

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA**

**SELECCIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE
FUENTES VEGETALES POR SU CAPACIDAD ANTIMICROBIANA Y
SU USO EN BIOPRESERVACIÓN DE ALIMENTOS.**

POR:

JOSÉ RAFAEL LINARES MORALES

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS**

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

ENERO DE 2021

Chihuahua, Chih., a 11 de enero 2021.
Oficio: 13/CA/SIP/21

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
Presente:

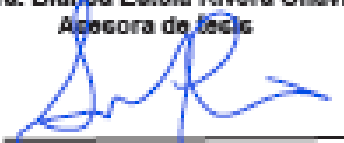
Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: **Selección de bacterias ácido lácticas aisladas de fuentes vegetales por su capacidad antimicrobiana y su uso en biopreservación de alimentos**, presentada por el Mto. José Rafael Linares Morales, alumno del programa de Doctorado de Ciencias.

Después de la revisión, indicamos al tesisista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

Atentamente
"Por la ciencia para bien del hombre"


Dra. Blanca Estela Rivera Chavira
Asesora de tesis


Dr. Néstor González Méndez
Asesor de tesis


Dr. Samuel Bernardo Pérez Vega
Asesor de tesis


Dra. Guadalupe Virginia Nevárez Moorillón
Directora de tesis


Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado

***El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

AGRADECIMIENTOS

A Dios todo poderoso por darme la oportunidad, la fuerza y la entereza para cumplir esta meta.

A mi madre Graciela Elvira Morales Carriel y a la Familia Valenzuela Jurado por su constante apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del gobierno de México por su invaluable contribución.

A mi Directora de tesis, Dra. Vicky y los asesores Dra. Blanca, Dr. Nestor y Dr. Samuel, así como a los demás maestros que de una o otra forma contribuyeron a mi formación. Por su apoyo y enseñanza constante, MIL GRACIAS.

A la Dra Daniela, al Dr. Iván y al maestro Guillermo por su valioso aporte.

A mis compañeros Mayra, ET y Selene y a mis compañeros de laboratorio por toda su colaboración desinteresada.

DEDICATORIA

A MI MADRE



ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Inocuidad en frutas y hortalizas frescas.	3
Contaminación durante la precosecha.	3
Contaminación durante la postcosecha.....	4
Métodos de descontaminación de frutas y hortalizas frescas	7
Métodos de preservación tradicionales.	8
<i>Tratamientos físicos</i>	8
<i>Productos químicos.</i>	10
<i>Cloro</i>	11
<i>Ozono</i>	12
<i>Ácidos orgánicos.</i>	12
Nuevas tecnologías de preservación	13
<i>Tratamientos físicos</i>	13
<i>Preservación óhmica, con Microondas y campos eléctricos pulsados.</i>	13
<i>Radiación ultravioleta.</i>	15
<i>Preservación con alta presión.</i>	16
<i>Aceites esenciales.</i>	17
<i>Recubrimientos y películas comestibles.</i>	19
<i>Empacado en atmosfera modificada.</i>	23
<i>Empacado activo.</i>	26
<i>Bioprotección.</i>	26
<i>Bacterias ácido lácticas.</i>	30
<i>Péptidos antimicrobianos.</i>	35
JUSTIFICACIÓN	51
HIPÓTESIS	52



OBJETIVO GENERAL.	53
Objetivos específicos.	53
MATERIALES Y MÉTODOS	54
a).- Materiales y equipo:	54
b).-Métodos.	55
Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas.	55
Determinación de la actividad antimicrobiana.	56
Determinación de la actividad enzimática.	58
Detección de proteasa, lipasa, amilasa y la capacidad de metabolizar citrato.	58
Producción de biopelículas.	59
Identificación de las cepas de Bacterias ácido lácticas.	59
Extracción del ADN.	59
Amplificación del ADN ribosomal 16s.	60
Secuenciación.	61
Formulación de medios de cultivo empleando desechos agroindustriales.	61
Caracterización de desechos agroindustriales	61
Formulación de los medios de cultivo.	63
Fermentación de los medios formulados y actividad antimicrobiana.	63
Análisis químico de cultivo estéril y sobrenadante.	63
Evaluación del efecto bioprotector del sobrenadante de BAL.	64
Solución de cubierta	64
Preparación de las muestras	64
Análisis físico-químicos	65
Análisis Estadístico.	67
RESULTADOS Y DISCUSION	69
Evaluación de la actividad antimicrobiana.	72
Evaluación de la Capacidad enzimática.	78
Formulación de medios de cultivo	86
Actividad antimicrobiana en los medios de cultivo formulados	92
Análisis químicos	97
Evaluación del efecto bioprotector del sobrenadante de bacterias ácido lácticas	99
Análisis físico-químicos	100



BIBLIOGRAFÍA	116
---------------------------	------------

APÉNDICES	131
------------------------	------------

Apéndice I. Secuencias parciales del gen 16s de las bacterias ácido lácticas aisladas de frutas y vegetales frescos.	131
--	------------

Índice de tablas

Tabla 1 Patógenos aislados de vegetales frescos en investigaciones en algunos países.	6
Tabla 2. Métodos tradicionales de desinfección.	10
Tabla 3. Nuevas tecnologías de preservación.	14
Tabla 4. Investigaciones sobre la actividad inhibitoria de bacterias ácido lácticas aisladas de fuentes vegetales.	33
Tabla 5. Clasificación de bacteriocinas propuesto por Klaenhammer en 1993.	38
Tabla 6. Evaluaciones sobre producción de péptidos antimicrobianos de bacterias ácido lácticas.	42
Tabla 7. Evaluaciones sobre crecimiento de BAL en desechos agroindustriales.	47
Tabla 8. Microorganismos indicadores para la prueba de determinación de la capacidad antimicrobiana.	57
Tabla 9. Cantidad y forma de Bacterias ácido lácticas aisladas según su fuente.	70
Tabla 10. Identificación molecular de bacterias ácido lácticas aisladas de vegetales frescos, seleccionadas según su actividad antimicrobiana y enzimática.	76
Tabla 11. Número y porcentaje de Bacterias ácido lácticas con actividad enzimática.	78
Tabla 12. Caracterización en porcentajes de los desechos agroindustriales empleados para la formulación de tres medios de cultivo similares al caldo MRS.	87
Tabla 13. Caracterización en porcentajes de los desechos agroindustriales empleados para la formulación de tres medios de cultivo similares al caldo MRS.	88
Tabla 14. Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células de las bacterias ácido lácticas inoculadas en medios formulados con desechos agro-industriales.	93
Tabla 15. Actividad antimicrobiana de los caldos de cultivo formulados con desechos agroindustriales y el caldo MRS evaluada contra microorganismos indicadores.	94
Tabla 16. Comportamiento de la cepa L. mesenteroides PIM5 en caldo harina de pescado y en caldo MRS.	98
Tabla 17. Efecto del recubrimiento sobre el color de manzanas almacenadas a 25°C durante 28 días.	105

Índice de figuras

Figura 1. Decantado del efluente de la elaboración de cerveza artesanal.	62
Figura 2. Ejemplos de aislamientos de BAL en agar MRS.	71
Figura 3. Tinción de Gram de BAL aisladas de fuentes vegetales mostrando las siguientes morfologías: a) cocos, b) bacilos largos y c) y d) bacilos cortos.	72
Figura 4. Porcentajes de inhibición de microorganismos indicadores agrupados en Clusters con 85% de similitud.	74
Figura 5. Sobrenadantes agrupados en el Cluster 2 con actividad inhibitoria contra microorganismos indicadores.	74
Figura 6. Arbol filogenético de las bacterias ácido lácticas aisladas de vegetales frescos... ..	77
Figura 7. Actividad enzimática de las Bacterias Ácido Lácticas aisladas de fuentes vegetales. A) proteasa, b) lipasa, c) metabolismo de citrato y d) amilasa.	79
Figura 8. Actividad enzimática de las Bacterias Ácido Lácticas aisladas de fuentes vegetales con un 85% de similitud.	80
Figura 9. Cepas de BAL seleccionadas para ser identificadas molecularmente de acuerdo a su actividad enzimática.	81
Figura 10. Porcentajes de la prueba de adhesión de las Bacterias ácido lácticas aisladas de fuentes vegetales.	85
Figura 11. Diferencia de color entre el medio Harina de pescado estéril y el sobrenadante de Leuconostoc mesenteroides PIM5 incubado en el mismo caldo.	97
Figura 12. Porcentaje de pérdida de peso de manzanas recubiertas con el sobrenadante libre de células del crecimiento de L. mesenteroides PIM5, almacenadas durante 28 días a 25°C.	101
Figura 13. Apariencia del grupo de muestras control de manzanas (SR) durante el almacenamiento a 25°C durante 28 días.	103
Figura 14. Apariencia del grupo de muestras de manzanas recubiertas (R) durante el almacenamiento a 25°C hasta el día 28.	104
Figura 15. Índice de color promedio de los grupos de muestras recubiertas y control durante el almacenamiento a 25°C por 28 días.	107
Figura 16. Comportamiento del contenido de sólidos solubles en muestras de manzana recubiertas y controles durante el almacenamiento a 25°C por 28 días.	108
Figura 17. Comportamiento del pH en muestras de manzana recubiertas y controles durante el almacenamiento a 25°C por 28 días.	109
Figura 18. Comportamiento de la acidez titulable en muestras de manzana recubiertas y controles durante el almacenamiento a 25 °C por 28 días.	111
Figura 19. Índice de madurez en muestras de manzana recubiertas y controles durante el almacenamiento a 25°C por 28 días.	112
Figura 20. Recuentos de bacterias mesófilas aerobias en muestras de manzana recubiertas y controles durante 28 días de almacenamiento a 25°C.	113
Figura 21. Recuentos de Mohos y Levaduras en muestras de manzana recubiertas y controles durante 28 días de almacenamiento a 25°C.	114



SELECCIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE FUENTES VEGETALES POR SU CAPACIDAD ANTIMICROBIANA Y SU USO EN BIOPRESERVACIÓN DE ALIMENTOS

RESUMEN

La biopreservación de vegetales con bacterias ácido lácticas (BAL) promete ser un método eficaz, ya que producen péptidos antimicrobianos. Muestras de vegetales se lavaron con agua peptonada, se inocularon en caldo MRS y luego en agar MRS. Se seleccionaron colonias características para determinar su actividad antimicrobiana. En microplacas se colocó caldo BHI con K_2HPO_4 (0,1 M), suspensiones de microorganismos indicadores y sobrenadantes de BAL centrifugados y pasteurizados. Se midió la densidad óptica (t_0), se incubaron y se midió de nuevo (t_{24}). También se evaluó la producción de proteasa (Agar Leche Descremada), lipasa (Agar Tributirina), amilasa (Agar Almidón), metabolismo de citrato (Agar Citrato) y adhesión en microplacas. Además, se formularon medios con desechos agroindustriales. Se evaluó la actividad antimicrobiana. El sobrenadante de BAL con mejor actividad antimicrobiana se utilizó para recubrir manzanas. Se evaluó pérdida de peso, color, apariencia, sólidos solubles, pH, acidez titulable, índice de madurez, BMA y Mohos y levaduras. Se aislaron 116 cepas de BAL. Mostraron actividad antimicrobiana principalmente contra *L. monocytogenes* (ELO8, 60% $\pm$ 8.3; PIM5, 58% $\pm$ 13; CAL14, 52% $\pm$ 6.6; PIM4, 65% $\pm$ 15). Hidrolizaron proteínas (61.2%), lípidos (22.4%), metabolizaron citrato (69.8%). Presentaron mejor actividad antimicrobiana en el medio con harina de pescado. *L. mesenteroides* PIM5 presentó la mejor actividad antimicrobiana en todos los medios. *L. mesenteroides* CAL14 inhibió el crecimiento de *L. monocytogenes* y fuertemente *B. cereus* (91.1%). Aunque no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) las muestras recubiertas perdieron más peso (12.33%) que los controles (10.54%). El Índice de madurez (34.7%) y los recuentos microbianos (BMA 71 UFC/g) fueron inferiores que en las muestras control (39.92% y 17 UFC/g). El sobrenadante de *L. mesenteroides* PIM5 ejerció un efecto bioprotector moderado como recubrimiento de manzanas.

Palabras clave: Bacterias ácido lácticas, péptidos antimicrobianos, vegetales



SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM VEGETABLE SOURCES FOR THEIR ANTIMICROBIAL CAPACITY AND THEIR USE IN BIOPRESERVATION OF FOOD

ABSTRACT

Biopreservation of vegetables with lactic acid bacteria (LAB) promises to be an effective method, as they produce antimicrobial peptides. Vegetable samples were washed with peptone water, inoculated into MRS broth and then onto MRS agar. Characteristic colonies were selected to determine their antimicrobial activity. BHI broth with K_2HPO_4 (0.1 M), suspensions of indicator microorganisms and centrifuged and pasteurized LAB supernatants were placed in microplates. Optical density (t_0) was measured, plates were incubated and measured again (t_{24}). Production of protease (Skim Milk Agar), lipase (Tributyryn Agar), amylase (Starch Agar), citrate metabolism (Citrate Agar) and adhesion on microplates were also evaluated. In addition, media were formulated with agroindustrial wastes. The antimicrobial activity was again evaluated. The supernatant with the best antimicrobial activity was used to coat apples and weight loss, color, appearance, soluble solids, pH, titratable acidity, maturity index, BMA and Molds and yeasts were evaluated. One hundred sixteen strains of LAB were isolated. They showed antimicrobial activity mainly against *L. monocytogenes* (ELO8, $60\% \pm 8.3$; PIM5, $58\% \pm 13$; CAL14, $52\% \pm 6.6$; PIM4, $65\% \pm 15$). They hydrolyzed proteins (61.2%), lipids (22.4%), metabolized citrate (69.8%). Furthermore, they presented better antimicrobial activity in the medium with fish flour. *L. mesenteroides* PIM5 had the best antimicrobial activity in all media. *L. mesenteroides* CAL14 inhibited the growth of *L. monocytogenes* and strongly *B. cereus* (91.1%). Although no significant differences were found ($p > 0.05$), the coated samples lost more weight (12.33%) than the controls (10.54%). Maturity index (34.7%) and microbial counts (BMA 71 CFU / g) were lower than in control samples (39.92% and 17 CFU / g) respectively. The supernatant of *L. mesenteroides* PIM5 exerted a moderate bioprotective effect as a coating of apples in storage.

Key words: Lactic acid bacteria, antimicrobial peptides, vegetables

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el consumo de frutas y hortalizas frescas ha ido en aumento debido a que los consumidores se esfuerzan por mantener una dieta saludable. Además, la disponibilidad de productos considerados de “temporada” se ha extendido a todo el año (Cardamone, *et al.*, 2015; Falomir, *et al.*, 2010; Jeddi, *et al.*, 2014)

No obstante, es bien conocido que las frutas y hortalizas mínimamente procesadas pueden ser un riesgo para la salud de los consumidores (Russo, *et al.*, 2014). Gran cantidad de los brotes de enfermedades gastrointestinales reportados se han relacionado con contaminación bacteriana en frutas y hortalizas frescas. Es de gran preocupación que su frecuencia ha ido aumentando en los últimos años (Cardamone, *et al.*, 2015; Falomir, *et al.*, 2010; Jeddi, *et al.*, 2014). Así mismo, la contaminación con aflatoxinas durante la pre-cosecha puede llevar a la acumulación de niveles considerables aun en óptimas condiciones de post-cosecha (Ahlberg, *et al.*, 2016). El uso de fungicidas químicos, principal método de control de hongos, puede causar el desarrollo de resistencia en hongos patógenos; también existe la posibilidad del riesgo toxicológico en humanos, además del riesgo de contaminación ambiental (El-Mabrok, *et al.*, 2012a; Trias, *et al.*, 2008a; Coda, *et al.*, 2011). La preocupación de los consumidores debido a los aditivos sintéticos ha estimulado la investigación de métodos alternativos para reducir la descomposición de frutas y vegetales mínimamente procesados y el mejoramiento de la inocuidad (Siroli, *et al.*, 2015).

Por lo tanto, entre los principales retos para la industria de alimentos actual se encuentra el desarrollar nuevos métodos, efectivos y económicos capaces de reducir los efectos negativos durante el proceso y distribución de frutas y hortalizas frescas, la disminución de las pérdidas económicas debido al deterioro de los alimentos e impedir la transmisión de patógenos microbianos a través de la cadena alimenticia mientras que se satisface la creciente demanda de los consumidores por alimentos frescos, listos para el consumo, mínimamente procesados y ricos en nutrientes (Corbo, *et al.*, 2015; Gálvez, *et al.*, 2007).



La biopreservación o uso empírico de microorganismos y/o sus metabolitos para la conservación de alimentos, ha sido una práctica común en la historia de la humanidad. No obstante, ha surgido recientemente como una prometedora técnica para aumentar el tiempo de vida útil y mejorar la inocuidad de los alimentos de forma natural. Varias bacterias y levaduras han sido identificadas como agentes bioprotectores y se han llevado a cabo diferentes estudios sobre su capacidad antagonista en microorganismos patógenos (Ghazvini, *et al.*, 2016; Hernández-Saldaña, *et al.*, 2016; Pessione y Cirrincione, 2016; El-Mabrok, *et al.*, 2012b).

En general, las bacterias ácido lácticas (BAL) han mostrado un gran potencial como agentes de control biológico de varios alimentos mínimamente procesados debido a que producen una gama de compuestos bioactivos tales como ácidos orgánicos de cadena corta, peróxido de hidrogeno y péptidos antimicrobianos. Además, son ampliamente utilizadas en alimentos fermentados desde hace siglos y tienen un gran historial de uso seguro (Hernández-Saldaña, *et al.*, 2016; Corbo, *et al.*, 2015; Olvera-García, *et al.*, 2015; Valerio, *et al.*, 2013). Incluso, se han utilizado numerosos péptidos antimicrobianos como agentes útiles en agricultura y medicina, por lo cual, su caracterización genética y química se ha convertido en un esfuerzo continuo (Snyder y Worobo, 2013). Adicionalmente, la bioprotección empleando BAL puede apoyarse en el uso de desechos agro-industriales como sustrato para la fermentación (Veeravalli y Mathews, 2018). De esta forma, se puede ayudar a reducir la cantidad de efluentes que se vierten al medio ambiente (Boumaiza, *et al.*, 2018).

Esta investigación estará dirigida a aislar e identificar la microbiota predominante de Bacterias Ácido Lácticas en diferentes fuentes vegetales, evaluar su efecto antagonista contra patógenos y sus características fisiológicas (producción de enzimas y exopolisacáridos). También se evaluará la influencia de medios de cultivo formulados con desechos agro-industriales sobre la actividad antimicrobiana de las Bacterias Ácido Lácticas. Por último, se evaluará el efecto bioprotector del sobrenadante del crecimiento de bacterias ácido lácticas en manzanas frescas (*Malus domestica* var. Golden delicious) durante la post cosecha.

ANTECEDENTES

Inocuidad en frutas y hortalizas frescas.

Las frutas y vegetales frescos generalmente tienen una resistencia externa dada por una cubierta protectora de cera a prueba de agua que funciona como barrera para la entrada de microorganismos. Sin embargo, la superficie de las frutas puede albergar microorganismos como parte de su microbiota natural, Entre estos microorganismos se incluyen bacterias (*Pseudomonas*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Lactobacillus spp.*) hongos (*Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eurotium*, *Wallemia*) levaduras (*Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*) virus y parásitos o especies ocasionales durante el procesamiento (Corbo, *et al.*, 2010). También pueden tener microorganismos epifíticos no patógenos, sin embargo, durante el crecimiento, cosecha y transporte pueden ser contaminados con patógenos de origen animal o humano (Cardamone, *et al.*, 2015; Lee, *et al.*, 2014; Falomir, *et al.*, 2010); su crecimiento está influenciado por factores intrínsecos y extrínsecos en cualquier punto del procesamiento y manejo (Corbo, *et al.*, 2010). Esta contaminación puede aumentar como consecuencia de un deficiente manejo pre cosecha y post cosecha.

Contaminación durante la precosecha.

Las fuentes potenciales de contaminación con patógenos durante la precosecha incluyen el suelo, heces de animales salvajes, fungicidas e insecticidas reconstituidos, polvo, animales salvajes o domésticos, trabajadores de campo y equipo de cosechado (Jung, *et al.*, 2014). También el uso de fertilizantes orgánicos como lodos residuales y estiércol, así como la presencia de polvo, heces y baja calidad del agua de irrigación. El nivel de contaminación se ve influenciado por la habilidad de los patógenos para

persistir y proliferar en vegetales (Jeddi, *et al.*, 2014; Vital, *et al.*, 2014; Falomir, *et al.*, 2010). Las bacterias patógenas comúnmente asociadas con brotes en productos frescos tales como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes* son conocidos por ser esparcidos en el ambiente por los animales que viven en el lugar (Jung, *et al.*, 2014). El viento, los insectos, incluso la mosca de la fruta, pueden inocular la piel o la superficie externa con una variedad de bacterias favoreciendo la contaminación (Corbo, *et al.*, 2010). Los contenedores empleados para cosechar, transportar y exhibir los productos pueden considerarse otra fuente de contaminación, con frecuencia no son limpiados y desinfectados efectivamente, favoreciendo el desarrollo de biopelículas las cuales pueden proveer protección contra desinfectantes aumentando la supervivencia y la probabilidad de contaminación cruzada (Corbo, *et al.*, 2010).

Contaminación durante la postcosecha.

La contaminación cruzada de vegetales puede ocurrir por contacto con los equipos de cosechado, cuchillos, manos de trabajadores, guantes, contenedores tales como bandejas, cajas y cubetas. Estos materiales son colocados directamente en el piso y apilados unos sobre otros (Jung, *et al.*, 2014). Inmediatamente después de la cosecha, los productos frescos deben ser seleccionados y clasificados. Durante estas operaciones, los productos dañados e inmaduros deben ser removidos ya que estos pueden convertirse en fuentes de etileno aumentando la tasa de respiración, maduración y senescencia de los productos sanos (Shafiur-Rahman, 2007). Posterior a la selección y clasificación, se debe realizar un enfriamiento rápido, ya que es un factor significativo para mantener la calidad. Para ello se emplean métodos como el hidrogenenfriamiento y el enfriamiento al vacío los cuales se aplican rociando los productos con agua y posterior evaporación del agua superficial respectivamente. Sin embargo, pueden llevar a la contaminación cruzada de los productos o internalización de patógenos (Jung, *et al.*, 2014).

Las operaciones de procesamiento como lavado, cortado, desinfección, empaclado y almacenamiento, proveen muchas oportunidades de contaminación cruzada. El

lavado de frutas frescas y vegetales antes del cortado es importante para controlar las cargas microbianas que incluyen microbiota mesofílica, BAL, coliformes, coliformes fecales, mohos, levaduras y microbiota pectinolítica (Jung, *et al.*, 2014; Corbo, *et al.*, 2010; Shafiur-Rahman, 2007). El lavado también remueve tierra y otros escombros, no obstante, el agua de lavado de calidad microbiana insatisfactoria o no tratada puede servir como un vehículo de dispersión de microorganismos (Jung, *et al.*, 2014). Adicionalmente, los nutrientes se hacen disponibles y los patógenos se pueden diseminar de las partes contaminadas a las no contaminadas (Corbo, *et al.*, 2015). El cortado libera exudados que contienen nutrientes que pueden ayudar al crecimiento de patógenos entéricos. Condiciones no favorables durante el empaclado y el almacenamiento pueden contribuir al crecimiento y sobrevivencia de microorganismos deterioradores y patógenos en vegetales. Los cambios en las condiciones de empaclado y la temperatura de almacenamiento influyen la expresión de los factores de virulencia en patógenos (Jung, *et al.*, 2014). Las frutas y vegetales cultivados en Estados Unidos pueden permanecer cinco días en tránsito post cosecha antes de arribar a un centro de distribución. Los productos cultivados en el hemisferio sur para el consumo en Estados Unidos durante el invierno y la primavera, pueden durar en tránsito entre días si es transportado por avión a varias semanas si es transportado por barco. Una vez que los vegetales llegan al expendio para ser vendidos directamente al consumidor, pueden durar de 1 a 3 días en exhibición hasta que son comprados y llevados a los hogares donde pueden permanecer almacenados hasta siete días a temperatura ambiente o en refrigeración hasta su consumo (Barrett y Lloyd, 2012).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se relacionan principalmente al consumo de frutas y vegetales tanto frescos como mínimamente procesados (Russo, *et al.*, 2014). No obstante, el número de brotes se ha incrementado exponencialmente desde 1970. De hecho, numerosos estudios han reportado la presencia de *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Shigella* sp. y *Campylobacter* sp. en vegetales (Cardamone, *et al.*, 2015; Siroli, *et al.*, 2015; Jeddi, *et al.*, 2014). La tabla 1 muestra los microorganismos encontrados en vegetales frescos en algunas

investigaciones a nivel mundial. Estos microorganismos permanecen en las superficies de las frutas mientras la piel está sana e intacta, cualquier corte o contusión que aparezca durante las operaciones de cosechado y procesamiento post cosecha pueden permitir su entrada a los tejidos internos suaves menos protegidos (Corbo, *et al.*, 2015).

La calidad higiénica de vegetales frescos sin procesar fue investigada en Italia. Los recuentos de Mesófilos aerobios variaron entre 2 y 6 log UFC/g, *Enterobacteriaceae* entre 2 y 6 log UFC/g y *E. coli* entre 2 y 3 log UFC/g. Adicionalmente, indicaron que a pesar de estos altos recuentos los productos no tenían signos visibles de alteraciones sensoriales. Entre los patógenos, detectaron *Salmonella veneziana* (6.8 log UFC/g) y *L. monocytogenes* serotipo 4b asociada a *L. innocua* (< 1 log UFC/g). No detectaron *Shigella* spp., *Escherichia coli* O157 o *Campylobacter* spp. (Cardamone, *et al.*, 2015),

Tabla 1 Patógenos aislados de vegetales frescos en investigaciones en algunos países.

Autores	País	Patógenos
Cardamone <i>et al.</i> , 2015	Italia	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> sp., <i>L. monocytogenes</i> , <i>Campylobacter</i> sp. y <i>Shigella</i> sp.
Vital <i>et al.</i> , 2014	Filipinas	<i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> sp.
Corbo <i>et al.</i> , 2015	Italia	<i>E. coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella</i> sp.
Jeddi <i>et al.</i> , 2014	Irán	<i>Salmonella</i> sp.
Falomir <i>et al.</i> , 2010	España	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> y <i>Enterobacter sakazakii</i>

Una investigación en Irán determinó que el 87% de las muestras de vegetales mínimamente procesados contenían coliformes totales. Además, *E. coli* se detectó en el 9.4% de las muestras de vegetales frescos cortados y en el 30% de las muestras de ensaladas listas para comer. *Salmonella* spp. fue detectada en el 5% de las muestras de ensaladas listas para comer (Jeddi, *et al.*, 2014). *E. coli* fue aislada de

lechuga (24%), zanahoria (22%) y tomate (16%) mientras que *Salmonella* spp fue aislada de zanahoria (30%), lechuga (24%) y col (22%) en una evaluación realizada en Las Filipinas (Vital, *et al.*, 2014). La presencia de bacterias coliformes en vegetales frescos (tomate, lechuga, zanahoria y espinaca) fue evaluada en España, en donde lograron aislar coliformes del 50% de las muestras. Aunque no identificaron *E. coli* O157:H7, *Salmonella* o *Shigella*, la presencia de algunos patógenos oportunistas como *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter sakazakii* indican que los vegetales frescos pueden representar un factor de riesgo de infección (Falomir, *et al.*, 2010).

Según Jeddi *et al.* (2014), entre los factores que influyen en las altas cargas de coliformes en vegetales de hoja se incluyen las grandes superficies expuestas a la contaminación y el uso intenso de estiércol sin tratamiento durante la pre cosecha. Por otra parte, Falomir *et al.* (2010), indican que la adhesión a la superficie del vegetal y la internalización de las bacterias pueden limitar la utilidad del procesamiento convencional y los métodos de desinfección para tratar los productos frescos, por lo tanto, el efecto del lavado de productos contaminados parece ser débil. Por ejemplo, se determinó que las zanahorias tenían las más altas cargas microbianas en muestras de vegetales debido a la exposición extensiva de este producto durante su cultivo (Vital, *et al.*, 2014). Esto indica que la prevención de la contaminación pre y post cosecha es primordial para controlar los brotes asociados a los productos frescos (Vital, *et al.*, 2014; Falomir, *et al.*, 2010).

Métodos de descontaminación de frutas y hortalizas frescas.

Inmediatamente después de la cosecha, la calidad sensorial y nutricional de los productos frescos empieza a declinar como resultado de la alteración del metabolismo y el crecimiento microbiano (Shafiur-Rahman, 2007). Las frutas y hortalizas tienen una vida de anaquel muy corta debido a su alto contenido de humedad, por lo cual, están propensos al deterioro. Además, son organismos vivos que llevan a cabo transpiración, respiración e incluso algunos continúan la maduración aun después de

cosechados, por lo tanto, su metabolismo continúa aumentando la tasa de deterioro debido a la senescencia, a los factores ambientales desfavorables y a la misma maduración. Por estas razones, a los vegetales se les conoce como alimentos perecederos y necesitan atención inmediata post cosecha para reducir la carga microbiana y aumentar su tiempo de vida útil (Lal Basediya, *et al.*, 2013).

Entre 25 y 40% de las frutas cosechadas se pierden antes de consumirse debido a un deficiente manejo post cosecha y al ataque microbiano. Después de que la fruta ha sido cosechada a un nivel óptimo de madurez, la característica más importante es la retención de calidad por un mayor período de tiempo, lo que le permite mantenerse en anaquel por un período de tiempo extenso. Las pérdidas post cosecha pueden ser reducidas extendiendo la vida de anaquel, controlando la velocidad de transpiración y respiración y la contaminación microbiana (Bisen, *et al.*, 2010).

Es probable que la desinfección no elimine todos los patógenos en el producto, por lo tanto, es importante emplear protocolos eficientes. La eficacia de los desinfectantes empleados para reducir las cargas microbianas generalmente depende del tipo de tratamiento, tipo y fisiología de los microorganismos contaminantes, características de las superficies de los productos (rajas, hendiduras, textura, tendencia hidrofóbica), tiempo de exposición y concentración del desinfectante, pH y temperatura (Shafiur-Rahman, 2007). Una consideración importante para escoger el método de preservación apropiado es el tiempo de vida útil previsto para el producto (Barrett y Lloyd, 2012).

Métodos de preservación tradicionales.

Tratamientos físicos

La tabla 2 muestra algunos métodos tradicionales de desinfección. El procesamiento térmico es una de las formas más comunes de preservación de alimentos debido a su eficiente reducción de la población bacteriana. Muchas frutas y vegetales enlatados y embotellados se producen bajo condiciones de esterilización comercial y tienen un tiempo de vida útil de 2 años o más. El procesamiento térmico involucra el

calentamiento del producto final dentro de su contenedor final o el calentamiento del alimento antes del empaquetado y luego se empaqueta bajo condiciones de esterilidad (Barrett y Lloyd, 2012). Para asegurar la destrucción de esporas se requieren temperaturas de 121°C de calor húmedo por 15 minutos. Los alimentos con pH ácido (≥ 4.6) requieren temperaturas de 93°C durante 15 minutos para asegurar la esterilidad comercial. Una actividad de agua de 0.85 o menor, no requiere un proceso térmico independientemente del pH (Barrett y Lloyd, 2012).

También se ha sugerido como tratamiento de descontaminación, el uso del blanqueado en la industria de alimentos mínimamente, que consiste en calentar a alta temperatura, generalmente en agua de 85 a 100°C o con vapor, menos frecuente con microondas, radiofrecuencia o radiación infrarroja. Este tratamiento es capaz de reducir los recuentos bacterianos iniciales, pero desafortunadamente produce cambios perjudiciales en el producto por pérdida de nutrientes por degradación térmica, difusión y lixiviación, así como alteración del color y textura. El método de choque térmico comúnmente implica una etapa de lavado a una temperatura que varía de 45 a 70°C por pocos minutos, generalmente menos de 5 (Corbo, et al., 2010).

La congelación sirve como método de preservación debido a que la actividad de agua puede ser reducida a un nivel que puede prevenir la actividad microbiana y reduce la velocidad de las reacciones químicas. Existen tres métodos básicos de congelación utilizados comercialmente: congelación por aire, congelación por contacto indirecto con el refrigerante y congelación por inmersión en un medio refrigerante. Antes de la congelación, la mayoría de los vegetales se exponen a un tratamiento de blanqueo corto con vapor o agua caliente para inactivar enzimas (Barrett y Lloyd, 2012).

Los procesos de congelación y descongelación resultan en un daño significativo de los tejidos dependiendo de la velocidad y la temperatura aplicada. Esta degradación del tejido puede permitir la pérdida de la integridad celular y la interacción de enzimas y nutrientes (Barrett y Lloyd, 2012).

Tabla 2. Métodos tradicionales de desinfección.

Método	Principio	Ventajas	Desventajas	Referencia
Esterilización comercial	Calentamiento (121°C-15 min)	Esterilidad del producto	Pérdida de nutrientes, Cambio de color y textura	Barret y Lloyd, 2012
Blanqueado	Calentamiento (70°C-95°C por 1,5-15 min)	Reducción carga microbiana Inactivación enzimas	Pérdida de nutrientes, Cambio de color y textura	Kim, <i>et al.</i> , 2014; Behsnilian y Mayer-Miebach, 2017
Cloro	Agente oxidante	Económico Bajas concentraciones	Formación de productos carcinogénicos. Gran cantidad de efluentes, alto DBO. Desarrollo patógenos resistentes. Pérdida de color. Corrosión. Incapacidad para eliminar por completo microorganismos en alimentos frescos	Jung <i>et al.</i> , 2014; Boyacioglu <i>et al.</i> , 2013; Corbo <i>et al.</i> , 2010; Siroli <i>et al.</i> , 2015
Ácidos orgánicos	Disminución pH del medio. Disrupción de permeabilidad de membrana. Reducción pH de célula. Atacan enzimas metabólicas, síntesis de proteínas, material genético	Activos contra amplia gama de microorganismos	Olores indeseables. Sabor amargo	Corbo <i>et al.</i> , 2010; Shafiur Rahman, 2007

Productos químicos.

Para reducir las cargas bacterianas en frutas, se han empleado varios compuestos químicos, ya sea antes del procesamiento o durante las operaciones de pre y post cortado. Por su potencial como preservativo se han evaluado etanol, aceites

minerales, agua caliente o clorinada, quitosano y ozono. No obstante, sus olores indeseables o sabor amargo que pueden conferir al producto durante el almacenamiento han sido limitantes significativas en sus aplicaciones prácticas (Sabir, *et al.*, 2010).

Cloro

El método de descontaminación más utilizado para reducir la carga microbiana es la aplicación de cloro en sus diferentes presentaciones, tales como hipoclorito de sodio líquido o de calcio granulado, dióxido de cloro, y cloro gaseoso. Los productos mínimamente procesados generalmente se enjuagan en soluciones de 50 a 200 ppm de cloro o 5 ppm de dióxido de cloro y tiempos de contacto de menos de cinco minutos. El cloro libre es un buen desinfectante, 1 ppm de cloro libre residual puede desinfectar agua a pH entre 6.5 y 7 (Jung, *et al.*, 2014; Corbo, *et al.*, 2010; Shafiur-Rahman, 2007).

El hipoclorito de sodio líquido concentrado es el más empleado, aunque también se usa el hipoclorito de calcio granulado y el cloro gaseoso, sin embargo, los gránulos de hipoclorito de calcio deben ser disueltos lo que requiere una labor adicional y el cloro gaseoso es difícil de manejar. Adicionalmente, altos niveles de cloro pueden causar irritación en los pulmones y piel de los trabajadores, decoloración de los productos, aumento de la corrosión de los equipos y pueden formar clorofenoles y cloraminas volátiles que pueden causar daños a la salud (Shafiur-Rahman, 2007).

Aunque los tratamientos con cloro son empleados comúnmente para descontaminar productos frescos, en algunos países europeos su uso está prohibido en alimentos listos para el consumo debido a su potencial toxicidad por la formación de productos halogenados carcinogénicos al reaccionar con materia orgánica natural. Además, el uso de cloro se asocia con una gran cantidad de efluentes con alta demanda biológica de oxígeno. Estudios recientes han demostrado la incapacidad de estos productos para eliminar o inactivar completamente a los microorganismos en los alimentos frescos (Jung, *et al.*, 2014; Corbo, *et al.*, 2010) debido a que las concentraciones utilizadas no son suficientes para eliminar el 100% de las bacterias patógenas, (Boyacioglu, *et al.*, 2013), permitiendo reducciones de 1-2 logaritmos en la población

bacteriana (Siroli, *et al.*, 2015). El efecto oxidativo del cloro libre es inactivado por factores como la formación de biopelículas, internalización de bacterias patógenas, las cuales pueden estar adheridas a los vegetales de hoja y otras superficies vegetales, las sustancias orgánicas liberadas por las superficies dañadas o cortadas de los vegetales y la condición hidrofóbica de las superficies de las plantas. Además, existe una creciente preocupación por la producción de sustancias potencialmente tóxicas para el humano y por el desarrollo de patógenos más resistentes (Li, *et al.*, 2015; Siroli, *et al.*, 2015; Jeddi, *et al.*, 2014; Boyacioglu, *et al.*, 2013).

Otros desinfectantes tales como peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos y ozono también han demostrado su incapacidad de erradicar completamente o matar a los microorganismos en productos frescos, así como su potencial toxicidad (Siroli, *et al.*, 2015).

Ozono.

El ozono ha sido empleado como método de desinfección debido a su fuerte poder oxidante que es capaz de inactivar microorganismos efectivamente. Hasta ahora no hay indicaciones de efectos adversos a la salud, sin embargo, es un método costoso (Shafiur-Rahman, 2007).

Ácidos orgánicos.

El uso de tratamientos por inmersión es sugerido para reducir las poblaciones microbianas y extender el tiempo de vida útil de las frutas. Se han empleado soluciones de lactato y propionato de calcio, las cuales han sido empleadas con éxito en melón y manzana en trozos. También se han empleado soluciones de peróxido de hidrógeno en melón (Corbo, *et al.*, 2010). Los ácidos orgánicos como el succínico, málico, tartárico, ascórbico y cítrico son comúnmente encontrados en frutas y vegetales y son utilizados como preservativos en alimentos. Estos reducen las cargas microbianas debido a la disminución del pH del ambiente, disrupción de la permeabilidad de la membrana y reducción del pH interno de la célula por la asociación de iones hidrógeno del ácido. También atacan enzimas metabólicas,

sistemas de síntesis de proteínas y material genético, y, por lo tanto, son activos contra una amplia gama de microorganismos. Son efectivos en la reducción del pH superficial de frutas cortadas como naranja, manzana, pera, kiwi, aguacate, plátano y albaricoque (Corbo, *et al.*, 2010; Shafiur-Rahman, 2007).

Nuevas tecnologías de preservación.

Tratamientos físicos

Dentro de las nuevas tecnologías de preservación se incluyen las tecnologías avanzadas, las cuales pueden o no estar en uso comercial (tabla 3). Incluyen el procesado con alta presión y el uso de varios métodos eléctricos como las microondas, campos eléctricos pulsados y procesamiento óhmico, las cuales producen cambios en el alimento mientras son absorbidas (Barrett y Lloyd, 2012).

Preservación óhmica, con Microondas y campos eléctricos pulsados.

Una gran ventaja de estos métodos es la aplicación uniforme de presión o campos eléctricos al producto entero a diferencia de la aplicación del calentamiento o congelamiento en donde el aumento o disminución de la temperatura del exterior al interior del producto no es uniforme. El calor es generado de forma rápida y uniforme a través de la masa, el vapor generado calienta las áreas adyacentes por conducción, lo que produce un calentamiento localizado que causa la ruptura de las células microbianas (Barrett y Lloyd, 2012).

Tabla 3. Nuevas tecnologías de preservación.

Método	Principio	Ventajas	Desventajas	Referencias
Preservación óhmica	Corriente alterna 50-60 Hz	Calentamiento uniforme a alta velocidad		Lu, <i>et al.</i> , 2015; Barret y Lloyd, 2012
Microondas	915 MHz-2.45 GHz	Destrucción de toxinas, patógenos. Menor pérdida de nutrientes	Dificultad para calentamiento uniforme. Influencia del pH	Renna, <i>et al.</i> , 2017; Reverte-Ors, <i>et al.</i> , 2017
Campos eléctricos pulsados	Pulsos cortos de campos eléctricos intensos	Elimina microorganismos	Daño depende de estructura de tejido, forma de células, propiedades electrofísicas	Xiang, <i>et al.</i> , 2011; Ben Ammar, 2011
Radiación ultravioleta	200-280 nm	No deja residuos, elimina amplia gama de microorganismos	Patrón de flujo, propiedades ópticas de los alimentos, la turbidez de los líquidos afectan la calidad	Gayán, <i>et al.</i> , 2014; Corbo <i>et al.</i> , 2010; Jones, <i>et al.</i> , 2014; Barba, <i>et al.</i> , 2010
Alta presión	3000-8000 bars	Elimina microorganismos	Afecta productos porosos	Corbo <i>et al.</i> , 2010
Aceites esenciales	Degradación de la pared celular, daño en la membrana citoplasmática, daño en las proteínas de la membrana, coagulación del citoplasma y agotamiento de la fuerza protonmotriz	Controlar el deterioro de alimentos, la oxidación lipídica y eliminar bacterias patógenas	Aroma intenso cambia propiedades organolépticas del alimento. Toxicidad	Cardoso y Sosa, 2012; Heydari <i>et al.</i> , 2015; EÇA <i>et al.</i> , 2014
Recubrimientos y películas comestibles	Disminuye respiración y senescencia.	Económico, no tóxico, alarga y mantiene calidad en condiciones ordinarias de almacenamiento	Polisacáridos, no son barreras efectivas contra humedad. Proteínas tienen pobre resistencia al vapor de agua son susceptibles a Proteasas.	Corbo <i>et al.</i> , 2015; Raeisi <i>et al.</i> , 2014; Bisen <i>et al.</i> , 2010; Sánchez-Ortega, <i>et al.</i> , 2014

CONTINUACIÓN Tabla 3

Empacado en atmósferas modificadas	Reducción de respiración y actividad del producto	Inhibe el crecimiento de microorganismos, aumenta el tiempo de vida útil	Sistema no estéril. Respiración del producto modifica la atmósfera del empaque, imposible definir la mezcla única de gases. Perjudica el balance de microambiente.	Chaudhary, 2015; Boyacioglu <i>et al.</i> , 2013; Shafiur Rahman, 2007
Empacado activo	Liberación de antimicrobianos dentro del empaque	Mantiene la calidad y aumenta el tiempo de vida útil del producto	Necesita contacto directo entre el alimento y el O_2 . Control del O_2 no es posible	Lu <i>et al.</i> , 2015; Otero-Pazos, <i>et al.</i> , 2014; Corbo <i>et al.</i> , 2010
Bioprotección	Aplicación de microorganismos/metabolitos. Disminución de pH, dinámica de humedad, salinidad o introducción antimicrobiano	Eliminar patógenos introduciendo alteraciones menores en el nicho.	Falta de investigación en vegetales frescos	Adam <i>et al.</i> , 2016; Cizeikiene <i>et al.</i> , 2013; Settanni y Corsetti, 2007

El procesamiento Óhmico es un proceso continuo aplicado a partículas en una solución conductora pasándolas por una serie de corrientes alternas de baja frecuencia entre 50 y 60 Hz. Las partículas y el líquido se calientan rápidamente, luego son enfriadas por una tecnología similar y por último son empacadas asépticamente (Barrett y Lloyd, 2012).

El procesamiento con campos eléctricos pulsados, es aplicado comúnmente a jugos. Esta tecnología involucra la aplicación de pulsos cortos de campos eléctricos intensos en un líquido fluyendo para eliminar las células vegetativas de los microorganismos (Barrett y Lloyd, 2012).

Radiación ultravioleta.

La radiación ultravioleta artificial no ionizante, es aplicada extensivamente en un amplio rango de aplicaciones antimicrobianas incluyendo desinfección de agua, aire, alimentos, preparación de superficies, contenedores de alimentos y desinfección de superficies de productos vegetales. El tratamiento con energía ultravioleta puede ofrecer varias ventajas a los procesadores de frutas frescas cortadas ya que no deja residuos y no tiene restricciones legales. Es fácil de usar y es letal para una amplia gama de microorganismos, no requiere de una alta inversión en equipos de seguridad para implementarse.

La luz UV, es una radiación no ionizante con longitudes de onda de 100 a 400 nm, que se clasifica en tres tipos: UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) y UV-C (100-280 nm). La radiación UV-C tiene el más alto poder germicida y es la más usada para la descontaminación de superficies y para control de crecimiento de microorganismos en productos frescos cortados. La radiación UV actúa como un agente antimicrobiano directamente debido al daño en el ADN e indirectamente debido a la inducción de los mecanismos de resistencia contra patógenos (Corbo, *et al.*, 2010). La irradiación fue aprobada por la FDA para el uso en frutas y vegetales. Algunas veces la calidad del producto es extendida mientras que en otras resulta en una pérdida de los atributos de calidad (Corbo, *et al.*, 2010).

Preservación con alta presión.

Este método es efectivo contra microorganismos debido a que causa la ruptura de las membranas microbianas (Barrett y Lloyd, 2012). El uso de altas presiones en un rango de 3000 a 8000 bars fue recientemente sugerido para su aplicación en algunos alimentos con el fin de inactivar microorganismos y enzimas. Este método no causa la degradación de sabor y nutrientes asociados al procesamiento térmico tradicional. Desafortunadamente, afecta la integridad de los productos frescos porosos como consecuencia de la compresión y expansión del aire confinado en la matriz del alimento (Corbo, *et al.*, 2010).

Aceites esenciales.

Los preservativos químicos han ocasionado reacciones alérgicas en personas sensibles, de ahí el interés de los consumidores por los compuestos antimicrobianos naturales (Corbo, *et al.*, 2010). Las plantas han sido apreciadas por siglos debido a su actividad antimicrobiana, las hierbas y especias han sido empleados como preservativos. Los aceites obtenidos de partes de especias, incluyendo flores, capullos, semillas, hojas, ramas, corteza, madera, frutas y raíces. Estos aceites esenciales son productos volátiles olorosos, derivados del metabolismo secundario de las plantas, ricos en una mezcla compleja de compuestos bioactivos como ésteres, aldehídos, cetonas, terpenos y ácidos fenólicos (Heydari, *et al.*, 2015; Shafiur-Rahman, 2007) y otros compuestos aromáticos y alifáticos; pero su composición puede variar dependiendo de su origen (EÇA, *et al.*, 2014). Estos pueden ser utilizados para controlar el deterioro de alimentos, la oxidación lipídica y eliminar bacterias patógenas (Heydari, *et al.*, 2015).

