$			SM	$4,47 \times 10^6$	
	SD	$4,73 \times 10^6$			SD	$6,07 \times 10^6$	
22R	RU	$6,20 \times 10^5$	$1,27 \times 10^6$	22R	RU	$1,93 \times 10^5$	$7,98 \times 10^5$
	RM	$1,07 \times 10^6$			RM	$6,00 \times 10^5$	
	RD	$2,13 \times 10^6$			RD	$1,60 \times 10^6$	
Comercial	RC	$7,33 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$	Comercial	RC	$7,53 \times 10^4$	$7,74 \times 10^5$
	SC	$6,87 \times 10^3$			SC	$1,47 \times 10^6$	