



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Efecto de recubrimientos comestibles con bacterias ácido-lácticas sobre Botrytis cinerea en uva

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: Asunción Fernández Catalán

TUTORAS ACADEMICAS: Lorena Atarés Huerta
Amparo Chiralt Boix

DIRECTORA EXPERIMENTAL: Anna Marín Gozalbo

Curso Académico: 2015/2016

Valencia 14 de septiembre

EFECTO DE RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES CON BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS SOBRE *Botrytis cinerea* EN UVA

Asunción Fernández, Anna Marín, Lorena Atarés, Amparo Chiralt

RESUMEN

Se estudió la mejora de la efectividad de bacterias ácido lácticas (LAB), frente a *Botrytis cinerea* en uvas mediante su aplicación con recubrimientos comestibles (RCs). Se diseñaron ocho formulaciones, utilizando almidón de patata pregelatinizado (AP) o caseinato sódico (NaC), combinando además la incorporación de ácido oleico y LAB. Se utilizaron dos tipos de controles: agua destilada (C. agua) y una dispersión acuosa de *L. plantarum* (LAB). El uso de RCs con y sin LAB, no afectó los valores de peso, color, firmeza, acidez y °Brix, ya que no se observaron diferencias claras con respecto al control con agua. No obstante, sí que se apreció una tendencia hacia menores índices de madurez en las muestras recubiertas con RCs. La aplicación de LAB junto con los RCs consiguió mejorar la adherencia de *L. plantarum* a la superficie vegetal a los 7 días de almacenamiento en las formulaciones con NaC. Todos los recubrimientos fueron efectivos en el control de la incidencia de *B. cinerea*, hasta 15 días después de la aplicación. Estos resultados apuntan a la viabilidad del biocontrol ejercido con bacterias ácido lácticas para el control de *Botrytis* en uva, sin modificaciones de la calidad del fruto.

Palabras clave: polímero, caseinato, almidón, bacterias ácido-lácticas, antifúngico, dinámica poblacional, incidencia, parámetros de calidad.

RESUM

Es va estudiar la millora de l'efectivitat de bacteris àcids làctics (LAB), enfront de *Botrytis cinerea* en raïm per mitjà de la seua aplicació amb recobriments comestibles (RCs). Es van dissenyar huit formulacions, utilitzant midó de creïlla pregelatinitzat (AP) o caseinato sòdic (NaC), combinant a més la incorporació d'àcid oleic i LAB. Es van utilitzar dos tipus de controls: aigua destil·lada (C. aigua) i una dispersió aquosa de *L. plantarum* (LAB). L'ús de RCs amb i sense LAB, no va afectar els valors de pes, color, fermesa, acidesa i °Brix, ja que no es van observar diferències clares respecte al control amb aigua. No obstant això, sí que es va apreciar una tendència cap a menors índexs de maduresa en les mostres recobertes amb RCs. L'aplicació de LAB junt amb els RCs va aconseguir millorar l'adherència de *L. plantarum* a la superfície vegetal als 7 dies d'emmagatzemament en les formulacions amb NaC. Tots els recobriments

van ser efectius en el control de la incidència de *B. cinerea*, fins a 15 dies després de l'aplicació. Estos resultats apunten a la viabilitat del biocontrol exercit amb bacteris àcids làctics per al control de *Botrytis* en raïm, sense modificacions de la qualitat del fruit.

Paraules clau: polímer, caseinat, midó, bacteris àcid-làctiques, antifúngic, dinàmica poblacional, incidència i paràmetres de qualitat.

ABSTRACT

The improvement of the effectiveness of lactic acid bacteria (LAB) against *Botrytis cinerea* on grapes through their application with edible coatings (RCs) was studied. Eight formulations were considered, using pregelatinized potato (AP) or sodium caseinate (NAC), and combining them with the incorporation of oleic acid and LAB. Two types of controls were used, one was treated with distilled water (C. water) and other with *L. plantarum* dispersed in an aqueous solution (LAB). The use of RCs with and without LAB, did not affect the weight values, color, firmness, acidity and °Brix, since no clear differences from the water control were observed. However, a trend towards lower rates of maturity in the samples coated with RCs was observed. The application of LAB with the RCs achieved improve adherence of *L. plantarum* to the plant surface at 7 days storage in formulations with NaC. All coatings were effective in controlling *B. cinerea* incidence, until 15 days after of application. These results point to the viability of lactic acid bacteria to the biocontrol exercised in control of *Botrytis* in grapes, without modification of the quality of the fruit.

Keywords: polymer, caseinate, starch, lactic acid bacteria, antifungal, population dynamics, impact and quality parameters.

1. INTRODUCCION

Durante el procesamiento de productos agrícolas se producen pérdidas económicas significativas, debido a la acción de hongos y microorganismos causantes de enfermedades. Las pequeñas heridas o cortes que se producen durante la cosecha y/o el transporte, facilitan el acceso de estos patógenos, incrementando sus potenciales efectos negativos (Trias *et al.*, 2008). La uva es uno de los productos más vulnerables a las enfermedades producidas por hongos. Ésta se cultiva en regiones cálidas de todo el mundo, siendo los mayores productores Australia, Sudáfrica, Italia, Francia, España, Portugal, Turquía, Grecia y, en el continente americano, California, Chile y Argentina. En España se cultivan alrededor de 5.200.000 toneladas de uva al año, de las cuales solamente el 6 % está destinado a su consumo en fresco, debido a la importancia de la industria vitivinícola en este país (FAO, 2014). La enfermedad producida por el hongo *Botrytis cinerea*, o moho gris, es la más importante y destructiva para este cultivo, ya que causa

importantes pérdidas (Elmer y Reglinski, 2006; Zahavi *et al.*, 2000). El hongo causante puede desarrollarse a 0°C, y es frecuente la contaminación de una baya a otra. Los síntomas comienzan con una coloración parda de la baya, seguida por la aparición de las hifas de color blanco del patógeno, las cuales finalmente producen masas de esporas de color gris (Vannini y Chilosi, 2013)

En los últimos años el principal método de control de las enfermedades fúngicas en frutas y hortalizas ha sido el uso de compuestos químicos durante los tratamientos pre y post-cosecha. Sin embargo, los cambios legislativos, la creciente preocupación por el uso de plaguicidas y fungicidas por parte del consumidor, junto con la aparición de resistencias a los fungicidas y el alto costo del desarrollo de nuevos productos químicos, ha promovido la búsqueda de enfoques alternativos (Trias *et al.*, 2008). Entre ellos, el control biológico ha sido ampliamente estudiado y presenta un gran potencial. El control biológico o biocontrol consiste en la utilización de organismos vivos (agentes de biocontrol, ABCs o antagonistas) que tienen una acción específica contra otros organismos patógenos causantes de deterioro de cultivos en campo y/o durante el periodo postcosecha (Usall *et al.*, 2000). El uso de bacterias ácido-lácticas (LAB), para el control biológico, es de particular interés debido a que se han utilizado durante siglos en la industria alimentaria. Su uso en alimentos y piensos, en procesos de fermentación y conservación, está ampliamente documentado en la literatura (Kim, 1993). Puesto que las verduras son el hábitat natural de numerosas especies de LAB, su potencial de aplicación para la prevención del deterioro de vegetales abre una nueva área en la tecnología de la biopreservación. Las propiedades antimicrobianas de LAB se pueden atribuir tanto a la competencia por los nutrientes y la producción de una variedad de compuestos inhibidores, tales como ácidos orgánicos, bacteriocinas, antibióticos y otros productos como etanol, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído etc. (Ouwehand 1998). Aunque muchos estudios han evaluado los efectos antibacterianos de las LAB y sus metabolitos, sólo unas pocas investigaciones se han centrado en los compuestos antifúngicos y su potencial para aumentar la seguridad. Por ejemplo, Schnurer y Magnusson (2005) publicaron un estudio sobre péptidos antifúngicos de bajo peso molecular sintetizados por los ribosomas de diversas LAB, que inhibieron el deterioro y hongos patógenos, aunque la información obtenida sobre su mecanismo de acción fue imprecisa. Entre las bacterias que mayoritariamente se utilizan como agentes de biopreservación destacan las del género *Lactobacillus* y más concretamente las especies *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. case i*, *L. dellbrueckii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*. Muchas de estas especies son capaces de producir metabolitos secundarios de interés.