Aunque, se han utilizado muchos métodos para extraer los aceites esenciales el más comúnmente utilizado es el método de arrastre por vapor (Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2010; Shafiur-Rahman, 2007). Los componentes bioactivos de los aceites esenciales con un amplio espectro de efectos antimicrobianos incluyen al timol de tomillo y orégano, cinamaldehído de la canela y eugenol del clavo (Shafiur-Rahman, 2007), el metil jasmonato presente en el aceite esencial de jazmín, carvacol y el ácido cinámico presente en la canela (Corbo, *et al.*, 2010). A los aceites esenciales en plantas se les atribuye la función de mecanismo de defensa contra microorganismos y pestes, de ahí su capacidad antimicrobiana y antifúngica (Cardoso Ugarte y Sosa Morales, 2012; Shafiur-Rahman, 2007).

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales no está dada por un solo mecanismo debido a que contienen gran número de compuestos químicos, de los cuales unos tienen propiedades antimicrobianas y otros solo sirven como soporte o aumentan la capacidad antimicrobiana de los demás. Por lo tanto, se han propuesto diferentes mecanismos como la degradación de la pared celular, el daño a la membrana citoplasmática, el daño a las proteínas de la membrana, coagulación del citoplasma y agotamiento de la fuerza motriz de los protones (Cardoso Ugarte y Sosa

Morales, 2012). Por ejemplo, la actividad antibacteriana del timol y otros monoterpenos está relacionada a daños estructurales y funcionales producidos en la fracción lipídica de la membrana plasmática, ya que interactúan con proteínas de membrana y dianas intracelulares, provocando alteraciones en la permeabilidad de la membrana, despolarización y liberación de material intracelular de las bacterias (Rojas, *et al.*, 2014).

El aceite esencial de albahaca ha sido efectivo inhibiendo tanto bacterias Gram positivas (*Micrococcus flavus*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis* y *Bacillus subtilis*) como en bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *S. enteritidis* y *Shigella sonnei*) aunque las Gram positivas han sido más susceptibles (Cardoso Ugarte y Sosa Morales, 2012). Rojas *et al.* (2014), extrajeron los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* L. (tomillo), *Pimpinella anisum* L. (anís), *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. (naranja dulce), *Ocimum basilicum* L. (albahaca blanca), *Curcuma longa* L. (cúrcuma), *Ruta chalepensis* L. (ruda) y *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake (melaleuca) y evaluaron su capacidad antimicrobiana contra *Pectobacterium carotovorum*, subsp. *carotovorum* empleando el método de difusión en agar. El aceite de tomillo tuvo la mayor actividad antimicrobiana al inhibir totalmente el crecimiento del patógeno, los aceites de anís y albahaca tuvieron actividad ligera mientras que los aceites de naranja dulce, cúrcuma, ruda y melaleuca no inhibieron el crecimiento del patógeno. Colivet *et al.* (2012), evaluaron la capacidad antimicrobiana de extractos etanólicos de albahaca, *Ocimum basilicum*. Los extractos de albahaca tanto fresca como seca, en concentraciones de 5 y 10% fueron capaces de inhibir el crecimiento de *S. aureus*. Sienkiewicz *et al.* (2013), evaluaron la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) y romero (*Rosmarinus officinalis* L.) contra cepas clínicas de *Escherichia coli* multiresistentes empleando el método de dilución en agar. Determinaron que ambos aceites fueron efectivos contra todas las cepas. El aceite de albahaca fue el más efectivo. Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn (2010), extrajeron los aceites esenciales de Albahaca (*Ocimum basilicum*), Canela (*Cinnamomum verum*), Clavo (*Eugenia caryophyllus*), Raíz de dedo (*Boesenbergia pandurata*), Ajo (*Allium sativum*), limoncillo (*Cymbopogon citrates*), Orégano (*Salvia*

officinalis), Tomillo (*Thymus vulgaris*) y Cúrcuma (*Curcuma longa*) y evaluaron su actividad antimicrobiana contra *Salmonella* enteritidis *in vitro* y en una salchicha de puerco fermentada llamada Nham. Todos los aceites inhibieron el crecimiento de *S. enteritidis in vitro* en diferentes grados, siendo el aceite de albahaca el de mayor actividad antimicrobiana a una concentración mínima de 20 µg/mL, mientras que en Nham, una concentración de 100 ppm fue suficiente para inhibir el crecimiento del patógeno luego de 3 a 4°C (Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2010).

Estos compuestos antimicrobianos tienen el inconveniente de que algunas de sus características como aroma intenso y toxicidad pueden causar cambios en las propiedades sensoriales del alimento lo que ha limitado su uso en la preservación de alimentos (EÇA, *et al.*, 2014; Shafiur-Rahman, 2007). Una estrategia para resolver este problema ha sido el incorporar aceites esenciales a los recubrimientos y películas comestibles. También es posible minimizar las dosis requeridas encapsulándolos en matrices poliméricas las cuales limitan la volatilización, controla su liberación y preserva la calidad y atributos de inocuidad de frutas y hortalizas frescas (EÇA, *et al.*, 2014). Las evaluaciones de la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales se han llevado a cabo por medio de experimentaciones *in vitro*, no obstante, la aplicación directa es muy poca (Cardoso Ugarte y Sosa Morales, 2012).

Recubrimientos y películas comestibles.

Las cubiertas en frutas y vegetales se conocen desde hace muchos años, sin embargo, recientemente, el uso de películas comestibles y recubrimientos para la protección y extensión de la vida útil de frutas y hortalizas ha aumentado en todo el mundo. Esto debido a ventajas como biocompatibilidad, no tóxico, no contamina al ambiente y de bajo costo, manteniendo la calidad aun en condiciones ordinarias de almacenamiento (Corbo, *et al.*, 2015; Raeisi, *et al.*, 2014; Bisen, *et al.*, 2010; Shafiur-Rahman, 2007).

Un recubrimiento comestible es una capa delgada de material adecuado para el consumo, formado por suspensiones de hidrocoloides o lípidos grado alimenticio que pueden ser aplicadas por aspersión, untado o inmersión sobre la superficie de un

alimento. Al secarse, forman una fina capa en adición o sustitución de los recubrimientos protectores naturales con el propósito de generar una barrera semipermeable a los gases, vapor de agua, humedad y compuestos volátiles. Además, son considerados parte del producto final. Las películas comestibles son definidas como una capa delgada de material comestible obtenida de suspensiones filmogénicas grado alimenticio, formada en la superficie del producto como un recubrimiento o colocada ya preformada sobre superficies inertes. Estos recubrimientos pueden alargar la vida de anaquel de los productos frescos cortados por la disminución de la respiración y la senescencia, retardan la pérdida de humedad proveyendo una barrera al vapor de agua, oxígeno y dióxido de carbono, dando como resultado un ambiente de alta humedad. De este modo, hacen más lentas las reacciones de oxidación protegiendo el aroma, textura y color al tiempo que reduce la contaminación microbiana. También sirven como acarreadores de sustancias antimicrobianas (Corbo, *et al.*, 2015; Heydari, *et al.*, 2015; EÇA, *et al.*, 2014; Sánchez-Ortega, *et al.*, 2014). La principal diferencia entre películas comestibles y recubrimientos es el grosor (Sánchez-Ortega, *et al.*, 2014).

Es necesario que los materiales empleados posean varias características como solubilidad en agua, naturaleza hidrofóbica o hidrofílica, fácil formación de cubiertas, buenas características sensoriales, además, es esencial la capacidad de plastificación para una buena flexibilidad (Corbo, *et al.*, 2015).

Las cubiertas comestibles son hechas generalmente de cuatro tipos de materiales: lípidos, resinas, polisacáridos y proteínas. Entre los lípidos más comunes utilizados como cubiertas comestibles se incluyen aceites y grasas vegetales y animales, entre ellos, aceites de castor, mineral, cacahuete, soya, palma, coco, cacao, manteca de cerdo y mantequilla. Entre los aceites esenciales y extractos empleados se encuentran alcanfor, menta, y aceites esenciales de cítricos. También se incluyen emulsificantes y agentes tensioactivos como lecitina, alcoholes ácidos y ácidos grasos como cáprico, láurico, mirístico, oleico, palmítico y esteárico y mono, di y triglicéridos. Entre las ceras se encuentran cera de abeja, carnauba, parafina, candelilla y jojoba. Entre las proteínas vegetales se emplean el gluten de trigo, proteína de soya, de cacahuete,

maíz y de semilla de algodón. Entre las proteínas animales se utiliza la queratina, colágeno, gelatina, caseína, proteínas de suero de leche, de soya, gelatina y albúmina de huevo. Entre los polisacáridos se emplea agar, alginato, carragenato, quitosano, dextrina, etíl celulosa, carboximetil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa, goma arábica, goma guar, almidón modificado, pectinas, extractos de algas (alginatos, carragenato y agar), gomas (acacia, tragacanto, guar, goma gellan y goma xantán), pululano y quitosano. Entre las resinas naturales se han utilizado chicle, guaraná y olíbano (Corbo, *et al.*, 2015; EÇA, *et al.*, 2014; Sánchez-Ortega, *et al.*, 2014; Shafiur-Rahman, 2007).

Los polisacáridos producen películas comestibles transparentes y homogéneas, tienen permeabilidad selectiva contra O_2 y CO_2 y resistencia a grasas y aceites debido a su red estructural ordenada de puentes de hidrógeno estrechamente empacada, además, son inodoros e insípidos. Por otra parte, no son barreras efectivas contra la humedad debido a su naturaleza hidrofílica. Estos compuestos imparten dureza, frescura, compacidad, viscosidad, adhesividad y habilidad para formar gel. La carboximetil celulosa es un polisacárido soluble en agua, con propiedades adecuadas de biodegradabilidad y formación de películas y que puede ser producido a bajo costo y gran escala a partir de diferentes fuentes; es inodoro, insípido, y no tóxico (Sánchez-Ortega, *et al.*, 2014; Raeisi, *et al.*, 2014).

Las películas a base de proteínas son buenas barreras contra el oxígeno, dióxido de carbono y tienen buenas propiedades de barrera lipídicas y mecánicas, se adhieren bien a las superficies hidrofílicas. Sin embargo, su aplicación se ve limitada por una pobre resistencia al vapor de agua debido a la hidrofiliidad de algunas proteínas. Para mejorar la flexibilidad se le agregan plastificantes como polietilenglicol o glicerol mientras que la permeabilidad al agua se puede superar añadiendo materiales hidrofóbicos tales como cera de abeja o aceites oleicos. A pesar de sus ventajas, las películas proteicas son susceptibles a las enzimas proteolíticas (Corbo, *et al.*, 2015; Sánchez-Ortega, *et al.*, 2014). Los recubrimientos lipídicos son eficientes barreras contra la humedad y mejoran la apariencia de las superficies. Los triglicéridos y los

lípidos neutros forman una capa continua estable sobre la superficie del alimento gracias a su alta polaridad (Corbo, *et al.*, 2015).

La lima Kagzi fue tratada con recubrimientos comestibles (aceite de coco, de mostaza, de sésamo, castor y parafina líquida). Los recubrimientos lograron un efecto significativo en la reducción de los daños fisiológicos además de no tener incidencia de mohos, en particular, el aceite de coco mostró mejores resultados (Bisen, *et al.*, 2010). El efecto del aceite de carnauba y mineral en la calidad post cosecha fue evaluado en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Ambos recubrimientos retardaron los cambios de color, la actividad enzimática y las pérdidas de peso, sin embargo, el recubrimiento de aceite mineral fue más efectivo por lo que es una buena alternativa para preservar la calidad y extender el tiempo de vida útil del tomate (Dávila, *et al.*, 2010).

La funcionalidad de los recubrimientos comestibles puede ser aumentada agregando algunos aditivos para ayudar a la preservación y la calidad del alimento, entre los cuales se encuentran compuestos antimicrobianos, antioxidantes, ácidos orgánicos, y aceites esenciales entre otros (Alikhani, 2014; EÇA, *et al.*, 2014; Sánchez-Ortega, *et al.*, 2014; Corbo, *et al.*, 2010). Sin embargo, antes de añadir antioxidantes a las películas o recubrimientos, es necesario evaluar no solo su capacidad antioxidante sino también como influyen las propiedades de los materiales en los cuales serán incorporados (poder de retención) y las características del alimento tales como sabor, olor y modificaciones químicas (EÇA, *et al.*, 2014). Por ejemplo, las cubiertas han mostrado un aumento en la eficiencia de los preservativos, pero los fungicidas han reducido su actividad (Shafiur-Rahman, 2007).

Por ejemplo, se recubrieron filetes de Carpa (*Aristichthys nobilis*) con alginato de sodio y alginato suplementado con aceite esencial de menta. Los filetes recubiertos con alginato y aceite mostraron significativamente menos nitrógeno básico volátil y oxidación lipídica en comparación con los filetes cubiertos solo con alginato. Además, redujeron el grado de deterioro microbiano en 1.5 log₁₀ CFU/g, más eficientemente que el alginato puro (Heydari, *et al.*, 2015). De igual forma, se trató mango cortado con un recubrimiento de mucílago de opuntia y aceite de romero (Mu + RO), con aceite

de romero microencapsulado (ROM) y con una combinación de ROM más (Mu + RO). Los tratamientos retardaron la pérdida de ácido ascórbico y la caída de la aceptabilidad sensorial, menor cambio de color y disminución de la actividad enzimática. También inhibieron la incidencia de la descomposición e hicieron más lento el crecimiento microbiano. El tratamiento (Mu + RO) fue más efectivo en el control de la calidad postcosecha en comparación con el tratamiento ROM. El tratamiento (Mu + RO & ROM) mostró la inhibición máxima en el crecimiento de microorganismos. Después del almacenamiento a 6°C por 9 días, muestras tratadas con (Mu + RO & ROM) mostraron el más bajo porcentaje de mangos infectados, la más baja actividad POD y buena aceptabilidad sensorial (Alikhani, 2014). El efecto antioxidante de varias formulaciones de un recubrimiento de carboximetil celulosa con aceite esencial de *Zataria multiflora* (1% y 2%) y dos concentraciones de extracto de semilla de uva (0.5% y 1%) se evaluaron en su aplicación en carne de trucha arcoíris durante 20 días. Los resultados indicaron que ambos aceites fueron efectivos reduciendo las reacciones químicas indeseables durante el almacenamiento de la carne de pescado (Raeisi, *et al.*, 2014).

Empacado en atmosfera modificada.

Bajo los canales de distribución actuales, los productos frescos y los productos frescos cortados pueden viajar grandes distancias hasta su eventual destino. Para preservar los atributos de calidad de los productos frescos, cortados o no, el empackado en atmósferas modificadas ofrece una ventaja indispensable (Boyacioglu, *et al.*, 2013).

El empackado en atmósferas modificadas (EAM) es una técnica de preservación que puede minimizar el deterioro microbiano de productos perecederos, manteniéndolos en una atmósfera diferente a la composición normal del aire (Corbo, *et al.*, 2015; Shafiur-Rahman, 2007). Durante el transporte de los productos, la temperatura de almacenamiento y la concentración de los gases son controladas para reducir el deterioro y aumentar el tiempo de vida útil (Boyacioglu, *et al.*, 2013). Un adecuado sistema de EAM permite un nivel básico de metabolismo, lo que quiere decir, que cierta cantidad de O₂ debe estar disponible alcanzando la inocuidad y/o alargando el

tiempo de vida útil (Corbo, *et al.*, 2010; Shafiur-Rahman, 2007). El nivel básico requerido de metabolismo es muy variable con los diferentes productos, tipo y madurez, composición, constituyentes, microbiota natural y pH. También depende fuertemente de la temperatura de almacenamiento y el grado de procesamiento aplicado, ya sea corte, rebanado, emparejado (Corbo, *et al.*, 2015; Shafiur-Rahman, 2007). Por lo tanto, es imposible definir una mezcla única de gases, además, para cada tipo de fruta se debe estudiar un empaque en atmósfera modificada apropiado (Corbo, *et al.*, 2010). Debido a la actividad respiratoria de los alimentos, la atmósfera dentro del empaque cambia durante el período de almacenamiento, por lo cual es necesario ser un experto para poder diseñar el empaque de un producto (Shafiur-Rahman, 2007). No obstante, Corbo *et al.* (2010), señalan varios reportes de aplicación exitosa de atmósferas modificadas en el empaque de piña fresca cortada, manzanas, kiwi, melón, bananas y mangos.

La conservación en atmósferas modificadas es un sistema de preservación no estéril por diseño. Las frutas y vegetales se caracterizan por un microbiota consistente de muchos tipos diferentes de bacterias, mohos y levaduras, muchos involucrados en el deterioro del producto, pero que son inofensivos para el consumidor. Los patógenos, normalmente no pueden establecer una alta densidad de población debido a que deben competir con los microorganismos deterioradores, sin embargo, el empaque puede producir cambios en el microambiente percibido por los microorganismos pudiendo perjudicar este balance. En consecuencia, se debe evaluar el impacto del diseño del empaque y el uso en la cadena de logística, obligatorio para asegurar la inocuidad (Shafiur-Rahman, 2007).

El objeto del EAM es disminuir la actividad del producto, así como el crecimiento de los microorganismos presentes limitando el suministro de O_2 aplicando un elevado nivel de CO_2 . Generalmente se combina con el almacenamiento en refrigeración. Muchos productos como aguacate, mango, papaya y pepino son muy sensibles al daño por bajas temperaturas, por lo que no deben almacenarse a menos de $13^{\circ}C$. Productos como manzanas, brócoli y peras no son sensibles al enfriamiento y se pueden almacenar cerca de los $0^{\circ}C$ (Shafiur-Rahman, 2007).

En general, se aplican bajos niveles de O_2 (2-3%) y moderadamente altos de CO_2 (5-20%) para reducir la tasa de respiración y prolongar el tiempo de vida útil. Atmósferas con bajos niveles de O_2 inhiben el crecimiento de muchos microorganismos deterioradores aeróbicos mientras que el crecimiento de patógenos aeróbicos facultativos como *L. monocytogenes*, debido a que no son suprimidos en estas condiciones, su crecimiento puede ser estimulado debido a la reducción de los microorganismos deterioradores que pudieran ser competidores de patógenos (Corbo, *et al.*, 2010; Shafiur-Rahman, 2007). De esta forma, un coctel de bacteriófagos de la familia *Myoviridae* aislados del medio ambiente, específicos para *Escherichia coli* O157:H7 entero hemorrágica fueron inoculados en Lechuga y Espinaca almacenadas a temperatura ambiente o en atmósfera modificada (5% O_2 /35% CO_2 /60% N_2). Los bacteriófagos fueron capaces de reducir considerablemente las concentraciones de *E. coli* O157:H7 a temperatura ambiente y la reducción aumentó cuando el almacenamiento se realizó en atmósfera modificada (Boyacioglu, *et al.* 2013).

Muy bajos niveles de O_2 podrían potenciar el metabolismo anaeróbico en frutas frescas y resultar en un incremento en la fermentación. Por otra parte, altas concentraciones de O_2 inhiben varias enzimas del ciclo de Krebs (Corbo, *et al.*, 2010). Las atmósferas modificadas pueden ser creadas pasivamente debido a la actividad respiratoria del producto o activamente introduciendo la mezcla deseada de gas. Otras formas activas son el uso de generadores de gas y depuradores, evacuación del aire o adición de sistemas químicos que pueden absorber o generar gases o compuestos volátiles (Shafiur-Rahman, 2007). Es conocido que las atmosferas modificadas beneficiosas en frutas frescas empacadas se consiguen escogiendo un material de empaque adecuado, que pueda proveer los niveles apropiados de O_2 y CO_2 dentro del empaque. De hecho, existe una gran variedad de polímeros y mezclas de gases disponibles para el empaque de productos frescos (Corbo, *et al.*, 2010).

La calidad general de uvas de mesa cv. Razaki se mantuvo durante el almacenamiento a 0°C en humedad relativa de 90%, tanto en el empaque en atmósfera modificada, como al ser sumergidas en miel y su combinación. Aunque hubo un aumento en el índice de madurez, la solución de miel para inmersión fue

significativamente mejor manteniendo la calidad general de la uva mínimamente procesada disminuyendo la pérdida de calidad y el desarrollo de la descomposición. Por lo tanto, la solución de inmersión de miel puede ser utilizada como barrera orgánica a la humedad y resistente a la difusión de vapor de agua durante el almacenamiento en frío (Sabir, *et al.*, 2010).

Empacado activo.

El primer empaque activo comercializado fue un dispositivo colocado en el espacio de cabeza en forma de bolsitas en el interior del empaque conteniendo el material antimicrobiano, estos incluían compuestos volátiles como dióxido de azufre, etanol, ácidos orgánicos y aceites esenciales. Otro tipo de artefactos de empaque activo son aquellos en los cuales el compuesto antimicrobiano está embebido en el polímero a granel y tiene que migrar a la superficie para interactuar con el microorganismo. Se han empleado diferentes polímeros naturales y sintéticos como acarreadores, péptidos, enzimas, poliamidas y ácidos orgánicos. El principal inconveniente es que se necesita el contacto directo entre el alimento y el polímero (Corbo, *et al.*, 2010).

En el empackado activo, se agregan materiales que pueden absorber o liberar un compuesto específico en la fase gaseosa tales como CO₂, O₂, vapor de agua, etileno etc. La cantidad de compuestos activos necesaria dependerá de la tasa de producción de gases, las concentraciones a alcanzar, el tiempo durante el cual el empaque debe ser funcional. Sin embargo, el control del O₂ no es posible (Shafiur-Rahman, 2007).

Bioprotección.

En la actualidad, existe una gran necesidad de encontrar soluciones naturales para la protección de alimentos que puedan asegurar la inocuidad de los alimentos y el tiempo de vida útil. Una de las soluciones posibles es la bioprotección basada en el concepto del uso de microorganismos grado alimenticio, ya que pueden formar una multitud de sustancias diferentes, inhibitorias para otros microorganismos. Estos mecanismos son parte del balance natural en ecosistemas microbianos complejos, cualidad que se puede aprovechar para diseñar sistemas de preservación que aseguren la inocuidad

y el tiempo de vida útil al tiempo que se mantienen las características deseadas del producto (Corbo, *et al.*, 2015; Elsser-Gravesen y Elsser-Gravesen, 2013).

La real academia de ciencias de los Estados Unidos de América define control biológico como “el uso de organismos naturales o modificados, genes o sus productos para reducir los efectos de organismos indeseables y favorecer los organismos deseables tales como cosechas, árboles, animales, insectos y microorganismos beneficiosos” (Trias, 2008). Biopreservación se refiere al aumento del tiempo de vida útil y al mejoramiento de la inocuidad de los alimentos utilizando microorganismos y/o sus metabolitos (Cizeikiene, *et al.*, 2013; Settanni y Corsetti, 2008).

La colonización de microorganismos depende de una compleja interacción entre el antagonista, el patógeno, la resistencia del huésped, la respuesta en caso de haberla y la acción de otros microorganismos que pudieran causar una variación de los niveles de biocontrol (Trias, 2008). Frecuentemente, los patógenos son eliminados causando grandes alteraciones que incluso pueden interrumpir las funciones beneficiosas de la comunidad microbiana nativa. Sin embargo, se pueden eliminar patógenos selectivamente introduciendo alteraciones menores en el nicho como, por ejemplo, el uso de bacterias que modifiquen el pH, la dinámica de la humedad, la salinidad o que introduzcan antibióticos (Adam, *et al.*, 2016).

Según Trias (2008), para que un agente sea considerado como antagonista es deseable que cumpla con las siguientes características:

- Estabilidad genética.
- Eficacia a bajas concentraciones y contra una amplia gama de patógenos en una variedad de frutas y vegetales.
- Requerimientos nutricionales simples.
- Sobrevivencia en condiciones ambientales adversas.
- Crecimiento en fermentadores de sustrato económicos.

- Que no sea patógeno para la planta y que no produzca metabolitos potencialmente tóxicos para los humanos.
- Resistencia a los pesticidas más frecuentemente utilizados.
- Compatibilidad con otros tratamientos físicos y químicos.

El desarrollo de agentes de control biológico (ACB) requiere de muchos estudios diferentes, pero generalmente se realiza en las siguientes etapas:

1. Aislar y seleccionar los posibles antagonistas con pruebas *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.
2. Determinar sus características fenotípicas, genotípicas, mecanismo de acción, bioensayos de eficacia y espectro de actividad.
3. Desarrollar un método de producción en masa y encontrar una formulación adecuada la cual permita incrementar el biocontrol y asegurar la estabilidad.
4. Determinar los mecanismos de biocontrol para mejorar su actividad, desarrollar un sistema de monitoreo para detectar y cuantificar los agentes de control biológico en el ambiente y hacer más extensivo el análisis toxicológico o los estudios de impacto ambiental con el objeto de registrar el producto (Trias, 2008).

Los microorganismos con capacidad bioprotectora pueden ser aislados del mismo ambiente natural donde serán reintroducidos o aplicados posteriormente para asegurar la adaptación ecológica del ACB y el éxito en el control de patógenos (Trias, 2008; Reina, *et al.*, 2005). De igual forma, la superficie y las lesiones de frutas son lugares con una alta probabilidad de encontrar ACB efectivos (Trias, 2008).

La adaptación ecológica y las características de crecimiento de los cultivos en productos alimenticios pueden determinar su efectividad como cultivos de biocontrol (Reina, *et al.*, 2005). Siroli *et al.* (2015), resaltan la importancia de aislar y seleccionar agentes de biocontrol del mismo ambiente donde se van a reintroducir, ya que en su

investigación determinaron que el mayor desempeño de las cepas de BAL empleadas para evaluar la capacidad antagonista, no fue solo contra los patógenos inoculados deliberadamente, sino también contra los microorganismos deterioradores naturalmente presentes en las muestras. Esta habilidad debe atribuirse a la capacidad de las cepas de colonizar el producto y sobrevivir bajo condiciones de almacenamiento en refrigeración. Una vez seleccionados los antagonistas en el ensayo *in vitro*, es necesario realizar bioensayos de inhibición en frutas y hortalizas para verificar que tienen capacidad bioprotectora (Trias, 2008). Una vez seleccionado el microorganismo por su capacidad antagonista sobre un patógeno específico, es necesario identificarlo y caracterizarlo por análisis fenotípico y genotípico (Trias, 2008).

Una gran limitación en el uso de biocontrol es el conocimiento del mecanismo desarrollado por el antagonista ya que es crítico para el desarrollo y mejoramiento de su eficacia. La mayoría de los agentes de biocontrol no emplean un solo mecanismo sino una combinación de varios mecanismos con los cuales logran la inhibición del patógeno. Los mecanismos más importantes son la producción de sustancias antimicrobianas, competición por nutrientes y espacio, inducción de resistencia del huésped e interacción directa entre el antagonista y el patógeno (Corbo, *et al.*, 2015; Trias, 2008).

La brecha entre el laboratorio y la eficacia en el campo puede acortarse entendiendo el modo de acción, además, se debe tomar en cuenta que el éxito de un producto no depende de un sólo atributo, si no de la combinación de varios como por ejemplo su efectividad técnica, practicidad, liberación, persistencia y viabilidad comercial. La practicidad se refiere a la facilidad para adoptar el uso del producto para el personal, incluyendo el equipo y las instalaciones. La liberación representa el mayor desafío para la industria debido a que requiere producción en masa, formulación y aplicación. Una adecuada liberación del microorganismo en la superficie deseada, así como una aplicación y persistencia efectivas para que cumpla su función dependen de una buena formulación del producto. La formulación de productos para biocontrol es un tema crucial, pero hay poca investigación al respecto (Parnell, *et al.*, 2016).

Reina *et al.* (2005), sugieren que un agente de control biológico ideal para encurtidos no acidificados pudiera describirse como sigue:

- Perteneciente al grupo de BAL.
- Homofermentador para evitar la producción de gas.
- Capaz de sobrevivir en condiciones severas iniciales, más de 4% de sal y bajas temperaturas de almacenamiento.
- Capaz de crecer lentamente pero más rápido que los patógenos en almacenamiento refrigerado sin disminuir el tiempo de vida útil del producto.
- Capaz de crecer más rápido que los patógenos y de producir sustancias inhibitorias contra el patógeno en condiciones de abuso de temperatura.
- Capaz de utilizar los recursos bioquímicos disponibles y por lo tanto puede ser preferiblemente aislado del producto en el cual se pretende utilizar.
- El pH final debe ser de 4.

El biocontrol en la post cosecha es muy factible debido a que los productos cosechados pueden ser tratados fácilmente con agentes antagonistas y las instalaciones se pueden adecuar a emplear este tratamiento (Trias, 2008).

Bacterias ácido lácticas.

Entre los métodos propuestos para inhibir la colonización de bacterias patógenas se encuentra el uso de Bacterias Ácido Lácticas (BAL), las cuales tienen capacidad antagonista contra bacterias patógenas y son generalmente reconocidas como seguras (GRAS) por la *Food and Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos y como presunción calificada de seguridad (QPS) por la Unión Europea (Muhialdin, *et al.*, 2016; Olvera-García, *et al.*, 2015; Settanni y Corsetti, 2008; Trias, *et al.*, 2008a). Esto las convierte en ideales para desarrollar agentes bioprotectores en frutas y hortalizas frescas (Li, *et al.*, 2015; Jeddi, *et al.*, 2014; Trias, *et al.*, 2008a). Para ello, se pueden aplicar directamente las BAL, su fermentado bacteriano o incluso sus

metabolitos purificados como aditivos alimentarios (Olvera-García, *et al.*, 2015; Snyder y Worobo, 2013).

Las BAL son un grupo formado por cocos o bacilos de longitud variable, Gram positivos, catalasa y oxidasa negativos, no esporulados, no presentan motilidad, anaerobios o microaerófilos y productores de ácido láctico como mayor o único producto final durante la fermentación de carbohidratos ya sean homo o heterofermentativos, pueden ser mesófilos o termófilos. Pertenecen al phylum Firmicutes, entre los géneros más importantes que constituyen este grupo se encuentran: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. Todos tienen un bajo contenido de Guanina-Citosina, 31-49% (Olvera-García, *et al.*, 2015; Liu, *et al.*, 2014; Parra, 2010 además, del phylum *Actinobacteria* incluye sólo especies del género *Bifidobacterium*. El género más grande es el de *Lactobacillus* el cual incluye más de 100 especies ubicuas (Zheng, *et al.*, 2020). Se encuentran en diversos hábitats, donde quiera que haya sustratos de carbohidratos disponibles, incluyendo productos lácteos, granos y sus productos, intestinos, productos cárnicos y pesqueros, cerveza, vino, frutas y jugos de frutas, vegetales encurtidos, hierbas, piensos, forraje y masas fermentadas (Liu, *et al.*, 2014), por lo que también son clasificadas en dos grupos de acuerdo con su fuente de aislamiento: fuente animal y fuente vegetal (Liu, *et al.*, 2012; Wada, *et al.*, 2009).

Algunas BAL, se pueden definir como probióticos, cuando producen efectos benéficos en los humanos al ser consumidos como suplementos en los alimentos (Swain, *et al.*, 2014; Idoui, 2014). Además, las BAL obtienen su energía por fosforilación a nivel del sustrato debido a que no poseen un sistema respiratorio funcional, emplean dos rutas fermentativas de hexosas: la ruta homofermentativa, basada en la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas y produce virtualmente sólo ácido láctico como producto final. La ruta heterofermentativa o heteroláctica, también conocida como ruta de las pentosas fosfocetolasa o ruta 6-fosfogluconato, produce ácido láctico como producto final además de cantidades significativas de dióxido de carbono, etanol o acetato (Liu, *et al.*, 2014). En general, se utilizan para elaborar alimentos fermentados ya sean de

origen vegetal como el Kimchi, aceitunas y pepinillos, ensilajes, de origen lácteo como bebidas fermentadas, yogurt, quesos y productos de origen cárnico tales como salchichas, chorizos y otros (Olvera-García, *et al.*, 2015; Parra, 2010).

La actividad inhibitoria de las BAL ha sido ampliamente reportada (tabla 4) y se debe a la competencia por los mismos nutrientes y por los sitios de adhesión. También se debe a la acumulación de metabolitos primarios tales como ácido láctico, etanol, dióxido de carbono y bacteriocinas entre otros (Li, *et al.*, 2015; Abedi, *et al.*, 2013; Menconi, *et al.*, 2014). Nguyen *et al.* (2015), indican que al agregar BAL a los alimentos se puede mejorar actividades biológicas como la conservación. En la agricultura, el interés por el uso de BAL como alternativa para el control de patógenos entéricos ha ido en aumento (Nguyen, *et al.*, 2015; Menconi, *et al.*, 2014), por lo cual, se han venido estudiando varios métodos biológicos para evitar el crecimiento de microorganismos patógenos, particularmente, el uso de BAL en alimentos frescos, con resultados alentadores (Li, *et al.*, 2015; Russo, *et al.*, 2014). Además, existe una creciente evidencia de la posibilidad de obtener BAL a partir de fuentes no lácteas. Alimentos crudos tales como cereales, frutas y hortalizas están siendo investigados recientemente con este fin (Swain, *et al.*, 2014).

Se han aislado cepas de *E. faecalis*, *L. plantarum*, *P. pentosaceus*, *L. mesenteroides*, *L. lactis* y *Enterococcus sp.* a partir de encurtidos tradicionales provenientes de zonas urbanas y rurales del Himachal Pradesh en la India. Todas estas cepas fueron capaces de inhibir el crecimiento de *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus* y *S. dysenteriae* (Monika, *et al.*, 2017). Se aislaron cepas de *Lactobacillus plantarum* de una leche fermentada tradicional de Kenia y productos de maíz. Las cepas mostraron actividad antifúngica, sin embargo, ninguna cepa fue capaz de inhibir completamente el crecimiento de los hongos bajo condiciones favorables para el hongo y subóptimas para las BAL (Ahlberg, *et al.*, 2016).

La adición de *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus fermentum* en cultivo, logró una reducción significativa de la producción de aflatoxinas y de la velocidad de crecimiento de *A. parasiticus* y los metabolitos redujeron los niveles de aflatoxinas entre un 88.8 y un 99.8% (Ghazvini, *et al.*, 2016).

Tabla 4. Investigaciones sobre la actividad inhibitoria de bacterias ácido lácticas aisladas de fuentes vegetales.

Autores	Fuente	BAL	Patógenos
Monika <i>et al.</i> , 2017	Encurtidos tradicionales de Himachal Pradesh	<i>E. faecalis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. lactis</i> y <i>Enterococcus</i> sp.	<i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> y <i>S. dysenteriae</i>
Ahlberg <i>et al.</i> , 2016	Leche fermentada Prod. maíz	<i>L. plantarum</i>	<i>A. flavus</i>
Ghazvini <i>et al.</i> , 2016	—	<i>B. bifidum</i> , <i>L. fermentum</i> ,	<i>A. parasiticus</i> , Aflatoxinas
Siroli <i>et al.</i> , 2015	Manzana Lechuga	<i>L. plantarum</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>W. soli</i> , <i>L. pentosus</i>	<i>S. enteritidis</i> , <i>L. monocytogenes</i> y <i>E. coli</i> .
Li <i>et al.</i> , 2015	Rastrojo de maíz	<i>L. plantarum</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>E. mundtii</i> , <i>W. cibaria</i> y <i>Ln. pseudomesenteroides</i>	<i>S. entérica</i> , <i>M. luteus</i> y <i>E. coli</i> .
Wong <i>et al.</i> , 2015	Vegetales frescos y productos fermentados	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Weissella cibaria</i>	<i>S. aureus</i>
Cizeikiene <i>et al.</i> , 2013	Colección Kaunas University of Technology	<i>L. sakei</i> , <i>P. acidilactici</i> y <i>P. pentosaceus</i>	<i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Listeria</i> , <i>Escherichia</i> <i>F. culmorum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>P. expansum</i> , <i>A. niger</i> , <i>D. hansenii</i> y <i>C. parapsilosis</i>
El-Mabrok ^b <i>et al.</i> , 2012	Guayaba durian jengibre papaya carambola	<i>L. paracasei</i> <i>L. plantarum</i>	<i>C. capsici</i>

CONTINUACIÓN Tabla 4

Wada <i>et al.</i> , 2009	Frutas, flores, vegetales	<i>L. brevis</i>	<i>L. monocytogenes</i> y <i>Streptococcus mutans</i>
Trias ^b <i>et al.</i> , 2008	Frutas y vegetales	<i>L. mesenteroides</i> , <i>Ln.</i> <i>citreum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. lactis</i> , <i>W. cibaria</i> , y <i>E. mudtii</i>	<i>X. campestris</i> , <i>E.</i> <i>carotovora</i> , <i>P. expansum</i> , <i>M. laxa</i> y <i>B. cinérea</i>

Cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus pentosus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella soli*, *Lactococcus lactis* aisladas de manzana y cepas de *Lactobacillus casei*, *paracasei*, *rhannosus* y *plantarum* aisladas de lechuga no mostraron habilidad de producir bacteriocinas, sin embargo, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *W. soli*, y *L. pentosus* inhibieron el crecimiento de *S. enteritidis*, *L. monocytogenes* y *E. coli*. También redujeron de forma significativa los niveles de aerobios mesófilos de forma similar a la inducida por la aplicación de cloro. Las BAL no afectaron la calidad de los productos (Siroli, *et al.*, 2015).

Cepas de *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus mundtii*, *Weissella cibaria* y *L. pseudomesenteroides* aisladas de ensilaje de rastrojo de maíz. produjeron ácido a partir de galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-mannosa, esculina, celobiosa y sacarosa. De las 59 cepas aisladas, 56 mostraron actividad antimicrobiana contra *Salmonella entérica*, *Micrococcus luteus* y *E. coli* (Li, *et al.*, 2015). Por otra parte, cepas de *L. plantarum* aisladas de vegetales fermentados, frutas y vegetales frescos ejercieron una fuerte inhibición del crecimiento de *S. aureus* y produjeron compuestos antimicrobianos de origen proteico (Wong, *et al.*, 2015).

Los metabolitos de cepas de *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus* han logrado inhibir el crecimiento de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Listeria* y *Escherichia* en varios grados. Además, mostraron actividad fungicida y fungistática contra *Fusarium culmorum*, *Penicillium chrysogenum*,

Aspergillus fumigatus, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *Debaryomyces hansenii* y *Candida parapsilosis* (Cizeikiene, et al., 2013).

Cepas de *L. paracasei* y *L. pantarum* aisladas de frutas y vegetales se aplicaron exitosamente como agentes de biocontrol contra *Colletotrichum capsici* causante de una enfermedad en chiles (*Capsicum annum*) denominada antracnosis. Adicionalmente, infectaron semillas del chile con *C. capsici* y las trataron con estas cepas y sus sobrenadantes. Determinaron que las semillas tratadas con las cepas de BAL mostraron mejor tasa de crecimiento que las tratadas con los sobrenadantes (El-Mabrok, et al., 2012b). También una cepa de *L. Brevis*, produjo una bacteriocina (brevicin) capaz de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* y *Streptococcus mutans*. (Wada, et al., 2009).

Varias cepas de BAL de vegetales frescos y frutas fueron inoculadas en lesiones de manzanas y hojas de lechuga Iceberg cortadas y se evaluó su capacidad para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium*. Las cepas crecieron en los sustratos sin causar efectos negativos en los tejidos de manzana y lechuga y lograron reducir los recuentos de *S. typhimurium* y *E. coli* mientras que el crecimiento de *L. monocytogenes* fue inhibido por completo. Estos resultados apoyan el uso potencial de las BAL como agentes protectores contra patógenos en productos de frutas y vegetales listos para comer, sin embargo, los autores afirman que aún es necesario el estudiar el efecto de las BAL sobre el tiempo de vida útil de frutas y hortalizas (Trias, et al., 2008a).

La eficacia de cepas de BAL aisladas de frutas y vegetales como agentes de biocontrol contra bacterias fitopatogénicas, bacterias deterioradoras y hongos (*Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora*, *Penicillium expansum*, *Monilinia laxa* y *Botrytis cinérea*) fue evaluada exitosamente. Todos los microorganismos evaluados fueron inhibidos por al menos una cepa de BAL con excepción de *P. expansum* (Trias, et al., 2008b).

Péptidos antimicrobianos.

Las BAL pueden producir otros compuestos antimicrobianos además de los muy conocidos ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y diacetilo, entre otros (Olvera-

García, *et al.*, 2015). Sin embargo, los péptidos se diferencian de los demás compuestos antimicrobianos en que son de naturaleza proteica (Muhialdin, *et al.*, 2016; Olvera-García, *et al.*, 2015; Pessione, 2012; Coda, *et al.*, 2011).

A los péptidos antimicrobianos se les atribuye una alta actividad contra un amplio rango de microorganismos, además tienen la ventaja de que su mecanismo de acción tiene baja susceptibilidad a aquellos patógenos de importancia, incluyendo cepas multirresistentes a antimicrobianos (Sharma, *et al.*, 2011). Todo esto se debe a que son una fuente muy interesante de nuevos agentes antimicrobianos para el uso en la industria de alimentos. Aunque se han aplicado muchos con éxito solo representan una pequeña fracción de la diversidad de péptidos antimicrobianos, aún quedan muchas bacterias productoras y péptidos por descubrir. La continua investigación dirigida al descubrimiento de nuevos péptidos antimicrobianos llevará a su comercialización para el uso en alimentos y agricultura (Hu, *et al.*, 2013; Snyder y Worobo, 2013).

La habilidad hidrolítica está relacionada con la secuencia de aminoácidos del sustrato proteico y el panel de enzimas proteolíticas de cada cepa microbiana (Pessione y Cirrincione, 2016). La interacción inicial entre péptidos antimicrobianos y la célula es mediante atracciones de cargas entre el péptido catiónico y la envoltura negativamente cargada de la célula, una disminución de la carga neta de cualquiera de ellos resulta en la disminución de la actividad (Snyder y Worobo, 2013).

Se han propuesto varios modelos del mecanismo de acción de estos compuestos antibacteriales. La actividad antibacterial puede resultar de la formación de poros en la membrana llevando a la disipación del potencial transmembrana y gradientes de solutos vitales (Sánchez-Ortega, *et al.*, 2014) ya que, siendo moléculas anfipáticas, con una mitad hidrofóbica y un dominio positivo cargado fuertemente. Estos péptidos pueden, primeramente, enlazarse a los ácidos teicóicos en las bacterias Gram positivas o a los Lipopolisacáridos (LPS) en bacterias Gram negativas, y de esta forma, interactúan con las membranas bacterianas cargadas negativamente. Muchos de ellos actúan como moléculas perturbadoras del gradiente de protones causando la despolarización de la membrana (como la polimixin B o la colistina). Sin embargo,

algunos autores sugieren también que la remoción/quelación del hierro ligado a la membrana puede afectar la viabilidad bacteriana. También se han reportado mecanismos complejos incluyendo la inhibición de la síntesis de macromoléculas, así como una acción sinérgica con los compuestos de inmunidad innatos del huésped (Pessione y Cirrincione, 2016; Sharma, *et al.*, 2011). No obstante, los compuestos antimicrobianos en la naturaleza, rara vez funcionan aislados, los sistemas combinados tales como aquellos encontrados en el huevo de gallina son más comunes. Estrategias basadas en sistemas multifactoriales tienen mayor probabilidad de éxito en la protección de alimentos contra microorganismos deterioradores (Elsser-Gravesen y Elsser-Gravesen, 2013).

Olvera-García *et al.* (2015), indican que estos péptidos antimicrobianos se pueden dividir en bacteriocinas, BLIS (Bacteriocin like inhibitor substances) y peptidoglucano hidrolasas. Las bacteriocinas son péptidos antibacterianos de bajo peso molecular (de 30 a 60 aminoácidos) aunque existen bacteriocinas de cadenas más largas, se identifican como proteínas. Son sintetizadas en el ribosoma y liberadas extracelularmente, permanecen estables en amplios rangos de pH y son termoresistentes (Olvera-García, *et al.*, 2015; Sánchez-Ortega, *et al.*, 2014; Snyder y Worobo, 2013; Settanni y Corsetti, 2008). Además, poseen carácter catiónico debido a la presencia de residuos de aminoácidos como lisina, arginina e histidina y poseen naturaleza hidrofóbica debido a la presencia de residuos de alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina y triptófano (Heredia-Castro, *et al.*, 2017). Tienen efecto bactericida o bacteriostático con amplio espectro de acción cuando son efectivas contra diferentes géneros o pueden tener espectro reducido cuando solo son efectivas contra su misma especie (Olvera-García, *et al.*, 2015; Snyder y Worobo, 2013; Settanni y Corsetti, 2008).

Aunque las bacteriocinas tienen propiedades antibióticas no se denominan como tal para diferenciarlas de los antibióticos empleados en humanos con fines terapéuticos. Sin embargo, se pueden diferenciar principalmente en que las bacteriocinas son sintetizadas en el ribosoma y su principal objetivo es la permeabilización de la membrana celular; mientras que los antibióticos son sintetizados enzimáticamente y

tienen diferentes funciones de acuerdo con la estructura que posean. Comúnmente afectan la síntesis de la pared celular, degradan ácidos nucleicos o tienen otras funciones enzimáticas (Snyder y Worobo, 2013).

Debido a su amplia diversidad, ha sido difícil desarrollar una clasificación de las bacteriocinas, aunque se han propuesto versiones modificadas (Tabla 5) del sistema de clasificación propuesto inicialmente por Klaenhammer (1993).

Tabla 5. Clasificación de bacteriocinas propuesto por Klaenhammer en 1993.

CLASE	CARACTERÍSTICA
Clase I	Lantibióticos (<5 KDa)
IA	Lineal, flexible
IB	Globular, rígida
IC	Multi-componente
Clase II	Sin lantibióticos (<10 kDa)
Ila	Tipo pediocina
Ilb	2 péptidos
Ilc	Circulares
Ild	Lineales
Ile	Degradación de Proteínas
Clase III	Termolábiles (<30 kDa)
IIIa	Bacteriolítica
IIIb	No bacteriolítica
Clase IV	Complejas

Fuente: Heredia-Castro *et al.*, 2017; Snyder y Worobo, 2013.

El sistema original clasificaba a las bacteriocinas en 4 clases con base en su estructura (Snyder y Worobo, 2013). Las bacteriocinas de Clase I, lantibióticos, y clase II, bacteriocinas no modificadas constituyen los más abundantes, mejor caracterizados y presumiblemente los más útiles (Elsser-Gravesen y Elsser-Gravesen, 2013). Entre las bacteriocinas de clase I se incluyen los lantibióticos lactococales, lactinas, que han mostrado eficacia para propósitos de tiempo de vida útil e inocuidad. La clase II incluye aquellos péptidos termoestables, no modificados, pequeños (<10 KDa) que no contienen lantibióticos e inducen la permeabilización de la membrana. Las subclases iniciales incluían a la IIa, péptidos pequeños, no modificados, estables al calor, muy efectivas contra *Listeria*, pero tienen un espectro de acción relativamente estrecho. La subclase IIb está compuesta por dos péptidos y la IIc incluye péptidos activados por Tiol (Olvera-García, et al., 2015; Elsser-Gravesen y Elsser-Gravesen, 2013; Snyder y Worobo, 2013; Vignolo, 2012).

