

RESUMEN

La presente tesis doctoral plantea distintas estrategias para el desarrollo y aplicación de envases activos portadores de agentes de biocontrol vivos, con el fin de inhibir la proliferación de microorganismos como bacterias y hongos patógenos y alterantes y así, conseguir aumentar la seguridad y prolongar la vida útil de los alimentos.

El desarrollo de envases activos antibacterianos se llevó a cabo incorporando bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas, *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus sakei* en diferentes matrices formadoras de películas. Previa a la preparación de las películas activas, se estudió la actividad antimicrobiana de los agentes naturales seleccionados frente a *Listeria monocytogenes*. Los resultados sugirieron que, a partir de una determinada concentración inicial de bacterias viables, estos microorganismos eran buenos candidatos para ser utilizados como aditivos naturales en materiales de envasado de alimentos, siendo una alternativa al uso de aditivos de origen sintético. En este trabajo se observó que la viabilidad inicial de las bacterias ácido lácticas (LAB) era esencial para obtener una buena capacidad antibacteriana por lo que la optimización de la composición de las películas o recubrimientos fue crucial para su aplicación con éxito.

El polímero escogido como base para hacer las películas y recubrimientos mediante la técnica de *casting*, fue el alcohol polivinílico, (PVOH) mezclado con diferentes proteínas, gelatina y caseinato sódico y sus versiones hidrolizadas añadidas en diferentes proporciones.

En este estudio, *L. lactis* demostró tener una mayor resistencia a la deshidratación durante la preparación y almacenamiento de las películas que *L. sakei*. Las películas de PVOH mezcladas con gelatina hidrolizada y caseína hidrolizada dotaron de protección a las bacterias ácido lácticas durante el secado y demostraron tener una mayor efectividad antilisteria. Por último, se varió la proporción de caseína hidrolizada obteniendo una mayor viabilidad de las bacterias en las películas prolongada en el tiempo a mayor proporción de HCs.

Para desarrollar un envase activo antilisteria, se adaptaron las matrices para ser aplicadas como recubrimiento sobre ácido poliláctico (PLA) con el objetivo de desarrollar bolsas activas antilisteria para crema de setas y como separadores de lonchas de jamón cocido. Los recubrimientos demostraron tener una efectividad similar a la obtenida con las películas *in vitro*. Sin embargo, su eficacia disminuyó ligeramente al ser aplicadas en la crema de champiñones y el jamón cocido debido a la complejidad de las matrices alimentarias utilizadas, pero siendo una buena herramienta para, junto a otras estrategias de conservación, asegurar la salubridad de los alimentos. Se llevaron a cabo ensayos sensoriales con consumidores y se obtuvo una buena aceptación de ambos productos, pero una alteración del sabor debido a la generación de ácido láctico en la crema de champiñones corregible mediante correctores de acidez sin modificación de la efectividad antimicrobiana.

Para desarrollar envases que aumentaran la vida útil, se trabajó para ampliar el espectro de acción de *L. lactis* frente a las bacterias Gram-negativas, normalmente responsables de la descomposición de los alimentos. Combinando el agente de biocontrol productor de nisina, *L. lactis*, con una baja concentración de ácido fítico, sustancia quelante y desestabilizadora de la membrana bacteriana, se amplió el espectro antimicrobiano de *L. lactis* frente a las bacterias Gram-negativas obteniendo una nueva herramienta para garantizar la seguridad alimentaria y prolongar la vida útil de los alimentos. Las películas desarrolladas presentaron muy buena actividad antimicrobiana frente *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *Listeria monocytogenes* en medio de cultivo a temperaturas de refrigeración y simulando

roturas en la cadena del frío. Por último, se desarrollaron recubrimientos de *L. lactis* y ácido fólico sobre polietileno y se formaron bolsas que consiguieron alargar la vida útil 10 días de una crema pastelera casera.

Finalmente, se estudiaron los impactos ambientales del envase convencional y del envase activo para la crema pastelera. En cualquier caso, a pesar de las limitaciones relativas a la estimación del producto desperdiciado, la prolongación de la vida útil mediante la innovación de los envases pudo reducir significativamente los impactos ambientales de todo el sistema de envasado de alimentos.

En la presente tesis, también se exploró el potencial uso de levaduras autóctonas con capacidad antifúngica para el control de *Penicillium expansum* y el control de la micotoxina que generan denominada patulina. En la presente investigación se seleccionaron tres nuevas cepas de levadura aisladas de la superficie de manzanas por su eficacia contra *P. expansum*. Las levaduras fueron identificadas como *Metschnikowia pulcherrima* siendo 3 cepas diferentes. También se demostró la capacidad de estas levaduras para la biodegradación de la patulina. A continuación, se realizaron diferentes estudios sobre la viabilidad de la levadura y su efectividad antifúngica en diferentes películas hechas con biopolímeros que se encuentran de forma natural en la manzana (pectina, éteres de celulosa y orujo de manzana). Los datos de los ensayos antifúngicos realizados *in vitro* mostraron que las películas bioactivas hechas a base de orujo de manzana mantuvieron la viabilidad de *M. pulcherrima* e inhibieron significativamente el crecimiento de *P. expansum* o modificaron su crecimiento morfológico. Finalmente, los recubrimientos realizados con residuo de manzana que contuvieron levaduras aisladas de manzana, fueron aplicados sobre manzanas contaminadas con *P. expansum* demostrando una muy buena eficacia antifúngica con respecto al resto de tratamientos aplicados por separado.