Durante los últimos años, se han realizado importantes esfuerzos para comprender el modo de acción de los ABCs y para mejorar su viabilidad, ya que su sensibilidad a condiciones ambientales adversas deriva en una baja reproducibilidad y control en condiciones prácticas de aplicación (Droby *et*

al., 2009). Una de las posibles estrategias para disminuir la sensibilidad de los ABCs es su aplicación conjunta con recubrimientos comestibles (RCs). Estos recubrimientos se definen como finas capas de material comestible (Lacroix y Dang Vu, 2014). Algunos estudios han puesto de manifiesto que es posible proteger las uvas de la enfermedad del moho gris utilizando RCs antifúngicos en postcosecha (Romanazzi *et al.*, 2007; González-Martínez *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2007). Por ello, la incorporación de bacterias ácido-lácticas (LAB) a RCs ofrece muchas posibilidades, tanto por la gran variedad de matrices disponibles como por los diferentes beneficios que, tanto estos microorganismos como los RCs podrían tener sobre la degradación la fruta. Los RCs pueden estar constituidos por diferentes biopolímeros tales como proteínas, polisacáridos, lípidos o mezclas de los mismos. Otros componentes, tales como plastificantes o tensoactivos, pueden incorporarse con diversos fines (Han, 2009). El tipo y concentración de sólidos formadores de recubrimiento con respecto a LAB puede cambiar las condiciones en las que éstas son aplicadas, y consecuentemente, afectar a su actividad. Además, estos aspectos pueden afectar a otros factores, como la adherencia del microorganismo y el espesor del RC formado sobre la superficie del fruto.

Debido a que existen pocos estudios sobre las propiedades antifúngicas de LAB, los objetivos de este trabajo fueron (a) valorar la eficacia de LAB en el control de *B. cinerea*, así como su supervivencia sobre la superficie vegetal, a las 24 h y a los 7 días de almacenamiento de las uvas, y (b) hacer un seguimiento de la evolución de los parámetros de calidad de las uvas, para analizar en qué medida la aplicación de RCs con LAB afecta a la misma.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preparación del inóculo de *Lactobacillus plantarum*

Para la obtención de sustancias antifúngicas a partir de *L. plantarum*, se adaptó el protocolo propuesto por Roos (US 20140057992. 2014) y Lüthi-Peng *et al.* (2002). A partir del cultivo en medio sólido se hicieron diferentes siembras en medio líquido y finalmente éste se centrifugó a 4000xg durante 10 min a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la masa celular con glicerol 150 mM. El glicerol con la masa celular se introdujo en botes estériles y se incubó a 37°C durante 2h en condiciones de anaerobiosis, para favorecer la síntesis de sustancias antifúngicas por parte de la bacteria.

2.2. Preparación de las dispersiones formadoras de recubrimiento

Entre los biopolímeros formadores de RCs se seleccionaron una proteína de origen lácteo (caseinato sódico, NaC) y almidón de patata pregelatinizado (AP). Ambos recubrimientos son transparentes, están exentos de sabores y

olores extraños y son bastante estables (Baldwin *et al.*, 1996; Perdones *et al.*, 2012). Se prepararon en total 8 dispersiones formadoras de recubrimientos (DFRC): cuatro a base de NaC (Sigma – Aldrich, Madrid) y cuatro a base de AP (Roquette Laisa España, S.A., Valencia). Para cada polímero, se combinó la incorporación o ausencia de bacterias ácido-lácticas (LAB) y ácido oleico (OA, Sigma – Aldrich, Madrid), de acuerdo con la tabla 1. Paralelamente se prepararon dos controles: uno con agua desionizada estéril, sin microorganismo y sin agentes formadores de recubrimiento (C. agua), y una suspensión de *L. plantarum* con $5 \cdot 10^7$ UFC mL⁻¹ en agua desionizada estéril (sin agentes formadores de recubrimiento), al que se denominó LAB.

TABLA 1. Diseño de las DFRC sin *L. plantarum* y con $5 \cdot 10^7$ UFC mL⁻¹ de *L. plantarum* para la aplicación sobre la superficie de uvas. C agua: control de agua desionizada. LAB: control de suspensión de *L. plantarum* con $5 \cdot 10^7$ UFC mL⁻¹

| Tratamiento | Polímero | OA | <i>L. plantarum</i> |
|-------------|----------|----|---------------------|
| C agua | - | - | - |
| LAB | - | - | + |
| NaC | NaC | - | - |
| NaCOA | NaC | + | - |
| NaC + LAB | NaC | - | + |
| NaCOA + LAB | NaC | + | + |
| AP | AM | - | - |
| APOA | AM | + | - |
| AP + LAB | AM | - | + |
| APOA + LAB | AM | + | + |

Para preparar las DFRC, los polímeros se dispersaron en agua desionizada (20.00 mg mL^{-1}) a 25°C durante 2 h. Tras la completa dispersión de los polímeros, se incorporó ácido oleico (OA) en proporción másica polímero: tensoactivo 1:0,1. Tanto la concentración de biopolímeros como la proporción polímero: tensoactivo se seleccionaron en base a estudios previos (Jiménez *et al.*, 2012; Sánchez-González *et al.*, 2009; Sánchez-González *et al.*, 2013). Las dispersiones se homogeneizaron a 13600 rpm durante 4 minutos con un rotor stator ultraturrax (DI25, Janke and Kunkel, Alemania) y se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos para reducir su carga microbiana.

En las dispersiones con LAB, *L. plantarum*, fue incorporado a partir de la suspensión de trabajo a cada una de las DFRC, tras enfriarlas, en una concentración final del $5 \cdot 10^7$ UFC mL⁻¹ (Cañamás *et al.*, 2011). A continuación, las DFRC se agitaron durante 15 minutos a 150 rpm para lograr una distribución homogénea de los microorganismos.

2.3. Aplicación de los recubrimientos

Los recubrimientos se aplicaron sobre uvas, variedad *Red Globe*, procedentes de un comercio local. Se prepararon 3 repeticiones para cada DFRC, constando cada repetición de 5 granos de uva. Éstos fueron seleccionados en base a su homogeneidad en términos de madurez así como a la ausencia de daños mecánicos o infección por mohos. Las muestras se colocaron por separado en rejillas de plástico y se pulverizaron durante 15 segundos utilizando un aerógrafo. Las uvas se dejaron secar a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora y a continuación las rejillas se colocaron en bandejas de plástico que se sellaron con papel film. Las muestras se llevaron a incubación a 20°C y 85% durante 24 h o 7 días.