La subclase IId, está compuesta por péptidos lineales y la subclase IIe incluye aquellas bacteriocinas producto de la hidrólisis específica de proteínas (Heredia-Castro, *et al.*, 2017). Las BAL tienen un complejo y sofisticado sistema proteolítico que les permite obtener aminoácidos a partir de proteínas presentes en el medio. Una proteinasa de envoltura celular hidroliza las proteínas del exterior en varios oligopéptidos, estos son absorbidos por medio de un sistema de transporte específico y ya en el citoplasma sufren otra degradación en aminoácidos y péptidos más cortos que pueden ser compuestos bioactivos.

Los compuestos más bioactivos son liberados al medio solo cuando las células sufren autólisis. Las enzimas proteolíticas liberadas por las BAL son muy diferentes entre las distintas especies y cepas, aunado a las diferentes secuencias de aminoácidos resulta en una amplia gama de péptidos bioactivos. Las fuentes vegetales también pueden ser fuente de péptidos bioactivos (Pessione y Cirrincione, 2016; Griffiths y Tellez, 2013). Estos fragmentos específicos de proteínas que se pueden agrupar como un conjunto de sustancias polifacéticas con complejos mecanismos de acción tipo hormonas, relacionados con la interacción del patógeno a través de su membrana o afectando objetivos internos en la célula diana tales como la síntesis de ADN, ARN o

proteínas, induciendo respuestas fisiológicas. Son resistentes al calor, acidez y baja aw, por lo que pueden ser empleados como conservadores en alimentos en sustitución de los aditivos químicos (Hernández-Saldaña, *et al.*, 2016; Sharma, *et al.*, 2011).

La única bacteriocina aprobada por la FDA como GRAS es la nisina, producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Snyder y Worobo, 2013). La clase III, incluye a las bacteriocinas termolábiles de alto peso molecular. Las bacteriolisinas o proteínas bacteriolíticas forman la subclase IIIa, y las no bacteriolíticas la subclase IIIb (Olvera-García, *et al.*, 2015; Snyder y Worobo, 2013). La clase IV, comprendía bacteriocinas complejas que contienen carbohidratos o lípidos, no obstante, esta clase fue eliminada debido a la falta de sustanciación de que estas bacteriocinas existen.

Las sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica y bajo peso molecular, sin mecanismo de acción completamente definido y que no cumplen con los criterios de definición de bacteriocinas se clasifican como BLIS. Tienen un espectro de actividad más amplio debido a que pueden inhibir el crecimiento tanto de bacterias Gram positivas como de bacterias Gram negativas, hongos y levaduras (Olvera-García, *et al.*, 2015; Snyder y Worobo, 2013), sin embargo, su secuencia de aminoácidos no ha sido caracterizada (Cizeikiene, *et al.*, 2013).

Las peptidoglucano-hidrolasas (PGHs) son enzimas que hidrolizan el peptidoglucano, componente más importante de la pared celular. Las PGHs participan en muchas funciones de transformación de la pared celular durante el crecimiento y la división celular, tales como regulación del crecimiento de la pared celular, intercambio de unidades de peptidoglucano durante el crecimiento, separación de células hijas durante la división, la autólisis etc. Según el tipo de enlace que atacan en el peptidoglucano se clasifican en *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, las cuales rompen el enlace amida entre MurNAc y la L-alanina del péptido. Las carboxipeptidasas, que hidrolizan el último aminoácido del extremo carboxilo de los péptidos, las endopeptidasas, que rompen los puentes formados por los péptidos, las *N*-acetilglucosaminidasas que hidrolizan los enlaces β -1.4 de la cadena de glucanos dejando un extremo GlcNAc reductor y las *N*-acetilmuramidases que hidrolizan los

enlaces β -1.4 de la cadena de glucanos entre MurNAc y GlcNAc, estas pueden ser transglucosilasas líticas si forman un anillo 1,6-anhidro en MurNAc o lisozimas si dejan libre un extremo MurNAc reductor. La lisostafina es una PGH que ha sido utilizada como agente antibacteriano contra *Staphylococcus aureus*, ya que hidroliza los enlaces Gly-Gly de su pared celular. La lisozima de huevo, se emplea como conservante en quesos y vinos (Olvera-García, *et al.*, 2015).

El control de las condiciones experimentales y la actividad proteasa se utilizan frecuentemente para asegurar que la inhibición del crecimiento bacteriano es resultado de la secreción de péptidos antimicrobianos y no de ácidos orgánicos, antibióticos de bajo peso molecular o producción de etanol (Snyder y Worobo, 2013). Para la detección de péptidos antimicrobianos producidos por BAL se debe eliminar el efecto de los otros metabolitos de acción antibacteriana, para ello se debe ajustar el pH de la muestra a valores entre 6 y 7. De este modo, se neutraliza la acción de los ácidos orgánicos, el diacetilo y la reuteriicina. El peróxido de hidrógeno puede ser neutralizado a estos valores de pH o adicionando catalasa (Olvera-García, *et al.*, 2015). Sin embargo, Pessione y Cirrincione (2016), indican que los medios ricos en péptidos como el MRS, que suministran una fuente de nitrógeno “lista para el consumo” no son favorables para la producción de muchas enzimas proteolíticas por ejemplo las codificadas para PepN y PepX. Por otra parte, las PGHs, pueden hidrolizar caseínas solo después del crecimiento en leche descremada pero no después del pre-cultivo en MRS. A pesar de las limitaciones, la evaluación de la actividad inhibitoria tiene su utilidad, sobre todo desde la perspectiva de aplicación, de hecho, las observaciones fortuitas de actividades inhibitorias sin caracterización previa han llevado al descubrimiento de nuevos antimicrobianos como la penicilina (Snyder y Worobo, 2013).

A pesar del número de investigaciones, no todos los mecanismos microbianos inhibitorios están completamente entendidos y no todos los metabolitos antimicrobianos de microorganismos grado alimenticio han sido descubiertos (Elsser-Gravesen y Elsser-Gravesen, 2013). La tabla 6 muestra algunas investigaciones sobre producción de péptidos antimicrobianos por BAL.

Tabla 6. Evaluaciones sobre producción de péptidos antimicrobianos de bacterias ácido lácticas.

Autor	LAB	Fuente	Péptido	Patógeno
Borrero et al., 2017	<i>L. plantarum</i>	Aceituna	Plantaricyclin A	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>
Chen et al., 2017	<i>L. pseudomesenteroides</i>	Caqui	Leucocin C607	<i>L. monocytogenes</i>
Muhialdin et al., 2015.	<i>L. plantarum</i>	Tempeh	20	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> , <i>Eurotium rubrum</i>
Kwak et al., 2014	<i>L. plantarum</i>	Kimchi	<i>cis</i> -ciclo(L-Val-L-Pro) <i>cis</i> -ciclo(L-Phe-L-Pro)	<i>Ganoderma boninense</i> y <i>C. albicans</i>
Cizeikienė et al., 2013	<i>L. sakei</i> <i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus</i>	Rye sourdough	<i>Sakacin</i> , <i>Pediocin</i>	<i>F. culmorum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>P. expansum</i> , <i>A. niger</i> , <i>D. hansenii</i> and <i>C. parapsilosis</i>
Hu et al., 2013	<i>L. plantarum</i> 163	Repollo fermentado, rábano encurtido	Plantaricina 163	<i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>M. luteus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. thermophilus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Coda et al., 2011.	<i>L. plantarum</i>	Masa fermentada	9 nuevos	<i>P. roqueforti</i>

CONTINUACIÓN Tabla 6

Wada <i>et al.</i> , 2009	<i>L. brevis</i>	Frutas Flores Hortalizas	Brevicin	<i>E. coli</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>coagulas</i> , <i>cereus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>epidermidis</i>
---------------------------------	------------------	--	----------	---

Se estudiaron cepas de *L. plantarum* aisladas de aceitunas produjeron una nueva bacteriocina circular denominada plantariciclina A. La bacteriocina tuvo una masa molecular de 5.570 Da. Además, su actividad se mantuvo en un rango de pH de 2 a 10 y luego de ser calentada a temperaturas entre 30 y 100°C durante 10 minutos. Esta bacteriocina fue efectiva contra una bacteria deterioradora (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) y contra BAL (Borrero, *et al.*, 2017). Por otro lado, cepas de *L. pseudomesenteroides* C607 obtenidas a partir de Caqui fueron efectivas contra *L. monocytogenes* debido a la producción de péptidos. El péptido encontrado tenía una masa molecular de 4.6 kDa. Se determinó que el péptido tenía una secuencia terminal YGNGV/L característico del grupo de bacteriocinas IIa. Un análisis de secuencia de nucleótidos determinó que la bacteriocina difiere en un residuo de aminoácidos con la leucocina C, ya que el 26vo residuo aminoácido de la leucocina C es la alanina, mientras que, para la nueva bacteriocina, dicho residuo es valina. Por lo tanto, la consideraron una variación y la denominaron leucocina C607 (Chen, *et al.*, 2017).

En otro reporte, se identificaron ocho fracciones peptídicas producidas por cepas de *L. plantarum*. Las fracciones con los pesos moleculares más bajos mostraron mayor efectividad contra *Aspergillus flavus*, *Penicillium roqueforti* y *Eurotium rubrum*. De la fracción con mayor actividad antifúngica identificaron 20 péptidos. Posteriormente, seleccionaron un péptido de acuerdo con sus características (catiónico con alta tasa de hidrofobicidad y secuencias cortas) para la prueba de potencial antifúngico. El péptido mostró la mayor actividad antifúngica contra los hongos anteriormente nombrados (40-60%) a una concentración de 5 mg/mL, lo que demuestra que *L.*

plantarum puede emplearse como bioprotector contra hongos deterioradores (Muhialdin, *et al.*, 2016).

Una cepa de *L. plantarum* aislada de Kimchi produjo dos bacteriocinas cíclicas, cis-ciclo(L-Val-L-Pro) cis-ciclo(L-Phe-L-Pro), Las dos bacteriocinas fueron efectivas contra *Ganoderma boninense* y *C. albicans* (Kwak, *et al.*, 2014). Cizeikiene *et al.* (2013), reportan la producción de BLIS por *L. sakei* (sakacin), *P. acidilactici* y *P. pentosaceus* (Pediocin) detectando la sensibilidad a tripsina, pepsina, quimiotripsina y proteinasa K en los sobrenadantes del cultivo. Por otra parte, una cepa de *L. plantarum* obtenida de vegetales fermentados tradicionales de China produjo una bacteriocina a la cual denominaron plantaricina 163. El peso molecular del péptido fue de 3553.2 Da. Se mantuvo estable después de calentarse a 121°C por 20 minutos, así como también a un rango de pH entre 3 y 5. La secuencia descubierta “VFHAYSARGNYYGNCPANWPSCRNNYKSAGGK” fue diferente a las plantaricinas conocidas (Hu, *et al.*, 2013).

Durante la fermentación de masa agria se identificaron varios péptidos antifúngicos nuevos producidos por *Lactobacillus plantarum*. Sólo se caracterizó la fracción con menor masa molecular (< 10 KDa). Se identificaron 9 péptidos nuevos de entre 14 y 55 residuos aminoácidos encriptados en secuencias de proteínas de arroz. Todos los péptidos menos uno, tenían carga negativa. Las dos fracciones purificadas parcialmente fueron capaces de inhibir la germinación de *P. roqueforti* en concentraciones de 3.9, 4.5 y 9.6 mg de péptido/mL (Coda, *et al.*, 2011). Por otra parte, Trias *et al.* (2008b), reportaron que el mayor efecto antimicrobiano producido por las cepas de BAL fue la acidificación del medio, la mayoría de las cepas perdieron su capacidad inhibitoria en sobrenadantes a pH neutro.

Varios factores influyen la actividad antifúngica de las BAL. Estos incluyen: el período de incubación y la temperatura, el efecto del medio de cultivo en el metabolismo bacteriano, los compuestos nutricionales que retrasan y mejoran la producción de compuestos antifúngicos y el pH. Todos estos factores son muy específicos para cada especie. Por ejemplo, las concentraciones de ácido láctico y acético por si solos no se correlacionan directamente con la inhibición de la tasa de

crecimiento del hongo, además muchos otros metabolitos inhibidores se han sugerido (Ahlberg, *et al.*, 2016). Es muy probable que la actividad antifúngica sea una matriz compleja de sinergismo entre la cepa de BAL y la producción de metabolitos en las condiciones del medio, la temperatura y la humedad, así como la cepa de patógeno (Ahlberg, *et al.*, 2016; Muhialdin, *et al.*, 2016; El-Mabrok, *et al.*, 2012b).

Existen tres formas posibles de aplicación de péptidos antimicrobianos en alimentos: como un concentrado antimicrobiano, como un fermento o como un cultivo vivo que produce metabolitos en el producto (Elsser-Gravesen y Elsser-Gravesen, 2013). Se comenta sobre estas formas de aplicación a continuación.

Fermentos. Son ingredientes alimentarios fermentados producidos a partir de una variedad de materiales (leche, azúcar, material derivado de plantas) fermentados por BAL, diseñados para proveer un alto rendimiento de metabolitos antimicrobianos, pero no tienen una composición bien definida, generalmente se suplen como un polvo libre de células. Aunque la documentación científica es mucho más escasa que para las bacteriocinas, las aplicaciones industriales son mucho más amplias (Elsser-Gravesen y Elsser-Gravesen, 2013). Las preparaciones del compuesto antimicrobiano activo pueden ser utilizadas con la ventaja de un efecto más rápido y controlable (Shafiur-Rahman, 2007)

Cultivos bioprotectores. La fermentación de alimentos utilizando cultivos iniciadores es uno de los usos más antiguos de biotecnología y aun hoy en día son parte importante (20-40%) de la dieta humana (Elsser-Gravesen y Elsser-Gravesen, 2013). Las BAL se pueden aplicar directamente como cultivo protector al alimento confiando en su proliferación y consecuente competición con los microorganismos a ser suprimidos (Shafiur-Rahman, 2007). Las principales funciones deseadas comprenden las siguientes: durabilidad mejorada debido a la acción de los metabolitos antimicrobianos y la disminución de la *a_w* (salado/secado). Inocuidad debido a la reducción de microorganismos patógenos y sus toxinas, valor nutricional mejorado, así como las características organolépticas. Los cultivos microbianos son referidos como cultivos iniciadores o protectores, aunque estas propiedades están unidas inherentemente.

Desechos agroindustriales

Por años, las industrias han aplicado métodos de disposición de desechos fáciles y económicos como por ejemplo el vertido en alcantarillado, cuerpos de agua o campos. Obviamente, esto ha traído como consecuencia la contaminación del ambiente (Sabo, *et al.*, 2019). Para el año 2016, la producción mundial de pescado fue de 171 millones de toneladas de acuerdo con la Organización de alimentos y agricultura de las naciones unidas (FAO, por sus siglas en inglés), de los cuales, entre un 25 y un 70% se convierten en desechos (Vázquez, *et al.*, 2019). Los efluentes producto de la elaboración de cerveza también son un desecho de importancia. La producción mundial de cerveza llega casi a los 84 billones de litros por año, lo que resulta en efluentes compuestos por una cantidad significativa de levaduras que pueden alcanzar los 19 millones de kg al año en el mundo (Mathias, *et al.*, 2017). Por su parte, el suero de leche es uno de los sub-productos más importantes en la industria de alimentos ya que tan solo en el 2011, la producción mundial fue cercana a los 200 millones de toneladas (Chalermthai, *et al.*, 2019). Además, es un subproducto muy nutritivo debido a que posee considerables cantidades de nutrientes tales como lactosa, proteínas, vitaminas y minerales. Por ello, es de los efluentes más contaminantes debido a su alta demanda bioquímica de oxígeno y cuyo tratamiento para poder alcanzar los requerimientos legales para poder ser vertido es muy costoso (Boumaiza, *et al.*, 2018; Veeravalli y Mathews, 2018). Por último, para el período del 2011 al 2012, la producción de manzana destinada para la producción de jugo en el mundo alcanzó los 12.2 millones de toneladas métricas. La cantidad de bagazo obtenida luego de la extracción del jugo es aproximadamente un 35% de la fruta procesada (Bolarinwa, *et al.*, 2015; Bravo, *et al.*, 2019). Estos desechos pueden ser aprovechados a través de su inclusión en procesos de fermentación microbiana para la obtención de compuestos de interés para de esta forma, ayudar a reducir la contaminación que le causan al medio ambiente (Boumaiza, *et al.*, 2018). Al sustituir sustratos costosos para fermentación por estos desechos agroindustriales se puede

lograr un proceso de bajo costo y amigable al ambiente al mismo tiempo que se evita el vertido de efluentes al ambiente (Veeravalli y Mathews, 2018).

Aunque las BAL son microorganismos considerados fastidiosos debido a que demandan medios de cultivo ricos en nutrientes tales como nitrógeno, minerales y vitaminas, poseen un sistema proteolítico capaz de liberar aminoácidos esenciales, logrando crecer adecuadamente en productos ricos en proteínas (Veeravalli y Mathews, 2018; Mathias, *et al.*, 2017). La tabla 7 muestra diferentes investigaciones sobre BAL en desechos agroindustriales.

Tabla 7. Evaluaciones sobre crecimiento de BAL en desechos agroindustriales.

Autores	Desecho	BAL	Investigación
Vázquez <i>et al.</i> 2019	Pescado	<i>P. acidilactici</i>	Lípidos, Hidrolizados de proteínas. Á. láctico
Ruthu <i>et al.</i> 2014	Pescado	<i>E. faecium</i> <i>P. acidilactici</i>	Lípidos, Hidrolizados de proteínas
Sabo <i>et al.</i> , 2019	Suero	<i>L. plantarum</i>	Bacteriocina
Worsztynowicz <i>et al.</i> , 2020	Suero	<i>E. faecium</i>	Bacteriocina
Bartkiene, <i>et al.</i> 2019	Suero	<i>L. uvarum</i> <i>L. casei</i>	Actividad antimicrobiana
Mathias, <i>et al.</i> 2017	Desecho de levaduras	<i>L. delbrueckii</i>	Actividad proteolítica
Bustos <i>et al.</i> 2004	Efluentes de vinificación	<i>L. rhamnosus</i>	Ácido Láctico
Gullón <i>et al.</i> 2008	Bagazo de manzana	<i>L. rhamnosus</i>	Ácido láctico
Leroy <i>et al.</i> , 2006	Bagazo de manzana	<i>L. amylovorus</i>	Bacteriocina
Zhang <i>et al.</i> , 2018	Avena forrajera	<i>L. plantarum</i>	Ácido láctico

Pediococcus acidilactici ha sido empleada con éxito en la transformación de desechos de pescado para la producción de soluciones de gelatina, aceites, hidrolizados de proteínas que incluye la obtención de péptidos bioactivos y peptonas. Además, produjeron ácido láctico y pediocina SA-1 a partir de un medio de cultivo de bajo costo formulado con las peptonas obtenidas (Vázquez, *et al.*, 2019).

Pediococcus acidilactici y *Enterococcus faecium* también fueron empleadas en la transformación de desechos de pescado en hidrolizados proteicos y aceites, sin embargo, a pesar de que su sobrenadante mostró actividad antimicrobiana no realizaron la determinación de péptidos (Ruthu, *et al.*, 2014).

De igual forma, los nutrientes contenidos en el suero de leche han sido aprovechados para la obtención de bacteriocinas al ser fermentado por *L. plantarum* (Sabo, *et al.*, 2019) y *E. faecalis* (Worsztynowicz, *et al.*, 2020) así como para evaluar su influencia en la capacidad antimicrobiana de BAL, en donde determinaron que la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus uvarum* y *Lactobacillus casei* fue mayor en un medio rico en suero de leche que en el medio MRS (Bartkiene, *et al.*, 2019).

La avena forrajera es un cultivo importante en muchas partes del mundo debido a que puede ser cultivado en ambientes adversos como por ejemplo en suelos de baja fertilidad. Entre otras características de importancia, la avena forrajera tiene un contenido de proteína cruda que puede variar entre 52 y 148 g/Kg en peso seco (Kafilzadeh y Heidary, 2013). Este contenido de proteínas puede ser aprovechado por las BAL nutrientes para el crecimiento. De esta forma, *L. plantarum* BAL ha sido utilizada como aditivo para ensilaje de avena asegurando una fermentación rápida y vigorosa debido a la rápida acumulación de ácido láctico y disminución del pH, manteniendo el ensilado en perfectas condiciones durante 7 meses. Además, se determinó la inhibición del crecimiento de *E. coli*, *S. aureus*; *S. enterica*; *L. monocytogenes*; *P. aeruginosa* y *B. subtilis* (Zhang, *et al.*, 2018).

Por su parte, el desecho de levadura provee aminoácidos, nitrógeno, vitaminas B, bases de purina y pirimidina y minerales esenciales para el crecimiento de BAL durante la fermentación ácido láctica (Veeravalli y Mathews, 2018; Bustos, *et al.*,

2004). Esta variedad de nutrientes presentes en el extracto de levadura se debe a la alta probabilidad que tienen las levaduras de sufrir lisis al final de su fase activa, liberando de esta forma compuestos solubles en el medio (Mathias, *et al.*, 2017). La influencia del desecho de levadura de cerveza sobre la producción de proteasas por BAL fue evaluada en medios de cultivo con diferentes concentraciones. Demostraron que la actividad proteolítica fue la mayor en medios conteniendo 50% o más de desecho de levadura de cerveza (Mathias, *et al.*, 2017). Así mismo, los efluentes de la elaboración de vino fueron empleados como único nutriente para la producción de ácido láctico por *L. rhamnosus* logrando mayor rendimiento que en el medio MRS (Bustos, *et al.*, 2004).

El bagazo de manzana ha sido reportando como un ingrediente clave para mejorar el crecimiento de BAL ya que posee varias ventajas como son un alto contenido de glucosa y fructosa libre, los cuales son conocidos como excelentes fuentes de carbono para el crecimiento microbiano y la producción de ácido láctico. Además, posee otros mono, di y oligosacáridos, ácido cítrico y málico que también pueden ser metabolizados por las BAL. Iones metálicos como Magnesio, Manganeso e Hierro fundamentales para el crecimiento de las BAL también forman parte del bagazo de manzana (Gullón, *et al.*, 2008). Esta diversidad de azúcares ha sido reportada como estimulante para la producción de bacteriocinas por una cepa de *Lactobacillus amylovorus* ya que los niveles de la actividad de la amilovorina fueron superiores cuando el sustrato contenía mezclas complejas de azúcares que cuando se emplearon fuentes de energía simples (Leroy, *et al.*, 2006). Gullón *et al.* (2008), reportan un alto rendimiento en la producción de ácido láctico empleando bagazo de manzana suplementado con los ingredientes similares a los empleados en el medio MRS.

Por lo antes expuesto, se puede constatar la necesidad de implementar métodos de desinfección de frutas y hortalizas post cosecha, así como la investigación en cuanto al potencial uso de BAL como método de desinfección en frutas y hortalizas. Esta investigación se dirige al aislamiento de BAL de fuentes vegetales y su selección basándose en su capacidad antimicrobiana para luego identificar las cepas



molecularmente. Por último, se aplicará el sobrenadante libre de células del crecimiento de BAL sobre manzanas (*Malus domestica* var Golden delicious) para evaluar su capacidad como agente bioprotector.

JUSTIFICACIÓN

En vista de la evidencia en cuanto a la presencia de Bacterias patógenas asociadas a los brotes de ETA por consumo de frutas y hortalizas frescas y de la falta de métodos alternativos para su desinfección durante la post cosecha, surge la necesidad de evaluar la actividad antimicrobiana de las Bacterias ácido lácticas aisladas de vegetales frescos para mejorar su efectividad al aplicar su sobrenadante libre de células en manzanas frescas (*Malus domestica* var Golden delicious) como método alternativo de desinfección que garantice su inocuidad y alargue el tiempo de vida útil.



HIPÓTESIS

Los sobrenadantes libres de células del cultivo de bacterias lácticas que fueron aisladas de vegetales presentan actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas y deteriorativas presentes en alimentos. Por ello, los sobrenadantes pueden utilizarse como método de biopreservación en alimentos, particularmente en manzanas enteras (*Malus domestica* var. Golden delicious).

OBJETIVO GENERAL.

Obtener sobrenadantes con actividad antimicrobiana a partir de cultivos de bacterias ácido lácticas aisladas de fuentes vegetales, para utilizarse en la biopresevación de alimentos.

Objetivos específicos.

- Obtener cepas de Bacterias ácido lácticas a partir de fuentes vegetales y evaluar su capacidad antimicrobiana *in vitro* contra microorganismos patógenos y deterioradores.
- Caracterizar bioquímica y molecularmente las cepas de Bacterias ácido lácticas que presentan actividad antimicrobiana.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes del crecimiento de bacterias ácido lácticas de fuentes vegetales provenientes de medios de cultivo formulados con desechos agroindustriales.
- Evaluar la capacidad bioprotectora *ex vivo* de una cobertura a base del sobrenadante de *Leuconostoc mesenteroides* PIM5 durante el almacenamiento de manzanas (*Malus domestica* var. Golden delicious) frescas.

MATERIALES Y MÉTODOS**a). - Materiales y equipo:**

- Caldo MRS, Difco.
- Cloruro de sodio, Favela pro Sa de CV.
- Agar MRS, Difco.
- Caldo Infusión Cerebro Corazón, Bioxon.
- K_2HPO_4 Contek Química S.A. de C.V.
- Safranina Becton Dickinson and Company.
- Yodo Lugol Becton Dickinson and Company.
- Alcohol/acetona JT Baker.
- Cristal Violeta Becton Dickinson and Company.
- Peróxido de hidrógeno Laboratorios Jaloma S.A. de C.V.
- Extracto de levadura, Bioxon.
- Extracto de malta, Bioxon.
- Leche descremada Svelty Nestlé
- Peptona de caseína, Difco.
- Agar, Difco.
- Glucosa, JT Baker.
- Ferrocianuro de potasio, JT Baker.
- Citrato de hierro, JT Baker.
- Citrato de sodio JT Baker.
- Tributirina Sigma Aldrich.
- Agar M17, Difco.
- Almidón, Técnica Química, S.A.
- Sacarosa, Favela pro S.A. de C.V.
- Metanol, JT Baker.
- Ácido acético, JT Baker.
- buffer TE 1X Sigma.
- Lisozima, Sigma.
- Dodecilsulfato de Sodio Sigma.
- Proteinasa K, Sigma Aldrich.
- Vortex
- Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), Sigma Aldrich.
- Cloroformo JT Baker.
- Alcohol Isoamílico JT Baker.
- Alcohol Isopropílico. JT Baker.
- Alcohol etílico, JT Baker.
- Agua Mili-Q, Promega.
- Go Taq® Colorless Master Mix 2X, Promega Corporation.
- Primer 8F, Integrated DNA technologies.
- Primer 1492R, Integrated DNA technologies.
- Ciclador térmico, Biorad, T100 Thermal cycler.

- Agarosa Biorad Laboratories, Inc.
- Buffer Tris Borato 1X EDTA (TBE 1X) Sigma
- Syber Safe DNA gel stain, Invitrogen.
- DNA mass ladder, Invitrogen.
- Ácido 3,5 dinitrosalicílico Sigma Aldrich.
- Reactivo de Bradford, Sigma Aldrich.
- Fructosa, Materiales y Abastos Especializados S. A. de C.V.
- Hidróxido de sodio, Coontek Química S.A. de C.V.
- Agar cuenta estándar, Bioxon.
- Agar papa dextrosa, Difco.
- Ácido tartárico, Favela pro S.A. de C.V.
- Unidad de Destilación Kjeldahl, Labconco.
- Unidad de digestión, Novatech.
- Incubadora, Shel-lab 1535, Sheldon manufacturing inc
- Incubadora, Isotemp incubator, Fisher scientific
- Centrífuga, Eppendorf 5810R.
- Centrífuga, Velab.
- Espectrofotómetro, Biorad 550.
- Baño de maria, VWR Scientific 1203.
- Transiluminator UV, Kodak Gel Logic 2200 Imaging System (Eastman Kodak Company).
- Colorímetro portátil (Minolta Chroma Meter CR-300, Minolta Corp.
- Teléfono móvil Samsung note 9
- Bascula digital, T-fal optiss.
- Licuadora de inmersión, BAPI 850 plus.
- Refractómetro de mano, Master 53T, Atago.
- Potenciómetro, Orion Dual star, Thermo Scientific.
- Plancha de agitación, Nuova stir plate Thermolyne, 18 425
- Campana de extracción, Nuaire, Class II, type A/B3.
- Microscopio Olympus CX21LED
- Contador de colonias Felisa FE 500

b).-Métodos.

Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas.

Se tomaron muestras de frutas y hortalizas en campos de cultivo, tianguis y supermercados. Las muestras se colocaron en bolsas estériles de cierre rápido y se transportaron al laboratorio en hieleras con refrigerante. Se añadió 10 mL de Diluyente de Máxima Recuperación (DMR, 8,5 g/L NaCl, 1,0 g/L Peptona). Luego se transfirió 1 mL de la muestra a tubos con caldo MRS y se incubaron a 26°C de 24 a 48 h en

anaerobiosis. Posteriormente, de los tubos con crecimiento se estrió una asada del caldo en agar MRS y se incubó a 26°C de 24 a 48 h en anaerobiosis. Se seleccionaron las colonias típicas de acuerdo a su morfología y se sometieron a tinción de Gram, prueba de Catalasa y Oxidasa. Las colonias Gram positivas, catalasa y oxidasa negativas fueron seleccionadas como presuntas BAL para la determinación de su capacidad antimicrobiana (Siroli, *et al.*, 2015)

Determinación de la actividad antimicrobiana.

La determinación de la actividad antimicrobiana (AA) se llevó a cabo siguiendo lo reportado por Inglin *et al.* (2015), con modificaciones. Las cepas de presuntas BAL seleccionadas fueron inoculadas en tubos con 1.5 mL de caldo MRS y se incubaron a 26°C de 24 a 48 h. Para la prueba se emplearon los sobrenadantes del crecimiento de BAL libres de células (SLC), los cuales fueron obtenidos por centrifugación de los cultivos (4400 g x 25 min) y se pasteurizaron a 75°C por 3 minutos. Se prepararon suspensiones de microorganismos patógenos a concentraciones de 1.5×10^8 cel/mL empleando el método del Nefelómetro de Mc Farland y suspensiones de esporas de hongos entre 10^3 y 10^4 . En una microplaca, se colocaron en cada pozo 100 µL de Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) suplementado con K_2HPO_4 (0.1 M). Para Mohos y Levaduras se colocaron 100 µL de caldo YM. Luego se transfirieron 50 µL del SLC del crecimiento de BAL y 30 µL de las suspensiones de cada microorganismo indicador (Tabla 8). En una fila se agregaron 150 µL de caldo BHI con K_2HPO_4 y 30 µL de la suspensión de cada microorganismo indicador. Se incubó cada placa en condiciones adecuadas para cada microorganismo indicador (Tabla 8) y se midió la densidad óptica a 595 nm (OD_{595}) a los tiempos t_{0h} y t_{24h} para bacterias y levaduras y t_{48} para mohos empleando un espectrofotómetro con lector de microplacas (Biorad 550, Japón).

Tabla 8. Microorganismos indicadores para la prueba de determinación de la capacidad antimicrobiana.

Indicador	ATCC	Condiciones
<i>Bacillus cereus</i>	11778	
<i>Listeria monocytogenes</i>	19114	
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Aerobiosis
<i>Escherichia coli</i>	35218	37°C, 24 h
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	43888	
<i>Salmonella typhimurium</i>	14028	
<i>Lactococcus lactis</i>	Comercial	26°C, 24 h
<i>Lactobacillus casei</i>	Comercial	Anaerobiosis
<i>Aspergillus niger</i>	Colección BUAP	
<i>Penicillium expansum</i>	Colección UDLAP	
<i>Fusarium oxysporum</i>	Colección UDLAP	26°C, 48 h
<i>Candida albicans</i>	10231	aerobiosis
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9763	
<i>Candida tropicalis</i>	1369	

Los porcentajes de inhibición se calcularon empleando la fórmula 1:

$$AA = 100 - ((\Delta DO_s / \Delta DO_c) * 100) \quad (1)$$

Donde:

ΔDO_s : Promedio de la diferencia de la densidad óptica de la muestra entre t_0 y t_{24} ó t_{48} .

ΔDO_c : Promedio de la diferencia de la densidad óptica del control entre t_0 y t_{24} ó t_{48} .

Determinación de la actividad enzimática.

Detección de proteasa, lipasa, amilasa y la capacidad de metabolizar citrato.

Se evaluaron la capacidad de las BAL para producir proteasa, lipasa, amilasa y la capacidad de metabolizar citrato. Para la determinación de la producción de proteasa se preparó Agar leche descremada según lo establecido por Pailin *et al.* (2001), con modificaciones (Leche descremada 1.5%, peptona de caseína 1%, agar 1.5%). Para la determinación de la producción de lipasa se preparó Agar MRS suplementado con 1% Tributirina. Para comprobar la producción de Amilasas se empleó Agar Almidón (Agar M17, almidón 1%) inundado con solución de yodo para prueba de Gram después de la inoculación e incubación (Abbasiliasi, *et al.*, 2017). Cada placa con medio fue inoculada por punción con un cultivo de 18 h de BAL y se incubaron a 26°C por 24 h. La presencia del halo de hidrólisis alrededor de la punción se consideró como actividad positiva. Para la determinación del metabolismo de citrato se empleó Agar citrato (Kempler & Mckay, 1980; leche en polvo descremada 1%, peptona de caseína 0.25%, glucosa 0.5% y agar 1.5%), complementado con una solución de 10 mL de ferrocianuro de potasio (Ferrocianuro de potasio 10%, Citrato de hierro 2.5% y citrato de sodio 2.5%). Las placas con Agar citrato fueron inoculadas por punción con un cultivo de 18 h de BAL y se incubaron a 26°C por 24 h. La formación de colonias azules se consideró positivo para el metabolismo de citrato.

Producción de biopelículas.

El ensayo para la formación de biopelículas se realizó de acuerdo con el método empleado por Stepanovic *et al.* (2000), con modificaciones. Las cepas de BAL se inocularon en tubos con 2.5 mL de caldo MRS suplementado con 2% de sacarosa. De cada tubo se tomaron 200 μ L y se colocaron en pozos de una microplaca por triplicado. Como control negativo se colocó 200 μ L de caldo por triplicado. La microplaca se incubó en anaerobiosis a 26°C por 48 h. Después de incubada, se vació el contenido de la placa y se lavó con solución salina estéril. Las bacterias que quedaban en la placa fueron fijadas con 200 μ L de metanol al 99% por 15 minutos. Posteriormente, se vaciaron los pozos y se dejaron secar. Una vez secos fueron teñidos con 200 μ L de cristal violeta para prueba de Gram durante 5 minutos. El exceso se eliminó enjuagando con agua corriente y se dejaron secar. Por último, se agregaron 160 μ L de una solución de ácido acético glacial al 33% en cada pozo y se midió la Densidad Óptica a 595 nm empleando un lector de microplacas (Biorad 550, Japón).

Se determinó la desviación estándar del control negativo (OD_C) con base en la cual las desviaciones estándar de la Densidad Óptica de las cepas (OD_M) se clasificaron de la siguiente forma:

$OD_M \leq OD_C$ no adherente

$OD_C < OD_M \leq 2 \times OD_C$ débilmente adherente

$2 \times OD_C < OD_M \leq 4 \times OD_C$ moderadamente adherente

$4 \times OD_C < OD_M$ fuertemente adherente

Identificación de las cepas de Bacterias ácido lácticas.**Extracción del ADN.**

La extracción de ADN se realizó de acuerdo con lo reportado por Pospiech y Neumann (1995) con variaciones. Una asada de cada BAL se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 mL con 400 μ L de buffer TE 1X y 50 μ L de Lisozima (10 mg/mL). La mezcla se incubó por 1.5 h a 37°C. Luego, se agregó 70 μ L de Dodecilsulfato de Sodio (SDS, 10%) y 5 μ L of Proteinasa K (10 mg/mL), la mezcla se homogeneizó en vortex y se

incubó a 65°C por 10 min. Posteriormente, se añadió 100 µL de NaCl 5 M y 100 µL de una solución de Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y NaCl (CTAB 100 mg/mL, NaCl 41 mg/mL) la mezcla fue homogeneizada en vortex e incubada por 10 minutos a 65°C. Después de ello, se agregó 700 µL de una mezcla de Cloroformo/Alcohol Isoamílico (24:1), se homogeneizó en vortex y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 minutos a 20°C. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y se agregaron 0.6 volúmenes de Alcohol Isopropílico. El ADN se dejó precipitar a -20°C por 24 h y se recuperó por centrifugación a 12.000 rpm y 20°C por 15 minutos. Se decantó el sobrenadante y la pastilla de ADN fue lavada 3 veces con 600 µL de Alcohol etílico al 70% y subsecuentes centrifugaciones a 12.000 rpm y 4°C por 5 minutos. Finalmente, la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente, se re-suspendió en 50 µL de agua Mili-Q y se almacenaron a -20°C.

Amplificación del ADN ribosomal 16s.

La amplificación del rADN 16s se llevó a cabo aplicando la Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) de acuerdo a lo establecido por Liu *et al.* (2012), con algunas modificaciones. Se empleó una mezcla de reacción con un volumen final de 25 µL. La mezcla contenía 5 µL de cada ADN de BAL (100 ng), 2.5 µL de agua Mili-Q, 12.5 µL de Go Taq® Colorless Master Mix 2X (Promega Corporation, Madison, WI, USA; ADN polimerasa 2X GoTaq®; buffer de reacción incoloro pH 8.5; 400 µM dATP, 400 µM dGTP; 400 µM dCTP; 400 µM dTTP y MgCl₂ 3 mM.) y 2.5 µL de cada primer. Los primers empleados fueron 8F- 5' GCG GAT CCG CGG CCG CTG CAG AGT TTG ATC CTG TCT CAG 3' y 1492R- 5' GGC TCG AGC GGC CGC CCG GGT 3' TAC CTT GTT ACG ACT T 3' (Integrated DNA technologies, Coralville, USA). La reacción se llevó a cabo en un Ciclador térmico (Biorad, T100 Thermal cycler, Singapore), con un programa de amplificación que incluyó los siguientes pasos: pre-desnaturalización a 94°C por 5 min, 30 ciclos que consistían en desnaturalización a 95°C por 1 min, alineación a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min. Finalmente, una última extensión a 72°C por 5 min. Los productos de PCR fueron confirmados por electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) a 90 V, por 40 min, en Buffer Tris Borato 1X EDTA (TBE 1X) con Syber Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA) y un



Transiluminator UV, Kodak Gel Logic 2200 Imaging System (Eastman Kodak Company).

Secuenciación

Las muestras amplificadas del gen 16s rRNA fueron enviadas a MacroGen Corp. (Rockville, MD, USA) para ser secuenciadas por medio del método Sanger con los primers descritos para la amplificación. Las secuencias obtenidas (sentido y anti sentido) fueron comparadas con las secuencias contenidas en la base de datos GenBank del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) empleando el programa *Standard nucleotide Basic Local Alignment Search Tool* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con la finalidad de determinar si ambas secuencias coincidían con la secuencia de un mismo microorganismo. Posteriormente, a partir de la secuencia anti sentido se generó una secuencia complementaria (sentido complementario) para incrementar el porcentaje de similitud. Para ello se utilizó la herramienta en línea de *bioinformatics.org*. Una vez obtenida la secuencia sentido complementaria, se alinearon ambas secuencias (sentido y sentido complementaria) utilizando la aplicación SeaView 3.2 (<http://134.214.32.76/software/seaview3.html>). La secuencia resultante se analizó de nuevo con el programa *Standard nucleotide Basic Local Alignment Search Tool* de la base de datos GeneBank del NCBI. Finalmente, las secuencias fueron enviadas a la base de datos del GeneBank para obtener los números de acceso. Adicionalmente, las secuencias de nucleótidos fueron analizadas con los programas Clustal.X (<http://clustal.org/clustal2/>) y Mega X (<https://www.megasoftware.net/>) para generar un árbol filogenético.

Formulación de medios de cultivo empleando desechos agroindustriales.

Caracterización de desechos agroindustriales

Para poder llevar a cabo la formulación de los medios de cultivo empleando desechos agroindustriales, previamente se caracterizaron los desechos a utilizar. Los desechos agroindustriales manejados fueron: Bagazo de manzana (BM) proveniente de la industria de elaboración de jugos La Norteña, agua de levadura (AL) como desecho

de la fabricación artesanal de cerveza proveniente de Tijarare Cervecería Artesanal. Para obtener el agua de levadura se le aplicó un tratamiento preliminar al efluente de la elaboración de cerveza para eliminar los desechos adicionales que contiene. A este efluente se le agregó agua estéril en una relación 2:1, agua/efluente y se dejó decantar por 30 minutos. Una vez decantado se formaron 3 fases como se puede observar en la figura 1. La tercera fase o fase inferior, es la más oscura y se descartó debido a que corresponde a lúpulo y sustrato no utilizado. Las dos fases superiores corresponden a levadura activa e inactiva, fueron esterilizadas y se tomaron como agua de levadura. Los demás desechos utilizados fueron: harina de pescado comercial (HP) la cual fue adquirida en el supermercado S-mart, suero de leche (SL) de la elaboración de queso donado por la fábrica de queso de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Autónoma de Chihuahua y avena forrajera (AF), *Avena sativa* L. var. Karma, suplida por Semillas Pura Sangre. A todos los desechos se les determinó el contenido de nitrógeno total y proteína por el método Kjeldahl (Wang, *et al.*, 2016) y el contenido de azúcares reductores por el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (Miller, 1959).



Figura 1. Decantado del efluente de la elaboración de cerveza artesanal.

Formulación de los medios de cultivo.

Una vez caracterizados los desechos agroindustriales se formularon caldos de cultivo similares al caldo MRS. Para ello, se elaboró un medio base que contenía Tween 80 y las mismas sales en las mismas cantidades contenidas en el caldo MRS. Además, se sustituyó la glucosa por BM, y el extracto de levadura por AL. Posteriormente, se prepararon tres caldos de cultivo agregando una fuente de proteínas diferente (HP, SL, AF) al medio base sustituyendo la peptona y el extracto de carne. Todos los ingredientes sustituidos fueron reemplazados por los desechos agroindustriales en cantidades equivalentes a las contenidas en el medio MRS en carbono y nitrógeno. Los caldos resultantes fueron caldo harina de pescado (CHP), caldo suero de leche (CSL) y caldo avena forrajera (CAF).

Fermentación de los medios formulados y actividad antimicrobiana.

Se colocaron triplicados de 45 mL de los caldos formulados y del caldo MRS, se inocularon con 5 mL de cultivos de una noche de las BAL seleccionadas de acuerdo con su actividad antimicrobiana. A continuación, se incubaron los medios a 26°C por 48 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación los medios fueron centrifugados a 14000 rpm durante 10 minutos y pasteurizados a 75°C por 3 minutos para obtener el SLC. La actividad antimicrobiana se evaluó como se explicó anteriormente empleando los mismos microorganismos indicadores con excepción de las bacterias Gram-positivas y las BAL utilizadas como indicadores.

Análisis químico de cultivo estéril y sobrenadante.

El consumo de proteínas y azúcares reductores, así como el pH y la producción de ácido láctico de la cepa con la mejor actividad antimicrobiana se evaluó en el SLC y en el caldo donde las BAL desarrollaron mejor su actividad antimicrobiana y en el SLC y en el caldo MRS para comparar el comportamiento de la cepa en ambos medios. Por lo tanto, el contenido de proteínas se determinó empleando el método de Bradford (Bradford, 1976), los azúcares reductores expresados como fructosa por el método de ácido 3,5 dinitrosalicílico (Miller, 1959), los azúcares totales expresados como fructosa

(Dubois, *et al.*, 1956), azúcares no reductores por diferencia, la acidez titulable total expresada como la cantidad en gramos de ácido láctico por cada 100 g de muestra (Souza, *et al.*, 2015)) y el pH se determinó tanto en el SLC como en el caldo estéril.

Evaluación del efecto bioprotector del sobrenadante de BAL.

Solución de cubierta

Para evaluar el efecto bioprotector del sobrenadante de BAL se empleó como solución de cubierta al sobrenadante del crecimiento de la BAL en los medios formulados con desechos agro-industriales con mayor actividad antimicrobiana. Para lo cual, se preparó el medio donde las BAL mostraron mayor actividad antimicrobiana y se inoculó con la BAL con mayor actividad antimicrobiana siguiendo el procedimiento explicado anteriormente.

Preparación de las muestras

Se adquirieron 100 muestras de manzanas (*Malus domestica* var. Golden Delicious) seleccionadas manteniendo el mismo color y tamaño, sin defectos, enfermedades o contaminación. Se transportaron al laboratorio y se desinfectaron por inmersión en una solución de cloro al 1% por 30 segundos, se enjuagaron tres veces en agua estéril y se secaron al aire. Una vez secas, se les realizaron análisis físico-químicos para determinar sus características iniciales (t_0) y posteriormente cada cuatro días hasta el día 28 (t_{28}). Luego, las muestras fueron separadas en dos grupos: El primero consistió en las muestras desinfectadas sin recubrimiento (SR), las cuales fueron colocadas en rejillas plásticas luego de la desinfección. El segundo grupo constó de las muestras recubiertas (R). Las muestras fueron sumergidas en la solución de cubierta por 5 minutos, colocadas en rejillas plásticas y secadas al aire. Todas las muestras fueron almacenadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 28 días.

Análisis físico-químicos

Los análisis físico-químicos realizados fueron Color, Índice de color, apariencia, pérdida de peso, acidez titulable total, contenido de sólidos solubles, Índice de Madurez, pH, Bacterias mesófilas aerobias y mohos y levaduras. Todas las mediciones se realizaron por quintuplicado con excepción de las mediciones de color, y se reportaron los promedios y su desviación estándar.

Color y Apariencia

Para las pruebas de color y apariencia se separaron cinco muestras de cada grupo (SR y R) a las cuales se les realizaron las mediciones durante los 28 días. Para la prueba de color externo se empleó un colorímetro portátil (Minolta Chroma Meter CR-300, Minolta Corp., Ramsey, N.J., U.S.A.), utilizando los parámetros de color CIE $L^*a^*b^*$: L^* (Claridad), a^* (rojo/verde), y b^* (amarillo/azul). El colorímetro fue calibrado con una placa blanca de calibración estándar antes de iniciar las mediciones. Se tomaron diez mediciones a cada una de las muestras cada cuatro días colocando las manzanas en la misma posición para asegurar que todas las mediciones se realizaran en las mismas condiciones. Adicionalmente, se determinó el índice de Color, IC (Kus, et al., 2017) empleando la fórmula 2:

$$IC = \frac{(a \times 1000)}{(L \times b)} \quad (2)$$

Para la prueba de apariencia, se tomaron fotos a cada muestra cada cuatro días en la misma posición utilizada para las mediciones de color empleando un teléfono móvil Samsung Note 9.

Pérdida de peso

De igual forma, para la prueba de pérdida de peso se separaron 5 muestras de cada grupo, las cuales fueron pesadas individualmente desde el inicio de la prueba (t_0) y cada 4 días hasta completar los 28 días. Para la prueba se empleó una balanza marca Tfal, los resultados se expresaron en gramos y la pérdida de peso ($P\%$) se expresó en porcentaje aplicando la ecuación 3:

$$P\% = \left(\frac{P_i - P_f}{P_f} \right) \times 100 \quad (3)$$

Donde P_i es el peso inicial de las muestras y P_f es el peso final de las muestras. (Souza, *et al.*, 2015),

Contenido de sólidos solubles

Una vez realizadas las pruebas anteriores, a las manzanas se les eliminó el centro con un saca-corazones estéril y luego fueron cortadas con un cuchillo estéril. Luego, se convirtieron en puré empleando una licuadora de inmersión (BAPI 850 plus, Taurus, España), se dejó separar el jugo de los sólidos y se colocó una gota en un refractómetro de mano (Master 53T, Atago, Japón). El contenido de sólidos solubles (CSS) se expresó en °Brix (Souza, *et al.*, 2015).

pH y acidez titulable.

Para determinar el pH se pesaron 10 g del puré y se les añadió 100 mL de agua destilada. Se midió el pH de la solución utilizando un potenciómetro (Orion Dual star, Thermo Scientific, Singapur). Luego, para la determinación de acidez titulable (AT) se tituló la solución con NaOH 0.1 N en agitación hasta alcanzar un pH de 8.2. Los resultados se expresaron porcentaje (m/m) en gramos de ácido málico (Souza, *et al.*, 2015).

Índice de madurez.

Para determinar el índice de madurez (IC), se aplicó la relación entre el contenido de sólidos solubles (CSS) expresado en °Brix y la acidez titulable (AT) expresada en porcentaje de ácido málico (Cocci, *et al.*, 2014).

Bacterias mesófilas aerobias y mohos y levaduras.

Para la determinación de Bacterias mesófilas aerobias (BMA) y Mohos y levaduras (ML), se pesaron 10 g del puré de manzana y se colocaron en 90 mL de DMR, se homogeneizó por 5 minutos. Se tomó como dilución madre. Luego, se realizaron las diluciones a 10^{-2} y 10^{-3} . Posteriormente se colocó 1 mL de cada dilución en placas de Petri, inmediatamente se añadieron aproximadamente 15 mL de agar para cuenta estándar para BMA (NOM-092-SSA1-1994) o agar Papa Dextrosa para ML (NOM-111-SSA1-1994). Los agares se vaciaron a 40°C aproximadamente y se homogeneizaron por rotación para obtener colonias separadas. Luego de solidificar, las placas se incubaron a 37 °C por 3 días, para BMA y a 26 °C durante 7 días para ML. Las determinaciones se realizaron por quintuplicado y se expresaron en UFC/g de manzana.

Análisis Estadístico.

Los resultados de la prueba de actividad antimicrobiana contra microorganismos indicadores y enzimática fueron agrupados en *Clusters* con un 85% de similitud con la finalidad de seleccionar las cepas con las mayores actividades. Para ellos se aplicó un análisis jerárquico de agrupación utilizando el método de la distancia euclidiana con amalgamiento completo. Se generó un dendograma para la actividad antimicrobiana y uno para la actividad enzimática.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los SLC provenientes de la fermentación de medios de cultivo formulados con desechos agro-industriales, los



resultados de la AA fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey para las diferencias de medias. Los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa Minitab 18 con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

El análisis y reporte de los datos recopilados durante la evaluación del efecto bioprotector del sobrenadante de BAL se realizó a través un ANOVA y una prueba de t de Student con un nivel de significancia de $p < 0.05$ empleando el Office Excel professional plus 2016.

RESULTADOS Y DISCUSION

Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas.

Esta investigación se enfocó en coleccionar BAL aisladas de fuentes vegetales en el área de Chihuahua, Chih. caracterizarlas según su actividad antimicrobiana, enzimática y adhesiva, las cuales pueden ser de importancia para la industria de alimentos. Por lo tanto, a partir de una amplia variedad de muestras de vegetales (220) se aislaron 116 cepas de presuntas BAL. Se seleccionaron de acuerdo con su actividad antimicrobiana, enzimática y adhesiva. Posteriormente, los aislados seleccionados fueron identificados molecularmente y las secuencias fueron enviadas a la base de datos GenBank del NCBI. Posteriormente, las cepas seleccionadas por su actividad antimicrobiana fueron empleadas para evaluar el efecto de medios de cultivo formulados con desechos agroindustriales sobre su actividad antimicrobiana. Por último, el sobrenadante libre de células de la cepa con la actividad antimicrobiana más relevante fue utilizado como cubierta protectora en manzanas (*Malus domestica* var Golden Delicious) y su capacidad bioprotectora fue evaluada.

Las bacterias ácido lácticas son ampliamente conocidas por su participación en la elaboración de productos lácteos. Sin embargo, en los últimos años han sido extensamente aisladas de fuentes vegetales como muestran diferentes publicaciones (Borrero, *et al.*, 2017; Chen, *et al.*, 2017; Fessard y Remize, 2019; Garzón, *et al.*, 2017). Además, muchos autores también han reportado que BAL aisladas de fuentes vegetales han conseguido inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, mohos y levaduras (Zhang, *et al.*, 2018; Borrero, *et al.*, 2017; Chen, *et al.*, 2017; Garzón, *et al.*, 2017; Salvucci, *et al.*, 2016). No obstante, la promoción del crecimiento de los microorganismos indicadores ha sido muy poco reportada.

Se lograron aislar 116 cepas de BAL obtenidas de las diferentes fuentes vegetales mostradas en la tabla 9. El número de muestras tomadas dependió de su disponibilidad de acuerdo con la estación y de que no hubiesen sido sometidas a ningún tratamiento ya sea de limpieza o desinfección. La Figura 2, muestra varios ejemplos de aislamientos de BAL en Agar MRS. La figura 3, muestra algunas de las tinciones de Gram que se realizaron la para confirmación.

Tabla 9. Cantidad y forma de Bacterias ácido lácticas aisladas según su fuente.

Muestra	N°	Forma	N°	Muestra	N°	Forma	N°
Manzana roja	21	Cocoide	4	Tomate verde	15	Coco	2
Manzana verde	21	Cocoide	15			Cocoide	4
Pera	6	Bacilo	3	Uva	3	Bacilo	3
		Cocoide	1	Naranja	9	Coco	1
Granada	3	Coco	3			Bacilo	1
Pimiento	12	Cocoide	7			Cocoide	5
Jalapeño	27	Cocos	3	Durazno	6	Bacilo	3
		Cocoide	10			Cocoide	2
Chilaca	24	Coco	3	Guayaba	18	Coco	3
		Bacilo	4			Cocoide	9
		Cocoide	7	Elote	9	Bacilo	2
Mandarina	4	Cocoide	4			Cocoide	4
Pepino	12	Cocoide	3	Lechuga	6	Cocoide	2
Calabacita	18	Bacilo	3	Flor de Nopal	3	Cocoide	1
		Cocoide	3	Brote de soya	3	Cocoide	1

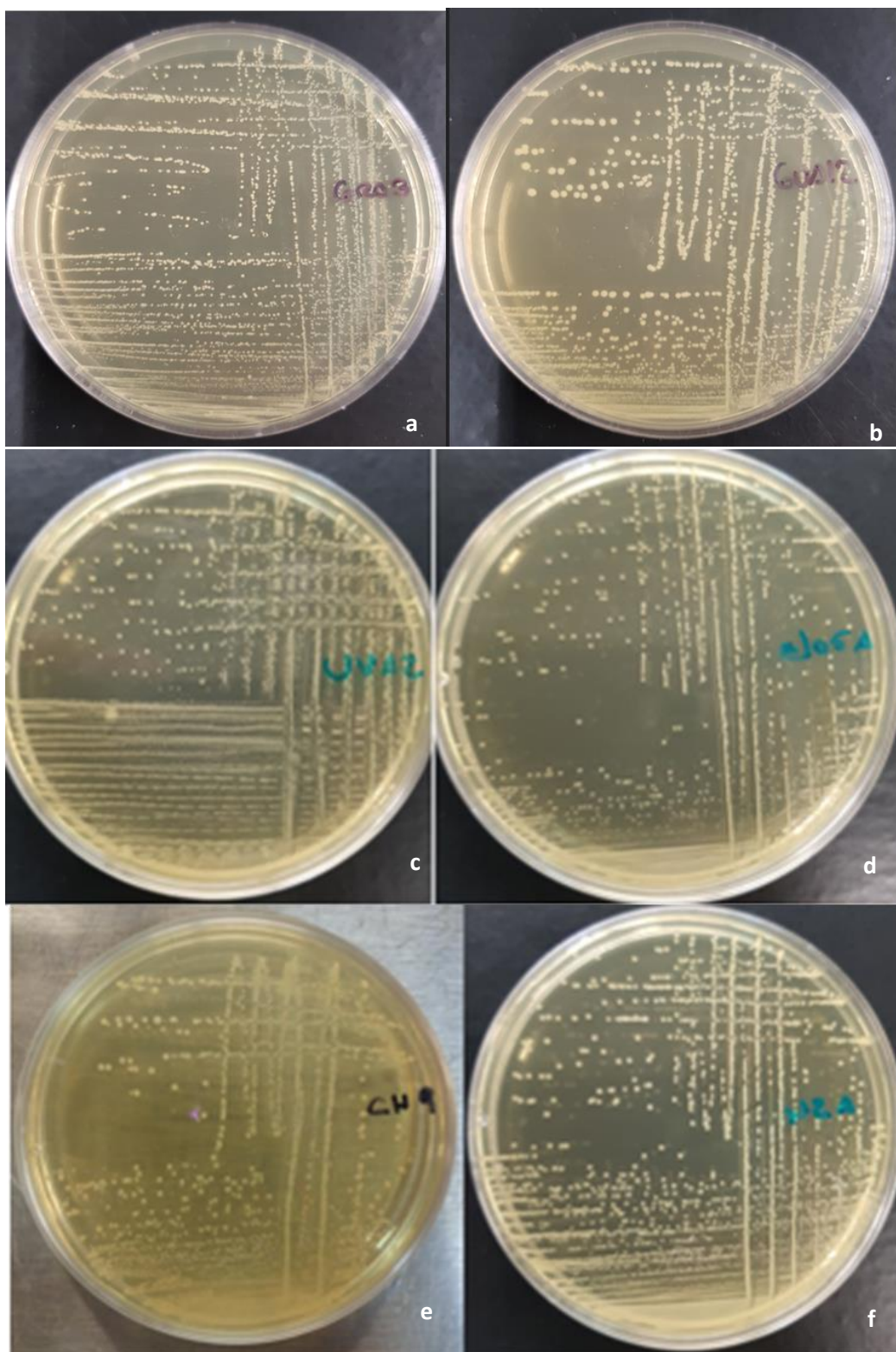


Figura 2. Ejemplos de aislamientos de BAL en agar MRS.

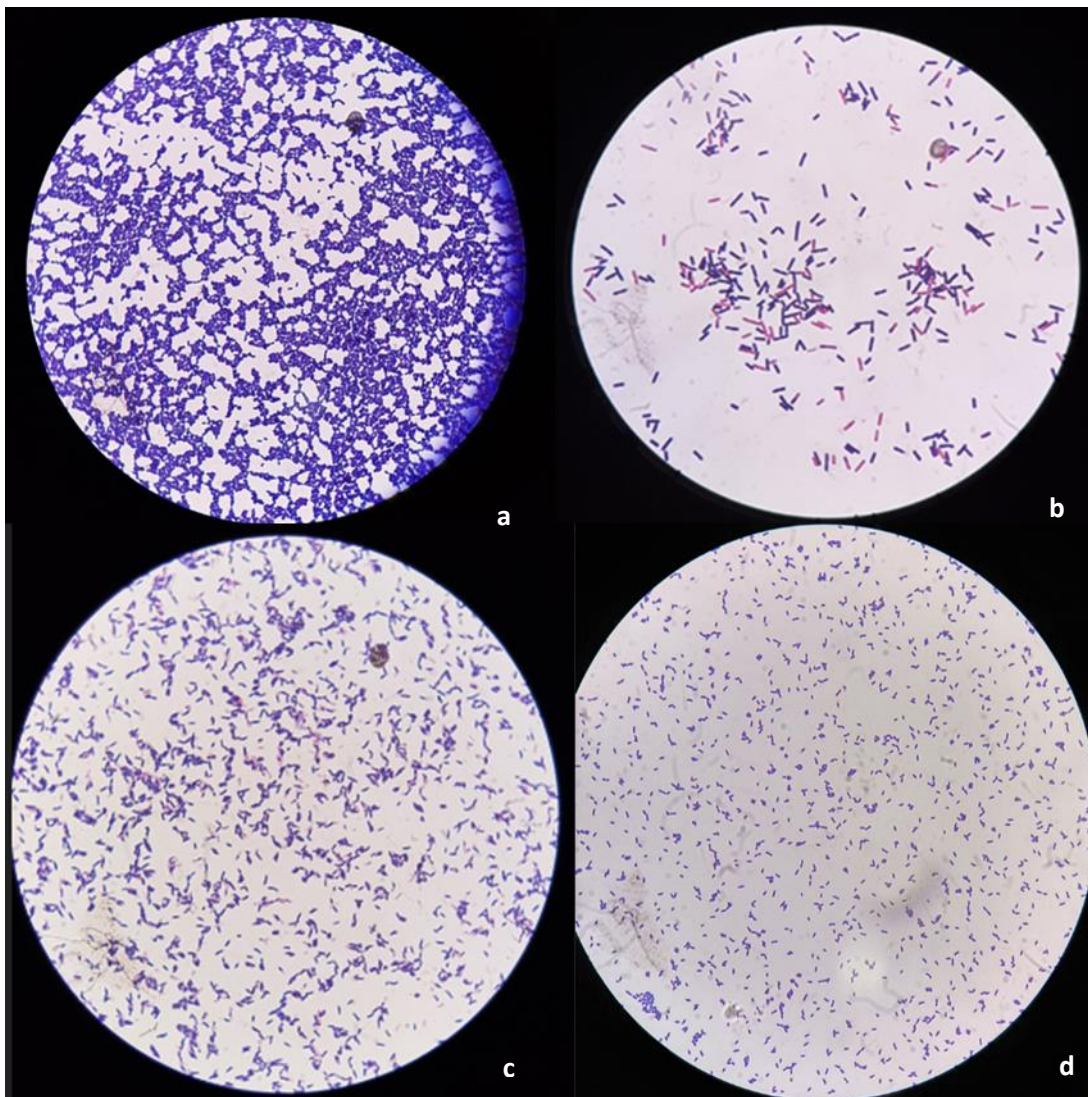


Figura 3. Tinción de Gram de BAL aisladas de fuentes vegetales mostrando las siguientes morfologías: a) cocos, b) bacilos largos y c) y d) bacilos cortos.

Evaluación de la actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana de los SLC del crecimiento de las BAL se evaluó por microtitulación. Los porcentajes de inhibición/promoción se clasificaron de la siguiente forma: mayor de 50% inhibición fuerte, entre 15 y 49.99% inhibición moderada, entre 14.99 y -14.99% se consideró inhibición o promoción no significativa, de -15% a -99.99 % se consideró como crecimiento normal y valores menores a -100% se consideraron como promoción del crecimiento.

La figura 4, muestra los porcentajes de inhibición del crecimiento de los microorganismos indicadores luego de ser incubados con los SLC de las BAL, agrupados en *Clusters*. Estos porcentajes fueron agrupados en 17 *Clusters* con un 85% de similitud. Los sobrenadantes del crecimiento de las BAL aisladas de fuentes vegetales, en general, mostraron mayor actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram⁺ (*B. cereus*, *L. monocytogenes*), BAL (*L. lactis* y *L. casei*) y levaduras (*S. cerevisiae*, *C. albicans* y *C. tropicalis*). Contra mohos, fueron mayormente efectivos contra *P. expansum*, en menor grado contra *F. oxysporum* y contra *A. niger* la actividad fue escasa (7/116). La actividad inhibitoria contra bacterias Gram⁻ fue prácticamente nula. La mayoría de los sobrenadantes agrupados de los *Clusters* 3 al 17, con excepción del *Cluster* 14, inhibieron a *S. aureus*, a las BAL, Levaduras y *P. expansum*, sin embargo, mostraron una fuerte promoción del crecimiento de *A. niger* y *F. oxysporum*. El *Cluster* 2, agrupa aquellos SLC que mostraron mayor inhibición del crecimiento de los microorganismos indicadores como se puede observar en la figura 5.

Todos los sobrenadantes en este *Cluster* inhibieron entre débil y moderadamente a *B. cereus*, *P. expansum*, *S. cerevisiae* y *C. tropicalis*. *L. monocytogenes*, *L. lactis*, *F. oxysporum* sufrieron una inhibición de débil a fuerte. Además, todos los sobrenadantes de este *Cluster* inhibieron moderadamente a *C. albicans*. Cabe resaltar que los SLC del crecimiento de una cepa de BAL aislada de pimienta (PIM4) logró inhibir el crecimiento de todos los indicadores con excepción de las bacterias Gram⁻ y *S. aureus*. Los SLC de este *Cluster* con inhibición fuerte del crecimiento de alguno de los indicadores fueron seleccionados para identificarlos molecularmente.

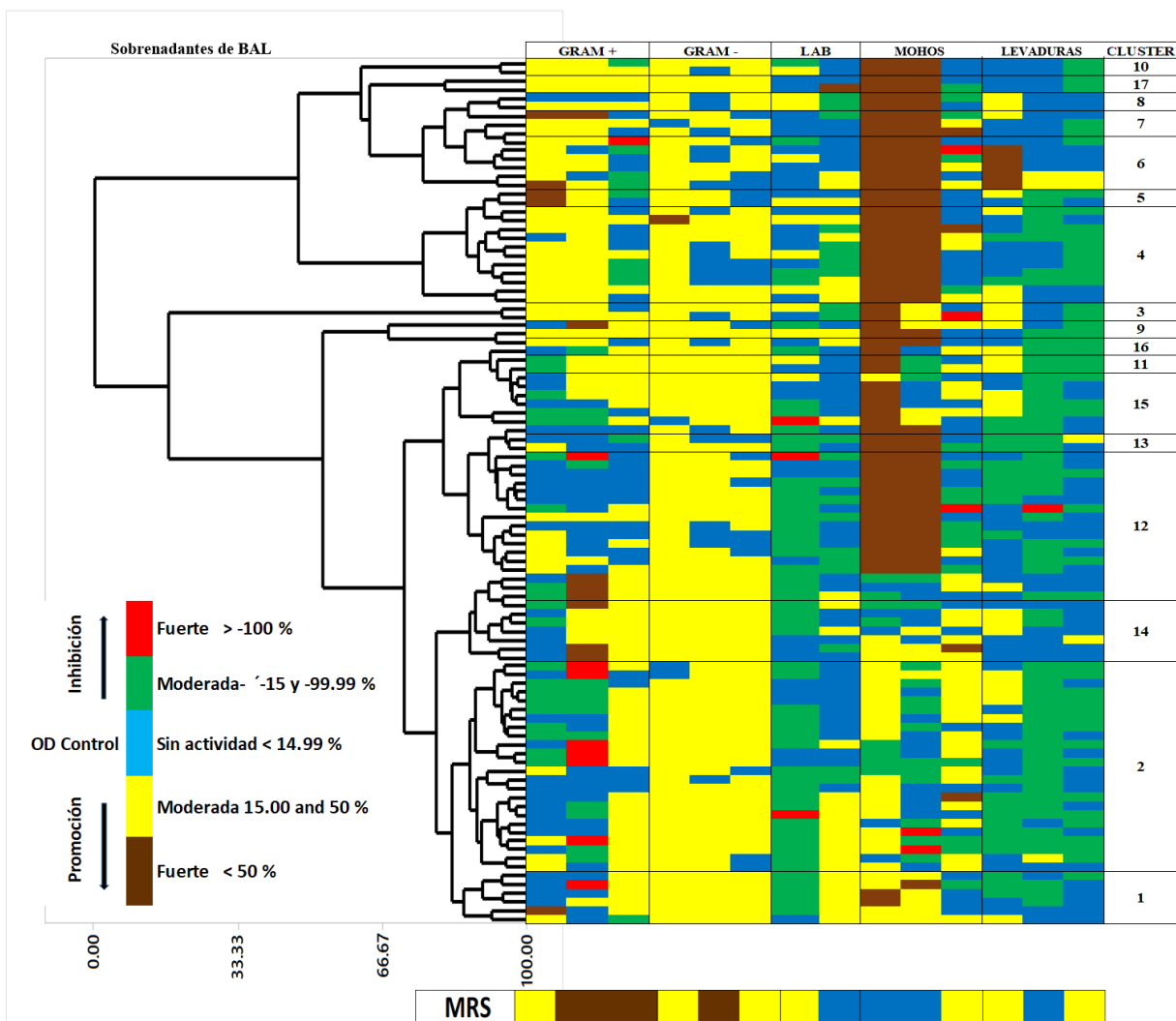


Figura 4. Porcentajes de inhibición de microorganismos indicadores agrupados en Clusters con 85% de similitud.

FECHA	ESTACIÓN	FUENTE	CÓDIGO	GRAM +	GRAM -	BAL	MOHOS	LEVADURAS
06/02/2018	Invierno	Calabacita	CAL14					
06/02/2018	Invierno	Elote	ELO8					
06/02/2018	Invierno	Pimiento	PIM5					
06/02/2018	Invierno	Pimiento	PIM4					
31/11/2017	Otoño	Pepino	PEP12					
31/11/2017	Otoño	Pepino	PEP11					
31/11/2017	Otoño	Jalapeño	JAV15					
31/11/2017	Otoño	Tomate Verde	TOV9					

Figura 5. Sobrenadantes agrupados en el Cluster 2 con actividad inhibitoria contra microorganismos indicadores.

Entre las propiedades más deseables en BAL por sus aplicaciones tecnológicas se encuentran la disminución del pH y la producción de metabolitos antimicrobianos (Abriouel, *et al.*, 2012). Las BAL aisladas de fuentes vegetales en esta investigación mostraron actividad antimicrobiana contra patógenos Gram-positivos (*B. cereus* y *L. monocytogenes*); contra otras BAL (*L. lactis*, *L. casei*); mohos (*F. oxysporum* y *P. expansum*) y levaduras (*C. albicans*, *S. cerevisiae*, *C. tropicalis*). Considerando que los medios de cultivo empleados en la prueba de actividad antimicrobiana (BHI, YM) fueron suplementados con K_2HPO_4 , se logró un efecto amortiguador, evitando la acción antimicrobiana derivada de la disminución del pH debido a la producción de ácido láctico. Por lo tanto, la actividad antimicrobiana puede deberse a que las BAL hayan producido metabolitos antimicrobianos. Sin embargo, tanto *A. niger* como *F. oxysporum* mostraron una fuerte promoción del crecimiento luego de ser incubados en caldo YM amortiguado con K_2HPO_4 y suplementado con el SLC del crecimiento de las BAL agrupados entre los *Clusters* 3 y 17, con excepción del 14. No obstante, estos mohos fueron incubados en el mismo caldo YM amortiguado, pero, en lugar del SLC de las BAL se suplementó con caldo MRS estéril en cuyo caso no mostraron la promoción del crecimiento mostrado anteriormente. Por lo tanto, se puede sugerir que la promoción del crecimiento de *A. niger* y *F. oxysporum* puede deberse a una estimulación causada por los metabolitos contenidos en los SLC producidos por las cepas de BAL.

Entre las BAL seleccionadas por su actividad antimicrobiana (Tabla 10, Figura 6), tres cepas (PIM5, CAL14, PEP12) fueron identificadas molecularmente como *L. mesenteroides*, otras tres fueron identificadas como *E. mundtii* (ELO8, JAV15, TOV9) y las dos últimas (PEP11, PIM4) fueron identificadas como *E. faecium*. Entre los géneros más frecuentemente aislados de frutas crudas y vegetales se cuentan *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus* and *Pediococcus* (Devriese, *et al.*, 2006). El género más comúnmente aislado en plantas es *Leuconostoc* y *L. mesenteroides* es la principal especie asociada a los vegetales frescos. De igual forma, *Enterococci* tales como *E. mundtii* y *E. faecium* han sido reportados con frecuencia como aislados de plantas (Liu, *et al.*, 2014; Di Cagno, *et al.*, 2013; Devriese, *et al.*, 2006). Entre las cepas de *E. mundtii* identificadas, la cepa TOV9 mostró

actividad antimicrobiana contra siete de los microorganismos indicadores (*L. monocytogenes*, *L. lactis*, *F. oxysporum*, *P. expansum*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* and *C. tropicalis*). Se han reportado previamente, cepas de *E. mundtii* aislada de fuentes vegetales con actividad antimicrobiana sobre *L. monocytogenes* (Zhang, et al., 2018; Trias, et al., 2008a). De forma similar, una cepa identificada como *L. mesenteroides* CAL14 demostró la mejor actividad antimicrobiana debido a que inhibió fuertemente el crecimiento de *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *L. lactis*, *F. oxysporum*, *S. cerevisiae* y *C. tropicalis*.

Tabla 10. Identificación molecular de bacterias ácido lácticas aisladas de vegetales frescos, seleccionadas según su actividad antimicrobiana y enzimática.

Fuente	Código	Criterio de selección	pb ¹	% Cubierta de consulta	% Identidad	Cepa relacionada	#Acceso
Maíz	ELO8	a, p, l, c, e	1011	100	100	<i>Enterococcus mundtii</i>	MN636717
Pimiento	PIM5	a	1106	100	99.91	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	MN636704
Calabacita	CAL14	a	574	100	99.83	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	MN636705
Pimiento	PIM4	a, p, l, c, e	897	99	99.11	<i>Enterococcus faecium</i>	MN636718
Jalapeño	JAV15	a, p, l, c	743	100	99.19	<i>Enterococcus mundtii</i>	MN636719
Tomate v.	TOV9	a, l, c, e	1019	100	99.8	<i>Enterococcus mundtii</i>	MN636706
Pepino	PEP11	a	780	100	95.27	<i>Enterococcus faecium</i>	MN636707
Pepino	PEP12	a, p, l, c, e	991	100	99.6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	MN636720
Manzana R.	MR15	p, l, m, c e	881	100	99.66	<i>Enterococcus mundtii</i>	MN636721
Mandarina	MAD3	p, l, m, c, e	1097	100	99.54	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	MN636708
Naranja	NAR1	p, m, c, e	938	99	99.89	<i>Enterococcus mundtii</i>	MN636722
Guayaba	GUA13	p, l, c, e	708	99	99.43	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	MN636709

¹pb: Pares de bases. a: Actividad antimicrobiana, p: proteólisis, l: lipólisis, m: actividad amilasa, c: metabolismo de citrato, e: producción de exopolisacáridos.

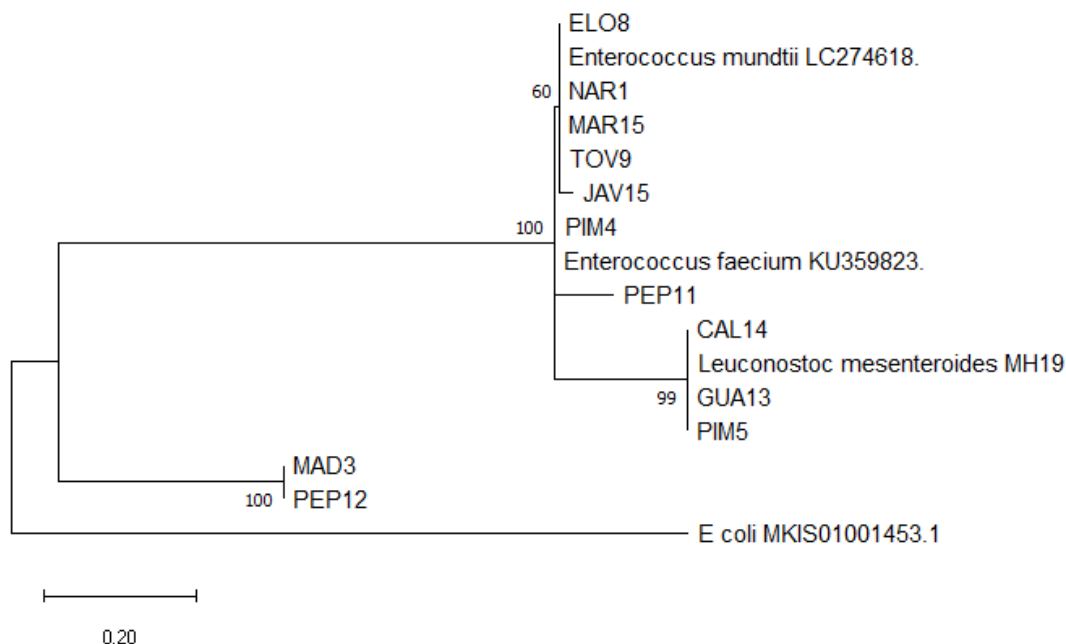


Figura 6. Arbol filogenético de las bacterias ácido lácticas aisladas de vegetales frescos. Las secuencias del gen 16s rDNA fueron alineadas y la distribución evolutiva se infirió aplicando el método de máxima verosimilitud. Se presenta el árbol con mayor probabilidad logarítmica (-1775,71). Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente mediante el uso de algoritmos Neighbour-Join y BioNJ para una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque de máxima probabilidad compuesta, y luego seleccionando la topología con el valor de probabilidad logarítmica superior. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en número de sustituciones por sitio. Este análisis involucró 16 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 366 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en el programa MEGA X.

El aislamiento de cepas de *L. mesenteroides* con capacidad para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* (Zhang, *et al.*, 2018; Verni, *et al.*, 2017; Siroli, *et al.*, 2015; Trias, *et al.*, 2008a; Trias, *et al.*, 2008b) o *B. cereus* (Monika, *et al.*, 2017) también ha sido a menudo reportado. Las cepas de *E. mundtii* y *L. mesenteroides* aisladas en esta investigación no lograron inhibir el crecimiento de *S. aureus*, *E. coli* y *S. typhimurium* aun cuando ha sido ampliamente reportado (Zhang, *et al.*, 2018; Monika, *et al.*, 2017; Salvucci, *et al.*, 2016; Siroli, *et al.*, 2015). De las cepas aisladas identificadas como *E. faecium*, la cepa PIM4 inhibió fuertemente el crecimiento de *B. cereus* y *L.*

monocytogenes, *A. niger*, *F. oxysporum*, *P. expansum*, así como *S. cerevisiae* y *C. tropicalis*.

Evaluación de la Capacidad enzimática.

La actividad enzimática de las 116 cepas de BAL aisladas de fuentes vegetales se muestra en la tabla 11. Un total de 71 cepas (61.2%) mostraron actividad proteasa (Fig 7a), solo 26 (22.4%) fueron positivas para lipasa (Figura 7b), 81 (69.8%) mostraron habilidad para metabolizar el citrato (Figura 7c) y muy pocas (9, 7.8%) pudieron hidrolizar el almidón (Figura 7d).

Tabla 11. Número y porcentaje de Bacterias ácido lácticas con actividad enzimática.

	PROTEASA	LIPASA	CITRATO	AMILASA
Sin actividad	44 (37.9)	90 (77.6)	35 (30.2)	107 (92.2)
Moderada	49 (42.2)	23 (19.8)	41 (35.3)	7 (6)
Alta	22 (18.9)	3 (2.6)	40 (34.5)	2 (1.7)
Total +	71 (61.2)	26 (22.4)	81 (69.8)	9 (7.8)
Total muestras	116	116	116	116

Entre paréntesis, el porcentaje de aislados positivos para cada una de las actividades enzimáticas.

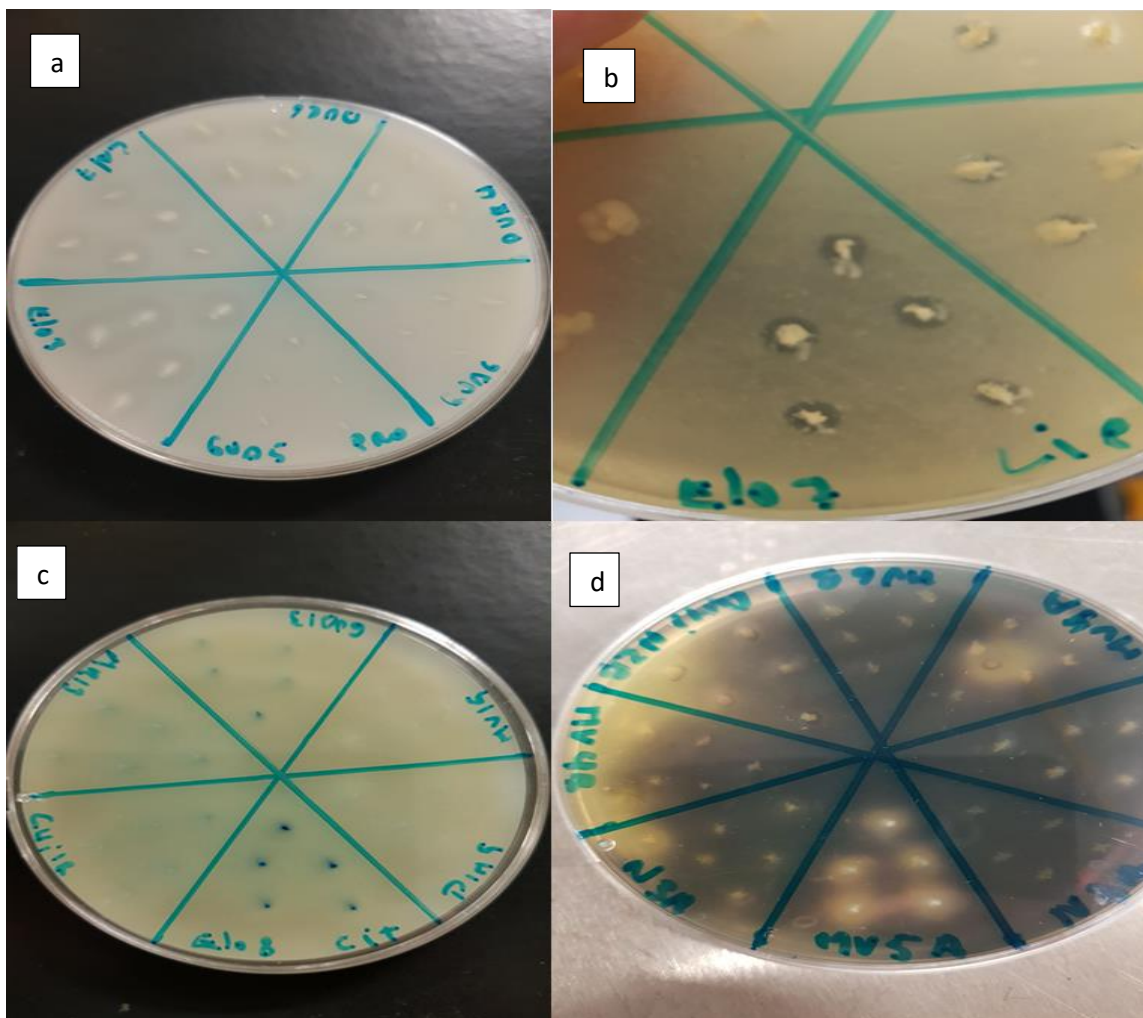


Figura 7. Actividad enzimática de las Bacterias Ácido Lácticas aisladas de fuentes vegetales. A) proteasa, b) lipasa, c) metabolismo de citrato y d) amilasa.

La figura 8, describe el comportamiento enzimático de las BAL con respecto a las cuatro actividades enzimáticas estudiadas (proteasa, lipasa, metabolismo de citrato y amilasa) agrupadas en *Clusters* con un 85% de similitud. Todas las cepas (22) agrupadas en el *Cluster 1* fueron positivas para proteasa, sin embargo, muy pocas cepas fueron capaces de degradar lípidos (9%), metabolizar citrato (18%) e hidrolizar almidón (4.5%). En el *Cluster 2* (35 cepas), el 77% de las cepas pudieron metabolizar el citrato, no obstante, sólo el 17% de estas cepas hidrolizaron proteínas y ninguna mostró actividad lipasa o amilasa.

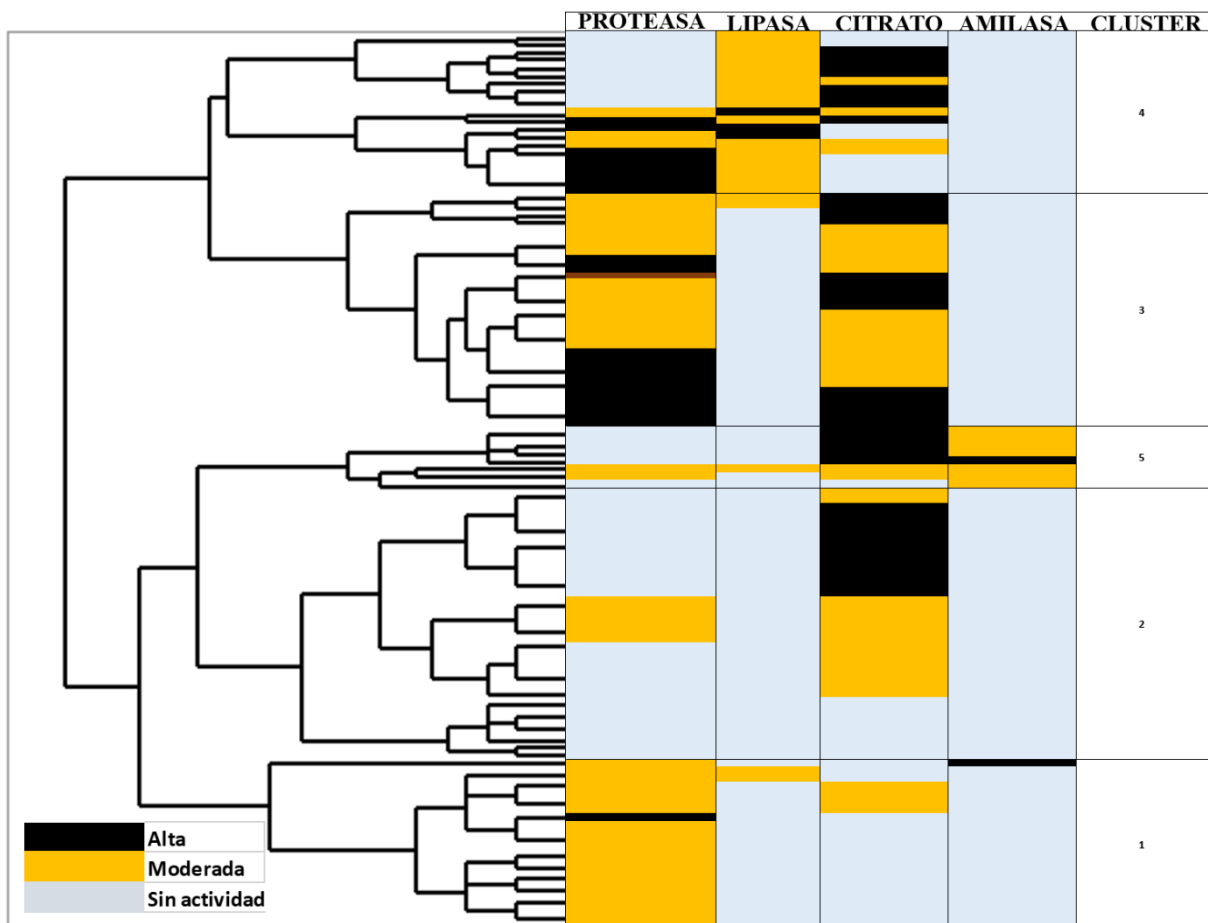


Figura 8. Actividad enzimática de las Bacterias Ácido Lácticas aisladas de fuentes vegetales con un 85% de similitud.

Todas las cepas incluidas en el *Cluster 3* (30) degradaron proteínas y metabolizaron el citrato, aunque, muy pocas (7%) expresaron actividad lipasa y ninguna expresó actividad amilasa. Adicionalmente, las cepas ELO8 y PEP12 aisladas de elote y pepino respectivamente, fueron las únicas cepas de este *Cluster* que mostraron tres capacidades enzimáticas (hidrolizaron la caseína y el ácido tributírico y metabolizaron el citrato). A pesar de que todas las cepas incluidas en el *Cluster 4* (21) pudieron degradar lípidos, sólo la mitad degradó proteínas y metabolizó el citrato y ninguna mostró actividad amilasa. De este *Cluster*, resaltan cepas aisladas de guayaba (GUA13), jalapeño verde (JAV15), manzana roja (MAR15) y pimienta (PIM4), las cuales expresaron tres de las cuatro actividades enzimáticas evaluadas (proteasa, lipasa y metabolismo del citrato). El *Cluster 5*, agrupó la menor cantidad de cepas (8). Todas fueron capaces de hidrolizar el almidón, casi todas (87.5%) metabolizaron

citrato, aunque, muy pocas mostraron actividad proteasa (25%) y lipasa (12.5%). De este *Cluster*, resalta una cepa aislada de mandarina (MAD3), la cual expresó moderadamente las cuatro capacidades enzimáticas evaluadas y una cepa obtenida de naranja (NAR1) positiva para proteasa, metabolismo de citrato y amilasa.

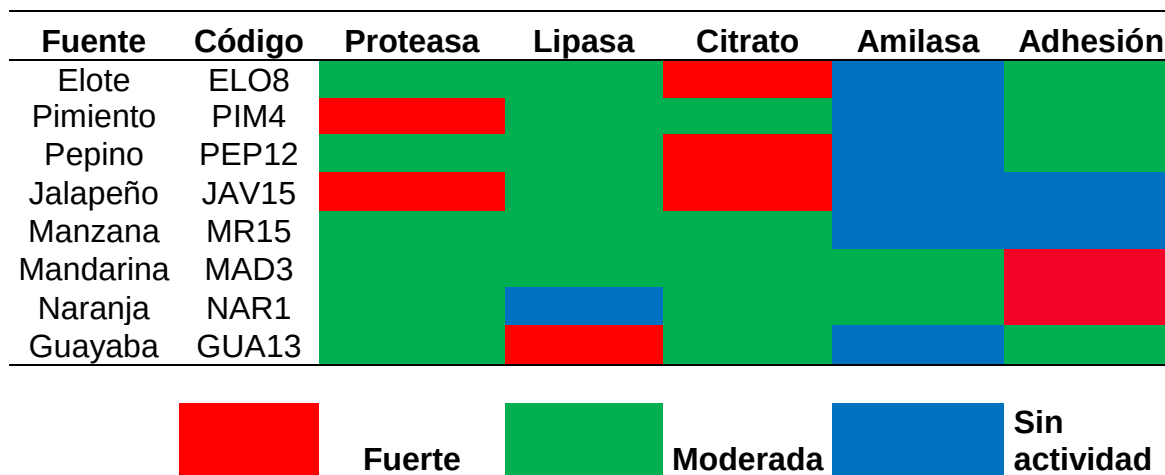


Figura 9. Cepas de BAL seleccionadas para ser identificadas molecularmente de acuerdo a su actividad enzimática.

Las cepas agrupadas en la figura 9, son las cepas que mostraron mayor cantidad de actividades enzimáticas, por lo tanto, fueron seleccionadas para ser identificarlas molecularmente (Tabla 10). Las muestras de vegetales colectadas fueron una muy buena fuente de presuntas cepas de BAL con actividades enzimáticas de importancia. Las enzimas evaluadas tienen la capacidad de optimizar características organolépticas de productos alimenticios como, por ejemplo, pueden mejorar el sabor, la textura o incluso pueden mejorar las características nutricionales debido a la liberación de aminoácidos esenciales. También pueden aprovecharse para la obtención de sustancias de importancia para la industria, como lo son el ácido láctico o el diacetilo (Comasio, *et al.*, 2019; Unban, *et al.*, 2017) o para la producción de enzimas que pueden emplearse a escala industrial como las amilasas (Unban, *et al.*, 2017; Konkitt y Kim, 2016).

Entre las ocho BAL seleccionadas por sus capacidades enzimáticas, cuatro fueron identificadas como *E. mundtii* (ELO8, JAV15, MAR15, NAR1), tres fueron identificadas como *L. mesenteroides* (MAD3, PEP12, GUA13) y una correspondió a *E. faecium* (PIM4). Todas las cepas seleccionadas, exhibieron al menos tres actividades enzimáticas y produjeron exopolisacáridos. La cepa MAD3, identificada como *L. mesenteroides*, mostró las cuatro actividades enzimáticas evaluadas y además, produjo exopolisacáridos.

Las cepas de BAL aisladas de fuentes proteicas deberían tener la capacidad de producir proteasas, tal y como lo reporta Sáez *et al.* (2017), quienes aislaron BAL con actividad proteasa a partir de frijoles. Así mismo, las BAL aisladas de sustratos no proteicos, es de esperarse que no expresen ninguna actividad proteasa, lo cual también ha sido reportado por Abriouel *et al.* (2012) quienes aislaron BAL sin actividad proteasa de las salmueras de aceite de oliva. Aunque las BAL obtenidas en la presente investigación provienen de fuentes no proteicas más de la mitad de las cepas desarrollaron actividad proteasa. Estos aislados muestran potencial tecnológico para la manufactura de productos lácteos y carnes fermentadas. Todas las BAL seleccionadas por su actividad enzimática (*E. mundtii*, *E. faecalis* y *L. mesenteroides*) mostraron actividad proteasa. El aislamiento de cepas proteolíticas de *E. faecalis*, *E. faecium* y *L. mesenteroides* a partir de fuentes vegetales no proteicos ha sido reportada anteriormente (Monika, *et al.*, 2017; Salvucci, *et al.*, 2016; Sonar y Halami, 2014). La capacidad para producir proteasas es una característica de gran importancia para las aplicaciones tecnológicas debido a que las cepas proteolíticas tienen la habilidad de aumentar los atributos de los alimentos. Por ejemplo, pueden aumentar la cantidad de aminoácidos libres o mejorar el sabor ya que los aminoácidos liberados pueden actuar como agentes saborizantes. Además, pueden aumentar la digestibilidad de polipéptidos y también pueden liberar péptidos bioactivos con muchas utilidades entre las que se cuentan antihipertensivo, antiinflamatorio, antioxidante, antialérgico, etc. (Sáez, *et al.*, 2017; Verni, *et al.*, 2017).