2.4. Caracterización de los parámetros de calidad

Se determinaron los siguientes parámetros de calidad de las uvas:

Pérdida de peso: Se utilizó una balanza de precisión (Kern PFB 120-3). Las pesadas se realizaron en 15 frutos por tratamiento, antes de la aplicación de los RCs y a los 4, 7 y 9 días de almacenamiento a 20°C. Los resultados se expresaron en porcentaje de pérdida de peso respecto al peso inicial de las uvas.

Color: se evaluó en 15 frutos por tratamiento, utilizando un espectrocolorímetro CM- 3600d (Minolta Co, Tokio, Japón) con una ventana de 10 mm de diámetro, usando el iluminante D65 y observador de 10°. Las mediciones se realizaron antes de la aplicación RCs y a los 4, 7 y 9 días a 20°C después de la aplicación. Se realizaron dos mediciones por fruto, en los dos lados opuestos de la zona ecuatorial de las uvas, evitando cualquier zona defectuosa. Los parámetros que se midieron fueron las coordenadas L^* a^*b^* , el croma (C_{ab}^*) y el tono (h_{ab}^*).

Firmeza: Se evaluó utilizando una prensa de ensayos de textura (TA-Xtplus, Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido) provista de un punzón de 10 mm de diámetro, a una velocidad de 10 mm/min. Los análisis se realizaron antes de la aplicación de los recubrimientos y tras 9 días de almacenamiento. Las uvas (15 por tratamiento) se cortaron por la mitad para su mejor fijación sobre la placa, y se registró la fuerza máxima (N) de punción en el punto de fractura.

°Brix y Acidez: El contenido en sólidos solubles (°Brix) y la acidez se midieron antes de la aplicación de los RCs y 9 días después de su aplicación. Ambas determinaciones se realizaron por triplicado, para cada uno de los tratamientos. Para la obtención de los °Brix del zumo de uva se utilizó refractómetro digital (Atago Co. Ltd., Japón). La determinación de la acidez se llevó a cabo con un valorador automático (Metrohm 800 Dosino), por valoración de alícuotas de zumo con una solución de NaOH 0,1 N hasta pH 8,2. Los resultados se expresaron en g ácido cítrico/ 100 g de uva. El índice de madurez se calculó como el cociente entre los °Brix y la acidez.

2.5. Dinámica poblacional en uva

Para evaluar la adherencia y supervivencia de *L. plantarum* sobre la superficie de las uvas a lo largo del tiempo (dinámica poblacional), se realizaron recuentos de microorganismos. Para cada DFRC que contenían LAB (NaC+LAB, NaCOA+LAB, AP+LAB, APOA+LAB y LAB) se prepararon 3 repeticiones, con 5 frutos cada una. Cada repetición se pesó y se transfirió a un matraz Erlenmeyer con 100 mL de agua de peptona esterilizada. Éstos se agitaron en un agitador rotatorio (Selecta, Abrera, Barcelona, España) a 150 rpm durante 20 minutos y seguidamente se introdujeron 10 minutos más en un baño de ultrasonidos, para lograr la máxima separación del microorganismo de la superficie de los frutos. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas por duplicado y se sembraron dos placas por dilución en medio agar MRS. Las placas se incubaron en condiciones de anaerobiosis en estufas de incubación a 37 °C durante 48 h. Transcurrido este tiempo se realizó la lectura de las placas y los resultados se expresaron como log UFC por gramo de uva tratada. Se obtuvieron resultados para 24 h y 7 días después del tratamiento.

2.6. Efectividad contra *Botrytis cinerea*.

La cepa de *Botrytis cinerea* empleada para los ensayos de efectividad (CECT-20518) se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia, Burjassot, España). Antes de cada ensayo, el hongo se cultivó en agar de dextrosa de patata (PDA) (Scharlab, Barcelona, España) durante 15 días a 25°C. Los conidios se rasparon del agar utilizando un asa estéril y se introdujeron en 10 mL de agua desionizada estéril con un 0,01% de Tween 85 (p/v). La suspensión se sonicó durante 5 min en un baño de ultrasonidos para facilitar la dispersión conidial. Finalmente se ajustó su concentración a 10^4 esporas mL⁻¹ (Cañamas et al., 2011). Esta suspensión se utilizó para infectar las uvas en los ensayos de efectividad.

Para este ensayo, del mismo modo que en los anteriores, se emplearon 3 repeticiones de 5 granos de uva en cada uno de los tratamientos aplicados con *L. plantarum*. Se indujo la ruptura del tejido en la superficie de las uvas con un papel de lija, a fin de facilitar la infección por parte del patógeno. Los RCs con *L. plantarum* se aplicaron como se describe en el apartado 2.3, junto con LAB y C. agua como controles. Una vez aplicados los tratamientos, se procedió a infectar las muestras con la suspensión de *B. cinerea*, que se aplicó con aerógrafo durante 5 segundos y se dejó secar. Las muestras se incubaron 20°C y 85% de HR durante 8 y 15 días. La incidencia de la infección se evaluó de forma visual por conteo del número de granos que presentaron los signos típicos de la presencia *B. cinerea*. Los resultados se expresaron como % reducción de la incidencia de la infección, tomando como referencia C. agua.

2.7. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA con un nivel de significación del 95% y utilizando para las comparaciones múltiples el test LSD. Los cálculos se realizaron con el Software STATGRAPHICS Centurion XVI (version 16.2.04).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Pérdida de peso

La figura 1 representa la pérdida de peso a los 9 días de almacenamiento para las uvas recubiertas con el control de agua desionizada (C agua) y los distintos RCs.

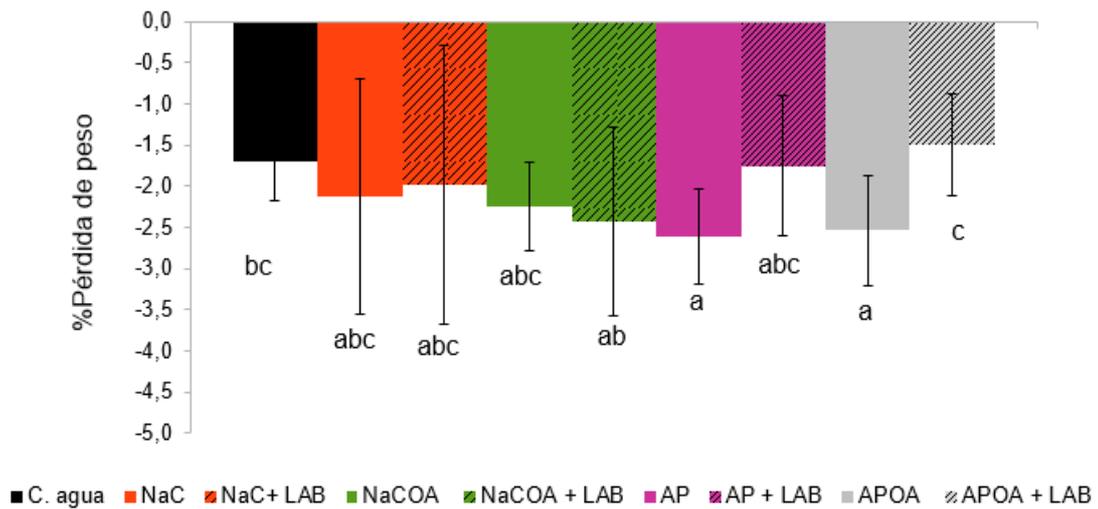


FIGURA 1: Pérdida de peso de las uvas recubiertas con C agua y las DFRC a los 9 días de almacenamiento. C. agua: control de agua destilada, NaC: caseinato sódico, AP: almidón de patata pregelatinizado, OA: ácido oleico, LAB: *L. plantarum*. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las formulaciones ($p < 0.05$).