Poco más de la cuarta parte de las BAL aisladas mostraron actividad lipolítica, de los cuales el 19.8% presentó actividad moderada. Sin embargo, una actividad lipolítica de

moderada a ausente en BAL ya ha sido reportada (Nediani, *et al.*, 2017; Sonar y Halami, 2014; Serio, *et al.*, 2010). De los aislamientos seleccionados para la identificación molecular y que presentaron actividad lipolítica se encuentran *E. mundtii* (ELO8, JAV15, MAR15), *L. mesenteroides* (PEP12, MAD3, GUA13) y *E. faecium* (PIM4). La actividad lipolítica es una característica de gran utilidad en la industria quesera ya que participa en la maduración del queso convirtiendo a los triglicéridos presentes en moléculas más simples como ácidos grasos o mono y diglicéridos (Taboada, *et al.*, 2015; Devriese, *et al.*, 2006). También puede sintetizar ésteres durante la última fase de maduración, etapa en la cual la actividad de agua es baja (Taboada, *et al.*, 2015). Los productos que resultan de la actividad lipolítica sobre la grasa láctea mejoran el aroma de los productos lácteos, dándole los aromas característicos a muchas variedades de quesos (Nediani, *et al.*, 2017).

En relación con metabolismo del citrato, casi tres cuartas partes del total de las cepas lograron metabolizar el citrato presente en el medio de cultivo. Adicionalmente, todos los aislamientos escogidos para la identificación molecular metabolizaron citrato. Estas cepas de BAL tienen la capacidad de producir los sabores cremosos y sabores a mantequilla gracias a que durante el metabolismo del citrato producen diacetilo y acetoína los cuales aportan estos sabores. Estos sabores y aromas característicos son un atributo sensorial significativo que deben tener los productos lácteos (Laroute, *et al.*, 2017; Liu, *et al.*, 2014) el chocolate y sus productos (Ouattara, *et al.*, 2017) e incluso el pan de masa agria fermentada (Comasio, *et al.*, 2019). Varias cepas de *L. mesenteroides* han sido reportadas como productoras de diacetilo (Liao, *et al.*, 2016; Martino, *et al.*, 2016) y acetoína (Ouattara, *et al.*, 2017). Cepas de *E. faecium* también son consideradas de gran utilidad en la elaboración de quesos debido a que pueden producir sabores deseables gracias al metabolismo de citrato (Martino, *et al.*, 2016). La liberación de aminoácidos, mono y diacilglicéridos así como la producción de acetaldehído, acetoína y diacetilo son productos importantes durante la maduración del queso (Liu, *et al.*, 2014; Devriese, *et al.*, 2006); por lo tanto, *L. mesenteroides* es considerada una de las BAL más valoradas desde el punto de vista económico para la industria quesera (Liu, *et al.*, 2014). A pesar de que el *E. faecium* es una BAL considerada patógena, también se ha demostrado su participación en la producción

de metabolitos que aportan sabores particulares ayudando a mejorar el sabor del queso como producto final (Martino, *et al.*, 2016).

En cuanto a la actividad amilolítica, las BAL no han sido asociadas con frecuencia a esta actividad, sin embargo, se han reportado algunas BAL con actividad amilolítica aisladas de sustratos ricos en almidón (Carrizo, *et al.*, 2017; Monika, *et al.*, 2017; Unban, *et al.*, 2017). No obstante, 9 cepas que representan el 7.8% de los aislamientos fueron capaces de hidrolizar el almidón contenido en el medio de prueba. De las cepas seleccionadas para identificación molecular, solo la cepa *L. mesenteroides* MAD3 y la cepa *E. mundtii* NAR1 mostraron actividad amilolítica aun cuando fueron aisladas de fuentes de bajo contenido de almidón. Las amilasas se pueden expresar cuando el almidón está presente en el sustrato, además, la eficiencia de la enzima aumenta a medida que aumenta el contenido de almidón en el sustrato como lo reportan (Unban, *et al.*, 2017) quienes lograron mejorar la eficiencia de amilasas en concentraciones de hasta 150 g/L de almidón. Por lo tanto, la efectividad de la hidrólisis de las BAL aisladas pudiera mejorarse, ya que el medio de prueba para determinar la actividad amilasa contenía solo 10 g/L de almidón. Las amilasas son enzimas de importancia para la manufactura de papel, telas, alimentos, medicinas y productos fermentados. Además, las BAL con alta actividad amilasa pueden ser empleadas para la producción de ácido láctico evitando los pasos de hidrólisis, haciendo el proceso más económico (Unban, *et al.*, 2017).

Capacidad de adhesión.

La figura 10 muestra la distribución de los resultados de la capacidad de adhesión. El 54% de las cepas mostraron adhesión de moderada a fuerte, de las cuales, 32 % tuvieron adhesión fuerte. Cabe destacar, que de las cepas anteriormente seleccionadas por mostrar varias capacidades enzimáticas, ELO8, PEP12, GUA13 y PIM4 mostraron capacidad de adhesión moderada mientras que JAV15 y MAR15 expresaron capacidad de adhesión débil. La cepa MAD3, también desarrolló una fuerte capacidad de adhesión además de las cuatro capacidades enzimáticas evaluadas.

Más de la mitad de las presuntas BAL y seis de las ocho cepas seleccionadas para identificación molecular (*E. mundtii* ELO8 y NAR1; *L. mesenteroides* PEP12, MAD3 y GUA13; *E. faecium* PIM4) produjeron exopolisacáridos. La producción de exopolisacáridos es una característica que depende del carbohidrato empleado como sustrato. Sin embargo, se ha reportado cepas de *L. mesenteroides* aisladas de vegetales como productoras de exopolisacáridos en medios suplementados con glucosa (Fessard y Remize, 2019; Carrizo, et al., 2017; Verni, et al., 2017; Manini, et al., 2016).

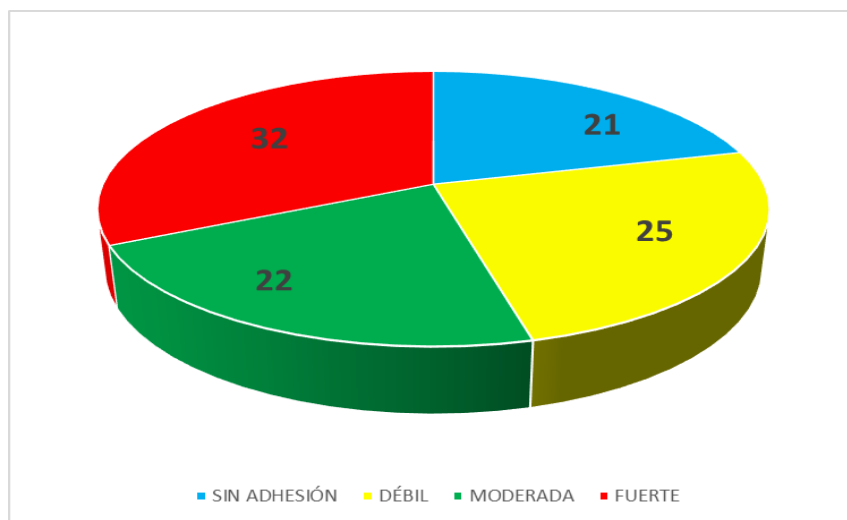


Figura 10. Porcentajes de la prueba de adhesión de las Bacterias ácido lácticas aisladas de fuentes vegetales.

Así mismo, se ha reportado *E. mundtii* como productora de exopolisacáridos en sustratos con glucosa (Carrizo, et al., 2017) mientras que no hay reportes de *Enterococcus* spp. (Verni, et al., 2017). Monika et al. (2017), indican que varias cepas de *E. faecalis* y *L. mesenteroides* aisladas de encurtidos tradicionales de la India produjeron exopolisacáridos aun cuando se trata de sustratos bajos en almidón. Domingos-Lopes, et al., (2018) señalan que las cepas de *Leuconostoc* generan mayormente homopolisacáridos a partir de glucosa (glucanos). Para la industria de alimentos, las cepas de BAL productoras de exopolisacáridos son de mucha importancia en vista de que pueden mejorar las características organolépticas y la

estabilidad en ciertos alimentos. En consecuencia, las BAL son empleadas como cultivos iniciadores o coadjuvantes en la manufactura de productos fermentados con alta viscosidad como los productos lácteos o incluso en la elaboración de purés y smoothies (Fessard y Remize, 2019; Carrizo, *et al.*, 2017). La producción de exopolisacáridos es una característica deseable en BAL empleadas como probióticos debido a que la adhesión y colonización del tracto gastrointestinal se realiza con la ayuda del exopolisacárido que producen (Michalak, *et al.*, 2018).

Formulación de medios de cultivo

Se formularon medios de cultivo similares al caldo MRS sustituyendo las fuentes de carbono, nitrógeno y peptona con la finalidad de evaluar su influencia en la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes del crecimiento de las BAL. Para ello, se sustituyó la glucosa del medio MRS por bagazo de manzana en cantidades de carbono equivalentes. El extracto de levadura se reemplazó por agua de levadura en cantidades similares de nitrógeno. Con ambos ingredientes, el Tween 80 y las sales del medio MRS en las mismas cantidades utilizadas en la formulación del medio se elaboró un “medio base” con el cual se formularon tres medios de cultivo agregando una fuente de proteínas diferente para sustituir la peptona el extracto de carne. Estas fuentes fueron: avena forrajera, suero de leche y harina de pescado en cantidades de nitrógeno similares a las aportadas por la peptona y el extracto de carne.

Todos los desechos agroindustriales empleados en este trabajo de investigación habían sido evaluados anteriormente con éxito como sustratos para la fermentación ácido láctica. Por ejemplo, el bagazo de manzana fue evaluado con éxito en la producción de ácido (Gullón, *et al.*, 2008), el agua de levadura se evaluó efectivamente como sustrato para la producción de proteasa (Mathias, *et al.*, 2017). La avena forrajera se evaluó satisfactoriamente durante el proceso de ensilado con BAL (Zhang, *et al.*, 2018). Un hidrolizado de vísceras de pescado se empleó para evaluar el crecimiento de BAL exitosamente (Vázquez *et al.*, 2004). Por último, el suero de leche se ha evaluado como sustrato para producción de bacteriocinas por BAL (Sabo, *et al.*, 2019).

El contenido de azúcares reductores, nitrógeno y proteínas de los cinco desechos agroindustriales empleados para la formulación de los medios de cultivo equivalentes al caldo MRS fueron caracterizados y los resultados se muestran en la tabla 12. El BM presentó el mayor contenido de azúcares reductores ($62.41\% \pm 0.06$), seguido por el agua de levadura ($9.84\% \pm 0.00$) y la harina de pescado ($6.69\% \pm 0.02$). Los desechos agro-industriales con mayor contenido de nitrógeno fueron el AL ($4.52\% \pm 0.33$) y la HP ($3.99\% \pm 0.11$).

Tabla 12. Caracterización en porcentajes de los desechos agroindustriales empleados para la formulación de tres medios de cultivo similares al caldo MRS.

Variable	BM	AL	AF	SL	HP
Azúcares reductores	62.41 ± 0.06	9.84 ± 0.00	2.49 ± 0.01	0.01 ± 0.00	6.69 ± 0.02
Nitrógeno	0.66 ± 0.21	4.52 ± 0.33	1.7 ± 0.03	0.16 ± 0.01	3.99 ± 0.11
Proteína	4.79 ± 0.9	28.25 ± 2.07	10.63 ± 0.22	1.02 ± 0.32	24.91 ± 0.70

BM: Bagazo de manzana, AL: Agua de levadura, AF: Avena forrajera, SL: Suero de leche, HP: Harina de pescado.

El contenido de nitrógeno del suero de leche fue muy bajo ($0.16\% \pm 0.01$). Basándose en estos resultados se formuló el medio base y los tres caldos de cultivo (Tabla 13). A pesar de la formulación se realizó sustituyendo los ingredientes por desechos agroindustriales en cantidades equivalentes de carbono o nitrógeno de acuerdo al ingrediente sustituido, la relación C/N de los tres medios formulados fue ligeramente inferior a la relación C/N del medio MRS.

El crecimiento de las BAL ha sido bien sustentado por el bagazo de manzana como fuente de carbono ya que representó una buena fuente de azúcares reductores. Aunque el porcentaje de azúcares varía de acuerdo con la variedad de manzana y al

método empleado para obtener el jugo (Mamma, et al., 2009) el contenido de azúcares reductores fue muy cercano a lo reportado por Gullón et al. (2008).

Tabla 13. Caracterización en porcentajes de los desechos agroindustriales empleados para la formulación de tres medios de cultivo similares al caldo MRS.

Ingrediente	Medio				Nutriente	
	MRS	CAF	CSL	CHP	Carbono	Nitrógeno
Extracto de levadura	5				~ 0.5	~0.5
Glucosa	20				8	0
Peptona	10				~3	~1.4
Extracto de carne	10				~3	~1
Tween 80	1	1	1	1	0.59	0
Citrato de Amonio	2	2	2	2	0.64	0.99
Acetato de Sodio	5	5	5	5	0.88	0
Sulfato de Magnesio	0.2	0.2	0.2	0.2	0	0
Sulfato de Manganeso	0.05	0.05	0.05	0.05	0	0
Fosfato Dipotásico	2	2	2	2	0	0
Agua de levadura		11 mL	11 mL	11 mL	0.5	0.5
Bagazo de manzana		32.01	32.01	32.01	8	0.2
Avena forrajera		141			3.51	2.4
Suero de leche			1000 mL		0.1	1.6
Harina de pescado				60	4	2.4
C/N	4.06	3.43	3.22	3.55		

CAF: Caldo avena forrajera. CSL: Caldo suero de leche. CHP: Caldo harina de pescado.

Tomando en cuenta la concentración de azúcares reductores en el BM, se agregó al medio base la cantidad necesaria para igualar el contenido de carbono aportado por la glucosa en el medio MRS (8 g C /L). La fructosa es el mayor componente de los azúcares contenidos en el BM (Gullón, *et al.*, 2008).

Cuando está presente en el medio de cultivo, *L. mesenteroides* tiene la capacidad de emplear una parte como aceptor de electrones, reduciendo la fructosa a manitol, por lo tanto, adquiriendo energía, y la otra parte la puede utilizar para producir ácido láctico, ácido acético y pequeñas cantidades de etanol. La fructosa también promueve el crecimiento de BAL cuando se encuentra combinada con otros azúcares como la glucosa; una cepa de *Lactobacillus amylovorus* mostró la misma tasa de crecimiento en un medio con una mezcla de glucosa y fructosa que solo con glucosa como fuente de carbono (Leroy, *et al.*, 2006). Sumado a esta capacidad metabólica, las BAL pueden transformar oligosacáridos en azúcares simples que pueden ser aprovechados fácilmente. Por ejemplo, las BAL son capaces de obtener fructosa a partir de los fructanos presentes en el BM (Filannino, *et al.*, 2018). Por lo tanto, un ingrediente como el BM, el cual está compuesto por una mezcla de azúcares tiene la capacidad de mantener el crecimiento de BAL. Las proteínas también forman parte del BM, sin embargo, su contenido es muy bajo (Mamma *et al.*, 2009) como lo confirman los resultados.

El extracto de levadura es una excelente fuente de carbono y nitrógeno, no obstante, sus contenidos pueden variar de acuerdo con su estado fisiológico y la fase de crecimiento en la que se encuentre (Mamma, *et al.*, 2009). El contenido de proteínas del AL fue inferior (52.7%) a lo reportado por Mathias *et al.* (2015). Sin embargo, se realizaron los cálculos para adicionar la cantidad necesaria para igualar la cantidad de nitrógeno y carbono que provee el extracto de levadura en el medio MRS. El extracto de levadura es un ingrediente rico en proteínas solubles debido a la autólisis de las levaduras durante la etapa final de la fermentación y durante el proceso de esterilización (Mathias, *et al.*, 2015). También, es fuente de aminoácidos como lisina, leucina, isoleucina y triptófano, además de vitaminas del grupo B, bases púricas y pirimidínicas y minerales. Todos estos nutrientes promueven el crecimiento de las BAL

durante la fermentación (Veeravalli y Mathews, 2018; Mathias, *et al.*, 2015; Bustos, *et al.*, 2004). El desecho de levaduras de la industria cervecera ya ha sido ensayado exitosamente en el cultivo de BAL, logrando incrementar su biomasa, reduciendo el tiempo de fermentación (Mamma *et al.*, 2009) y favoreciendo el consumo total de glucosa y fructosa (Gullón, *et al.*, 2008). Por otra parte, el desecho de levadura de cerveza tiene una relación de C/N baja debido a su alto contenido de carbono el cual influye en las células aumentando la biomasa, de ahí su importancia como ingrediente para medios de cultivo (Mathias, *et al.*, 2015).

Otra característica importante de las BAL es la capacidad de producir péptidos bioactivos a bajo costo por hidrólisis enzimática a partir de desechos agro-industriales utilizando BAL con capacidad proteolítica (Worsztynowicz, *et al.*, 2020). Liu *et al.* (2014), explican que las BAL poseen un Sistema proteolítico compuesto por proteínasas de pared celular las cuales hidrolizan proteínas en oligopéptidos. También poseen transportadores de péptidos encargados de transferir los péptidos a través de la pared celular y numerosas peptidasas intracelulares que degradan los péptidos transferidos en péptidos más pequeños y aminoácidos. Esta degradación proteica se ve favorecida por la producción de ácido láctico ya que altera la estructura de las proteínas incrementando la actividad de las proteasas (Nediani, *et al.*, 2017). Los desechos agro-industriales favorecen la actividad antimicrobiana dependiendo de fuente de proteínas y de la cepa de BAL. El contenido de proteínas totales en la HP fue inferior a lo reportado anteriormente por Vázquez *et al.* (2019), en desechos de pescado (31.3 to 43 g/L). No obstante, se realizaron los cálculos para agregar la cantidad de HP necesaria para igualar la cantidad de nitrógeno que proveen la peptona y el extracto de carne en el medio MRS.

Por su parte, el contenido de nitrógeno por litro en el SL fue mucho menor al aportado por la peptona y el extracto de carne agregado al medio MRS. Por lo que el caldo fue preparado añadiendo todos los ingredientes al SL sin añadir agua. El suero de leche, contiene una cantidad significativa de proteínas, aminoácidos, lípidos, vitaminas y minerales como calcio, potasio, sodio y sales de magnesio, además de la lactosa (Boumaiza, *et al.*, 2018; Kasmi, *et al.*, 2017; Ryan y Walsh, 2016) todos disponibles

para el crecimiento de las BAL. Además de la capacidad para utilizar la lactosa presente en el sustrato, el sistema proteolítico de las BAL es capaz de liberar péptidos antimicrobianos contenidos en las proteínas del suero (Worsztynowicz, *et al.*, 2020; Théolier, *et al.*, 2013) como caseína, β -lactoglobulina, α -lactalbumina y albúmina sérica. El SL, además de ser adecuado para el crecimiento de las BAL, también se ha reportado que pueden producir bacteriocinas en medios enriquecidos con suero (Sabo, *et al.*, 2019). Sin embargo, enzimas como lactoferrina, lactoperoxidasa y lisozima contenidas en el suero han demostrado ejercer actividad antimicrobiana (Chalermthai, *et al.*, 2019; Théolier, *et al.*, 2013). Esto fue confirmado cuando los microorganismos indicadores fueron incubados con los medios estériles donde *C. albicans* y *S. cerevisiae* fueron inhibidos parcialmente por el CSL.

Con respecto a la AF, su contenido de nitrógeno fue acorde a los resultados reportados por (Kafilzadeh y Heidary, 2013; Zhang, *et al.*, 2018). La AF es un sustrato adecuado para la fermentación ácido láctica en el cual se ha reportado el aislamiento de BAL, está constituido por una excelente cantidad de proteínas, carbohidratos y minerales capaces de fomentar el crecimiento de las BAL (Kafilzadeh y Heidary, 2013; Zhang, *et al.*, 2018).

La relación C/N de los tres medios formulados CHP (3.55), CAF (3.43) y CSL (3.22) fueron ligeramente menores a la relación C/N del medio MRS (4.06), a pesar de que los contenidos de carbono del BM y carbono y nitrógeno del AL y nitrógeno de las fuentes de proteína HP, SL y AF. Sin embargo, la cantidad de carbono de las fuentes de proteína fueron inferiores a lo aportado por la peptona y el extracto de levadura. La relación C/N es una característica muy relevante para que los medios de cultivo puedan alcanzar un crecimiento adecuado. El carbono es aprovechado por las BAL para producir energía y las fuentes de nitrógeno, vitaminas y minerales son utilizadas para la producción de biomasa, ácido láctico y para el mantenimiento de las células (Veeravalli y Mathews, 2018; Wang, *et al.*, 2015). Un medio de cultivo con una relación C/N alta puede ser útil para la producción de metabolitos bioactivos por BAL con capacidad proteolítica (Mathias, *et al.*, 2015).

Actividad antimicrobiana en los medios de cultivo formulados

La actividad antimicrobiana de los SLC del crecimiento de BAL en medios formulados con desechos agroindustriales, contra microorganismos indicadores se muestra en la tabla 14. El sobrenadante proveniente del crecimiento de la cepa *L. mesenteroides* PIM5 en CAF fue el único que logró reducir moderadamente el crecimiento de más de dos microorganismos indicadores, entre ellos: *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* y *C. tropicalis*. En el CSL, las BAL mostraron mayor actividad antimicrobiana que en el CAF (Tabla 14). El SLC de la cepa *L. mesenteroides* PIM5 mostró de nuevo la mayor actividad antimicrobiana entre las BAL evaluadas. Esta cepa logró inhibir moderadamente el crecimiento de cinco microorganismos indicadores (*B. cereus*, *L. monocytogenes*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* and *F. oxysporum*). No obstante, los SLC de las cepas *E. faecium* PIM4, *E. mundtii* TOV9 y *L. mesenteroides* PEP12 inhibieron moderadamente el crecimiento de *B. cereus*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* y *C. tropicalis* como se puede observar en la tabla 14. La actividad antimicrobiana de las BAL en el CHP fue ligeramente mayor a la mostrada en el CSL. La cepa *L. mesenteroides* CAL14 logró inhibir completamente el crecimiento de *L. monocytogenes* y fuertemente el crecimiento de *B. cereus*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* y *C. tropicalis*. Además, la cepa *L. mesenteroides* PIM5 presentó de nuevo inhibición moderada del crecimiento de *L. monocytogenes*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* y *C. tropicalis*. Con respecto a la actividad antimicrobiana de los SLC provenientes del crecimiento de las LAB en caldo MRS (Tabla 14), la cepa *L. mesenteroides* CAL14 inhibió el crecimiento de las levaduras (*C. albicans*, *S. cerevisiae* y *C. tropicalis*) y los mohos (*A. niger*, *F. oxysporum*, *P. expansum*). Así mismo, las cepas *E. mundtii* ELO8 y *L. mesenteroides* PIM5 fueron capaces de inhibir moderadamente el crecimiento de *L. monocytogenes*, *S. cerevisiae* y los mohos (*A. niger*, *F. oxysporum*, *P. expansum*).

Tabla 14. Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células de las bacterias ácido lácticas inoculadas en medios formulados con desechos agro-industriales.

	CAF							
	ELO8	PIM5	CAL14	PIM4	JAV15	TOV9	PEP11	PEP12
Bc	-8.2±10 ^{abc}	33.5±4.5 ^{ab}	-14.7±20.2 ^{abc}	-5.9±4.4 ^{abc}	-84.5±13.9 ^{cd}	-84.1± 18.2 ^{cd}	-27.1±13.4 ^{bcd}	-16.3±18.9 ^{abc}
Lm	15±2 ^{ab}	46.7±8.6 ^{ab}	-27.7±19.4 ^{abc}	-154.1±18.8 ^{cd}	-3.9±31.1 ^{ab}	4.8±27.6 ^{ab}	-132±23.2 ^{bc}	-21.5±15.8 ^{abc}
Sa	-549±78.2 ^d	-255±70.9 ^{cd}	-81.3±22.4 ^{abc}	-116.3±44.2 ^{abc}	-30.6±24.6 ^{ab}	-9.7±24.2 ^{ab}	-215.6±10.2 ^{bc}	-66.3±9 ^{abc}
Ca	5.2±1.9 ^a	39±5.5 ^a	9.17±5.5 ^a	-0.6±8.7 ^a	24.9±13.8 ^a	21.7±17.4 ^a	3.1±18.5 ^a	10.6±20.2 ^a
Sc	-2.2±5.9 ^a	45.2±14.9 ^a	9.64±2.5 ^a	-1.5±22.3 ^a	13.3±14.6 ^a	14.2±17.4 ^a	-1.4±14.2 ^a	19.3±20 ^a
Ct	-72.3±15.4 ^{ade}	49.2±15.1 ^{cde}	6.58±13.9 ^{bcd}	-3.6±13.1 ^{abcde}	10.3±5.8 ^{bcd}	10.6±9.8 ^{bcd}	-24.9±2.2 ^{abcde}	18.6±5.6 ^{bcd}
An	-1.5±5.6 ^{ab}	-41.6±15.5 ^{abc}	0.2±1.1 ^{ab}	29.2±25.2 ^{ab}	-111.1±23.3 ^{cde}	-138.7±12.5 ^{de}	-68.7±4.9 ^{bcd}	-70.6±4.5 ^{bcd}
Fo	13.4±11.5 ^{abc}	6.1±6.6 ^{abc}	-4.4±6.1 ^{abc}	-3.4±8.15 ^{abc}	-103.6±37.8 ^{cde}	-94.1±43.7 ^{cde}	-30.3±38.3 ^{abc}	-77.8±14.7 ^{bcd}
Pe	7.4±13.1 ^a	-14.5±5.1 ^a	-24.7±27.1 ^a	-27.4±10.3 ^a	-215.1±66.3 ^b	-218.5±47.7 ^b	-153.5±50.6 ^b	-209.2±31.4 ^b
	CSL							
Bc	5±8.5 ^a	39.5±6.6 ^a	47.9±27.4 ^a	56.2±22.7 ^a	7±39.9 ^a	19.3±47.7 ^a	15.5±17.5 ^a	25.5±1.7 ^a
Lm	20.7±12.1 ^{abc}	45.9±4.3 ^{abc}	56.5±34.9 ^a	-54±58.6 ^{abc}	-1.1±4.5 ^{abc}	-44.3±99.6 ^{abc}	-69.9±40.3 ^c	13.9±8.1 ^{abc}
Sa	-572.6±112.2 ^b	-459.1±20 ^b	-57.5±38.4 ^a	-64.8±12.2 ^a	-54.8±16 ^a	-76.3±27.9 ^a	-166.6±18 ^a	-73±14 ^a
Ca	4.1±1.4 ^{abc}	34.4±7.7 ^{ab}	6.8±20 ^{abc}	40.5±4.6 ^{ab}	31.1±7.2 ^{abc}	35.4±7.7 ^{ab}	-9.2±21.7 ^{ac}	39.5±5.7 ^{abc}
Sc	12.3±2 ^a	43.1±11.5 ^a	14.9±9.7 ^a	15.8±8.2 ^a	30.7±10.7 ^a	32.7±10.8 ^a	19.5±15.3 ^a	47.2±6 ^a
Ct	-31.5±29.9 ^{cde}	13.6 ± 3.7 ^{abcde}	48.7± 1.1 ^{abc}	34.7±16.5 ^{abcd}	23.3±3.1 ^{abcd}	26.7 ± 6.2 ^{abcd}	-8.2 ± 11 ^{bcd}	32.5±3.6 ^{abcd}
An	-128.3±2.9 ^{cd}	-2.3±12.6 ^{ab}	-202.8±44.6 ^e	-13.8±14.8 ^{ab}	-79.7±31.7 ^{bcd}	-117.7±29.9 ^{cd}	-92.2±7.5 ^{bcd}	-50.9±2.8 ^{abc}
Fo	16±7.2 ^a	23.3±3.4 ^a	-3.6±4.9 ^a	-2.8±4.6 ^a	-129.6±19.7 ^b	-114.5±30.1 ^b	-9±19.3 ^a	-24.2±17.4 ^a
Pe	-1.1±3.3 ^a	6.3±11.9 ^a	-33.7±2.7 ^a	-29.9±7.3 ^a	-155.5±66 ^b	-171.1±50.6 ^b	-172±7.2 ^b	-117.3±3.2 ^b
	CHP							
Bc	0.0±7.8 ^{ab}	-20.8±17.9 ^{abc}	91.1±20.6 ^d	11.7±23.7 ^{ab}	-62.8±7.7 ^{bc}	-60.8±8.8 ^{bc}	-22.8±11.5 ^{abc}	-15.9±9.5 ^{bcd}
Lm	0.8±8.3 ^{abc}	27.9±21 ^{abc}	114.2±53.5 ^{ab}	-127.3±39.6 ^{cd}	18.7±49.1 ^{abc}	17.8±38 ^{abc}	-63.4±99.8 ^{bc}	4.6±72.7 ^{abc}
Sa	-380.2±42.6 ^c	-255±70.9 ^{bc}	-11.8±22.4 ^{ab}	-127.3±33.8 ^{ab}	5.4±28 ^{ab}	-3.2±14.2 ^{ab}	-121±112 ^{ab}	-63±121.7 ^{ab}
Ca	26±5.3 ^{bcd}	39±5.5 ^{abcde}	74.6±2.6 ^{abc}	25.1±12 ^{bcd}	75.5±3.6 ^{abc}	67.1±2.8 ^{abcd}	20±42.4 ^{cde}	55.2±32.8 ^{abcde}
Sc	47.5±25.7 ^{ab}	45.2±14.9 ^{ab}	80.4±6.7 ^{ab}	-11.5±7.7 ^a	75.5±7.5 ^{ab}	73.7±5.9 ^{ab}	31±48.9 ^{abc}	-63±121.7 ^{ab}
Ct	37.3±17.4 ^{abcde}	49.2±15.1 ^{abc}	62.8±3.4 ^{abcd}	-3.2±5.7 ^{cde}	78.3±8 ^{abc}	72.8±5.3 ^{abc}	21.1±35.9 ^{bcd}	41.1±45.4 ^{abcde}
An	-45.9±9.2 ^{bc}	-41.6±15.5 ^{bc}	-7.5±2.8 ^{bc}	50.2±13.5 ^a	-107.3±6.7 ^{de}	-99.6±4.3 ^{cde}	-41±14.6 ^{bc}	-47.1±3.8 ^{bcd}
Fo	-0.3±1.5 ^a	6.1±6.6 ^a	11.8±3.8 ^a	-2.2±4.7 ^a	-130.2±40.4 ^b	-126±9.6 ^b	-42.2±46.7 ^a	-48.9±24.4 ^a
Pe	-16.9±4.6 ^a	-14.5±5.1 ^a	-18.6±5.9 ^a	-27.8±12.8 ^a	-223.3±12.1 ^b	-217.1±16.4 ^b	-154.1±56.4 ^b	-187.1±22.3 ^b
	MRS							
Bc ¹	7.6±22.8 ^a	-1.6±12.6 ^a	-4.5±8.2 ^a	-16.8±2.8 ^a	-42.7±34.1 ^a	-46.9±10.2 ^a	-1.8±15.7 ^a	-19.2±9.6 ^a
Lm ²	22.3±9.5 ^{abc}	40±11 ^{ab}	-18.4±13.2 ^{abc}	-41.5±17.3 ^{abc}	-40.8±29.2 ^{abc}	-69.6±25.7 ^{abc}	-93.7±6.3 ^{bc}	-12.5±7.6 ^{abc}
Sa ³	-504.7±33 ^f	235.9±90.8 ^{bcd}	-9.1±22.2 ^{abc}	-47.8±13.6 ^{abc}	-73.4±30.9 ^{abc}	-82.6±23.7 ^{abc}	-248.3±7.7 ^{cde}	-104.3±52.5 ^{abc}
Ca ⁴	-1±1 ^{bc}	10.1±10.4 ^{abc}	47.3±7 ^{ab}	55.9±4.7 ^{ab}	28.5±26.6 ^{abc}	29.6±10.2 ^{abc}	15.9±18.6 ^{abc}	37.4±10.6 ^{abc}

CONTINUACIÓN Tabla 14

Sc ⁵	21±8.1 ^a	20.3±8.1 ^a	16.4±6.1 ^a	5.4±2.5 ^a	11±16.3 ^a	19±9 ^a	5.2±9.5 ^a	31.8±8.7 ^a
Ct ⁶	-61.6±5.1 ^{cde}	-37.1±7.7 ^{bcd}	20.7±10.9 ^{abc}	12.1±3.8 ^{abcd}	5.6±6.7 ^{abcd}	7.9±4 ^{abcd}	-27.7±2.9 ^{abcde}	9.4±2.3 ^{abcd}
An ⁷	39.2±30.4 ^a	39.4±3.6 ^a	58.3±5 ^a	56.3±4.4 ^a	-121.5±9.4 ^d	-64.2±31.2 ^{bc}	20.6±2.9 ^{abc}	-59.4±4.8 ^{bc}
Fo ⁸	33.7±24.9 ^{abc}	47.1±10.3 ^{abc}	22.2±16.7 ^{abc}	34.7±23 ^{abc}	-86.5±47.4 ^{cde}	-68.7±11.5 ^{bcd}	-16.2±27.6 ^{abcde}	-5.5±6.9 ^{abcd}
Pe ⁹	32.2±26.9 ^{abcd}	17.7±13.1 ^{abcd}	33.4±17.9 ^{abcd}	40.6±11.1 ^{abc}	-116±47.5 ^{cde}	-57.9±21.6 ^{bcd}	-22.2±32.2 ^{abcde}	-119.2±15 ^{cde}

Clasificación del porcentaje de la Actividad antimicrobiana: > 50% = inhibición fuerte; 15- 50% = moderada; 14.99 – (-14.99%) = débil; (-15) – (-99.99%) = promoción moderada; < -100% = promoción fuerte. Microorganismos indicadores: ¹Bc: *B. cereus*, ²Lm: *L. monocytogenes*, ³Sa: *S. aureus*, ⁴Ca: *C. albicans*, ⁵Sc: *S. cerevisiae*, ⁶Ct: *C. tropicalis*, ⁷An: *A. niger*, ⁸Fo: *F. oxysporum*, ⁹Pe: *P. expansum*. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas $p < 0.05$.

Los resultados de la actividad antimicrobiana de los caldos de cultivo estériles formulados con desechos agroindustriales y el medio MRS contra los microorganismos indicadores se muestran en la Tabla 15. El medio MRS no inhibió el crecimiento de ningún microorganismo indicador. De igual forma, los medios formulados con desechos agroindustriales no mostraron ninguna actividad antimicrobiana con excepción del medio CSL el cual inhibió moderadamente el crecimiento de *C. albicans* y *S. cerevisiae*.

Tabla 15. Actividad antimicrobiana de los caldos de cultivo formulados con desechos agroindustriales y el caldo MRS evaluada contra microorganismos indicadores.

Indicador/Medio	CHP	CAF	CSL	MRS
<i>B. cereus</i>	-43.67 ± 18.3	-81.7 ± 22.2	-28.9 ± 22.8	-85.3± 3.4
<i>L. monocytogenes</i>	-51.04 ± 26.1	-93 ± 30.4	-30.1 ± 25.6	-102.5 ± 30.1
<i>S. aureus</i>	-220.24 ± 51.9	-209.2 ± 88.8	-192.3 ± 53	-377.1 ± 16.2
<i>C. albicans</i>	-1.8 ± 9.7	-1.1 ± 12.5	22.6 ± 7.2	-43.9 ± 7.7
<i>S. cerevisiae</i>	-8.6 ± 7.2	-4.1 ± 9.3	16.9 ± 9.4	-14.1 ± 5.4
<i>C. tropicalis</i>	-32.4 ± 17.1	-30.8 ± 13.4	-11.7 ± 5.5	-46.8 ± 2.8
<i>A. niger</i>	-19.7 ± 16.6	-41.9 ± 5.3	-23.2 ± 3.3	5.3 ± 15
<i>F. oxysporum</i>	-32.2 ± 9.9	-26.6 ± 6.4	-33.6 ± 7.3	-11 ± 5.5
<i>P. expansum</i>	-129.5 ± 19.5	-146.9 ± 7.3	-96.2 ± 10.7	-33.9 ± 2.9

CHP: Caldo harina de pescado, CAF: Caldo avena forrajera, CSL: Caldo suero de leche.

En relación con la actividad antimicrobiana de los SLC de las BAL cultivadas en los medios formulados con desechos agroindustriales, el CAF fue el medio en donde los

SLC de las BAL mostraron menor actividad antimicrobiana. Solamente el SLC de la cepa *L. mesenteroides* PIM5 fue capaz de inhibir más de dos microorganismos indicadores. La mayor cantidad de interacciones de inhibición del crecimiento de los microorganismos indicadores se observó en el CHP donde cuatro de los SLC de las BAL evaluadas (*L. mesenteroides* PIM5 and CAL14, *E. mundtii* JAV15 and TOV9) pudieron inhibir el crecimiento de al menos cuatro microorganismos indicadores y la cepa *E. faecium* PEP11 inhibió el crecimiento de las tres levaduras indicadoras. La cepa *L. mesenteroides* CAL14 presentó la mejor actividad antimicrobiana ya que inhibió completamente el crecimiento de *L. monocytogenes* e inhibió fuertemente el crecimiento de *B. cereus* y las tres levaduras indicadoras.

Esta actividad antimicrobiana puede deberse a la producción de péptidos antimicrobianos liberados de las proteínas de la HP por las proteasas de las BAL. Esto se sugiere en vista de que los medios empleados para el cultivo de los microorganismos indicadores en las pruebas de actividad microbiana (BHI y YM) fueron amortiguados por la adición de K_2HPO_4 , lo que evita la acción antimicrobiana por la reducción del pH debido a la producción de ácido láctico (Ruthu, *et al.*, 2014). Además, todas las cepas de BAL empleadas en esta prueba demostraron tener capacidad proteolítica (Linares-Morales, *et al.*, 2020). Los péptidos producidos de fuentes animales han presentado un mayor rango de actividad debido a que no son susceptibles a los mecanismos de resistencia a antibióticos de los microorganismos (Ruthu, *et al.*, 2014). Por otra parte, las BAL empleadas en esta investigación provienen de fuentes vegetales sin tratamiento alguno (Linares-Morales, *et al.*, 2020). De acuerdo con Veeravalli y Mathews (2018), el ambiente es la fuente más eficiente de BAL con características importantes. Los resultados de la actividad antimicrobiana son acordes a lo reportado por Ruthu *et al.* (2014), quienes también determinaron la inhibición de *B. cereus* y *L. monocytogenes* al agregar un hidrolizado proteico de desechos de pescado obtenido por fermentación ácido láctica. Cepas de BAL, incluyendo *L. mesenteroides* aislada de fuentes vegetales, codifican menos enzimas proteolíticas en sus genomas, posiblemente por una baja cantidad de proteínas en su nicho. No obstante, entre las peptidasas codificadas por *L. mesenteroides* se encuentran las aminopeptidasas, endopeptidasas, dipeptidasas y tripeptidasas (Liu,

et al., 2014). Los pesos moleculares de las enzimas proteolíticas varían de 80 a 145 KDa, con un pH óptimo entre 5.5 y 6.5 y una temperatura entre 30 y 40 °C (Muhialdin, *et al.*, 2016). De esta forma, las enzimas proteolíticas de *L. mesenteroides* tienen la capacidad de hidrolizar las proteínas presentes en los caldos de cultivo formulados con desechos agroindustriales convirtiéndolos en péptidos (Muhialdin, *et al.*, 2016). Liang *et al.* (2010), sugieren que las proteasas de las BAL producen péptidos antimicrobianos, ya que determinaron que una cepa de *L. paracasei* no mostró actividad antimicrobiana al primer día de incubación, pero alcanzó su actividad antimicrobiana más alta al cuarto día de incubación, sugiriendo el hecho de que la actividad se debe a la liberación de péptidos por la acción de las proteasas de la BAL. Por otra parte, el crecimiento de *A. niger* no pudo ser inhibido probablemente debido a que este moho ha sido reportado como productor de enzimas proteolíticas capaces de degradar los péptidos antimicrobianos (Ruthu, *et al.*, 2014).

Otro factor que influencia positivamente la actividad antimicrobiana de las BAL es la incorporación de BM. Se han descrito diversas frutas empleadas como sustrato, que han favorecido la producción de bacteriocinas (Todorov, *et al.*, 2011). Además, Todorov y Dicks (2006), lograron determinar que la producción de péptidos antimicrobianos por BAL en la presencia de maltosa, manosa, sacarosa y fructosa fue equivalente o incluso mejor que la obtenida en presencia de glucosa. Se ha demostrado que la producción de bacteriocinas ha tenido un mayor rendimiento cuando se emplean sustratos con fuentes complejas de carbono. Además, la presencia de fructosa, ha estimulado la producción de bacteriocinas cuando se formulan sustratos cuya fuente de carbono es una mezcla de fructosa y glucosa (Leroy, *et al.*, 2006) tal y como sucede al emplear BM como fuente de carbono. Adicionalmente, varias BAL han demostrado su capacidad para producir bacteriocinas cuando se han empleado fuentes de proteínas tales como suero e hidrolizados de pescado donde *Lactobacillus plantarum* (Sabo, *et al.*, 2019) y *Pediococcus acidilactici* (Vázquez, *et al.*, 2019) respectivamente produjeron bacteriocinas. Así mismo, cepas de *L. mesenteroides* (Wulijdeligen, *et al.*, 2012; Metsoviti, *et al.*, 2011), *E. mundtii* y *E. faecium* (Vera Pingitore, *et al.*, 2012) también han sido reportados como productores de bacteriocinas.

Los compuestos fenólicos presentes en el bagazo de manzana no afectaron *Leuconostoc* spp. ya que las BAL de este género que se encuentran comúnmente en vegetales pueden tolerar las altas cantidades de compuestos fenólicos presentes en plantas, gracias a su capacidad de metabolizarlos convirtiéndolos en compuestos de baja toxicidad (Filannino, *et al.*, 2018). En la figura 11 se puede observar la diferencia de color entre el CHP estéril y el SLC luego de ser inoculado con la cepa de *L. mesenteroides* PIM5, donde el SLC presenta una reducción en la coloración posiblemente debido al metabolismo de compuestos fenólicos por la BAL.

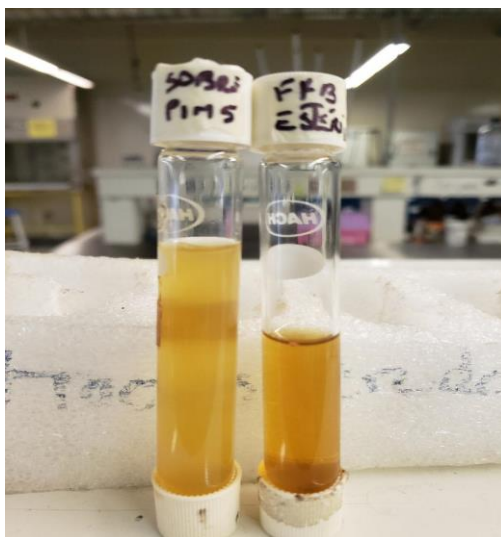


Figura 11. Diferencia de color entre el medio Harina de pescado estéril y el sobrenadante de *Leuconostoc mesenteroides* PIM5 incubado en el mismo caldo.

Análisis químicos

El desempeño de la cepa *L. mesenteroides* PIM5 en CHP comparado con su desempeño en caldo MRS se muestra en la tabla 16. Los valores de pH y producción de ácido láctico fueron muy similares en los SLC de ambos caldos. Sin embargo, la cepa *L. mesenteroides* PIM5 consumió mayor cantidad de proteínas y azúcares reductores cuando fue incubada en el CHP que en el caldo MRS. Más de tres cuartas partes de la cantidad inicial de proteínas presente en el CHP fue consumida por la cepa mientras que solo un poco más de la mitad de las proteínas iniciales en el caldo

MRS fue consumida por la BAL. Con respecto a los azúcares reductores, más de la mitad presente en el CHP fue consumido mientras que en el caldo MRS, solo un poco más de un tercio fue consumido.

La producción de ácido láctico en la presente investigación fue similar tanto en el CHP como en el caldo MRS como ya se ha reportado en medios conteniendo fructosa como fuente de carbono (Pessione y Cirrincione, 2016).

Tabla 16. Comportamiento de la cepa *L. mesenteroides* PIM5 en caldo harina de pescado y en caldo MRS.

Variable	CHP		MRS	
	Caldo estéril	SLC	Caldo estéril	SLC
pH	6.2 ± 0.00	4.35 ± 0.03	6.52 ± 0.00	4.38 ± 0.00
Acidez titulable g/100 mL	0.09 ± 0.00 *	0.80 ± 0.01 **	0.22 ± 0.01***	0.79 ± 0.02**
Proteínas g/L	2.17 ± 0.00	0.49 ± 0.06	0.56 ± 0.00	0.27 ± 0.01
Azúcares reductores g/L	19.01 ± 0.18	8.35 ± 0.19	18.90 ± 1.09	13.12 ± 0.68
Azúcares totales g/L	27.40 ± 9.68	16.29 ± 5.30	-	-
Azúcares no reductores g/L	8.39	7.94	-	-

CHP: Caldo harina de pescado. SLC: Sobrenadante libre de células. *g de ácido málico. **g de ácido láctico, ***g de ácido acético.

Algunas cepas de *L. mesenteroides* han mostrado un mayor aprovechamiento de los nutrientes cuando se emplea fructosa como fuente de carbono (Metsoviti, *et al.*, 2011), lo cual explica porqué las proteínas y los azúcares reductores fueron más aprovechados por la cepa *L. mesenteroides* PIM5 en el CHP que en el caldo MRS. Este aprovechamiento de nutrientes presentes en el medio de cultivo formulado con desechos agroindustriales resulta en un medio agotado, con una demanda biológica de oxígeno menor a la inicial, debido a la reducción de la carga orgánica (Kasmi, *et al.*, 2017).

Evaluación del efecto bioprotector del sobrenadante de bacterias ácido lácticas

Una característica para materias primas, ingredientes y todo tipo de alimento es el tiempo de vida en anaquel. Cada uno de ellos tiene su propio tiempo de vida útil, no obstante, todos los individuos involucrados en la cadena de producción pueden influenciar su duración (Nicoli, 2012).

De forma general, el tiempo de vida útil puede ser descrito como un período de tiempo definido después de la cosecha, producción, envasado, maduración o envejecimiento durante el cual el alimento conserva el nivel de calidad pretendido en condiciones de almacenamiento adecuadas. Por lo tanto, el producto puede ser consumido durante el tiempo en el cual conserve la calidad (Nicoli, 2012). La vida en anaquel es el periodo que corresponde, en condiciones adecuadas, a una disminución tolerable de la calidad del producto, sin embargo, la vida en anaquel del producto no necesariamente se relaciona con la pérdida de la inocuidad y las propiedades nutricionales, sino que se relaciona con la pérdida de su capacidad para ser vendido debido al deterioro de las características físicas y sensoriales típicas del producto. En consecuencia, la pérdida de estas características lleva al rechazo de los consumidores y el final de comerciabilidad del producto (Alamprese, *et al.*, 2017; Gotor-Vila, *et al.*, 2019).

El cultivo, las operaciones de cosecha y las condiciones de almacenamiento, así como la respiración postcosecha, transpiración y el ataque microbiano son los causantes del deterioro de la calidad de las frutas, limitando de esta forma, el tiempo de vida en anaquel (Abugoch, *et al.*, 2016; Bizjak, *et al.*, 2012). Las manzanas son frutas climatéricas, es decir, que el etileno desempeña el papel de modulador de la madurez y la senescencia, al disminuir su producción y secreción se puede mejorar la apariencia externa y la calidad de las manzanas (Bizjak, *et al.*, 2012).