En todos los tratamientos se produjo una pérdida de peso cuyo promedio osciló entre el 1,5 y el 2,5%. Este fenómeno es consecuencia de la migración de agua del interior de las uvas a las capas más superficiales produciéndose la evaporación de la misma con el paso del tiempo. No se encontraron diferencias significativas en función del tratamiento ($p > 0,05$), por lo que la aplicación de recubrimientos no supuso una mejora frente a la deshidratación de los frutos durante el almacenamiento. La aplicación de OA o LAB a los recubrimientos tampoco indujo cambios significativos en la pérdida de peso.

3. 2. Color

La tabla 2 representa los valores de Luminosidad (L^*), croma (C_{ab}^*) y tono (h_{ab}^*) de las uvas recubiertas con C. agua y las DFRC al inicio y al final del periodo de almacenamiento de 9 días. La figura 2 representa la proyección en el plano cromático correspondiente a las muestras de uva antes de la aplicación de los RCs (a) y 9 días después de la aplicación (b)

Tabla 2: Parámetros cromáticos de uvas recubiertas con C. agua y las DFRC al inicio y al final del almacenamiento (9 días). C. agua: control de agua destilada, NaC: caseinato sódico, AP: almidón de patata pregelatinizado, OA: ácido oleico, LAB: *L. plantarum*.

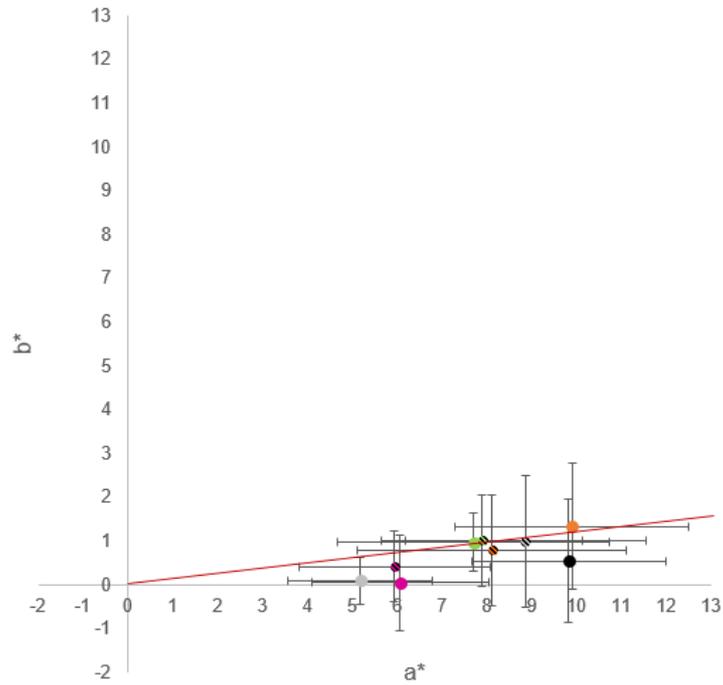
| Tratamiento | L^* inicial | L^* final | C_{ab}^* inicial | C_{ab}^* final | h_{ab}^* inicial | h_{ab}^* final |
|--------------------|----------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------|
| C agua | 36 (4) ^{d2} | 32 (2) ^{c1} | 10,3(1,5) ^{e1} | 10 (2) ^{e1} | 5 (5) ^{bcd1} | 9 (4) ^{d2} |
| NaC | 36 (3) ^{d2} | 34 (3) ^{d1} | 10 (2) ^{e2} | 8 (2) ^{d1} | 6 (7) ^{cde1} | 5 (6) ^{bc1} |
| NaCOA | 30 (2) ^{b1} | 28,8 (1,2) ^{b1} | 8 (3) ^{c2} | 4,9 (1,2) ^{ab1} | 8 (4) ^{ef1} | 10 (5) ^{d1} |
| NaC + LAB | 30 (3) ^{b2} | 28,4 (1,1) ^{b1} | 8 (3) ^{cd1} | 7 (2) ^{c1} | 7 (6) ^{de1} | 9 (6) ^{d1} |
| NaCOA + LAB | 30 (3) ^{b2} | 28 (2) ^{b1} | 8 (2) ^{cd2} | 7 (3) ^{c1} | 10 (4) ^{f1} | 8 (6) ^{cd1} |
| AP | 30 (2) ^{b1} | 29 (2) ^{b1} | 6 (2) ^{b2} | 5 (2) ^{b1} | 3 (7) ^{a1} | 4 (6) ^{b1} |
| APOA | 30 (3) ^{b2} | 26,9(1,0) ^{a1} | 5,3 (1,6) ^{a2} | 3,8 (1,0) ^{a1} | 3 (6) ^{ab1} | 3 (6) ^{ab1} |
| AP + LAB | 28 (2) ^{a1} | 29 (2) ^{b1} | 6 (2) ^{ab2} | 4 (2) ^{ab1} | 4 (6) ^{abc2} | -1 (5) ^{a1} |
| APOA + LAB | 34 (3) ^{c2} | 31,3(1,2) ^{c1} | 9 (2) ^{d1} | 9(3) ^{e1} | 5 (6) ^{bcd1} | 9 (4) ^{d2} |

Diferentes superíndices (abc) en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) debidas al tratamiento. Diferentes superíndices (12) en una misma fila indican diferencias significativas debidas al tiempo ($p < 0.05$).