El mantenimiento o el aumento de la vida en anaquel es vital para la creciente demanda de productos fácilmente disponibles. Al aumentar el periodo de vida útil disminuyen las pérdidas de alimentos, así como los impactos económicos y ambientales de la logística de distribución. Para lograr una mayor vida útil en un alimento se debe llevar a cabo un enfoque sobre la formulación, condiciones de procesamiento, almacenamiento y transporte (Nicoli, 2012).

Los recubrimientos en alimentos han sido estudiados por su habilidad para proveer una barrera para la transferencia de humedad y gases y para mejorar la integridad mecánica de los alimentos. El recubrimiento ideal no debe tener ningún impacto en las características sensoriales del alimento mientras mantiene la calidad del alimento. Al mismo tiempo, no debe impartir atributos indeseables en el alimento (Eswaranandam, *et al.*, 2006). Además de actuar como barreras selectivas para la humedad, gases y solutos, los recubrimientos tienen un alto potencial para llevar compuestos activos y funcionales tales como los antimicrobianos, aumentando el efecto inhibidor contra microorganismos patógenos y deterioradores ya que mantienen las concentraciones efectivas sobre la superficie de los alimentos (Fernández-Pan, *et al.*, 2012).

Por otra parte, el SLC del crecimiento de *L. mesenteroides* PIM5 empleado como recubrimiento tenía un contenido de proteínas y carbohidratos considerable, por lo cual se empleó como recubrimiento sin agregar aditivos. Algunas proteínas al igual que ciertos polisacáridos se consideran capaces de sustituir plásticos sintéticos convencionales debido a que poseen propiedades mecánicas y propiedades de barrera que los hacen impedir el paso de aromas y gases como O₂ y CO₂ (Sánchez-González, *et al.*, 2014)

Análisis físico-químicos

Pérdida de peso

Todas las muestras sufrieron una pérdida considerable de peso durante los 28 días de almacenamiento como puede observarse en la figura 12. Las muestras recubiertas no mostraron diferencias significativas en la pérdida de peso en comparación con los controles a pesar de que la pérdida de peso en las muestras fue ligeramente mayor que en los controles. La cubierta no logró retrasar la pérdida de peso debido a la migración de la humedad ($p > 0.05$) en ambos grupos. Sin embargo, las muestras recubiertas perdieron ligeramente mayor cantidad de humedad en comparación con las muestras control. La mayor pérdida de peso se registró a los 28 días donde alcanzó

12.33% $\pm$ 0.89 en las muestras recubiertas y 10.54% $\pm$ 1.08 en los controles. La pérdida de peso durante el almacenamiento es causada usualmente por la migración de agua de la fruta hacia el ambiente que la rodea (Mannozi, *et al.*, 2017). Esta se desarrolla debido al gradiente de presión de vapor que ocurre en el tejido celular, en donde las condiciones de almacenamiento tales como temperatura y humedad relativa tienen un efecto sobre la diferencia de presión de vapor entre las frutas y el ambiente resultando en la pérdida de peso (Mannozi, *et al.*, 2017).

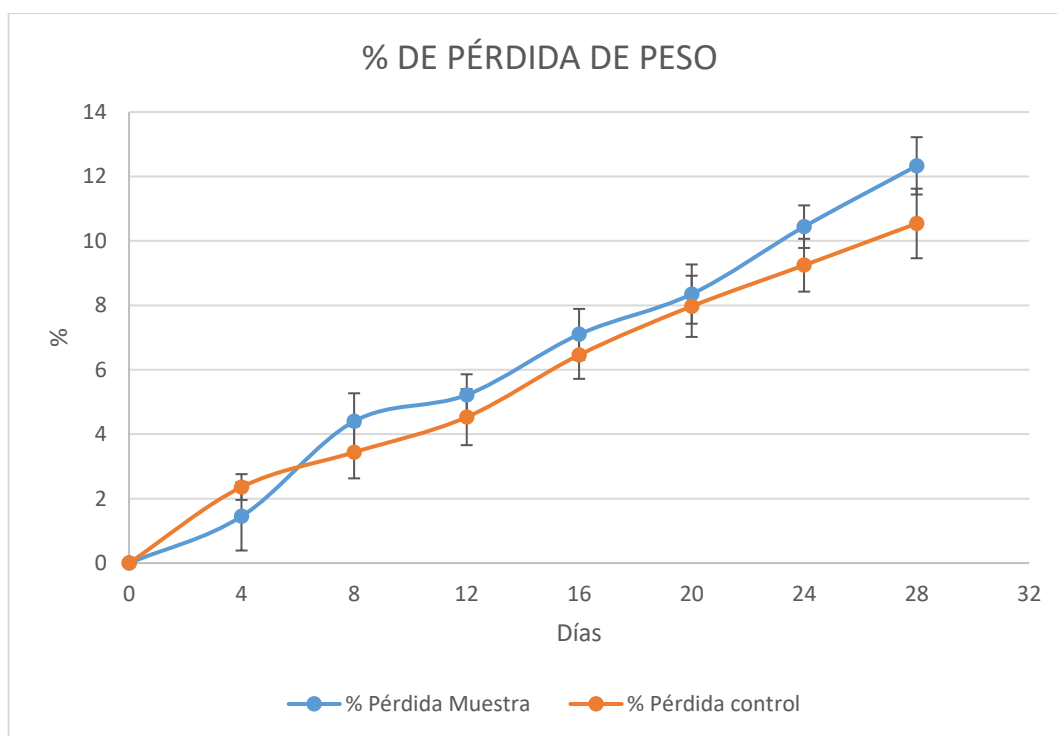


Figura 12. Porcentaje de pérdida de peso de manzanas recubiertas con el sobrenadante libre de células del crecimiento de *L. mesenteroides* PIM5, almacenadas durante 28 días a 25°C. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Nunes (2015) indica que una pérdida de peso de hasta 4-5% no afecta la frescura de la fruta. No obstante, una pérdida de peso superior a ese porcentaje está relacionada directamente con el deterioro del color y la firmeza de las frutas (Nunes, 2015). La permeabilidad del recubrimiento es uno de los parámetros más importantes que

definen su funcionalidad. Esta propiedad cuantifica la efectividad para prevenir el intercambio de humedad entre el alimento y el ambiente, lo cual afecta la firmeza del producto y su apariencia (Sánchez-González, *et al.*, 2014).

Una pérdida excesiva de peso hace al producto inadecuado para el consumo y mercadeo. La pérdida de peso puede ser el resultado de los procesos de respiración debido a que durante la respiración se libera agua y dióxido de carbono por la oxidación de carbohidratos. La pérdida de agua es más significativa, debido a que las pérdidas de otras sustancias como aromas, sabores y productos gaseosos de la respiración son prácticamente indetectables en términos de pérdida de masa (Souza *et al.* 2015).

Normalmente la pérdida de peso ocurre durante el almacenamiento debido a la transferencia de humedad y procesos de oxidación y respiración. Las cubiertas son barreras selectivas para el O₂ y el CO₂, modificando la atmósfera interna y reduciendo la tasa de respiración de la fruta, la cual a su vez reduce la pérdida de peso (Treviño-Garza, *et al.*, 2015)

Apariencia

Las figuras 13 y 14, muestra la apariencia del exterior del grupo de manzanas seleccionados como control y del grupo de manzanas recubiertas con el SLC del crecimiento de *L. mesenteroides* PIM5 durante el almacenamiento a 25°C por 28 días. Se puede detallar el cambio progresivo del color verde al momento de ser cosechadas al color amarillento al final del período de almacenamiento debido a la desaparición de la clorofila y la aparición de carotenos indicando el desarrollo de la madurez de las frutas. El comportamiento fue muy similar en ambos grupos.

Los principales atributos visuales que poseen las frutas y vegetales y que atraen a los consumidores son el tamaño, la apariencia, uniformidad, textura, color y frescura. Entre los atributos no visuales se encuentran sabor, aroma y los valores nutricionales, aunque, según estudios, la firmeza y el aroma parecen ser los más importantes para los consumidores (Veberic, *et al.*, 2010). El color externo de las frutas es un parámetro

de calidad de mayor importancia en las frutas frescas, debido a que influye directamente en la aceptación del consumidor (Rux, *et al.*, 2019; Treviño-Garza, *et al.*, 2015).

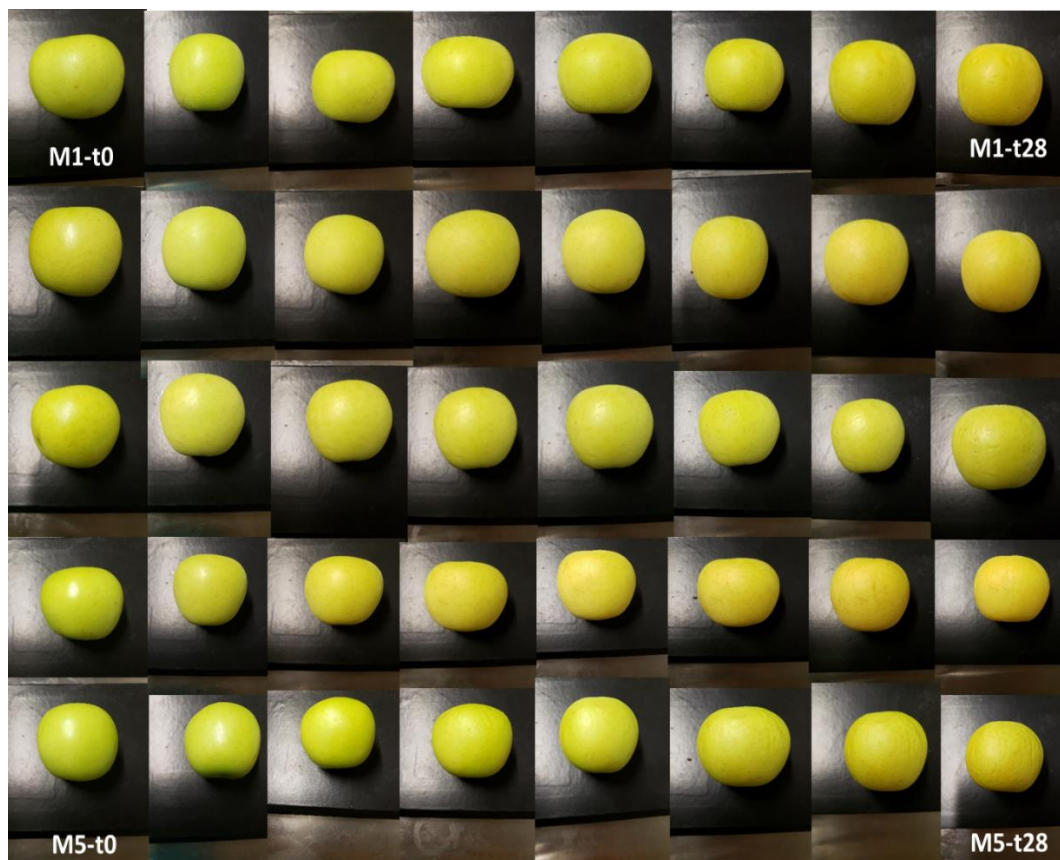


Figura 13. Apariencia del grupo de muestras control de manzanas (SR) durante el almacenamiento a 25°C durante 28 días.

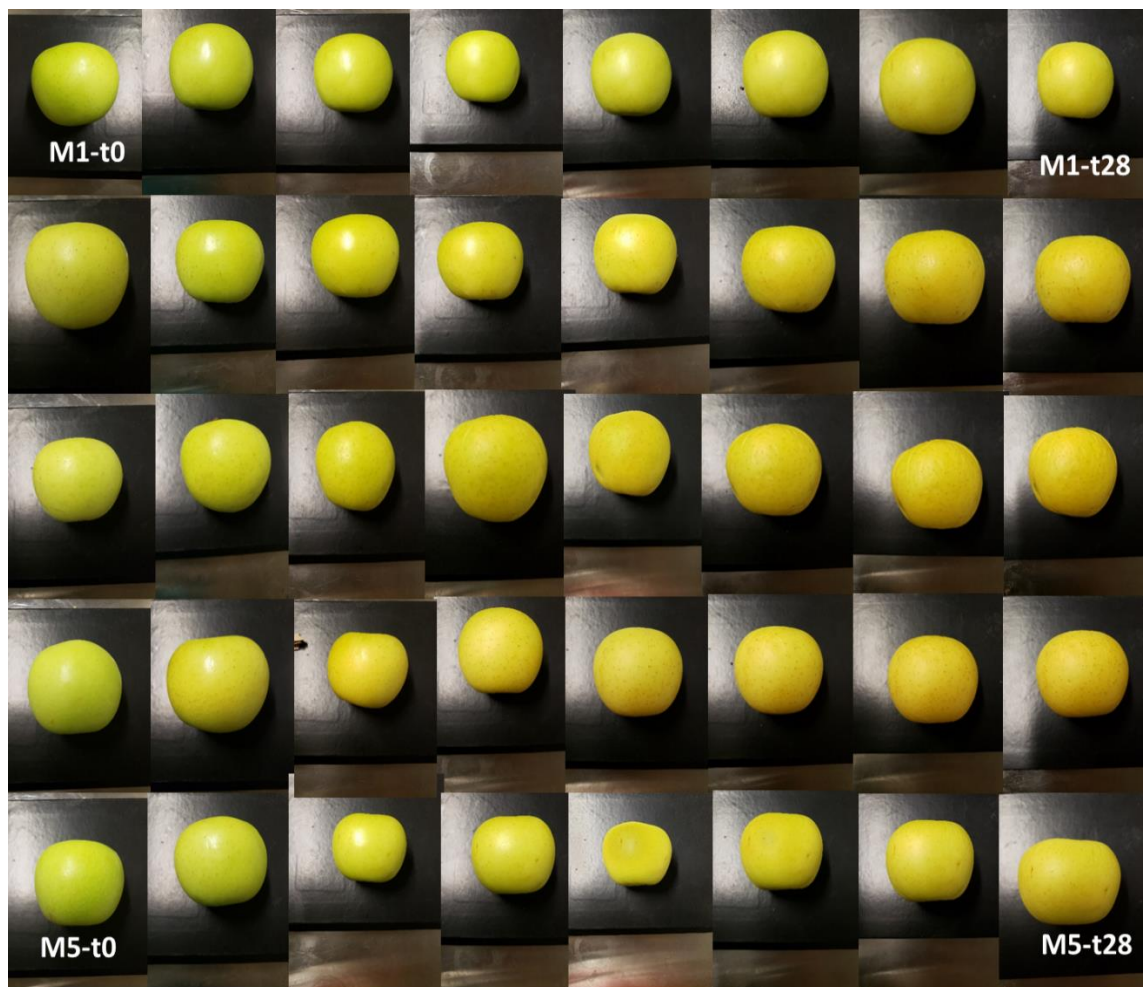


Figura 14. Apariencia del grupo de muestras de manzanas recubiertas (R) durante el almacenamiento a 25°C hasta el día 28.

Color

Los atributos de color CIE L^* , a^* y b^* de las manzanas de los dos grupos durante 28 días se muestran en la tabla 17. El recubrimiento no afectó ningún parámetro de color con respecto a lo observado en el grupo control. Las variaciones de L^* , a^* , b^* fueron pequeñas y no reflejaron ninguna tendencia. No se observó pardeamiento de la cáscara en ninguna muestra.

Tabla 17. Efecto del recubrimiento sobre el color de manzanas almacenadas a 25°C durante 28 días.

Tiempo	L*		a*		b*	
	Muestra	Control	Muestra	Control	Muestra	Control
0	76.29 ±	75.77 ±	-20.82 ±	-20.61 ±	48.41 ±	45.50 ±
	1.76	2.13	1.63	1.43	1.53	0.51
4	70.67 ±	71.70 ±	-17.94 ±	-17.93 ±	34.09 ±	32.05 ±
	6.32	3.75	1.79	1.26	1.53	0.84
8	74.59 ±	72.26 ±	-16.54 ±	-17.50 ±	35.65 ±	31.33 ±
	3.79	3.31	2.6	1.53	2.00	4.49
12	75.49 ±	73.58 ±	-15.62 ±	-16.92 ±	36.43 ±	34.32 ±
	2.39	2.89	2.38	2.05	1.31	1.36
16	77.96 ±	75.98 ±	-14.21 ±	-15.59 ±	37.95 ±	35.81 ±
	2.73	3.25	2.43	2.24	1.39	1.37
20	79.77 ±	76.83 ±	-12.85 ±	-14.78 ±	39.27 ±	36.01 ±
	2.09	2.14	2.8	2.67	1.41	1.49
24	82.07 ±	78.57 ±	-11.50 ±	-13.84 ±	40.88 ±	37.99 ±
	2.24	2.39	3.18	2.79	1.15	1.81
28	82.97 ±	80.14 ±	-10.06 ±	-12.69 ±	41.92 ±	39.22 ±
	1.98	2.61	3.26	2.73	1.49	2.12

El propósito de la medición de color es verificar los cambios en las muestras de color verde a amarillo como resultado de la degradación de clorofila. Los valores de L* corresponden a la escala de claro-oscuro y representa la luminosidad de los colores con un rango de 0 = negro y 100= blanco. Las escalas de a* y b* van de -60 a 60. En a*, los valores negativos indican un color verde y los valores positivos colores rojo. En b*, valores negativos indican color azul mientras que valores positivos corresponden a colores amarillos (Veberic, *et al.*, 2010). Valores de L* inferiores al valor inicial indicarían el oscurecimiento de la fruta, no obstante, los valores observados fueron altos sugiriendo que la retención del color final no fue exitosa debido a que no se logró la inactivación enzimática (Shayanfar, *et al.*, 2014).

Bhosale y Sundaram, (2011) y Eswaranandam *et al.* (2006), reportan que los parámetros de color L^* a^* b^* son directamente proporcionales a tiempo de vida en anaquel de las manzanas. Por lo tanto, existe una correlación significativa entre los valores de color visual y el contenido de clorofila, donde el contenido de clorofila disminuye a medida que el color cambia de verde brillante a verde amarillento (Nunes, 2015).

Los parámetros de color L^* y a^* aumentaron durante el período de almacenamiento tanto en las muestras recubiertas como en los controles lo que indica la degradación de la clorofila y la exposición de los carotenos dando la coloración amarillenta. Por lo tanto, en el grupo de manzanas recubiertas, no se inhibió la degradación de clorofila (Veberic, *et al.*, 2010). Los valores de L^* indican que las muestras recubiertas mantuvieron ligeramente un color más claro que las muestras control. Resultados similares fueron reportados por Eswaranandam *et al.* (2006) en manzanas recubiertas con películas de proteína de soya y glicerol. Sin embargo, las diferencias entre medias no fueron estadísticamente significativas. Aunque los valores de b^* en el t_0 fueron mayores a los valores del t_4 , a partir del t_8 mostraron un incremento progresivo. El aumento de los parámetros de color b^* , también demuestran la aparición de color amarillo debido a la maduración de las manzanas. Valores altos de b^* demuestran una coloración amarillo brillante (Veberic, *et al.*, 2010).

La figura 15 muestra el comportamiento del IC de las muestras de manzanas recubiertas (R) y control (SR) durante el almacenamiento a 25°C por 28 días. El IC no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$), sin embargo, el IC del grupo de muestras recubiertas fue ligeramente superior al de las muestras control, aunque ambos mostraron un comportamiento muy similar. El comportamiento de los IC de ambos grupos muestra una tendencia característica y confirman lo mostrado por los parámetros de color CIE L^* , a^* , b^* , ya que los valores negativos indican la presencia del color verde en las frutas. Además, su aumento durante el almacenamiento sugiere el desarrollo de los cambios en los pigmentos debido a la maduración (Liu, *et al.*, 2016).

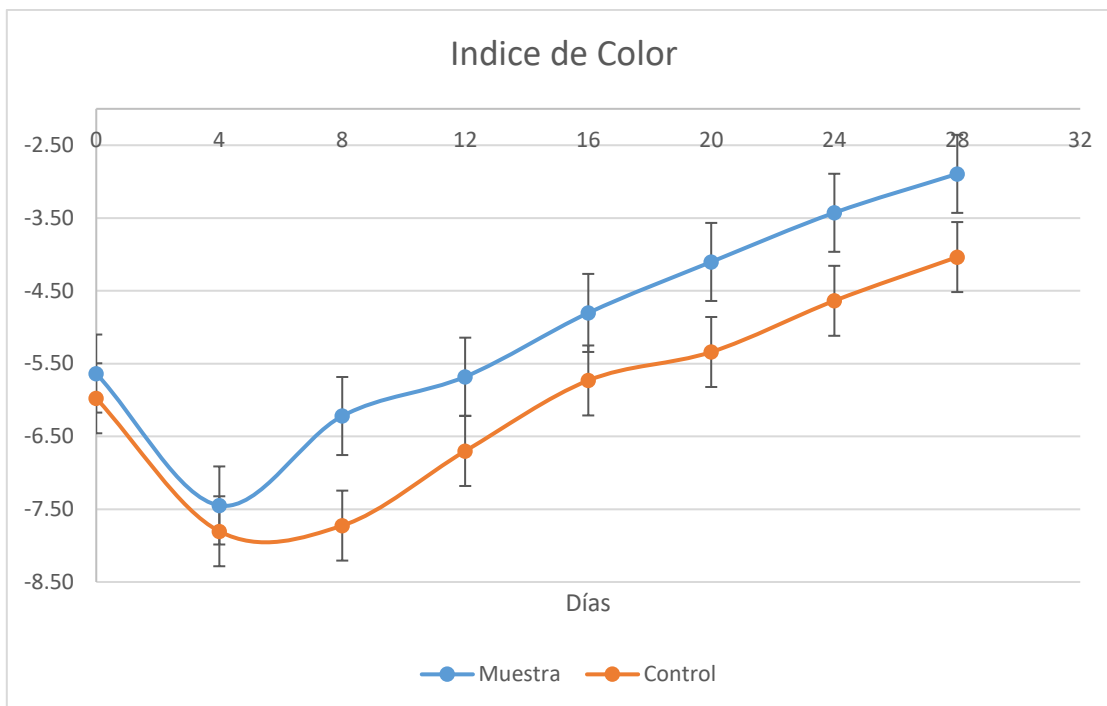


Figura 15. Índice de color promedio de los grupos de muestras recubiertas y control durante el almacenamiento a 25°C por 28 días.

Contenido de sólidos solubles

Con respecto al CSS, no se observaron diferencias significativas en el almacenamiento de ambos grupos. El CSS al principio del almacenamiento fue de 11.85 ± 0.80 en las muestras recubiertas y 11.20 ± 0.68 en los controles (Figura 16). Sin embargo, hasta el tiempo t_{16} el CSS en las muestras recubiertas fue superior al control y presentaron su punto más alto, posteriormente, a partir de ese tiempo disminuyó progresivamente hasta el t_{28} (11.50 ± 0.45) donde el CSS de los controles fue mayor al de las muestras recubiertas probablemente debido a la pérdida de humedad, lo que reduce el metabolismo de las frutas. Además, es posible que el recubrimiento haya actuado como una barrera porosa para el O_2 retrasando la maduración por la inhibición de la hidrólisis (Khalifa, *et al.*, 2016). Aunque el CSS en las muestras control reveló un comportamiento irregular, mostró su valor más alto al final del almacenamiento. El aumento del CSS durante el almacenamiento se debe a la hidrólisis de almidón en azúcares solubles o la hidrólisis de polisacáridos de la pared

celular (Khalifa, *et al.*, 2016). El CSS es empleado como un indicador del contenido de azúcares totales en las frutas, lo que proporciona un indicativo a cerca del estado de madurez. El CSS está constituido por los compuestos solubles en agua, tales como azúcares, ácidos, vitaminas hidrosolubles y algunas pectinas. Por lo tanto, un incremento durante la madurez es un comportamiento normal debido a la degradación gradual de almidón y materiales de la pared celular acumulados durante el período de precosecha (Souza, *et al.*, 2015).

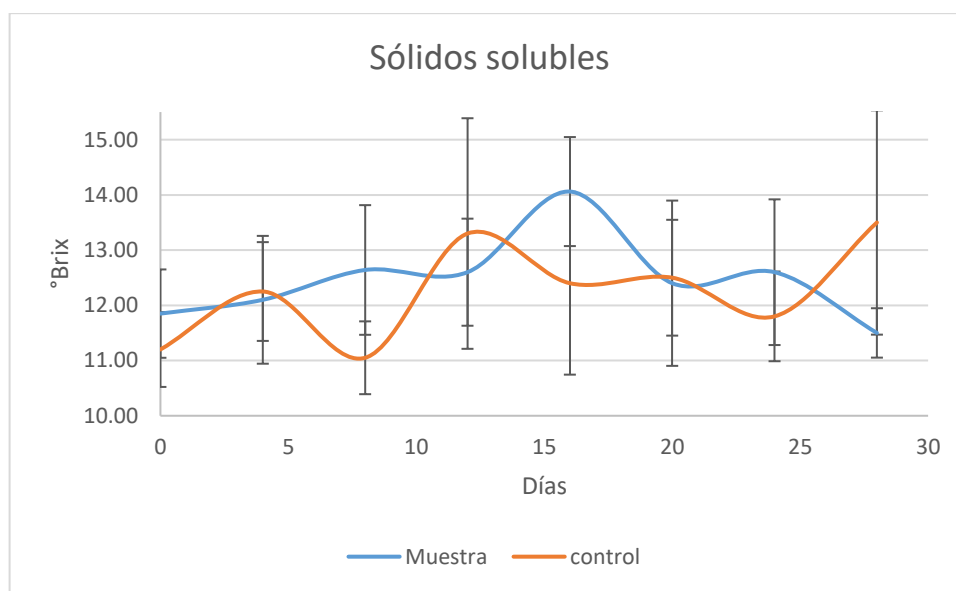


Figura 16. Comportamiento del contenido de sólidos solubles en muestras de manzana recubiertas y controles durante el almacenamiento a 25°C por 28 días.

Los cambios en el CSS de las frutas se relacionan con el grado de madurez y las reacciones metabólicas básicas que aumentan el contenido de azúcar y, por lo tanto, la dulzura durante el almacenamiento (Treviño-Garza, *et al.*, 2015). Los valores más bajos de CSS en las frutas recubiertas son el resultado directo de la barrera al vapor de agua lograda por la aplicación del recubrimiento. Además, la disminución de la velocidad de transferencia tanto de O₂ como de CO₂ debido a la presencia del recubrimiento indica una reducción en la actividad metabólica de las frutas lo que

conduce a una mayor desaceleración de las reacciones de degradación de polisacáridos y, por lo tanto, a un valor de CSS menor (Souza, *et al.*, 2015).

pH

Como se puede observar en la figura 17, el pH de las muestras de ambos grupos fue ascendiendo continuamente a lo largo del almacenamiento. Sin embargo, el pH de las muestras recubiertas fue ligeramente mayor al pH del control. No obstante, no se encontraron diferencias significativas en el pH ($p > 0.05$) entre las muestras recubiertas y el control durante cada tiempo de almacenamiento.

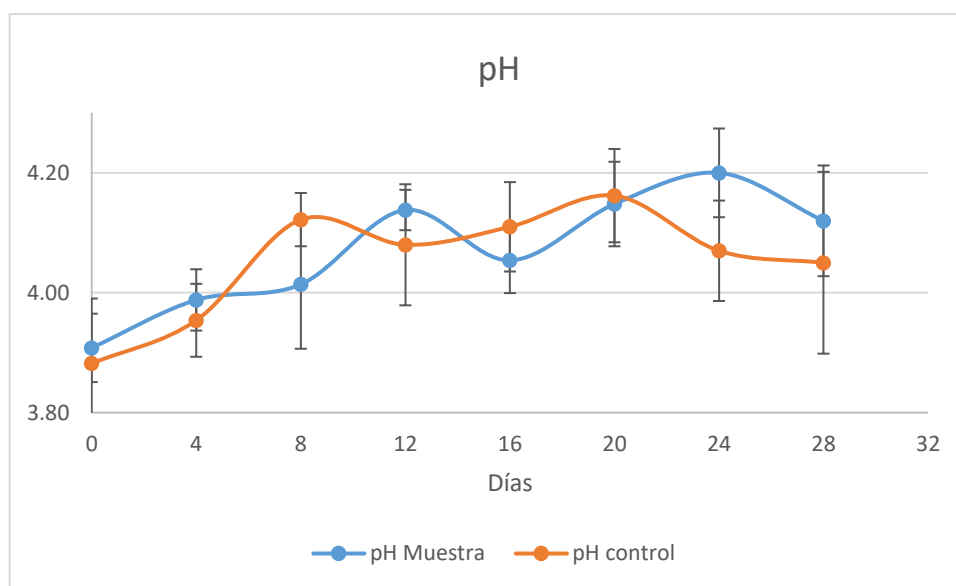


Figura 17. Comportamiento del pH en muestras de manzana recubiertas y controles durante el almacenamiento a 25°C por 28 días.

Los valores de pH tienden a variar poco después de cosechadas las manzanas, aun cuando están sometidas a factores ambientales como temperatura, CO₂ e incluso el recubrimiento (Treviño-Garza, *et al.*, 2015). Generalmente, durante el almacenamiento, ocurre un incremento del pH a consecuencia de la maduración de las frutas. En general, los procesos de descomposición causados por hidrólisis, oxidación o fermentación modifican la concentración de iones en el alimento. Al

mantener un pH ácido en la fruta recubierta, se puede lograr un mayor control del crecimiento microbiano y una mayor estabilidad de la fruta alcanzando mayor vida en anaquel (Souza, *et al.*, 2015).

Como regla general, los valores de pH y de CSS aumentan durante el almacenamiento. Este comportamiento se debe a los procesos y reacciones metabólicas post-cosecha que continúan llevándose a cabo en las frutas durante el almacenamiento como, por ejemplo, la conversión de almidón y ácidos en azúcares (Mannozi, *et al.*, 2017).

Acidez titulable

La acidez titulable de ambos grupos se fue reduciendo a lo largo del tiempo (Figura 18). Sin embargo, la AT de las muestras recubiertas presentaron una menor disminución (0.40 – 0.35% de ácido málico) que las muestras control (0.45- 0.35% de ácido málico). No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ambos grupos. Las variaciones en la acidez de las frutas son afectadas considerablemente por la tasa de metabolismos en especial, la respiración, la cual consume ácidos orgánicos causando una reducción de la acidez durante el almacenamiento. Además, puede causar la senescencia de la fruta (Khalifa, *et al.*, 2016)

El ácido málico es el principal ácido orgánico presente en las manzanas y su contenido se ve disminuido durante la maduración, lo cual es un comportamiento normal debido a que los ácidos orgánicos son empleados como sustrato para la respiración causando su disminución a medida que avanza la maduración (Souza, *et al.*, 2015). El recubrimiento aplicado a las manzanas no afectó el comportamiento de la acidez titulable a lo largo de los 28 días que duró el almacenamiento.

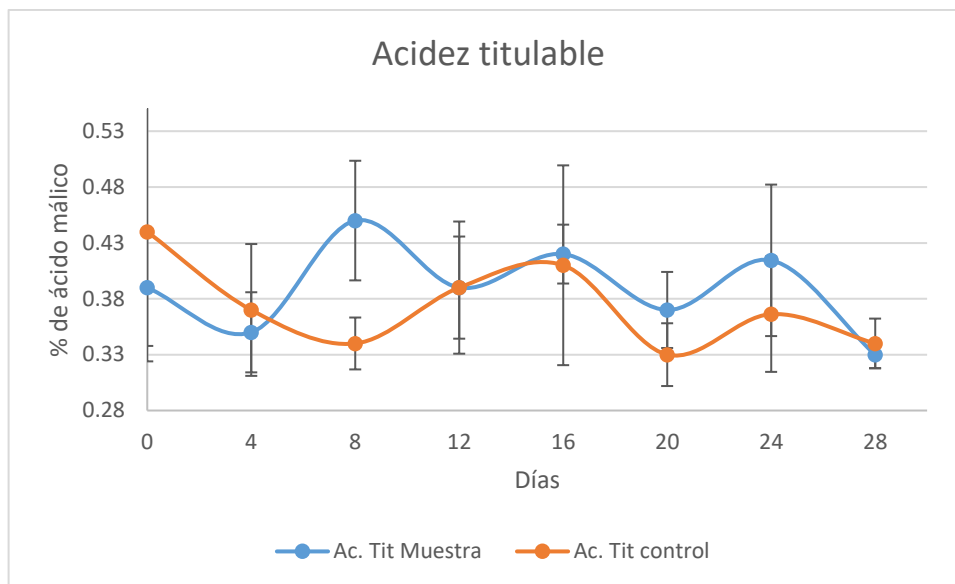


Figura 18. Comportamiento de la acidez titulable en muestras de manzana recubiertas y controles durante el almacenamiento a 25 °C por 28 días.

Índice de madurez

La figura 19 muestra el índice de madurez de las frutas recubiertas y los controles durante el almacenamiento a 25°C por 28 días. El comportamiento del IM muestra una tendencia ascendente normal debido al aumento del CSS y la disminución de la AT, no obstante, revela la capacidad del recubrimiento para retardar la madurez de las manzanas ya que el IM del grupo de las manzanas recubiertas se mantuvo mayormente por debajo del IM del grupo de las manzanas SR.

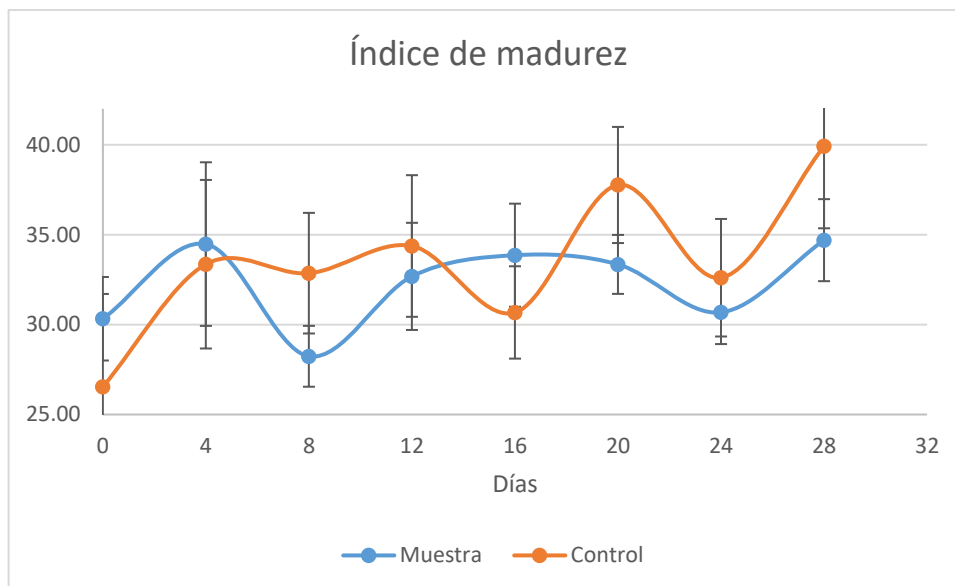


Figura 19. Índice de madurez en muestras de manzana recubiertas y controles durante el almacenamiento a 25°C por 28 días.

Bacterias mesófilas aerobias (BMA) y mohos y levaduras.

El uso de cultivos bioprotectores como es el caso de las BAL, ha sido propuesto para ser utilizado en productos mínimamente procesados. No obstante, su aplicación en la industria ha sido muy limitada (Beristain-Bauza, *et al.*, 2016). Además, Siroli *et al.* (2015) resaltan la importancia de obtener y elegir agentes de biocontrol a partir del tipo de muestras donde serán aplicadas. En el reporte de estos autores, las cepas seleccionadas fueron eficientes evitando el crecimiento no solo de los microorganismos patógenos inoculados intencionalmente, también de los microorganismos deterioradores presentes de forma natural en las muestras tratadas. Esto se debe a la capacidad de las BAL de colonizar, sobrevivir bajo condiciones de almacenamiento en refrigeración y, además, no afectan los índices de calidad del producto (Siroli, *et al.*, 2015).

El recubrimiento logró reducir ligeramente los recuentos de BMA, ya que las muestras control presentaron recuentos mayores a los observados en las muestras recubiertas; sin embargo, ambos recuentos fueron aumentando continuamente como se evidencia en la figura 20. Los recuentos iniciales se mantuvieron relativamente constantes, no

obstante, en los días 16 y 20 se observaron recuentos de BMA en las muestras control muy superiores a los iniciales. Los recuentos de Mohos y levaduras mostraron un comportamiento similar al de BMA (Figura 21), aunque los valores de los recuentos fueron menores, como es de esperarse. No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ambos grupos.

Los SLC de las BAL son ricos en metabolitos con actividades antimicrobianas, por lo tanto, pueden actuar como agentes antimicrobianos y pueden ser considerados como antimicrobianos naturales con buena aceptación. La retención de la actividad antimicrobiana luego de la neutralización de los sobrenadantes sugiere que la actividad se debe a la presencia de sustancias tipo péptidos antimicrobianos o bacteriocinas (Beristain-Bauza, *et al.*, 2016). Por otra parte, los microorganismos aplican cada mecanismo de reparación posible para mantener su homeostasis y poder sobrevivir al ambiente adverso, sin embargo, estos mecanismos de reparación requieren de gran cantidad de energía lo que puede llevarlos a la inactivación o incluso la muerte.

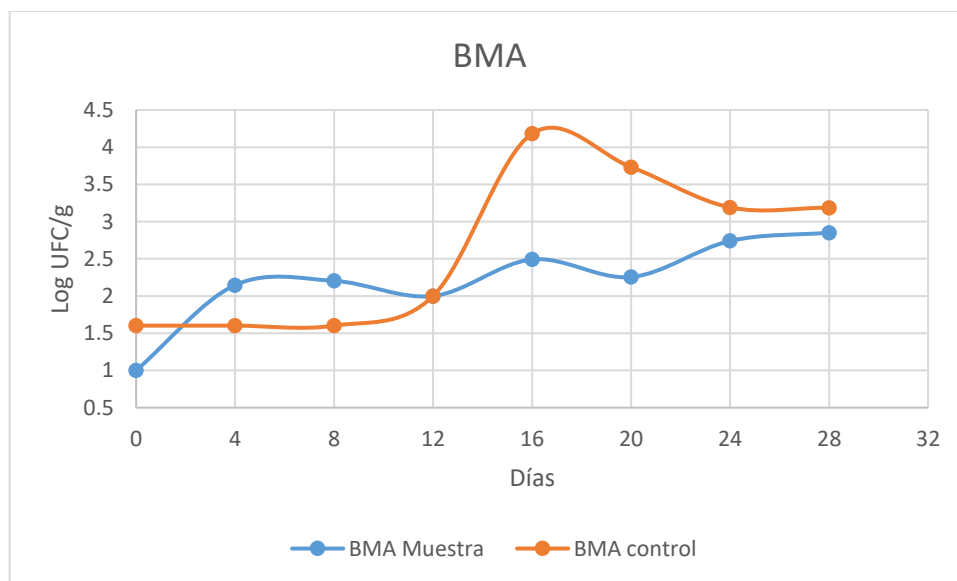


Figura 20. Recuentos de bacterias mesófilas aerobias en muestras de manzana recubiertas y controles durante 28 días de almacenamiento a 25°C.

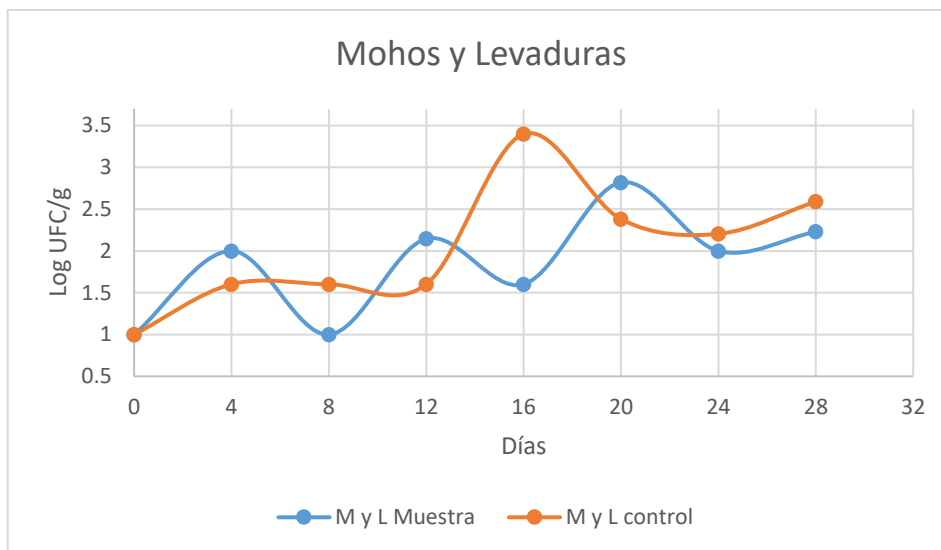


Figura 21. Recuentos de Mohos y Levaduras en muestras de manzana recubiertas y controles durante 28 días de almacenamiento a 25°C.

En consecuencia, el alimento se vuelve más inocuo durante el almacenamiento en especial a temperatura ambiente (Shayanfar, *et al.*, 2014). Siroli *et al.* (2015), aislaron BAL de frutas y vegetales mínimamente procesados y los emplearon como agentes de control biológico. Varias cepas de *L. plantarum* mostraron los mejores perfiles antimicrobianos por lo que fueron utilizadas para tratar trozos de manzana y lechuga. Los resultados demostraron que la inocuidad y la vida de anaquel se incrementaron sin modificar las características organolépticas (Siroli, *et al.*, 2015).

El recubrimiento empleado redujo levemente la cinética de crecimiento de las levaduras y las bacterias mesófilas aerobias en comparación con el crecimiento observado al aplicar la desinfección con la solución de cloro. La importancia de reducir su crecimiento radica en que estos microorganismos juegan un papel dominante en el deterioro de frutas mínimamente procesadas (Mannozi, *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Una cantidad considerable de bacterias ácido lácticas fueron aisladas de muestras de vegetales frescos en el área de Chihuahua, Chihuahua, México y sus actividades antimicrobianas y enzimáticas fueron evaluadas. Varias cepas mostraron actividad antimicrobiana inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas Gram-positivas, Bacterias ácido lácticas, mohos y levaduras, todos de importancia para la industria de alimentos posiblemente debido a la producción de péptidos antimicrobianos. Por otra parte, varias cepas mostraron potencial importancia para aplicaciones tecnológicas debido a que presentaron varias actividades enzimáticas como proteasa, lipasa, amilasa, metabolismo del ácido cítrico, así como también producción de exopolisacáridos.

Al inocular las bacterias ácido lácticas seleccionadas debido a su actividad antimicrobiana en medios formulados con desechos agroindustriales se logró determinar que estos medios promueven en diferentes niveles la actividad antimicrobiana. El medio Caldo harina de pescado ejerció mayor influencia, debido a que mayor cantidad de BAL lograron inhibir mayor cantidad de microorganismos indicadores. La cepa *Leuconostoc mesenteroides* PIM5 fue la cepa que mejor se desempeñó en todos los medios evaluados.

El recubrimiento que constituye el sobrenadante del crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* PIM5 cultivado en un medio de cultivo elaborado con harina de pescado, influencia positivamente la vida en anaquel de manzanas *Malus domestica*, var., porque alcanzó resultados similares a los obtenidos al tratar las manzanas recién cosechadas con una solución de cloro. Aunque el grupo de muestras recubiertas perdieron mayor cantidad de peso, el Índice de madurez y los recuentos microbianos fueron inferiores a lo encontrado en las muestras control.