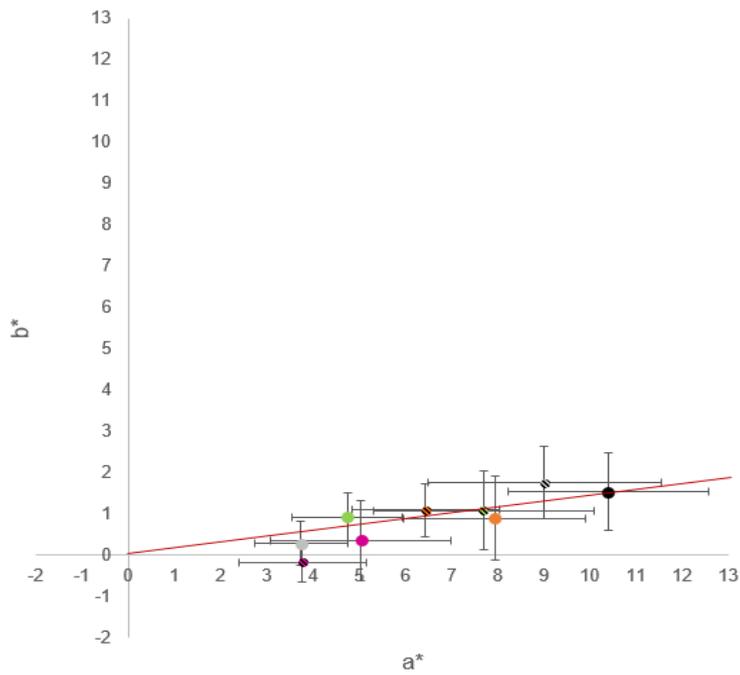
Tanto a luminosidad como el croma disminuyeron de forma muy ligera al final del almacenamiento, probablemente porque los frutos ya habían alcanzado un estado de madurez comercial al inicio del experimento. El análisis estadístico indicó la existencia de diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($p < 0,05$), sin un efecto claro del polímero utilizado ni de la presencia de OA y LAB. La pérdida de luminosidad se atribuyó al progreso de la maduración y mayormente a la pérdida de humedad en el tiempo. Todos los tratamientos alcanzaron valores de tono entre 0 y 10°, correspondientes a tonalidades rojizas. Los resultados de tono mostraron una gran variabilidad, sin que se pudiera detectar efectos claros de la aplicación de los recubrimientos, la incorporación de OA o LAB, y el tiempo de almacenamiento sobre el tono de los frutos.

En coherencia con los resultados de la tabla 2, la figura 2 muestra que los frutos tuvieron coloraciones localizadas en el primer cuadrante.

a)



b)



● C. agua ● NaC ● NaC+LAB ● NaCOA ● NaCOA+LAB ● AP ● AP+LAB ● APOA ● APOA+LAB

FIGURA 2: Representación en el plano cromático a-b, de las uvas antes aplicación de RCs (a) y a los 9 días tras la aplicación (b). C. agua: control de agua destilada, NaC: caseinato sódico, AP: almidón de patata pregelatinizado, OA: ácido oleico, LAB: *L. plantarum*. Se añade la línea isotono

3.3. Firmeza

En la tabla 3 se muestran los valores de firmeza a los 9 días de almacenamiento, obtenidos para las uvas recubiertas con C. agua y con las distintas DFRC.

Tabla 3: Valores de firmeza a los 9 días de almacenamiento para las uvas recubiertas con C. agua y con las diferentes DFRC. C. agua: control de agua destilada, NaC: caseinato sódico, AP: almidón de patata pregelatinizado, OA: ácido oleico, LAB: *L. plantarum*.

| Tratamiento | Firmeza (N) |
|--------------------|-----------------------|
| C agua | 23 (7) ^{ab} |
| NaC | 20 (5) ^a |
| NaCOA | 21(6) ^a |
| NaC + LAB | 24 (8) ^{ab} |
| NaCOA + LAB | 22 (5) ^{ab} |
| AP | 23 (7) ^{ab} |
| APOA | 27 (12) ^b |
| AP + LAB | 26 (11) ^{ab} |
| APOA + LAB | 20 (8) ^a |

Diferentes superíndices (abc) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) debidas al tratamiento.

La fuerza máxima obtenida al inicio del experimento fue 32 (± 13) N, por lo que se puede deducir que tras 9 días de almacenamiento las uvas presentaron una tendencia hacia la disminución de la firmeza en todos los tratamientos. Este fenómeno está probablemente asociado a la pérdida de agua, ocasionando una pérdida de turgencia. El análisis estadístico indica que no existen diferencias significativas entre las distintas DFRC y el C. agua ($p > 0,05$), por lo que los recubrimientos no supusieron una mejora en el mantenimiento de la firmeza. Tampoco se observó un efecto claro de la incorporación de OA o LAB en las formulaciones.

3.4. °Brix, acidez e índice de madurez

La tabla 4 muestra los valores de acidez (g de ácido cítrico en 100 g de uva), °Brix y el índice de madurez (IM) de las uvas recubiertas con C. agua y las DFRC, 9 días después de la aplicación.

TABLA 4: Acidez (g ácido cítrico/100 g de uva), °Brix e índice de madurez (IM) a los 9 días de almacenamiento para las uvas recubiertas con C. agua y las diferentes DFRC. C. agua: control de agua destilada, NaC: caseinato sódico, AP: almidón de patata pregelatinizado, OA: ácido oleico, LAB: *L. plantarum*.

| Tratamiento | ACIDEZ | °BRIX | IM |
|--------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|
| C agua | 0,309 (0,004) ^{ab} | 19,7 (1,3) ^a | 68 (5) ^{bc} |
| NaC | 0,343 (0,007) ^d | 20,0 (0,2) ^a | 58,3 (1,2) ^a |
| NaCOA | 0,314 (0,012) ^{ab} | 19,6 (0,6) ^a | 62,6 (1,7) ^{ab} |
| NaC + LAB | 0,297 (0,017) ^a | 20,1 (0,1) ^a | 67 (4) ^c |
| NaCOA + LAB | 0,331 (0,005) ^{cd} | 19,6 (0,1) ^a | 59,2 (0,8) ^a |
| AP | 0,318 (0,007) ^{bc} | 19,3 (0,1) ^a | 60,81 (1,04) ^{ab} |
| APOA | 0,323 (0,013) ^{bc} | 19,3 (0,2) ^a | 60 (3) ^{ab} |
| AP + LAB | 0,324 (0,018) ^{bc} | 19,4 (0,1) ^a | 60 (4) ^{ab} |
| APOA + LAB | 0,333 (0,005) ^{cd} | 20,0 (0,1) ^a | 60,1 (0,8) ^{ab} |

Diferentes superíndices (abc) en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) debidas al tratamiento.

El valor de la acidez al inicio del experimento fue $0,3897 \pm 0,0004$ g de ácido cítrico en 100 g de uva, por lo que puede afirmarse que la acidez disminuyó significativamente para todos los tratamientos. Esto está en concordancia con los procesos de maduración, ya que conforme avanza la madurez se produce una degradación de los ácidos orgánicos, como consecuencia de la respiración celular. En conjunto se observa una ligera tendencia hacia mayores valores de acidez al aplicarse las DFRC, aunque sin diferencias significativas con el C. agua. Esta tendencia se explicaría por un ligero efecto de los recubrimientos sobre el proceso de maduración de las uvas. El análisis estadístico indica pequeñas diferencias significativas en función de la formulación, sin un efecto claro de la incorporación de OA o LAB.

En los valores de °Brix, se observa que a los 9 días se produce un aumento con respecto al valor inicial ($18,6 \pm 0,3$ °B), como consecuencia del progreso de la maduración. El análisis estadístico indica que no hay diferencias significativas entre las distintas DFRC ($p > 0,05$), por lo que se puede afirmar que la aplicación de los recubrimientos no afectó a la evolución del contenido en azúcares de la uva.

El índice de madurez aumentó a lo largo del tiempo (valor inicial: $47,4 \pm 0,8$), como consecuencia de la disminución de la acidez y el aumento de los °Brix. Se observó una tendencia hacia menores índices de madurez en las muestras recubiertas con DFRC en comparación con las correspondientes a

C. agua. Aunque sin diferencias significativas, esto parece apuntar a un ligero retardo de la maduración al aplicar los recubrimientos. De nuevo no se observó un efecto claro de la incorporación de OA o LAB.