El sobrenadante del crecimiento de las Bacterias ácido lácticas con mayor actividad antimicrobiana debe ser caracterizado para determinar cuál es la o las sustancias que ejercen la actividad antimicrobiana.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasiliasi, S.; Tan, J.S.; Ibrahim, T.A.; Ramanan, R.N.; Vakhshiteh, F.; Mustafa, S.; Ling, T.C.; Rahim, R.A.; Ariff, A.B. (2017). In vitro assessment of *Pediococcus acidilactici* Kp10 for its potential use in the food industry. *BMC Microbiology*, 17, 121. doi:10.1186/s1286-017-1000-z
- Abedi, D., Feizizadeh, S., Akbari, V. y Jafarian-Dehkordi, A. (2013). In vitro anti-bacterial and adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* on *Escherichia coli*. *Res. Pharm. Sci.*, 8(4), 260-268.
- Abriouel, H., Benomar, N., Cobo, A., Caballero, N., Fernández Fuentes, M. A., Pérez-Pulido, R. y Gálvez, A. (2012). Characterization of lactic acid bacteria from naturally-fermented Manzanilla Aloreña green table olives. *Food Microbiol.*, 32(2), 308-16. doi:10.1016/j.fm.2012.07.006
- Abugoch, L., Tapia, C., Plasencia, D., Pastor, A., Castro-Mandujano, O., López, L. y Escalona, V. (2016). Shelf-life of fresh blueberries coated with quinoa protein/chitosan/sunflower oil edible film. *J. Sci. Food Agric.*, 92(2), 619-26. doi:10.1002/jsfa.7132.
- Adam, E., Groenenboom, A., Kurm, V., Rajewska, M., Schimdt, R., Tyc, O., Weidner, S., Berg, G., de Boer, W. y Falcao Salles, J. (2016). Controlling the microbiome: Microhabitat adjustments for successful biocontrol strategies soil and human gut. *Front. Microbiol.*, 7, 1-6.
- Ahlberg, S., Joustsjoki, V., Laurikkala, S., Varmanen, P. y Korhonen, H. (2016). *Aspergillus flavus* growth inhibition by *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented kenyan milk and maize products. *Springer Arch microbial.*, 199(3), 457-464.
- Alamprese, C., Cappa, C., Ratti, S., Limbo, S., Signorelli, M., Fessas, D. y Lucisano, M. (2017). Shelf life extension of whole-wheat breadsticks: Formulation and packaging strategies. *Food Chem*, 230, 532-539. doi:10.1016/j.foodchem.2017.03.092
- Alikhani, M. (2014). Enhancing safety and shelf life of fresh-cut mango by application of edible coatings and microencapsulation technique. *Food Science & Nutrition*, 2(3), 210-217.
- Barba, F., Esteve, M. y Frigola, A. (2010). Ascorbic acid is the only bioactive that is better preserved by high hydrostatic pressure than by thermal treatment of a vegetable beverage. *J. Agric. food Chem*, 58(18), 10070-5.
- Barrett, D. y Lloyd, B. (2012). Advanced preservation methods and nutrient retention in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric*, 92, 7-22.
- Bartkiene, E., Lele, V., Sakiene, V., Zavistanaviciute, P., Ruzauskas, M., Bernatoniene, J., Jakstas, V., Viskelis, P., Zadeikef, D., Juodeikiene, G. (2019). Improvement of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria in combination with berries/fruits and dairy industry by-products. *Journal of the science of food and agriculture*, 99(8), 3992-4002. doi:10.1002/jsfa.9625
- Behsnilian, D. y Mayer- Miebach, E. (2017). Impact of blanching, freezing and frozen storage on the carotenoid profile of carrot slices (*Daucus carota* L. cv. Nutri Red) . *Food Control*, 73, 761-767. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.09.045

- Ben Ammar, J., Lanoisellé, J.L., Lebovka, N.I., Van Hecke, E., Vorobiev, E. (2011). Impact of a pulsed electric field on damage of plant tissues: effects of cell size and tissue electrical conductivity. *J. Food Sci.* 76(1), E90-7 doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01893.x.
- Beristain-Bauza, S., Mani-López, E., Palou, E. y López-Malo, A. (2016). Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Control*, 62, 44-51. doi:10.1016/j.foodcont.2015.10.007
- Bhosale, A., y Sundaram, K. K. (2011). Equation for predicting shelf life of an apple . *Applied Mechanics and Materials* , 52-54, 1936-1941. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.09.844
- Bisen, A., Kumar Pandey, S. y Patel, N. (2010). Effect of skin coatings on prolonging shelf life of Kagzi lime fruits (*Citrus aurantifolia* S.). *J. Food Sci. Technol*, 49(6), 753-759. doi:10.1007/s13197-010-0214-y
- Bizjak, J., Slatnar, A., Stampar, F. y Veberic, R. (2012). Changes in quality and biochemical parameters in 'Idared' apples during prolonged shelf life and 1-MCP treatment. *Food Sci. Technol. Int.*, 18(6), 569-77. doi:10.1177/1082013212442178.
- Bolarinwa, I. F., Orfila, C. y Morgan, M. R. (2015). Determination of amygdalin in apple seeds, fresh apples and processed apple juices. *Food Chemistry*, 170, 437-442. doi:10.1016/j.foodchem.2014.08.083
- Borrero, J., Kelly, E., O'Connor, P., Kelleher, P., Scully, C., Cotter, P., Mahoney, J. y van Sinderen, D. (2017). Purification, characterization and heterologous production of plantaricyclin 1A, a novel circular bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NI326. *Appl. Environ. Microbiol.*, 84(1), e018101-17. doi:10.1128/AEM.01801-17
- Boumaiza, M., Colarusso, A., Parrilli, E., Garcia-Fruitós, E., Casillo, A., Arís, A., Corsaro, M.M., Picone, D., Leone, S. y Tutino, M.L. (2018). Getting value from the waste: Recombinant production of a sweet protein by *Lactococcus lactis* grown on cheese whey. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1-9. doi: 10.1186/s12934-018-0974-z
- Boyacioglu, O., Sharma, M., Sulakvelidze, A. y Goktepe, I. (2013). Biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut leafy greens. *Bacteriophage*, 3(1), e24620. doi: 10.4161/bact.24620
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem*, 72(1-2), 258-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Bravo, S. M., Morales, M., del Mónaco, S. M. y Caballero, A. C. (2019). Apple bagasse as a substrate for the propagation of Patagonian wine yeast biomass. *Journal of Applied Microbiology*, 126(5), 1414-1425. doi:10.1111/jam.14216
- Bustos, G., Moldes, A., Cruz, J. y Domínguez, J. (2004). Formulation of low-cost fermentative media for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus* using vinification lees as nutrients. *J. Agric. Food Chem.* , 52(4), 801-8. doi:10.1021/jf030429k



- Cardamone, C., Aleo, A., Mammina, C., Oliveri, G. y Di noto, A. (2015). Assessment of the microbiological quality of fresh produce on sale in Sicily, Italy: preliminary results. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 22(3), 1-6. doi: 10.1186/s40709-015-0026-3
- Cardoso Ugarte, G. y Sosa Morales, M. (2012). Propiedades del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) y sus aplicaciones en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 6(1), 54-65.
- Carrizo, S., Montes de Oca, C., H. M., Saavedra, L., Vignolo, G., L. J. y Rollán, G. (2017). Lactic Acid Bacteria from Andean Grain Amaranth: A Source of Vitamins and Functional Value Enzymes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*, 27(5), 289-298. doi:10.1159/000480542
- Chalermthai, B. C., Bastidas-Oyanedel, J. R., Taher, H., Olsen, B. D. y Schmidt, J. E. (2019). Preparation and characterization of whey protein-based polymers produced from residual dairy streams. *Polymers*, 11(4), 1-11. doi:10.3390/polym11040722
- Chaudhary, P.R., Jayaprakasha, G.K., Porat, R. y Patil, B.S. (2015). Influence of Modified Atmosphere Packaging on 'Star Ruby' Grapefruit Phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.*, 63(3), 1020-1028. doi: 10.1021/jf505278x
- Chen, Y., Wu, H., Kuo, C., Chen, Y., Ho, S. y Yanagida, F. (2017). Leucocin C-607, a Novel Bacteriocin from the Multiple-Bacteriocin-Producing *Leuconostoc pseudomesenteroides* 607 Isolated from Persimmon. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 10(2), 148-156. doi:10.1007/s12602-017-9359-6.
- Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A. y Bartkiene, E. (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganisms isolated from food and their control in wheat. *Food Control*, 31, 539-545.
- Cocci, E., Sacchetti, G., Rocculi, P. y Dalla Rosa, M. (2014). Response of Pink Lady® apples to post-harvest application of 1-methylcyclopropene as a function of applied dose, maturity at harvest, storage time and controlled atmosphere storage. *J. Sci. Food Agric.*, 94(13), 2691-8. doi:10.1002/jsfa.6610
- Coda, R., Cassone, A., Rizzelo, C. G., Nionelli, L., Cardinali, G. y Gobbetti, M. (2011). Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: Identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. *Applied and environmental microbiology*, 77(10), 3484-3492.
- Colivet, J., Marcano, G., Belloso, G., Brito, D. y Gómez, E. (2012). Efecto antimicrobiano de extractos etanólicos de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. *Revista venezolana de ciencia y tecnología de alimentos*, 2(2), 313-320.
- Comasio, A., Harth, H., Weckx, S. y De Vuyst, L. (2019). The addition of citrate stimulates the production of acetoin and diacetyl by a citrate-positive *Lactobacillus crustorum* strain during wheat sourdough fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 289, 88-105. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.030



- Corbo, M., Campaniello, D., Speranza, B., Bevilacqua, A. y Sinigaglia, M. (2015). Non-conventional tools to preserve and prolong the quality of minimally-processed fruits and vegetables. *Coatings*, 5(4), 931-961. doi: /10.3390/coatings5040931
- Corbo, M., Speranza, B., Campaniello, D., Amato, D. y Sinigaglia, M. (2010). Fresh-cut fruits preservation: current status and emerging technologies. *Current Research. Technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1143-1154.
- Dávila, J., Villa, J., Cruz, R., Rodríguez, M., Espino, M., Ayala, J., Olivas, G., Heredia, B. y González, G. (2010). Effect of edible coatings, storage time and maturity stage on overall quality of tomato fruits. *American Journal of agricultural and biological science*, 6(1), 162-171.
- Devriese, L., Baele, M. y Butaye, P. (2006). The genus enterococcus: taxonomy. En M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt, & M. Dworkin (Ed.), *The prokariotes, a handbook on the biology of bacteria. Symbiotic associations, biotechnology, applied microbiology* (Third ed., Vol. 4). New York, New York, USA: Springer Science + Business media Inc.
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M. Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol.*, 33, 1-10. doi: 10.3389/fmicb.2016.00377
- Domingos-Lopes, M., Lamosa, P., Stanton, C., Ross, R. y Silva, C. (2018). Isolation and characterization of an exopolysaccharide-producing *Leuconostoc citreum* strain from artisanal cheese . *Lett. Appl. Microbiol.*, 67(6), 570-578. doi:10.1111/lam.13073
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances . *Anal. Chem.*, 28(3), 350-356. doi:10.1021/ac60111a017
- EÇA, K., Sartori, T. y Menegalli, F. (2014). Films and edible coatings containing antioxidants- a review. *Campinas*, 17(2), 98-112. doi: 0.1590/bjft.2014.017
- El-Mabrok, A. S., Hassan, Z., Mokhtar, A. M. y Aween, M.M. (2012a). Efficacy of *Lactobacillus plantarum* C5 cell and their supernatant against *Colletotrichum gloeosporioides* on germination rate of Chilli seeds. *Research Journal of Biological Sciences*, 7(4), 159-164. 10.3923/rjbsci.2012.159.164
- El-Mabrok, A. S., Hassan, Z., Mokhtar, A. M., Hussain, K. y Abdul Kahar, F. K. (2012b). Screening of lactic acid bacteria as biocontrol against *Colletotrichum capsici* on Chilli Bangi. *Research Journal of Applied Sciences*, 7(9), 466-473.
- Elsser-Gravesen, D. y Elsser-Gravesen, A. (2013). Biopreservatives. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 143, 29-49. doi: 10.1007/10_2013_234
- Eswaranandam, S., Hettiarachchy, N. y Meullenet, J. (2006). .Effect of Malic and Lactic Acid Incorporated Soy Protein Coatings on the Sensory Attributes of Whole Apple and Fresh-Cut Cantaloupe. *Journal of Food Science*, 71, S307-S313. doi:10.1111/j.1365-2621.200

- Falomir, M., Gonzalo, D. y Rico, H. (2010). Coliform bacteria in fresh vegetables: from cultivated lands to consumers. *Current Research, Technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1175-1181.
- Fernández-Pan, I., Royo, M. y Ignacio Maté, J. (2012). Antimicrobial activity of whey protein isolate edible films with essential oils against food spoilers and foodborne pathogens. *J Food Sci.*, 77(7), M383-90. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02752.x.
- Fessard, A. y Remize, F. (2019). Genetic and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from tropically grown fruits and vegetables. *Int. J. Food Microbiol.*, 301, 61-72. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.003.
- Filannino, P., Di Cagno, R. y Gobbetti, M. (2018). Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 49, 64-72. doi:10.1016/j.copbio.2017.07.016
- Gálvez, A., Abriouel, H., Lucas Lopez, R. y Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International journal of food microbiology*, 120(1-2), 51-70. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001
- Garzón, K., Ortega, C. y Tenea, G. (2017). Characterization of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Native Fruits of Ecuadorian Amazon. *Polish Journal of Microbiology*, 66(4), 473-481. doi:10.5604/01.3001.0010.7037
- Gayán, E., García-Gonzalo, D., Álvarez, I. y Condón, S. (2014). Resistance of *Staphylococcus aureus* to UV-C light and combined UV-heat treatments at mild temperatures. *Int. J. Food Microbiol.*, 172, 30-39. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.003
- Ghazvini, R., Kouhsari, E., Zibafar, E., Hashemi, S., Amini, A. y Niknejad, F. (2016). Antifungal activity and aflatoxin degradation of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus fermentum* against toxigenic *Aspergillus parasiticus*. *The open microbiology journal*, 10, 197-201. doi: 10.2174/1874285801610010197
- Gotor-Vila, A., Usall, J., Torres, R., Solsona, C. y Teixidó, N. (2019). Enhanced shelf-life of the formulated biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 combining diverse packaging strategies and storage conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 290, 205-213. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.013
- Griffiths, M. y Tellez, A. M. (2013). *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. *Front. Microbiol.*, 4(30), 1-9. doi: 10.3389/fmicb.2013.00030
- Gullón, B., Yáñez, R., Alonso, J. L. y Parajó, J. C. (2008). L-Lactic acid production from apple pomace by sequential hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, 99(2), 308-319. doi:10.1016/j.biortech.2006.12.018
- Heredia-Castro, P., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. y Vallejo-Córdova, B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia [en línea]*, 42(6). Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33951621002>



- Hernández-Saldaña, O. F., De la Fuente-Salcido, N. M., Valencia-Posadas, M. y Barboza-Corona, J. E. (2016). Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de péptidos antimicrobianos obtenidas a partir de leche de cabra. *Investigación y desarrollo en ciencia y tecnología de alimentos*, 1(1), 429-435.
- Heydari, R., Bavandi, S. y Javadian, S. (2015). Effect of sodium alginate coating enriched with horsemint (*Mentha longifolia*) essential oil on the quality of bighead carp fillets during storage at 4°C. *Food Science and nutrition*, 3(33), 188–194. doi: 10.1002/fsn3.202
- Hu, M., Zhao, H., Zhang, C., Yu, J. y Lu, Z. (2013). Purification and Characterization of Plantaricin 163, a Novel Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* 163 Isolated from Traditional Chinese Fermented Vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 61(47), 11676-11682. doi: 10.1021/jf403370y
- Idoui, T. (2014). Probiotic properties of Lactobacillus strains isolated from gizzard of local poultry. *Iranian Journal of Microbiology*, 6(2), 120-126. PMID: 25705363
- Inglin, R., Stevens, M., Meile, L., Lacroix, C. y Meile, L. (2015). High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species. *Journal of microbiological methods*, 114, 26-29. doi: 10.1016/j.mimet.2015.04.011
- Jeddi, M., Yunesian, M., Gorji, M., Noori, N., Pourmand, M. y Khaniki, G. (2014). Microbial evaluation of fresh, minimally-processed vegetables and bagged sprouts from chain supermarkets. *J. Health Popul. Nutr.*, 32(3), 391-399.
- Jones, L., Worobo, R. y Smart, C. (2014). UV Light Inactivation of Human and Plant Pathogens in Unfiltered Surface Irrigation water. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(3), 849-854. doi: 10.1128/AEM.02964-13
- Jung, Y., Jang, H. y Matthews, K. (2014). Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence. *Microbial biotechnology*, 7(6), 517-527. doi: 10.1111/1751-7915.12178
- Kafilzadeh, F. y Heidary, N. (2013). Chemical composition, in vitro digestibility and kinetics of fermentation of whole-crop forage from 18 different varieties of oat (*Avena sativa* L.). *Journal of Applied Animal Research*, 41(1), 61-68. doi:10.1080/09712119.2012.739084
- Kasmi, M., Hamdi, M. y Trabelsi, I. (2017). Processed milk waste recycling via thermal pretreatment and lactic acid bacteria fermentation. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 24, 13604–13613. doi:10.1007/s11356-017-8932-6
- Kempler, G. y McKay, L. (1980). Improved Medium for Detection of Citrate-Fermenting *Streptococcus lactis* subs. diacetylactis. *Applied and environmental microbiology*, 39(4), 926-927.
- Khalifa, I., Barakat, H., El-Mansy, H. y Soliman, S. (2016). Improving the shelf-life stability of apple and strawberry fruits applying chitosan-incorporated olive oil processing residues coating. *Food Packaging and Shelf Life*, 9, 10-19. doi:10.1016/j.fpsl.2016.05.006
- Kim, S.Y., Kim, B.M., Kim, J.B., Shanmugavelan, P., Kim, H.W., Kim, S.Y., Kim, S.N., Cho, Y.S., Choi, H.S., Park, K.M. (2014). Effect of steaming, blanching and high temperature/high pressure

- processing on the amino acid contents of commonly consumed korean vegetables and pulses. *Prev. Nutr. Food Sci.*, 19(3), 220-226. doi: 10.3746/pnf.2014.19.3.220
- Klaenhammer, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 1993 (1-3):39-85. 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x.
- Konkit, M. y Kim, W. (2016). Activities of amylase, proteinase, and lipase enzymes from *Lactococcus chungangensis* and its application in dairy products. *J. Dairy Sci*, 99(7), 4999-5007. doi:10.3168/jds.2016-11002.
- Kus, Z., Demir, B., Eski, I., Gurbuz, F. y Ercisli, S. (2017). Estimation of the Colour Properties of Apples Varieties Using Neural Network. *Erwerbs-Obstbau*, 59, 291-299. doi: 10.1007/s10341-017-0324-z
- Lal Basediya, A., Samuel, D. y Beera, V. (2013). Evaporative cooling system for storage of fruits and vegetables-a review. *J. Food Sci. Technol.*, 50(3), 429-442. doi: 10.1007/s13197-011-0311-6
- Laroute, V., Tormo, H., Couderc, C., Mercier-Bonin, M., Le Bourgeois, P., Coccagn-Bousquet, M. y Daveran-Mingot, M. (2017). From Genome to Phenotype: An Integrative Approach to Evaluate the Biodiversity of *Lactococcus lactis*. *Microorganisms*, 5(2). doi:10.3390/microorganisms5020027
- Lee, H., Hong, S. y Kim, D. (2014). Microbial reduction efficacy of various disinfection treatments on fresh-cut cabbage.. *Food Science and nutrition*, 2(5), pp. 585-590.
- Leroy, F., De Winter, T., Adrian, T., Neysens, P. y De Vuyst, L. (2006). Sugars relevant for sourdough fermentation stimulate growth of and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. *Int. J. Food Microbiol.*, 112(2), 102-111. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.016
- Li, D., Ni, K., Pang, H., Wang, Y., Cai, Y. y Jin, Q. (2015). Identification and antimicrobial activity detection of Lactic Acid Bacteria isolated from corn stover silage. *Asian Australas. J. Anim Sci.*, 28(5), 620-631.
- Liang, T.W., Wu, Y.Y., Huang, T.Y., Wang, C.Y., Yen, Y.H., Liu, C.P., Chen, Y.C., Wang, S.L. (2010). Conversion of squid pen by a novel strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* TKU010, and its application in antimicrobial and antioxidants activity. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 56(6), 481-9. doi:10.2323/jgam.56.481
- Liao, X., Guo, L., Ye, Z., Qiu, L., Gu, F. y Lin, J. (2016). Use of autochthonous lactic acid bacteria starters to ferment mango juice for promoting its probiotic roles. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 46(4), 399-405. doi:10.1080/10826068.2015.1045615.
- Linares-Morales, J., Cuellar-Nevárez, G., Rivera-Chavira, B., Gutiérrez-Méndez, N., Pérez-Vega, S. y Nevárez-Moorillón, G. (2020). Selection of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fresh Fruits and Vegetables Based on Their Antimicrobial and Enzymatic Activities. *Foods*, 9, 1399. doi:10.3390/foods9101399
- Liu, C., Gong, F., Li, X., Li, H., Zhang, Z., Feng, Y. y Nagano, H. (2012). Natural populations of lactic acid bacteria in douchi from Yunnan Province, China. *J. Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*, 13(4), 298-306.



- Liu, W., Pang, H., Zhang, H. y Cai, Y. (2014). Biodiversity of lactic acid bacteria. En H. Zhang y Y. Cai, *Lactic acid bacteria: Fundamentals and practice Biodiversity of lactic acid bacteria*. Springer Science+business media Dordrecht. doi:10.1007/978-94-017-8841-0_2
- Liu, Y., Chen, N., Ma, Z., Che, F., Mao, J. y Chen, B. (2016). The Changes in Color, Soluble Sugars, Organic Acids, Anthocyanins and Aroma Components in "Starkrimson" during the Ripening Period in China. *Molecules*, 21(6), 812. doi:10.3390/molecules21060812
- Lu, L., Zhao, L., Zhang, C., Kong, X., Hua, Y., Chen, Y. (2015). Comparative effects of Ohmic induction cooker and electric stove heating on soymilk trypsin inhibitor inactivation. *J. Food Sci.*, 80(3), C495-503. doi: 10.1111/1750-3841.12773
- Kwak, M.K., Liu, R., Kim, M.K., Moon, D., Kim, A.H., Song, S.H., Kang, S.O. (2014). Cyclic Dipeptides from Lactic Acid Bacteria Inhibit the Proliferation of Pathogenic Fungi. *Journal of Microbiology*, 52(1), 64-70. doi: 10.1007/s12275-014-3520-7
- Mamma, D., Topakas, E., Vafiadi, C. y Christakopoulos, P. (2009). Biotechnological Potential of Fruit Processing Industry Residues. En P. Singh-Nee Nigam, A. Pandey (Edits.), *Biotechnology for Agro-Industrial Residues utilization* (págs. 274-286). Springer Science+Business Media B.V. doi:10.1007/978-1-4020-9942-7
- Manini, F., Casiraghi, M., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D. y Plumed-Ferrer, P. (2016). Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 275-283. doi:10.1016/j.lwt.2015.10.045
- Mannozi, C., Cecchini, J., Tylewicz, U., Siroli, L., Patrignani, F., Lanciotti, R., Rocculi, P., Dalla Rosa, M. y Romani, S. (2017). Study on the efficacy of edible coatings on quality of blueberry fruits during shelf-life. *LWT - Food Science and Technology*, 85B, 440-444. doi:10.1016/j.lwt.2016.12.056
- Martino, G., Quintana, I., Espariz, M., Blancato, V. y Magni, C. (2016). Aroma compounds generation in citrate metabolism of *Enterococcus faecium*: Genetic characterization of type I citrate gene cluster. *Int. J. Food Microbiol.*, 218, 27-37. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.004
- Mathias, T., Alexandre, V., Cammarota, M., de Mello, P. y Sérvulo, E. (2015). Characterization and determination of brewer's solid wastes composition. *J. Inst. Brew.*, 121, 400-404. doi:10.1002/jib.229
- Mathias, T., Fernandes de Aguiar, P., Batista de Almeida E Silva, J., Moretzsohn de Mello, P. y Sérvulo, E. (2017). Brewery Waste Reuse for Protease Production by Lactic acid fermentation. *Food Technol. Biotechnol.*, 2, 218-224. doi:10.17113/ftb.55.02.17.4378
- Menconi, A., Kallapura, G., L. J., Morgan, J., Pumford, N., Gargis, B. y Tellez, G. (2014). Identification and characterization of lactic acid bacteria in a commercial probiotic culture. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 33(1), 25-30.
- Metsoviti, M., Paramithiotis, S., Drosinos, E., Skandamis, P., Galiotou-Panayotou, M. y Papanikolaou, S. (2011). Biotechnological valorization of low-cost sugar-based media for bacteriocin



production by *Leuconostoc mesenteroides* E131. *N. Biotechnol.*, 28, 600-609.
doi:10.1016/j.nbt.2011.03.004

- Michalak, M., Gustaw, K., Waśko, A. y Polak-Berecka, M. (2018). Composition of lactic acid bacteria during spontaneous curly kale (*Brassica oleracea* var. sabellica) fermentation. *Microbiol. Res.*, 206, 121-130. doi:10.1016/j.micres.2017.09.011
- Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, 31(3), 426-428. doi:10.1021/ac60147a030
- Monika, Savitri, Kumar, V., Kumari, A., Angmo, K. y Bhalla, T. (2017). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional pickles of Himachal Pradesh, India. *J. Food Sci. Technol.*, 54(7), 1945-1952.
- Muhialdin, B. J., Hassan, Z., Abu Bakar, F. y Saari, N. (2016). Identification of antifungal peptides produced by *Lactobacillus plantarum* IS10 grown in the MRS broth. *Food Control*, 59, 27-30.
- Nediani, M., García, L., Saavedra, L., Martínez, S., López Alzogaray, S. y Fadda, S. (2017). Adding Value to Goat Meat: Biochemical and Technological Characterization of Autochthonous Lactic Acid Bacteria to Achieve High-Quality Fermented Sausages. *Microorganisms*, 5(2). doi:10.3390/microorganisms5020026.
- Nguyen, N., Dong, N., Nguyen, H. y Lee, P. (2015). Lactic acid bacteria: promising supplements for enhancing the biological activities of Kombucha. *Springer plus*, 4(1), 91. doi: 10.1186/s40064-015-0872-3
- Nicoli, M. (2012). An Introduction to Food Shelf Life: Definitions, Basic Concepts, and Regulatory Aspects. En M. Nicoli (Ed.), *Shelf Life Assessment of Food*. (pág. 2). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press. doi: 10.1201/b11871
- Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Diario Oficial de la Federación, 10 de mayo de 1995.
- Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa Diario Oficial de la Federación, 12 de diciembre de 1995.
- Nunes, M. C. (2015). Correlations between subjective quality and physicochemical attributes of fresh fruits and vegetables. *Postharvest biology and technology*, 107, 43-54. doi:10.1016/j.postharvbio.2015.05.001
- Olvera-García, Y., Serrano-Maldonado, C. E. y Quirasco, M. (2015). Detección de proteínas con actividad antibacteriana producidas por bacterias ácido lácticas. *Biotechnología*, 19(1), 25-43.
- Otero-Pazos, P., Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., Sendón, R., Benito-Peña, E., González-Vallejo, V., Moreno-Bondi, M.C., Angulo, I., Paseiro-Losada, P. (2014). Active Food Packaging Based on Molecularly Imprinted Polymers: Study of the Release Kinetics of Ferulic Acid. *J. Agric. Food Chem.*, 62(46), 11215-11221.

- Ouattara, H., Ouattara, H., Droux, M., Reverchon, S., Nasser, W. y Niamke, S. (2017). Lactic acid bacteria involved in cocoa beans fermentation from Ivory Coast: Species diversity and citrate lyase production. *Int. J. Food Microbiol.*, 256, 11-19. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.008
- Pailin, T., Kang, D., Schmidt, K. y Fung, D. (2001). Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. *Lett. Appl. Microbiol.*, 33(1), 45-9. doi:PMID 11442814
- Parnell, J., Berka, R., Young, H., Sturino, J., Kang, Y., Barnhart, D. y Dileo, M. (2016). From the lab to the farm: An industrial perspective of plant beneficial microorganisms. *Front. Plant Sci.*, 7, 1-12. doi: 10.3389/fpls.2016.01110
- Parra, R. (2010a). Microencapsulación de alimentos. *Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín*, 63(2), 5669-5684.
- Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 2(86), 1-15. doi: 10.3389/fcimb.2012.00086
- Pessione, E. y Cirrincione, S. (2016). Bioactive molecules released in food by lactic acid bacteria: Encrypted peptides and biogenic amines. *Front.in Microbio*, 7, 1-19. doi: 10.3389/fmicb.2016.00876
- Pospiech, A. y Neumann, B. (1995). A versatile quick-prep of genomic DNA from gram positive bacteria. *Trends in Genetics*, 11, 217-218. PMID: 7638902
- Raeisi, M., Tajik, H., Aliakbarlu, J. y Valipour, S. (2014). Effect of carboximetil cellulose edible coating containing Zataria multiflora essential oil and grape seed extract on chemical attributes of rainbow trout meat. *Veterinary Research Forum*, 5(2), 89-93. PMID: 25568700
- Rattanachaikunsopon, P. y Phumkhachorn, P. (2010). Antimicrobial activity of basil (*Ocimum basilicum*) oil against Salmonella enteritidis in vitro and in food. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 74(6), 1200-1204. doi: 10.1271/bbb.90939
- Reina, L., Breidt, F., Fleming, H. y Kathariou, S. (2005). Isolation and selection of lactic acid bacteria as biocontrol agents for nonacidified, refrigerated pickles. *Journal of food science*, 70(1), 7-11. doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb09050.x
- Renna, M. G. (2017). Efficacy of combined sous vide-microwave cooking for food pathogen inactivation in ready-to-eat chikory stems. *J. Food Sci.*, 82(7), 1664-1671. doi: 10.1111/1750-3841.13719
- Reverte-Ors, J.D., Pedreño-Molina, J.L., Fernández, P.S., Lozano-Guerrero, A.J., Periago, P.M. y Díaz-Morcillo, A. (2017). A Novel Technique for Sterilization Using a Power Self-Regulated Single-Mode Microwave Cavity. *Sensors (Basel)*, 17(6), 1309. doi: 10.3390/s17061309.
- Rojas, M., Corzo, M., Sánchez, Y., Brito, D., Montes de Oca, R., Martínez, Y. y Pino Pérez, O. (2014). Actividad antibacteriana de aceites esenciales sobre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Rev. Protección Veg*, 29(3), 197-203.



- Russo, P., de Chiara, M., Vernile, A., Amodio, M., A. M., Capozzi, V., Massa, S. y Spano, G. (2014). Fresh-cut Pineapple as a new carrier of probiotic lactic acid bacteria. *Biomed Research International*, 1-9. doi: 10.1155/2014/309183
- Ruthu, Murthy, P. S., Rai, A. K. y Bhaskar, N. (2014). Fermentative recovery of lipids and proteins from freshwater fish head waste with reference to antimicrobial and antioxidant properties of protein hydrolysate. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 1884-1892. doi:10.1007/s13197-012-0730-z
- Rux, G., Efe, E., Ulrichs, C., Huyskens-Keil, S., Hassenberg, K. y Herppich, W. (2019). Effects of Pre-Processing Short-Term Hot-Water Treatments on Quality and Shelf Life of Fresh-Cut Apple Slices. *Foods*, 8(12), 653. doi:10.3390/foods8120653
- Ryan, M. y Walsh, G. (2016). The biotechnological potential of whey. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 15, 479–498. doi:10.1007/s11157-016-9402-1
- Sabir, A., Sabir, F. y Kara, Z. (2010). Effects of modified atmosphere packing and honey dip treatments on quality maintenance of minimally processed grape cv. Razaki (*V. vinifera* L.) during cold storage. *J. Food Sci. Technol.*, 48(3), 312–318. doi: 10.1007/s13197-011-0237-z
- Sabo, S., Converti, A., Ichiwaki, S. y Oliveira, R. (2019). Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa in supplemented whey powder formulations. *J. Dairy Sci.*, 102(1), 87-99. doi: http://10.3168/jds.2018-14881
- Sáez, G., Hébert, E., Saavedra, L. y Zárate, G. (2017). Molecular identification and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented kidney beans flours (*Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus*) in northwestern Argentina. *Food Research International*, 102, 605-615. doi:10.1016/j.foodres.2017.09.042
- Salvucci, E., LeBlanc, J. G. y Pérez, G. (2016). Technological properties of Lactic acid bacteria isolated from raw cereal material. *LWT - Food Science and Technology*, 70, 185-191. doi:10.1016/j.lwt.2016.02.043
- Sánchez-González, L., Quintero Saavedra, J. I. y Chiralt, A. (2014). Antilisterial and physical properties of biopolymer films containing lactic acid bacteria. *Food Control*, 35(1), 200-206. doi:10.1016/j.foodcont.2013.07.001
- Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B., Santos-López, E., Amaro-Reyes, A., Barboza-Corona, J. y Regalado, C. (2014). Antimicrobial Edible Films and Coatings for Meat and Meat Products Preservation. *The scientific world journal*. doi: 10.1155/2014/248935
- Serio, A., Chávez-López, C., Paparella, A. y Suzzy, G. (2010). Evaluation of metabolic activities of enterococci isolated from Pecorino Abruzzese cheese. *International Dairy Journal*, 20, 459-464. doi:10.1016/j.idairyj.2010.02.005
- Settanni, L. y Corsetti, A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 123-138. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.09.001



- Shafiur-Rahman, M. (2007). *Handbook of food preservation* (Segunda edición ed.). Boca Ratón, Florida, Estados Unidos: .RC Press, Taylor and Francis Group LLC.
- Sharma, S., Singh, R. y Rana, S. (2011). Bioactive peptides: A review. *Int. J. Bioautomation*, 15(4), 223-250. doi: 10.1093/fqsafe/fyx006
- Shayanfar, S., Chauhan, O., Toepfl, S. y Heinz, V. (2014). Effect of non-thermal hurdles in extending shelf life of cut apples. *J. Food Sci. Technol.*, 51(12), 4033-9. doi: 10.1007/s13197-013-0961-7.
- Sienkiewicz, M., Lysakowska, M., Pastuszka, M., Bienias, W. y Kowalczyk, E. (2013). The potential use of basil and Rosemary essential oils as effective antibacterial agents. *Molecules*, 18, 9334-9351.
- Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D., Tabanelli, G., Mantanari, C., Gardini, F. y Lanciotti, R. (2015). Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce. *Food Microbiology*, 47, 74-84. doi: 10.1016/j.fm.2014.11.008
- Snyder, A. y Worobo, R. (2013). Chemical and genetics characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *J. Sci. Food Agric*, 94(1), 28-44. doi: 10.1002/jsfa.6293
- Sonar, N. y Halami, P. (2014). Phenotypic identification and technological attributes of native lactic acid bacteria present in fermented bamboo shoot products from North-East India. *J. Food Sci. Technol.*, 51(12), 4143-8. doi:10.1007/s13197-014-1456-x.
- Souza, M., Vaz, A., Cerqueira, M., Texeira, J., Vicente, A. y Carneiro-da-Cunha, M. G. (2015). Effect of an Edible Nanomultilayer Coating by Electrostatic Self-Assembly on the Shelf Life of Fresh-Cut Mangoes. *Food Bioprocess Technol*, 8, 647-654. doi:10.1007/s11947-014-1436-1
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. y Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40 (2), 175-179. doi: 10.1016/s0167-7012(00)00122-6
- Swain, M., Anandharaj, M., Ray, R. y Rani, R. (2014). Fermented fruits and vegetables of Asia: A potential source of probiotics. *Biotechnology Research International*, 2014, 190. doi: 10.1155/2014/250424
- Taboada, N., Van Nieuwenhove, C., López Alzogray, S. y Medina, R. (2015). Influence of autochthonous cultures on fatty acid composition, esterase activity and sensory profile of Argentinean goat cheeses . *Journal of Food Composition and Analysis*, 40, 86-94. doi:10.1016/j.jfca.2014.12.013
- Théolier, J., Hammami, R., Labelle, P., Fliss, I. y Jean, J. (2013). Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *J. Funct. Foods*, 5, 706–714. doi:10.1016/j.jff.2013.01.014
- Todorov, S. y Dicks, L. (2006). Section Cellular and Molecular Biology Medium components effecting bacteriocin production by two strains of *Lactobacillus plantarum* ST414BZ and ST664BZ isolated from boza. *Biologia Bratislava*, 61(3), 269-274. doi:DOI: 10.2478/s11756-006-0049-1

- Todorov, S., Prévost, H., Lebois, M. D., LeBlanc, J. y Franco, B. (2011). Food Research International Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*)-From isolation to application: Characterization of a bacteriocin. *Food Research International*, 44(5), 1351-1363. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.027>
- Treviño-Garza, M., García, S., del Socorro Flores-González, M. y Arévalo-Niño, K. (2015). Edible Active Coatings Based on Pectin, Pullulan, and Chitosan Increase Quality and Shelf Life of Strawberries (*Fragaria ananassa*). *J. Food Sci.*, 80(8), M1823-30. doi: 10.1111/1750-3841.12938
- Trias, R. (2008). *Lactic acid bacteria as bioprotective agents against foodborne pathogens and spoilage microorganisms in fresh fruits and vegetables*. Universidad de Girona: Tesis doctoral. Instituto de Tecnología Agroalimentaria. Departamento de Ingeniería Química, Agraria.
- Trias, R., Bañeras, L. y Montesinos, E. (2008a). Bioprotection of Golden delicious apples and iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 123(1-2), 50-60. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.065.
- Trias, R., Bañeras, L., M. E. y Badosa, E. (2008b). Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International microbiology*, 11(4), 231-236. doi: 10.2436/20.1501.01.66
- Unban, K., Kanpiengjai, A., Takata, G., Uechi, K., Lee, W. y Khanongnuch, C. (2017). Amylolytic Enzymes Acquired from L-Lactic Acid Producing *Enterococcus faecium* K-1 and Improvement of Direct Lactic Acid Production from Cassava Starch. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 183(1), 155-170. doi:10.1007/s12010-017-2436-1
- Valerio, F., Lomigro, S., Di Biase, M., De Candia, S., C. M. y Lavermicocca, P. (2013). Bioprotection of ready to eat probiotic artichokes processed with *Lactobacillus paracasei* LMGP 22043 against foodborne pathogens. *Journal of Food Science*, 78(11), 1757-1763.
- Vázquez, J., Meduñña, A., Durán, A. I., Nogueira, M., Fernández-Compás, A., Pérez-Martín, R. I. y Rodríguez-Amado, I. (2019). Production of valuable compounds and bioactive metabolites from by-products of fish discards using chemical processing, enzymatic hydrolysis and bacterial fermentation. *Marine drugs*, 17(3). doi:10.3390/md17030139
- Veberic, R., Schmitzer, V., Petkovsek, M. y Stampar, F. (2010). Impact of shelf life on content of primary and secondary metabolites in apple (*Malus domestica* Borkh.). *J. Food Sci.*, 75(9), S461-8. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01823.x.
- Veeravalli, S. S. y Mathews, A. P. (2018). Exploitation of acid-tolerant microbial species for the utilization of low-cost whey in the production of acetic acid and propylene glycol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(18), 8023–8033. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9174-3>
- Vera Pingitore, E., Todorov, S., Sesma, F. y Gombossy de Melo Franco, B. (2012). Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. *Food Microbiol*, 32, 38–47. doi:10.1016/j.fm.2012.04.005



- Verni, M., Wang, C., Montemurro, M., De Angelis, M., Katina, K., Rizzello, C. y Coda, R. (2017). Exploring the Microbiota of Faba Bean: Functional Characterization of Lactic Acid Bacteria. *Front Microbiol.*, 8, 2461. doi:10.3389/fmicb.2017.02461
- Vignolo, G. S. (2012). Food Bioprotection: Lactic Acid Bacteria as natural preservatives. En R. A. Bhat (Ed.), *Progress in food preservation* (págs. 451-483). John Wiley and Sons. doi:10.1002/9781119962045
- Vital, P., Dimasuay, K., Widmer, K. y Rivera, W. (2014). Microbiological quality of fresh produce from open air supermarkets in the Philippines. *The scientific World Journal*, 2014. doi: 10.1155/2014/219534
- Wada, T., Noda, M., Kashiwabara, F., Jeon, H., Shirakawa, A., Yabu, H., Matoba, Y., Kumagai, T. y Sugiyama, M. (2009). Characterization of four plasmids harboured in a *Lactobacillus brevis* strain encoding a novel bacteriocin, brevicin 925A and construction of a shuttle vector for lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. 155(5), 1726-1737. doi: 10.1099/mic.0.022871-0.
- Wang, H., Pampati, N., McCormick, W. y Bhattacharyya, L. (2016). Protein Nitrogen Determination by Kjeldahl Digestion and Ion Chromatography. *J. Pharm Sci*, 105(6), 1851-1857. doi: 10.1016/j.xphs.2016.03.039.
- Wang, Y., Tashiro, Y. y Sonomoto, K. (2015). Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *J. Biosci. Bioeng.*, 119, 10-18. doi:10.1016/j.jbiosc.2014.06.003
- Wong, C., Khoo, B., Sasidharan, S., Piyawattanametha, W., Kim, S., Khemthongcharoen, N., Ang, M.Y., Chuah, L.O. y Liong, M. (2015). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by crude and fractionated extract from lactic acid bacteria. *Benef Microbes.*, 6(1), 129-39. doi:10.3920/BM2014.0021
- Worsztynowicz, P., Białas, W. y Grajek, W. (2020). Integrated approach for obtaining bioactive peptides from whey proteins hydrolysed using a new proteolytic lactic acid bacteria. *Food chemistry*, 312, 126035. doi:10.1016/j.foodchem.2019.126035
- Wulijideligen, A. T., Hara, K., Arakawa, K., Nakano, H. y Miyamoto, T. (2012). Production of bacteriocin by *Leuconostoc mesenteroides* 406 isolated from Mongolian fermented mare's milk, airag. *Anim. Sci. J*, 83, 704-711. doi:10.1111/j.1740-0929.2012.01010.x
- Xiang, B.Y., Simpson, M.V., Ngadi, M.O. y Simpson, B.K. (2011). Effect of pulsed field on the rheological and colour properties of soy milk. *Int. J. Food Sci. nutr.*, 62(8), 787-93.
- Zhang, M., Wang, X., Cui, M., Wang, Y., Jiao, Z. y Tan, Z. (2018). Ensilage of oats and wheatgrass under natural alpine climatic conditions by indigenous lactic acid bacteria species isolated from high-cold areas. *PLoS One*, 13(2), e0192368. doi:10.1371/journal.pone.019
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., C.M., F., Harris, H., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G. y Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae*



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

and Leuconostocaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 70(4), 2782-2858. doi:
10.1099/ijsem.0.004107

APÉNDICES

Apéndice I. Secuencias parciales del gen 16s de las bacterias ácido lácticas aisladas de frutas y vegetales frescos.

Cepa	Secuencias	Nº de acceso	BAL
ELO8	TGCAGTCGAACGCTTCTTTTCCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGGAA AAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCA TCAGAAAGGGGATAACACTTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACA ATCGAAACCGCATGGTTTCGTTTTGAAAGGCGCTTTACGGTGCCGC TGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG CTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC CACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCA GTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCC GCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAG AAGAACAAGGGGTGAGAGTAACTGTTCAACCCCTTGACGGTATCTAAC CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT AGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCA GGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGG AGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTG GAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACAC CAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTC GAAAGCGTGAGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG CCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGT GCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGACCGC AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG GAGCATGTGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC TTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGG CAAAGTGACAGG	MN636717	<i>Enterococcus mundtii</i>
PIM5	CCTACGGGAGGCTGCAGTAGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCC TGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAA AGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAG TTTGACGGTACCATAACAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCA GCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGC GTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGG AGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACTGGTTAACTTGAGTGCAG TAGAGGTAAGTGGAATCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATAT ATGGAAGAACACCAGTGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTG ACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCT GGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTTTC CGCCTCTTAGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTGTTCGCCTGGGGA GTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGC ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAAC CTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTTTAGAGATAGAAGTGTT CTCTTCGGAGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCT CGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT TATTGTTAGTTGCCAGCATTGAGATGGGCACTCTAGCGAGACTGCC GGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGATCATCATGC CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAACG AGTTGCCAACC CGGAGGGTGAGCTAATCTCTTAAAGTACGTCTCA GTTCCGATTGAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTCGGAATCGCT AGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCT	MN636704	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

	TGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTAAATGCCCAAAGC CGGTGGCCTA		
CAL14	GACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCC ACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAA GGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAA TAGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGC TAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTA TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTC TGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACT GGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAATCCATGTGTAGCG GTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCACTGGCGAAGGCGGC TACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGGTAGC AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACA CTAGGTGTTAGGAGGTTTCCGCCTCTTAGTGCCGAAGCTAACGCAT TAAGTGTTCGCGCTGGGGAGTACGACC	MN636705	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
PIM4	TGCAGTCGACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAA AGAGGAGTGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCAT CAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAA TCAAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTGCT GATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC TCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC ACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTACGGGAGGCAGCAG TAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCG CGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGA AGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACC AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA GGTGGAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG GCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGA GGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG AATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACC AGTGCGGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCG AAAGCGTGCGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC CGTANACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTG CTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGNCGACCGCA AGGTTGAATCTCAAAGGAATTGACGTGGTCCGCAC	MN636718	<i>Enterococcus faecium</i>
JAV15	TGCAGTCGAACGCTTCTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGGAA AAGAGGAGTGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCA TCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACA ATCGAAACCGCATGGTTTCGTTTTGAAAGGCGCTTACGGTGCCGC TGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG CTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC CACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTACGGGAGGCAGCA GTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCC GCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAG AAGAACAAGGGTGAGAGTAACTGTTCAACCCCTTGACGGTATCTAAC CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCA GGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGG AGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTG GAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACAC CAGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGCCTGTAGCTGACGCTGAGGCTC GAAAGCGCGCTGAGCAA	MN636719	<i>Enterococcus mundtii</i>
TOV9	GAAGAACAAGGGTGAGAGTAACTGTTCAACCCCTTGACGGTATCTAA CCAGAAAGCCACGGCTAATTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC AGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGG	MN636706	<i>Enterococcus mundtii</i>

	GAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT GGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACA CCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCT CGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAG TGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCG CAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGT GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGACCCTTACCAGGT CTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGG GCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTT GCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACC GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT GGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCGAAGT CGCAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTTCGATTGTA GGCTGCAACTCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGG ATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG CCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTA ACCTTTTGGAGCCAGCCGC		
PEP11	TAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTAT CTAACCAGAAAGCCACGGGTAAGTACGTGCCATGAGCCGCGATAAT ACATACGTGGCATGCGTTGGCCGATTATTGGGCACAAAGCGAG CGCAGGCGGATTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGACTCAACC GGGGAGGATCATTGAACTGGGAGACTTGAATGCAGAAGAGGAG AGTGGAAATTCATGTGTAGCGGNGAAATGCGGAGATATATGGAGG ATCACCTACGCTGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG GCTGGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT CCACCCCGTAAACGATGAGTGTTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC TTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAC GACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACA AGCGGTGGAGGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTT ACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTATAGAGATAGAGCTTCCCC TTCGGGGGCAAAGTGCCAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT GTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATT GTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCCCTTTAGCAAGACTTCCGGTG ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAAGACGTCAAATCATCATGCCCT TATGACC	MN636707	<i>Enterococcus faecium</i>
LEC1B	CGGGCGAAGGGGGGCCGTTATAAAATGCAAGTCGACGGAGCTTTC GGGGAATTAGTGGCGGACGTTGAGTACGCGTAGGGATCAATCCA TGGGTGGGGGACAACTCCTCGCCAACTGGAGCTAATACCGCATG ATACCTGAGGGTCAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAACCTGCGT TCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAGGCGATGATCG ATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACAC GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT GGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCT TCGGATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACGATGATGACGGTACCC GTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA CGAAGGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCG CGTAGCGGTTGATGCCTTTAGATGTGAAATCCCCTGGCTTAACCTG CAACTGCATTTGAGACGCATTGACTAGAATTCGAGAGAGGTTGTGG AACCCCCAGCGTAGAGGTGAAATTTGTAGATTTGGGGAAGAAGAGC GGGGGGGAAAGGCGCACCTTTCTTCATTCTGAACGCTGAGCGCGA AAAGCGAGGGAAGCAAACAGGATTAGATACCCTTGATACCCACGTT GAAACCAAGGGGGGCTGAATGTTGGGTAACCTTATCACCCAGGGCAA AGCTAAACCGCATAATCTCCCCGCTTGGGGAGTACGGTCCCAAGG TTATACTCCAAAGAAATTTGACGGGGGGCCCGCACCA	--	--