3.5. Dinámica poblacional de *L. plantarum* en uvas

La figura 3 muestra la dinámica poblacional de *L. plantarum* aplicado en el control LAB y en los recubrimientos NaC+LAB, NaCOA+LAB, AP+LAB y APOA+LAB, 24 h y 7 días después de la aplicación.

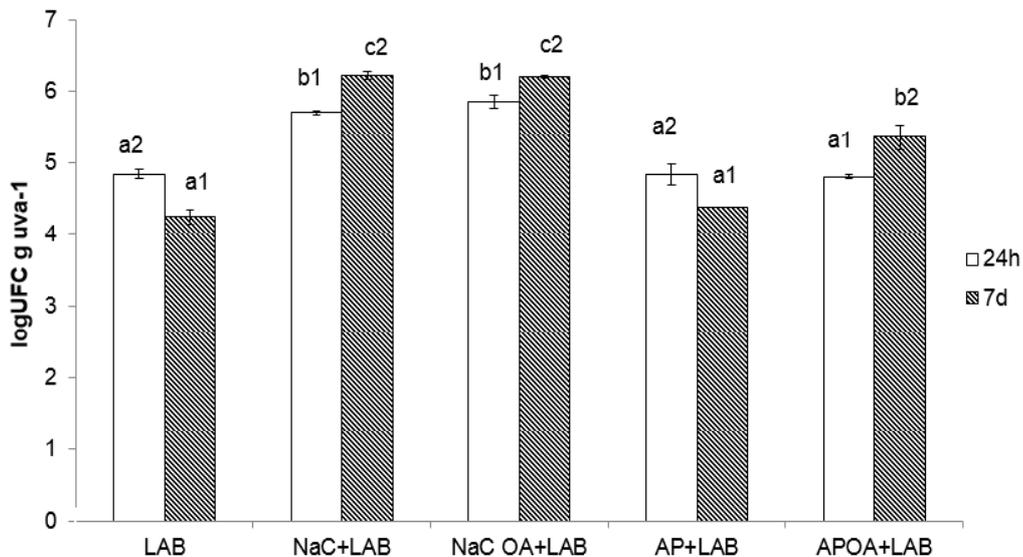


FIGURA 3: Dinámica poblacional de *L. plantarum* en la superficie de las uvas tras 24 horas y 7 días de almacenamiento a 20°C y 85%. LAB: *L. plantarum* en dispersión acuosa, NaC: caseinato sódico, AP: almidón de patata pregelatinizado, OA: ácido oleico. Diferentes letras (abc) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) debidas al tratamiento. Diferentes números (1,2) indican diferencias significativas debidas al tiempo ($p < 0.05$).

A las 24 h se apreciaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los distintos tratamientos. Tal y como se observa, la adherencia se mantuvo para los tratamientos realizados con AP y APOA con unos valores en torno a 4,8 log UFC g uva⁻¹, similares al control LAB. Por otro lado, la población de LAB sobre la superficie de la uva aumentó para los tratamientos a base de caseinato sódico (NaC+LAB y NaCOA+LAB), hasta unos valores de 5,7 log UFC g uva⁻¹.

Tras 7 días de almacenamiento, el análisis estadístico indicó un incremento de la población únicamente con los tratamientos NaC+LAB, NaCOA+LAB y APOA+LAB. La población bacteriana aumentó, con respecto a las 24h de aplicación, en 0,52, 0,35 y 0,55 log UFC g uva⁻¹, respectivamente. Con el resto de RCs, la población disminuyó. Esto podría

ser debido a que la proliferación de hongos en estos tratamientos, podrían haber entrado en competencia con *L. plantarum*, teniendo como factor limitante los componentes de los RCs como fuente de nutrientes dejando de estar éstos disponibles para el microorganismo, lo cual dificultaría su supervivencia.

A los 7 días de almacenamiento, se apreciaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las distintas DFRC. De nuevo, los mejores resultados se obtuvieron para los recubrimientos de caseinato sódico, sin efecto de la incorporación de OA.

3.6 Efectividad contra *Botrytis cinerea*.

La figura 4 muestra la eficacia de *L. plantarum* frente a *B. cinerea* a los 8 y 15 días de almacenamiento de las muestras. Dicha eficacia fue estimada visualmente por conteo de los granos infectados, y los resultados se expresaron tomando como referencia el C. agua.

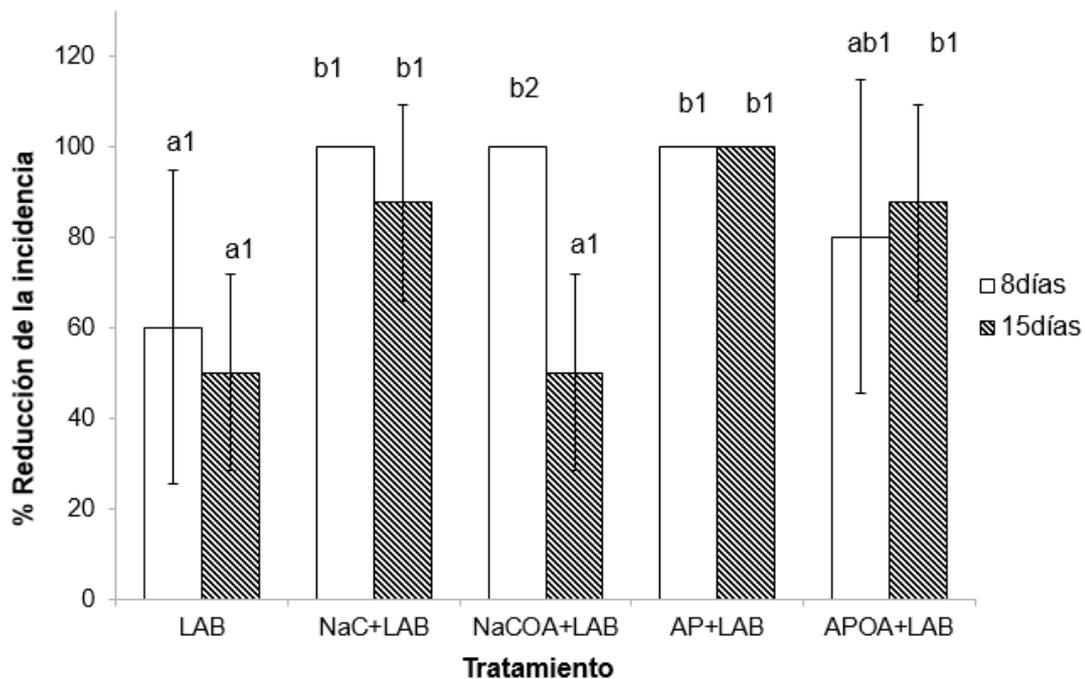


FIGURA 4: Eficacia de *L. plantarum*, incorporado a las DFRC, en la superficie de las uvas, en la reducción de la incidencia por *B. cinerea*. LAB: *L. plantarum* en dispersión acuosa, NaC: caseinato sódico, AP: almidón de patata pregelatinizado, OA: ácido oleico. Diferentes letras (abc) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) debidas al tratamiento. Diferentes números (1,2) indican diferencias significativas debidas al tiempo ($p < 0.05$).

A los 8 días, se observó un claro aumento de la reducción de la incidencia para todos los tratamientos que incorporaban LAB. Además, el porcentaje de reducción de la incidencia fue superior al aplicar LAB

conjuntamente con los recubrimientos. Los mejores resultados se obtuvieron para NaC+LAB, NaCOA+LAB y AP+LAB, obteniéndose un % de reducción de la incidencia del 100% para los tres RCs. Dicho efecto puede apreciarse también en la figura 5, que muestra la apariencia de las uvas para cada tratamiento a los 8 días de almacenamiento. En el caso de NaC+LAB se puede apreciar visualmente el crecimiento de *Rhizopus*, no de *B. cinerea*.

El porcentaje de reducción de la incidencia se mantuvo estable en el tiempo para LAB y los RCs, sin diferencias significativas ($p > 0,05$) excepto en el caso de NaCOA+LAB, donde se observó una disminución de la eficacia.

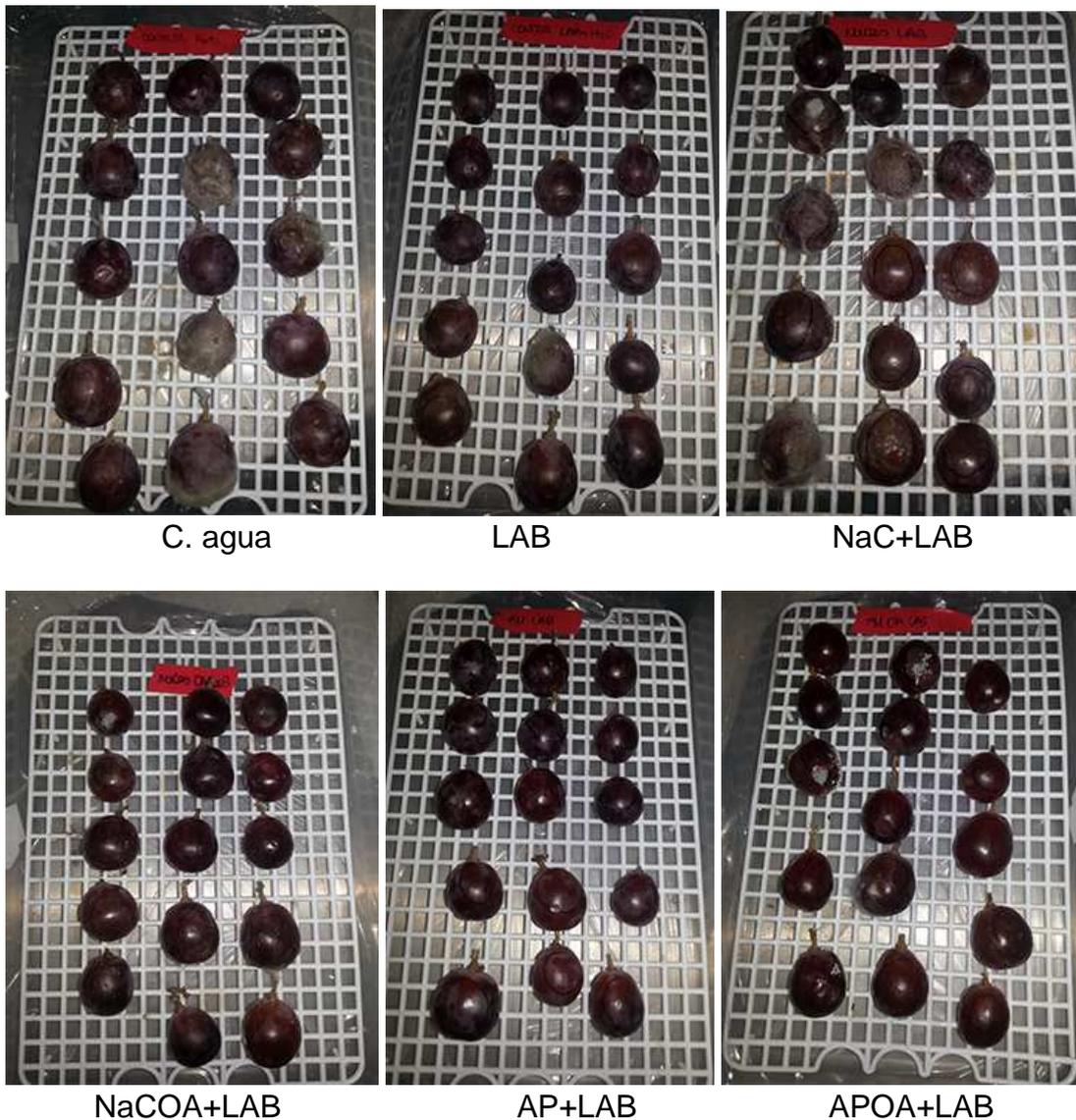


Figura 5: Incidencia a los 8 días de almacenamiento. C. agua: control de agua destilada LAB: *L. plantarum* en dispersión acuosa, NaC: caseinato sódico, AP: almidón de patata pregelatinizado, OA: ácido oleico.

Tras 15 días de almacenamiento, se observó un descenso claro del % reducción de la incidencia como consecuencia del progreso de la infección. Se observaron diferencias significativas entre los distintos RCs y LAB ($p < 0,05$). Los mejores resultados se obtuvieron para los tratamientos AP+LAB, APOA+LAB y NaC+LAB, obteniéndose un % de reducción de la incidencia, incluso del 100% para AP+LAB. El tratamiento NaCOA+LAB experimentó un descenso con respecto a los otros RCs. La figura 6 muestra la apariencia de las uvas para cada tratamiento a los 15 días de almacenamiento, donde se aprecia el crecimiento de hongos del género *Rhizopus* y *Penicillium*.

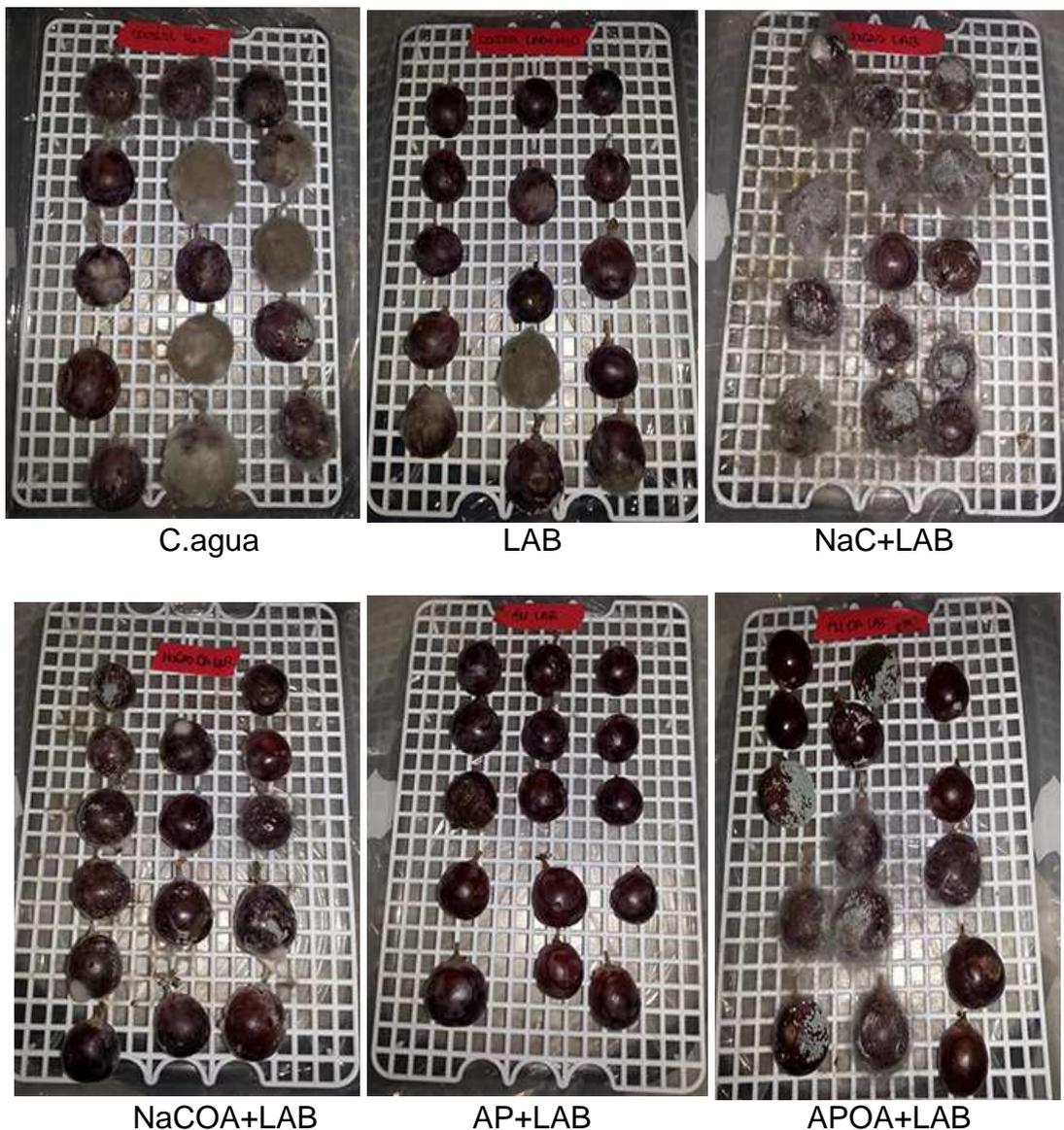


Figura 6: Incidencia a los 15 días de almacenamiento. C. agua: control de agua destilada LAB: *L. plantarum* en dispersión acuosa, NaC: caseinato sódico, AP: almidón de patata pregelatinizado, OA: ácido oleico.

4. CONCLUSIONES.

Los parámetros de calidad de las uvas (pérdida de peso, color, firmeza, °Brix, acidez) no se vieron afectados por la aplicación de recubrimientos, en comparación con el control de agua destilada. No obstante sí que se apreció una tendencia hacia menores índices de madurez en las muestras recubiertas.

Los ensayos de dinámica poblacional apuntaron a la eficacia de las formulaciones a base de caseinato sódico, puesto que la población de *L. plantarum* sobre la superficie de las uvas fue superior cuando se utilizaron estos recubrimientos, tanto 24 h como 7 días después de la aplicación.

Al aplicar bacterias acidolácticas en recubrimientos, la incidencia de la infección por *Botrytis* se vio reducida, en comparación con el efecto conseguido al aplicar una dispersión acuosa de las bacterias en la misma concentración.

Estos resultados apuntan a la viabilidad del biocontrol ejercido con bacterias ácido lácticas para el control de *Botrytis* en uva, sin modificaciones de la calidad del fruto.

5. Referencias Bibliográficas.

- Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O., Chen, X., Hagenmaier, R.D. (1996). Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. *Postharvest Biology and Technology*, 9, 151-163.
- Cañamás, T. P., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Solsona, C., Teixidó, N. (2011). Field applications of improved formulations of *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* in grapes. *Biological Control*, 56(2), 150-158.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*. 52: 137-145.
- Elmer, P. A. G., Reglinski, T. (2006). Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*, 55(2), 155-177.
- FAO: <www.fao.org>. [Consulta 15-06-2016].
- Jiménez, A., Fabra, M.J., Talens, P., Chiralt, A. (2012). Effect of sodium caseinate on properties and ageing behaviour of corn starch based films. *Food Hydrocolloids* 29, 265-271.
- González-Martínez, C., Cháfer, M., Sánchez-González, L., Vargas, M., Chiralt, A. (2011). Edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. En: *Advances in Postharvest Treatments and Fruit Quality and Safety*. Nova Science Publishers, Inc., New York, 59-84.
- Han, J.H. (2009). Innovations in food packaging, Chapter 9: Edible films and coatings: a review, 214-215. Elsevier Ltd.
- Kim, W.J. (1993) Bacteriocins of lactic acid bacteria: their potentials as food preservatives. *Food Rev Int* 9, 299–313.
- Lacroix, M., Dang Vu, K. (2014). Innovations in food packaging, Chapter 11: edible coating and film materials: proteins, 277-278. Elsevier Ltd.
- Lüthi-Peng, Q., Schärer, S., Puhán. (2002). Production and stability of 3-hydroxy propionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol Biotechnol*. Vol. 60, Pag: 73-80.
- Ouweland, A. C. (1998) Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects* ed. Salminen, S. and von Wright, A. pp. 139–159. New York: Marcel Dekker. Inc.

- Perdones, A., Sánchez-González, L., Chiralt, A., Vargas, M. (2012). Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 70(0), 32-41.
- Romanazzi, G., Karabulut, O. A., Smilanick, J. L. (2007). Combination of chitosan and ethanol to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 45(1), 134-140.
- Roos, S. (2014). Controlled activation of the reuterin-production machinery of *Lactobacillus*. US 2014/0057992 A1.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M. (2009). Characterization of edible films based on hydroxypropyl methylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids*, 23, 2102-2109.
- Sánchez-González, L., Quintero Saavedra, J. I. Chiralt, A. (2013). Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 92-98.
- Schnurer, J. and Magnusson, J. (2005) Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci Tech* 16, 70–78.
- Trias, R., Bañeras, L., Montesinos, E., Badosa, E., (2008) Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International Microbiology* 11:231-236.
- Usall, J., Teixidó, N., Fons, E., Viñas, I. (2000). Biological control of blue mold on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 58:83-92.
- Vannini, A., Chilosi, G. (2013). Botrytis infection: Grey mould and noble rot. p. 159-169. En: *Sweet, Reinforced and Fortified Wines: Grape Biochemistry, Technology and Vinification*. Ed: Wiley-Blackwell.
- Xu, W., Huang, K., Guo, F., Qu, W., Yang, J., Liang, Z., Luo, Y. (2007). Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control botrytis cinerea. *Postharvest Biology and Technology*, 46(1), 86-94.
- Zahavi, T., Cohen, L., Weiss, B., Schena, L., Daus, A., Kaplunov, T., Zutki, J., Ben-Arie, R., Droby, S. (2000). Biological control of Botrytis, Aspergillus and Rhizopus rots on table and wine grapes in Israel. *Postharvest Biology and Technology*, 20(2), 115-124.