GRA3	GGTCAATGTCCAGGTAGCCTGTACTGGGCTTGCATCATTGTCTTGG TAGGCCTTTACCCACCAGCTTACTGGTGCACCGCGGATCCATCTC TAGGTGACGCCGAAGCGCCTTTTAACTTTGTTTCATGCCAGACTCT ATTACCTTCGAAATTAGCATGTGTTTCCACATGTTATCCCCAGCCTT GAGGCAGGTTGTCCACGTGGGACTCGCCCGGCCGCGCACTCGCTG GTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATCGCCATTGTGA GACTGGTTCGGCCACATTGGGACTGAGCCAGGATCCAACCTTCCTAC GGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGAT GGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCA CTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGA CGGTACTATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTA AAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAG CTCACTCCCGGAATGGCATTGGGAACTGGTTAACTTGAGTGCAGT AGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGGTGAATGCGTAGAT ATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGCACTGCAAC TGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACC CTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGTAGGAGGTTT CTGCTTCTAACTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTGTTCCGCCTGGGG AGTACGACCGCAAGTTGAACTCCAAGGAATTGACGGGGACCCGC ACAGCGGTGGAGCCATGTGTTTAATTCAAGCCACCGCGAAAAACCT TACCAGGTCTTGACCTCCTTTGGATGCTTTTAAACGTAGAAGTGTTT TCTCTCCGGAACAAAGTGACAGGGCGGTGCATGGGTCGTTTCGTC ACCTCCGTGTCCGAGGAGAGTTGGGCTAAGTCGTCAACGGAGGCG AACTTTATTGTTAGCTGGCAGACTTCCGAATGGGCATCCTTAGCG ACTGGCCGGTGACAAACGGAGAGAAAGGGCGGGACCACACTTCGA AATACTACATGGCCCCTTATAGACACTGTGGCTCCACACACGTTGT CATACATATGGCGCGTATACACCACCGAGGTTGCGCGACGCCCG CGCAATGTTGC	--
MAV5 A	CCCCTACAAGGGCTTTCCCCCTCTCCTGGTGGCGCTTGCATCGT GGCCTTGGTGCAGCCGTTACCTCACCAACTTTCCTAATGCACCGCG GGTCCATCCATCAGCGGCACCGTAAAGCGCCTTCAAACGAAACC ATGCGGTTTCGATTGTTATACGGTCTTAGCACCTGTTTCCAAGTGTT ATCCCCTTCTGATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTTTCG CCACTCCTCTTTTCCCGGTGGAGCAAGCTCGGGTGGGAAAAGAGG CGTTCGACTTGCATGTATAAGGCACGCCGCGAGACATTGGGACTG AGACACGGCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCG GCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAA GGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGGTGA GAGTAAGTGTTCACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGC TAATACTAGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGT CTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAAC TGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAG CGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGGAACACCAAGTGGCGAAGGC GGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGCTCGAAAGCGTGGGGAG CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTG CTAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATT AAGCACTCCGCCTGGGGGAGTACGACCGCAGGGTTGAAACCCAAA GGAATTGACGGGGGCTCGCACAAAGCGGTGGAGCATGGTGGTTT AAATTCGAAGCAACCGCGAAGAACTCTACCAGGTTCTTGACATTTC TTTGGACCACTCTAGAAGAATAGAAGCTTCCCCTTTCGGGGGCAA GGAACAGGTGGTGCAATGGGTTGTCGTCAACTTCGTGTCGTGAGA ATGTTGGTTTAAAGTCCCGCAACGGAGCGCACCTTTATGGTAGTTG CCATCATTAAAGTGGAACCTCAAGCCAGAACTGCCCGGTGAAAACCG AGAAGGTGGTATAGACGTCAAAATACTCATGCCTTATGAACTGGCT	--

	CACACACGTGTGCTACACATTGGGAAAGTCAAACACCGAGTCGGTC GA		
GRA2	GAACGGCGCTTTACCCTGCCGCTACTCACATGGACCCGCACTCGC ATTAGCCCGTTGGTGTGGGCTCGGCTCACCAAGGCCACCATGCAT AGCCGACCTGAGAGCACGATCGCGCCACATTGGGACTGAGACACG ATCCCAAATACTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAAT GGACAAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGACCAAAGTTT TCAGATCATAAACTCTGATGATAGAGAACAACCTGGGTGAGAGTA ACTGTTACCCCTTGACGTTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT ACCTGCCAGCAGCCGCGGTAATACTTAGGTGGCAAGCACTTGTCTC CGCTTTATTGGGGCGTAACGCGAGCGCACGCGGTGTTCTTAAATCT GATGTGAAAGCCTCCCGGCTCAACCGGGGTAGGGTCATTGGAAAC TGGGATACTTGAGTGCAACCCTCGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGC GGTGAATGCGTACATATATGGTGAACACCAAGTGGTCCCCAGCGG CTCTCTGGTCTGTACTGACGCTGACGCTGAGACCGTGTGGCGCC AACAGGATTACATACCCTGGTTAGTCCACGCCGGAACAATGAGGG CTAACATTTTTTCGAGGGTTGCAGTCCTTCATTGCTGCAGCTAATGCA TTACGCACTTCCGCCTGGGAGGTACTACCGTCAAGATTGAACTTC AAGGCAGTGACGGGGGCCCGCCCCAAGAGTTGGAAACAAGGTGG TGTTTCATCTTAAAGCTATCCCGGAGAACTCTTGCCAGGG	MT146025	<i>Enterococcus mundtii</i>
PER2	TCAGAAGGAGGATATGACGTGTTAGCAGGTGCTAATGCCGTATCAC ATGCGAAACCGTGTGGTTACGTTCTGAAGGGCGCCTTACGGTGCC GCTGATGGAAGGACCCGCGGTGCATTACCTAGTTGGCGTGCGAAC GGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGTGAGGGTGATCG GCCACATTGGGACTGATACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAG CAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACG CCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAG AGAAGAACAAGGGTGAGAGTAACTGTTACCCCTTGACGGTATCTA ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGGCGTAAAGCGAGC GCACGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCG GGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAAAAGAGGAGA GTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTACATATATGGAGGAA CACCAGTGGCCAAGGCGGTTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG CTCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTACATACCCTGGTCGTCTAC GCCCTAAACAATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGTCTTTCA TCGCTGCAGCTAACGCCTTAACCCCTTCCGCTGGGGAGGTACTAC CGTCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACCGGGTGTCCCCCAAAG CAGTCGGAGCCAGGTGTTTTAATCTAAAGCAACCCGAAAAACCTTT ATCAGGGTTTTGAACATCCTTGTA	MT146026	<i>Enterococcus mundtii</i>
MAV1 5	GAGAGGGGCGATCGCCCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAAC TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAG TCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGT AAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGGTGAGAGTAACTGTTAC CCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA GCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAAGCGTTGTCCGGATTTATT GGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG CTCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGGACTT GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGATATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGG TCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGG ATTAGATACCCCTGGTAGTTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAG TGTTGGAGGGGTTTTCTCGCCTCTTTCAGTGCTGCCAGCTAAACGCA TTAAGCACTCCGGCTTGGGGGAGTACGACCGGCAAGGTTGAAACT TCAAGAAATTGACGGGGGCCCGCCACAGCGGTGGAGCATTGTGG	MT146027	<i>Enterococcus mundtii</i>

	TTTAATTCAAAGCAACGCGAAAACTCTACCAAGGTCCTGGACAT CCTTTTGACCACCTCTTAAGA		
GUA5	AACCGTGTGTTTTCGTTTTGAAGGGCGGTTTACGGTGGTGTGATG GATGGACCGGCGGTGCATTAGCTAGGTGGTGAGGGAACGGCTCAC CAAGGCCGCGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCGACAT TGTGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGG GAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTG AGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAA CAAGGGTGAGAGTAACTGTTCACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAA AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGTAGGT GGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAAGCGAGCGCAGGC GGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCCGGGGAGG GTCATTGGAAAACTGG	MT146028	<i>Enterococcus mundtii</i>
CHI16	CCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGA CGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCG GATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGGTGAGAGTAACT GTTCACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAT TTATTGGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT GAAAGCCCCCGGCTCACCCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAG ACTTGAGTGCAGAACACGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAA ATGCGTACATATATGGAGGAACACCAGTGGCCAAGGCGGCTCTCT GGTCTGTAAGTACGCTGAGCTCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGA TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGAAACAATGAGTGCTAATGTTG GAGGGTTTTCCGCCCTTTCATCGCTGCACTAACGCACTTAACCACGT CCGCCTGGGGAAAGTATCTACCGCAAGGATTGAAAACCTCAAAGCAA GTCGACGGTGTTCGCCGCCAAGCAGGTGGAGCAATGTGTGTTAATT CTCAAAGACATACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTTGAC	MT146029	<i>Enterococcus mundtii</i>
CHI15	TTACGGGAATAGCGCGATAGTTTGTATTGCCTGAGCCACAGGAGCT AGCTCGTAGGTCGAGAGGAGTCGCGTGGAAAAAAATTTGGGAG GCAGCAGGTCACTTTTATGGTAGTCACCGGGGCGCGCTGACCCGG GATTAACCCTTATTCCGGCTGCTCTTGGGATTAAGATAAACGAACCTC CCCCCATCAAACCTCTAA	--	
PER3	CTTGAAACACGTGCTAATACCGTAGCACGTGTGCCCTGTATGGTT CCCTTCTGAAGGGCGGTTTACGGTCGTGTTGATGGATGGACCGGC GGCGCATTAGCTGGTTGGTGAGGGCGCGGCTCACCAAGGCCGCAT GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGCACTGAGAC ACGGCCGGACGCCTACGGGAGGCAGCATTAGGGAATCTTCGGCAA TGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTT TTCGATCGTGAAACTCTGTTGATAGAGAAGAACAAGGGTGAGAGT AACTGTTACCCCTTGACGGTATCTAACCGGAAAGCCACGGCTAAC TACCTGCCAACAGCCTCGGTAATACGTATGTGGCAAGCGTTGTCCG GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCACAAGCTGTTACTTTAATCTGATG TGAAAGCTCCCGGATCAACCGGGGAGGGTGCAATTGGAAACTGGGA TACTTGAGTGCAGAACAGGACAGTGGAATTCCATGTGTGGCGGTGA AGTGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTC TGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGCGGGGAGCAAACG GATTACATACCCTGGTTAGTCCATGCCATAACGATGAGTGCTAATGT TGCAGGTTTTCCGCCCTTCAATGCTGCACCTAACGCATTAAGCACTC CGCCAGGGGAGTATTACCGCTAGATTGAAAATTAAGGATTGACG GGGGTCCGCCACAAGCGGTGGAACATGTGATTTTAATTCAAAGCAT CCCGAAGAATCCTTACCACGTCTTTGAACTCTTTTTGATCACTTTT GGAGATCTACCTTCCCCATTTCAGA	MT146030	<i>Enterococcus mundtii</i>
CAL11	TTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCTGCCGTAA GGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGT GTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTTAAGCACTGTTGTATGGCAAGA	MT146031	<i>Leuconostoc citreum</i>

	AATGCTAAAATACGGAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATACCAGAA AGGGACGGCTAAGTACGTGCCAACAACCGCGCAAATACCTATGTC CCGAGTGTTATCCGGATTTATTGCGCGTATAGCGAGCGCAAACCGA TGATTAACCTCTGATGTGAAACTCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCA TTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGTTGCATAGGTGAGTGAAACTCCA TGTGTAGTCCTGGAATGCGTAGATATATGGAACAACACCAAGTGGA CATGCGGGTTCATGGGACAATAACTGACTTTGAAGCTCCAATGTGT GGGTAGCACACGGGATTAAAATACCCTGGTTAGTCCACATCGTAAA CTATGAATACTAGGATGTAAGGAAGTTTCCGCCTCTTTAATGCCCAA TCTAACGCATTAAGTATTTCCGCTTGGGGAGTACGAACGCAAGGTT TAAACTCAAATGAATTTACCGGAACCCGCCCAAGCACTGGCACATG TGGTGAAATCGATCTACCTAAAAACCTTACCAGGATCTTGACACCTT TGA		
NAR3	CCGTCGCTTGGAGCTGAGTAAGTATGTACTGCAGTCGCCTGCGCG TCGTGGTGAGCTTGACCTTCCAAGTACTGAGTGCGCACGGCGGATA CATCTGTGGGTGACGCGGCTGCGCCTGGGGCTTGATTTGTGAACA GCTGCGTTACCTTCGGAATCTGAGTCTGTCATGATATGTAATCCAAA GGCGCTAGGGCGGTTCTTAACGTGGGATCCGCGCGTGCATTAGTT AGTTGGTGGGGGAAAGGCTTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAG TTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAAC TCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAG CCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGT AAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAATGCTAAAATAGGGAATGATTTTA GTTTGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAG CAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGG GCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATTAAGTCTGATGTGAAAGCC CGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGAAACTGGTTAACTTGAGTG TTGTAGAGGTAAGTGGAATCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGA TATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACAACAA CTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATAC CCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGATACTAGGTGTTAGGAGGTT TCCGCCTCTTAGTGCCGAAGCTAACGCATTAGTATTCGCGCTGGG GAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAGGAATTGACGGGGAACC CGCACAGCTGTGGAGCCTGTGGTTAATTCCGAGCAACGCGAGACC TTACCAGGTCTGGACATCCTTTGAACTTTAGAGATAGAGGTGTTCTC TTCCGAAACAAAGTGACAGGTGATGCATGGTCTGTCTCAGCTTCGT GGTCGTGGATGGTTGGGATAAGGTCCCGCAACGAGCCGCACCCTT AATGTAGTCGCCGACATTCGTGGGCACTCTAGCCAGCACTGCCCG TGACAACTGAGAAGCGGGTACAAAGCTCGAATACTCTGGCCCTTTA TGAACCTGGCTCAACAGCTGC	--	--
GUA1 2	TTCGGTGCTGTAAGGTGTGGCCTGTACCCACCAAGCTCAGTAATG CACGGGGGATCAATCTCTAGGTGACGCCGAAGCGCCTTTTGCTTTG TGTGTGCGACACTAAGTTTCCTTCGGTATTAGCATCTGTTTCCACAT GTTATCCCCAGCCTTGAGGCAGGTTGTCCACGTGTGACTCACCCGT TCGCCACTCACTTGAAAGGTGCAAGGACTACCACGCTGTGGGTGC ATAGTGATGTGAGAGGCTGGCCGGCCACATTGGGACTGAGACAC GGCCCAAACCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAAT GGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTT TCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGA AATGATTTTAGTTTGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAAT ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCG GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGAT GTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTT AACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAATCCATGTGTAGCGGTG GAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAAGCGGCTTAC TGGACTGCAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACA	--	--

	GGATTAGATACCCTGGTAGTCCAACACCGTAAACGATGAACACTAG GTGTTAGGAGTTTCCGCCTTCTTAGTGCCGAAGCTAACGCATTAAG TGTTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAGGGAA TTGACGGGGACCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGATTAAATTGAA GCACGCCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTTT AGAGATAGAGTTGTTCTCTTTTCGGAGAACAAGTGACAGGTGGTG CCATGTCGTCGTCAGCTTCCGTGTCGTGAGAATGTTGGTAAGTTCC CGCAACGAGCGCGCACCTTATTGTAGTTGCAGCCATTCAGATGGCA CTTCTAGCGAGAACTTGCCGTGACAACGGGAGGAAGGCGGGACGA ACGTCGGAATCTATCATGGCCCTTTATGAACTGGGCTTAACACGTG GTCTACAATGTGGCTATACACGAGTTGCACCGCGAGGGTGAGCTAA TCCTCTAGTAGCTTCCAGTCGGAATGGGATCTGCAATC		
ELO9	ACCCATGGCCCTTCCCCCTCGGTCGGCTTGCATCGTGGCCTTGGT GAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCAT CAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAACCATGCGGTTTCG ATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTG ATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTTTCGCCACTCGTCTT TTTCCGGTGGAGCAAGCTCCGGTGGAAAAAGAAGCGTTTCGACTTG CGTGTATAAGGCGCGCCGCGCGACATTGGGACTGAGACACGGCCC AAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACG AAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGA TCGTAACACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTT CATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA GCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTG AGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAAGGCGGCTCTCTGGT CTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTT GGAGGGTTTCCGCCCTTACAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCCACT CCGCCTGGGGAGTACGACCGCAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC GGGGGCCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCCGAAGCAC CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTTGACCACTCTAGA GATAGAGCTTCCCCTTTTCGGGGGCAAGTGACAGGTGGTGATGGT TGTCGTACAGCTCGTGTCCGGGAGATGTTGGGTTAGTCCCCGCCAC CGAGGCGCACCTTTATTTGTTAAGTTGCCAATCCAATTCAGTTGGCA CTTCTTAGCAGACCTGGCCGGGTGAACAAACGGAGAGAGGTGGGA TGACGTTCAAATCATCATGGCCCCTTTATGACCTGGCTCACACACG TGCTACAATGGGAGGTACAACAGATTGAAGTTCCGCCGAAGCTAGC TCAAT	--	--
MAD4	CCCAAATTTCTCCCCCTTCTTCGGCTGCGGGTGATCGTGGTCCT TGGTGCGCCGTTAGTCACCAACTCTGATAGTGACCGGGGGTCCG TCGTACGCGGCACCGTAACGCGCCTTTCAGACGAAACCATGCGGG TTCGCTTGATACGGCCTTAGCACCTGTTTCCCGTGTGGTCCCCT TCTGATGGGCGGGTTACCCACGTGTTACTCACACGTTCCGCACTCC TCTTTTCCCGGTGGAGCAAGCTCCGGTGGGAAGAGAAGCGTTTCA CTTGCGACCTGAGGGGGCGATGCGCGACATTGGGACTGAGACACG GCCCAAACCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATG GACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTT CGGATCGTAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGGTGAGAGTAA CTGTTACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG ATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATG TGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAG ACTTGAGTGCAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA	--	--

	AATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTC TGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAG TGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGC ACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAAT TGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGGTGGTTTAATTCAG AAGCAACGCCGAAGAACCTTACCAGGGTCTTGGACATCCTTTGACC ACTCTAGAAGATAAGAGGCTTCCCCTTTCCGGGGGCAAAGGTGACA GGTGGTGCATGATGTCGTGCTGAGTCTGTCCTTGGAGATGTGGGTAAA GTCCCGCACCGAGGCGCACCTTATTGTTAGTGCATCATTAAAGTTGG CACCTTAGACCAGAACTTGCCGGGTGACAACGGAAGAAGGGTGGG ATGACGTTCAATCTATCATGGCCTTTTATGACTTGCCTAACACGCTG CTTCACATTGGGAGTATCAACACGAGTCGCGTAAGTTCGCGAGGTC TTAGACT		
MAV1 4	CCCATTGGGCCCCCTTCTCTTCTCTGAGTCGGCTATGCATCGTGGC CTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACCAGCTAATGCACCGCGGGTC CATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAACCATGC GGTTTCGATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTCCACGTGTTATCC CCTTCTGATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACACGTTCCGCCAC TCCTCTTTTTCCGGTGGAGCAAGCTCCGGTGGAAAAAGAAGCGTTC GACTTGCATGTATTAGGGGCGATGGGCGACATTGGGACTGAGACA CGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAA TGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTT TTCGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGT AACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC GGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGA TGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGG AGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGT GAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTC TCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAA CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTA AGTGTGGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTA AGCCACTCCGCCTGGGGGAGTACGACCGCAAGGGTTGAACTCAA AGGAATTGACGGGGGGCCCGCAACAAGGCGGTGGAGCATGTTGG TTTAATTGCAAGCAACGCCGGAAGAACCTTACAGGGTCTTTGACAT CCTTTTGACCACTTCTAAAAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGGCAA AGTGACAAGGGGGGTGCATGGATTGTCGTCAACCTCGTGTTCTGAGA AATGTTGGGTTAGTCCCCGCAACAGAGCGCCACCCCTTTATGGTTA GTTTGCCCATCAATTGAGTTTGGGCACTCTAGCCAGAAGTGGCCGG GTGAACAAACCGAGGGAAGTGGGGAATGGACGTCAATATACTACCT GGCCCTTTAATGACACTTGGGCTACACCACGGTGCTACAAAGGGAA AGTACCACAGGTTTCGGAAATCGCGCGAGCTAAACACTAATACCCTA ACCGGAGCTTGCTCCACCGGGAAGAGGAGTGGCGAACGGGTG AGTAACACGTGGGTAACTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGA AACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGTTTCGTTT TGAAAGGCGCTTTACGGTGCCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCA TTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAG CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC CAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGAC GAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGG ATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGGTGAGAGTAACTG TTCACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATT TATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGA AAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACT	--	--
MR15	AGTGAACAAGGGGGGTGCATGGATTGTCGTCAACCTCGTGTTCTGAGA AATGTTGGGTTAGTCCCCGCAACAGAGCGCCACCCCTTTATGGTTA GTTTGCCCATCAATTGAGTTTGGGCACTCTAGCCAGAAGTGGCCGG GTGAACAAACCGAGGGAAGTGGGGAATGGACGTCAATATACTACCT GGCCCTTTAATGACACTTGGGCTACACCACGGTGCTACAAAGGGAA AGTACCACAGGTTTCGGAAATCGCGCGAGCTAAACACTAATACCCTA ACCGGAGCTTGCTCCACCGGGAAGAGGAGTGGCGAACGGGTG AGTAACACGTGGGTAACTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGA AACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGTTTCGTTT TGAAAGGCGCTTTACGGTGCCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCA TTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAG CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC CAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGAC GAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGG ATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGGTGAGAGTAACTG TTCACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATT TATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGA AAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACT	MN636721	<i>Enterococcus mundtii</i>

	TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGATATATGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGGCTCTCTGG TCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCANACAGGA TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT TGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACT CCGCCTGGCGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA CGGNGGCCCGCACAAAGCG			
ELO5 A	TTGTGACTGACACGGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG GAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTG AGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAA CAAGGATGAGAGTAACTGTTTATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAA AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGGTAATACGTAGGT GGGCAAGCGTTGTCCGGATTTTATTGGGCGTAAAAGCGAGCGCAG GCGGGTTTTCTAAAGTCTGATGTGAAAAGCCCCCGGGCTCAACCG GGGAGGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTTGAGTGCAGAAGAGG AGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAA GGAACCACCACTGGCCAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACG CTTGAGGCTTCAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAA	MT146032	<i>Enterococcus faecium</i>	
DUR3	TCCCCAAGGGGGTCCCCTCTCAGGTCGGCTTGCATCGTGGCCTTG GTGAGCCGTTACCTCACCATCTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCC ATCAGCGGCACCGTAACGCGCCTTTCAAACGAAACCATGCGGTTT CGATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCCGTGTATCCCCTTCT GATGGGCAGGTTACCCACGTGTTGCTCACCCGTTCCGCACTCGTCT TTTCTAGGTGGAGAGGGCTCGGGTGGGAAGGGAAGCGTGCGTATT GGATGTGAAAGGGTGATCGCGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC CAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGAC GAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGG ATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGGTGAGAGTAACTG TTCACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATT TATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGA AAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACT TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGATATATGGAGGAACACCACTGGCCGAAGGCGGCTCTCTG GTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGGCGTGGGGAGCAAACAG GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCGTAAACGATGAGTGCTAAG TGTTGGAGGGTTTTCCGCTCTTTCACTGCTGCAGCTAACGCATTAAG CACTTCCGCCTGGGGGAGTACGACCCGCAAGGGTTGAAACTTCAA AGGAATTGGACGGGGGCCCCGCACAAAGGCGGTGGGAGCATGTG GTTTAATTTTCGAAGCAACGCGAAAAAACCTTTACCCAGGTCTTTGAA CATCCTTTGGACCACTCTAGAGAATAGAGAGTTCCCTTCGGGGA CAAAGTGGACACAGGTGGTGGCCAATGGTTGTCGTCAAGCCTCGT TGTCGTGGAGAAAGTTTGGGATTAAGTTCCCGCCAACGAGCGCCAA CCCTATATTGTTAGGTTGCCCATCATTTAAGTTTGGGCACTCCTAGA CCAAGACTCGCCGTGACACCGGGAGAGAAAGTTGGGGATAGAACG CTCAAACCTATCCTAGTGCCCTCTCTTATGAGAACTCTGGGCCTCA CACACACAGTTGCTATACAAG	--	--	
NAR6	AGAGGAGAGAAGGACGGGTGTGAGCGGGTGTGGACGCGCCCTTC AGAGGGGGGCACACTTGGGAACAGGTGCTAAGGCCGCATAATAGG TTATGGTGGGTGGCTTAAGAGTGAAGGGCGCTTTCGGGTGTCGCT GATGTTGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC TCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC ACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG TAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCG CGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGA AGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACC	MT146033	<i>Enterococcus faecalis</i>	

	AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA GGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG GCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGA GGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG AATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACC AGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCG AAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT		
CAL7	TGAGCCAGGATCAAACCTCCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCT TCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGAT GAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTA GAATAGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACAGAAAGGGAC GGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCCGAG CGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATT AAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGAGCTCAACTCCCGGAATGGCATTG GAAGTGTAACTTGAGTGCAGTAAGGTAAGTGGAAGTCCATGTGT AGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGG CGCTTACTGGACTGCAACTGACGTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAG CAACAGGATTAGATACTCTGGTAATCAACCCGTAAACGATG	MT146034	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
CHI18	ACAAAAGGGGCCTTCGTCTCTCACTCGGCTATGCATCATCGTCTTG GTAGGCCTTTACCCACCATTTTTCTAATGCACCGCGGATCCATCT CTAGGTGACGCCGAAGCGCCTTTAACTTAGTATCATGCGATACTA AGTTTTATTCCGTATTAGCATCTGTTTCAAATGTTATCCCCAGCCT TGAGGCAGGTTGTCAACGTGTTACTCACGCGTTCGCAGCTCACTTG AAGGGGGCAAGGCCTACCCGCTGTGCGTGCGAATTGGATGTGAGA GGCTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTAC GGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGAT GGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCA CTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGA CGGTACCATAACAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAA AGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGAGC TCAACTCCGGAATTGCATTGGAAACTGGTAACTTGAGTGCAGTAG AGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATG GAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACG TTGAGGCTCGAAAGTGTGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTA GTCCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTTCCGC CTCTTAGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTGTTCCGCCTGGGGAGTA CGACCGCAAGGGTTGAAACTCAAAGGAATGGACCGGGGACCTCGC ACAAGGCGGTGGGAGCATGGTGGGTTTAATTCGAAGCCACCGCGA AGAACCTTACCCAGGTCTTTGGACATCCTTTGAAGCTTTTAGAGGAT AGGAAGTGTTCCTCGGAAACCAAGGTGTCAGGGGGGGGCATGG GTCGTGTCAGCCTCGGTGCCGGGAGAATGTGGGTAAGTCCCGCC ACCGAGCCGCCAACCTTATTGGTAAGTTGCCAGCATTGAGATGG GCACTCCTAAGCGAGAACTGGCTGGTGACAACTGGAGGGAAGGGG GGGACGCACGTGCAATCATACTGTGTCCCTTATAGAACTGGCCTCA CCCACGTGGCTTCAATGGGGCGTACAACGGAGGTGCCCGCCCTCG GCTAGTTG	--	--
MAV4 A	TTGGGACGAGCCGGGTCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG GAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTG AGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAA CAAGGATGAGAGTAACTGTTTATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAA AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG GCAAGCGTGGTCCGATTTATTGGGCGTAAACCGAGCGCAGGCGG TTTCTTTAATCCTGATGTGAAAACCCCCGGCTCAACCGGGGAAGG GTCATTTGAAACTGGGAGACTTTGAGTGCAGAAAAGGAAAGTGGA ATTCCATGTGTAGCCGTTGAAAATGCGTAGATTATATGGGAGGAAC	MT146035	<i>Enterococcus faecium</i>

	ACCAGGGGGCAAGCGGCTCTCTGGGTCTGTACCTGACGCTGACGT TCGAAAAGCGTGGGGAACCAACAGGATTAAATCCCTTGGTAGCCC ACGCCCCG		
PER4	CTCCATTGGTTTTCTTTCTCTGGTGCGCTTGCATCGTGGCCTTG	--	--
B	GTGAGCCGTTACCTACCAACTCTGCTAGTGCACCGCGGGTCCAT CCATCAGCGGCTCCGTAACGCGCCTTTTCAGACGAAACCATGCGGT TTCGCTTGTTATACGGCCTTAGCACCTGTTTCCCGTGTTATCCCCTT CTGATGGGCGGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTTTCGCCACTTGT CTTTTCCCGGTGGAGCGGGCTCGGGTGGGAAAAGAAGCGTGCGTC TTCGACCTGTTAGGCACGATCGCCCGACATTGGGACTGAGACACG GCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGG ACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCT GGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGGTGAGAGTAAC TGTTACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA TTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGT GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGA CTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAA ATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAAGCGGCTCTCT GGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTG TTGGAGGGTTTCCGCCCTTTTCAGTGCTGCAGCTACGCATTAAGCAC TCCGCCTGGGGAGTACGACCGCCAGGTTGAACTCAAGGAATTGA CGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCACG CGAAGACCTTACCAGGTCTGACATCCTTTGACCACTCTTAGAGATA GAGCTTCCCCCTTCGGGGGCAAGGTGACAGGTGGTGCATGTGTCGT CAGCTCGTGTCTGGAGAATGTTGGTAAGTCCGCCACGAGCGCCAC CCTTATTTGTAGCTGGCCTCCATTTAGTGGGCACTCTAGCAGACTG CCGGTGACCACCGGAGGAGGTGGAATGACGTCAATCATCTATGCC CTTTATGACTGCCTCACACGTGCTAATGGCAGTTCACACAGATCCG GATCCCAGGCTAGCTTATCCTCCTAAGGCT		
CHI17	GCCTTTTTGCCCCCCCCCTTCCCAATGGAGCATGCTCGTTGGTC TTGGTTGTGCCTGTTACCTACATTCTTTGTAATGGACCGGGGAATT CATCTCTAGGTGACGCCGAGCGGTTTTTACTTTTTGTCATGCGA CACTAAGTTTGATTTGGTATTTGCGTCTGTGTCCAAATGTGATCTCC AGCTTTGAGGCGGGGTGTCCACGTGTGACTCACCCGTGCGCGACT CACTTGAAGGTGGAGCACGACTTCGCTGTGCGTGCGACTTGCA GTGTTAGGCTCGCCGGCCGCGTTGCGACTGAGACACGGCCCAAAC TCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAG CCTGATGGAGCAACGCCGCGAGTGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGT AAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAAAAAACGAAATGATTTTA GTTTGACGGTACCATAACCAGAAAGGGACCGCTAAGTACCTGCCAAC AACCGCGCAAATACCTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGCG CGTAAAGCGAGCGCAAAGGTTTATTAAGTCTGATGTTAAACCCATG AGCTCACTCCGATTGGCTTTGGAACTGGTTAACTTTGAGTGCAG ACATAGGTAGGTGGAATCCATGTGTATCGCATGAATGCGTATATA TATGGAAGAACACCAGTGGAGAACGCGGCTTACTGGACTGCTAACT GACCCTGAAGTTCCAATGTGTGCTCGAGCAAACCGGGATTACATAC CCTGGAAGTCCCCACCGGTAAACAATGCACCACTACGATGTATAGG AAGGTTTCCGCCTCTTATCGCCCCAATCTAACGCTTTAACTGTTCCG TCTTGGGGGACTACGACGCGCAGGATGACACCTCAAAGGAATTCA ACAGAGGACCCGCACCAAGGGGGCCGCAACAATGTGGTTTAATATC GAAATCTACCTGCAAAAACCTACCAGGTCTTGACATCCTTTTGAA GCTTCTTTTAAATCAAAATTGTTTCTTTCGGAGCCCCAT	--	--
UVA2	GCGTGAATTCTTCGTTGCCGTATTGCAGTCGTCACGGGTAGCCGTA TGGTGGGCGTGGTGAGTTTCGTGCGGAACTTAAACCCGCCCGT	--	--

	CCGCCATCAGAGTTTGTACACCCAAGCCGGTGAGGTAACCTTTAAG GAGCCAACCGTCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGC ACAAGGTAACCGTA		
CHI8	AAAGGCCGGTTCGTCTCTCACTCGGCTATGCATCATCGTCTTGGA GGCCTTTACCCCTCATCTAATAAGAAAAGCGGATCCATCTCTAG GTGACGCCGAAGCGCCTTTTAACTTAGTATCATGCGATACTAAGTTT TATTCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCAAAGCCTTGAGG CAGGTTGTCAACGTGTTACTCACCCGTTTCGCCACTCACTTGAAAGG TGAAAGGACTTTTCGCTGTGCGTTTCGACTTGCAATGATTAGGCACG CCGCCAGCGTTGTCTATGGGCCAGGATCCCACTCTACTACGGGAGG CTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCA ACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTTCGGTTCGTAAAGCACTGTTGT ATGGGAAGAAGAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTAC CATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA TACGTATGTCCCAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAG CGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTC CGGAATTGCATTGGAAGTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAG TGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAAC ACCAGTGGCGAAAGGCGGCTTACTGGACTGCCACTGACGTTGAGG CTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCTGGGTAGTCC ACACCG	--	--
CHI7	GTTATGTTGTGCTTGTACTGAGGGAGAAAAATAAACACCTAGTGGG GGGTGTCCGGAGTGAGTATCTCGAGGGTAACCTGGGCCGGAAGTA GGGGATAACATCTGGAGACTGAGGCTGCTACTGGTAACCTACGGA ACCCGCTTGTTTTGCTTTTAAAGAGATGGCTCTGCTCTCACTTCTGG GTGGATCCGCGGCGTATTAGCTAGAGGGGTGGTAAAGGCTCGCCG AGGGGGGGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGCCTGGGCCGTTTGG GACCGAGAGCGGCACAGACTCCTACGGGAGGCAGTAGTAGGGAAT CTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTG AAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGACCGAG GGTAAGAGCACGTGTTACCCAGTGACGGTATTTACCAGAAAGCCAC GGGTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC GTTCTCCGGATTATTGGGCGTAAACGAGCGCAGGCGGTCTTTTA AGCCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCACCGAGAAGTGCAATGGAAC TGGGAGACTTGAGTGCAGAAAGGACAGTGAAACTCCTGTGTACCC GGGAAATTCGTATGTTTTTGGAAAAACACCTTGCGGAAGGCGGGTG TTTGGT	MT146036	<i>Pediococcus pentosaeus</i>
NAR2	GGGGCTATTTTGTGCTGCTGTATCGGCAGTCGCTAGAAGGTAACC CTAACGGTTTTAACGTACTTGTCCCGTCAGGAGCGAGTCGAAGTGGT GGCGGCGGGGGATTATTCGTGGATCCCTGCCCGGAAGTAGGGG ATAACACCTGGAACCGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCG CGTGGTTTTCTTTTAAAGAGATGGCTCTGCTCTCACTTCTGGATGGCT CCGCGGCGCATTAGCTGGAGGGTGAGGTAAGGCTCGCCAAGGGG GGGATGCTTATTCGACCTGAGCGGGTACTTGGTCACATTGGGACTG AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC CACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGA AGGGTTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAAGCTGGGTA AGAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGG CTAACTACGTGCCATCAGCCGCGGTAATACTTAGGTGGCAAGCGTT ATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAAGT CTCATGTGAAAGCCTTCGGCTCACCGAAGAAGTGCATTGGAAACTG GCAGACTTGAAATGCAAAAAGGACAGTGGAAGTCCGTGTGTACCGG GAAATGCGTAGATATATGGAACAACACCTTGCGGAAGGCGGCTGTT TGGTCTGCAACTGACGCTGACGCTCCAAAGCATGGTTAGCGAACA GATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTCAACGATGATTACTAGTG TTGGAAGGGTCTCCGCCCTATCGTGCTGCACCTAACGCATTAAGAA	--	--

	TCCCGCCTTGGGGAGTAACAACCGCCAAGGTTGAACTCTATACAAT CTGATAGGAGGCCCCGCACCAAGTCGGCGGCACCTGGTGTACT TCCTGACGTACCCGAAGAAACGTTACCAGGTTTCTGGAATCTTACG CACGTCTGAGAAAATTAGTAGCTTCCATTCCGCGTACTGAATTAACA GGCGGAGCCTTGCTTGATCGTCAAGCTCGTGTCCCAGAGCATGGT GGGTTTAAGTTCCCCGCACCTATGGCGCAACCCTTTTGATAACTAT AGTCTGCGCCACGCATTAACGTCTCGGCAACTCTATGTGGACACTG CGCCTGTCTGGAACACACCCGGGGAGAACAGAGGTGGGCGCAAC ACAGCTCAGTCTACACACTGGTCTTTGTAGTAGACTCTGGAGCTAT CACACCTCGTGTCTCTACCTAG		
PER1	CTGAGCACGGATCCCCTACTACTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT CTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTG AAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAG GGTGAGAGTAACTGTTACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCC ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA GCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTC TTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATT GGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAAGAGGAGAGTGGAATTCCAT GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGCGG AAGGCGGCTCTC	MT146037	<i>Enterococcus mundtii</i>
DUR6	TGAGCAAGGATCCCCTCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC TTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGA AGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG GTGAGAGTAACTGTTACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCA CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG CGTTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCT TAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGGAGGGTCATT GGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAAAAGAGGAGAGTGGAATTCCA TGTGTAAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGGAACACCAGTG GGCGAAGGCGGCTCTTCTGGTTCTTGTAAGTACGCTTG	MT146038	<i>Enterococcus mundtii</i>
CHI4B	GGACCTGAAGGGCGATCGCGCGAGTTCGTGACTGAGACGGATCCC AACTCCTACGGGAGGCTACAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACG AAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGA TCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGGTGAGAGTAACTGT TCACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTT ATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA AGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT GAGTGCAAGAGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGATATATGGAG	MT146039	<i>Enterococcus mundtii</i>
CHI4A	TCCTTTTTTCCCCCTCCCTGGTGGGCTTGATCGTGCCCTTGG TGAGCCGTTACCTACCAACTTCCCTAATGCACCGCGGGTCCATCC ATCAGCGGCACCGTAACGCGCCTTTCAAACGAAACCATGCGGTTT CGATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAGTGTTATCCCCTTCT GATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTTCCGCACTCCTCT TTTCTCGGTGGAGCAAGCTCCGGTGGGAAAAGAGGCGTTGCGACT TGCGACCTGTTGAGCGCGATCGCGCCGACATTGGGACTGATACAC GGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAAT GGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTT TCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGGTGAGAGTA ACTGTTACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGGCAAGCGTTGTCC CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG ATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGGAGGGTCATTGGAAACTG GGAGACTTGAGTGCAAGAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCG GTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCCAGTGCGGAAGGCGG	--	

CTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGGCTCGAAAGCGTG GGGGAG
CAAACAGGATTAGATACTCCTGGTAGTCCCACGCCGTAAACGATGG
AGTGCCTAAGTGTTGGAGGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTA
ACGCATTTAAGCACTTCCGGCCTGGGGAGTACCGACCGCCAAGGT
TGAAACTCAAGGGAATTGACCGGGGGCCCGCACAAAGCCGGTGGAG
CATGGTGGTTTAATTTCAAGCACGCGAAAACCTTTACCACTCTTGA
CATCCTTTGACCACTTCTAAAGATTAGAGCTTCCCTTTTCGGGGCCAA
GTTGAACAGGTGGGTGGCAATGGTTTGTCTGCAGCTTCTGGTCCGT
GGAGAATGTTGGTTTAGTTCCCGAACCAAGGCCACCTTTATTGT
TAGTGTCATTCATTTATTGGCTTCTCTACCAAGACGGCCGGTGACAA
CCGGAGAAGTGGGATAGACGTCATCTACATTGCCCTATGACACTGC
TCTACAACCGTGCTTCAAATGTAGATCACAAACGAGTC
CHI1A GTGGTTTTTCCCCTTCCCAGGTGCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTG --
AGCCGTTACCTCACCAATTAGTCTCATGCACCGCGGGTCCATCCAT
CAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAACCATGCGGTTTTCG
ATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTTTG
ATGGGCAGGTTACCCACGTGTTGATGGATGTTCCGCACTCGTATTT
TTCCGGTGAGAGGGAACGGGTGACCAAGGCCACGATGCATAGCC
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCA
AACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGAT
CGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTT
CATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA
TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTG
AGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGATATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGCGGCTCTCTGGTCT
GTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTG GGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGG
AGGGGTTTTCCGCCCTTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC
CGCCTGGGGAGTACGAACCGGCAAGGTTGAAACTCCAAAGGAATT
GGACGGGGGGCCCGCACAGCCGGTGGGAGCATGTGGTTTTATTCGAA
GCAACGCCGAAGACCTTACCAGGTCTTGGACATCCTTTGACCACTC
TAGAGATAGAGCTTCCCCTTTCCGGGGCAAAGTGACAGTGGTGCCAT
GGGTTGTCGTACCTCTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCCGCA
ACGAGCGCAACCCCTTAATGGTAGTGCCTATCATTAGTTGGGCACT
CTCTAGCAAGACTGGCGGGTGACAACCGGAGAGGTGGGATGACCG
CCAAATCTACTCATGCCCTTTATGAACTGGGCTCACACGTGCTCTA
CATGGGGAAGTACAACCGAGTGGCAAAGTCGA
JAV17 CCCGTTGGGGGTCCCGCCTGTGGTTCGGCTTGCATCGTGGCCCTGG --
AGAGCCGTTACCTCACCAACCAGCTAATGCACGGCGGGTCCATCC
ATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAGATCAAACCATGCGGTTT
TGCTTGTGATACGGTCTTAGCACCTGTTTCCCGTGTTATTTCTTTT
GATGGGCAGGTTCCGGTGGTGTGATGGTTGGTCCGGCACTTGCA
TTAGCTAGGTGGTGAGGTATCGGCTCACCAAGGCCACCATGCGTA
GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGC
CCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGA
CGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCG
GATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACT
GTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAAGCGTTGTCCGGAT
TTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTG
AAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGAC
TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCCATGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAAGGCGGCTCTC

LEC3	TGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGGCCGTAAACGATGAGTGCTAG TTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAG CAACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCCAAGGTTGAAACTCAAAGG AATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCAGTGGGAGCATGGTGGTTTAAT TCGGAGCAACGCGAAGAAACCTTACCAAGGTCTTGACATCCCTTTT GAACCACTTCTAAGAGATAAGAAGCTTCCCTTTTCGGGGGGCAAAGT GAACAGGGTGGTGGCATGGATTGATCGTCAAGCCTCCGTGTCTCT GGAGATGTGGTTAAGTCCCGCAAACGAGCCGCAAACCTTAATGTTAG TTGCCATTCAATCCAGCTTGGCACTCTCTAGCACAAAGACTTGCGG GTGACAAACGGAGAAGGTGGGGGAAATAGACGTCAATCCATCTCAT GCCTTGATAGAACTTGGGCTAAACACACTGGACTACAATGGAGA TGGAGGGGTTTCCCCCTTTTCATGTTGCAGTTAACGCTTTAACCATT CCCCTTGGGAGTGCACCCAGGGTAAAACTAAAAAAATTGAGGG GGCCCGGCACAACCGGGGGGACAATATGGTTTATTTGGAAGCAACG CGAAGACCTTACCAGGTCTTACATCCTTTGACCATTTTAGAATTAGA GCTTCCCCTTCGGGGCCAAAGTGACAGGTGGTGCAGGGTGGTCTT CAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCAACGAGCCCA ACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGCCACTCTAGCAAGAC TGCCGGTGCCAAACCGGAGGAAGGTGGGGAGGACGTCAAATCTTC ATGCCCTTATGCCCTGGGCTACCCACGTGTTCCAATGGGAAGTAC AACGAGTTGGGAAGTCGGGAGGTTAAGTTAATTTCTTAAAGCTTCT CCCAGTTTCGATTGCAGGCTGCAATTCGCCTGCATGAACCGGGAA TCGTTAGTAATCGCGGATCACCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCG GGCCTTGTACACACCGCCCGTCCCTCCCCGAGAGTTTGAAGCACC CGAAGTCGGTGAGGAAACCTTTCGGAGCCCGCCGTATAAGGGGAA T	MT146040	<i>Enterococcus faecium</i>
JAV7A	GGAGTTTGCTCCTCGGGGAAAGAGGAGTGGGGAACGGGTGAGTA GCGCGTGGGTAACGTGCCCATCAGAAGGGGATAACACGTGGAAC AGGTGCTAATACCGTATAACAAGCGAAACCGCGTGTTTCGTTTTG AAGGGCGGTTTACGGTGCCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATT AGCTAGTTGGTGAGGGAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGC CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC AAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACG AAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGA TCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGGTGAGAGTAACTGT TCACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG CCAGACGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTT ATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAA AGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTTCCATGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGATATATGGAGGAATACTCAGTGGCGAAAGCGGCTCTCTG GTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG TTGGGAGGGTTTCCGCCCTTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGC ACTCCGTCTGGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAA TTGACGGGGGTCCGCCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCA AGCAACCGCGAGAACCTTACCAGTCTTGACATCCTTTGACACTCTA GAGATAGAGCTTTCTCTTTCGGGGGGCAAAGTGAC	MT146041	<i>Enterococcus mundtii</i>
MAV6 B	GAGTTTGTCTCCCGGGAAGAGGAGTGGGGGTGCGGTGAGTAGCG GGTGGGTAAACGTGCCCATCAGAAGGGGATATGCGGGGAAGCAGGT GCTAAGACCGTAGAACAAGCGAAACCGCGTGTTTCGTTTTGAAGG GCGGTTTACGGTGCCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCT AGGTGGTGAGGGAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGAC CTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAAC TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAG	MT146042	<i>Enterococcus mundtii</i>

	TCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGT AAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGGTGAGAGTAACTGTTTAC CCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTG GGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC CCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAG TGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGT AGATATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTG TAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGA GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGC CTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAGGGAATTGACGGGG CCCCGCACAAGCGTGGGACCATGTGTTTAATTGAGCACCAGGAAG ACCTTACCAAGTCTGACATTCTTTGACCTACTCTGAAGAAAAAGCT T		
TOV3	CTTCGTGGATAGAGGAGTGGGGAACGGTTGAGTGCGGGTGGGTAA CGTGCCCATCAGACGGGGATAACACGGGGAAACAGGTGCTAAGGC CGTATAACAAGCGAAACCGCGTGTTTTGTTTTGAAGGGCGGTTTA CGGTGCCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTG AGGGAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGG GTGATCGGCGACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGG GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCG AGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTG TTGTTAGAGAAGAACAAGGGTGAGAGTAACTGTTCAACCCTTGACG GTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAG CGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTC AACCGGGGAGGGTTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAAGA GGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGG AGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGC TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGG TAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCG CTCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAGCACTCCGCCTGGGGAGTA CGACCGCAGGTTGAACTCAAAGGATTTGACGGGGGGCTCGCACAG CGGTGGAGCATGTGGTTTTATTGAAGCAACGCGAAGAACTTACCAG GTCTTGACATTCTTTGACCACTCTAGAGATTAGAGCTTCTCTCTT CGGGGGCAG	MT146043	<i>Enterococcus mundtii</i>
CAL13	GACAAAAAGTTAAAGGCGTTTTGGGCGGTTGCTAGAGTTGGATCCG CGGGGCGAGTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACGATG GTGCGTAGTCGAGTTGAGAGACTGGTCGGCCGCGTTGGGACTGAG ACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCA CAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAG GCTTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAGCTAGAAT AGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACAGAAAGGGACGGCT AAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTAT CCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCT GATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACTG GTAACTTGAGTGCACTAGAGGTAAGTGGAAGTCTATGTGTAGCGG TGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACAAGTGGCGAGGCGGCT TACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCTCGAAGTGTGGGGTAGCAA CAAGATTAGATACTCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACAC TAGGTGTTAGGAGGTTTCCCGCCTCTTAGTGCTCGAAGCTAACGCA TAAAGTGTCTCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTTCAA AGGAAATGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA TTCGAAGCAACGCGAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAG CTTTAGAGAAAGAAGTGTCTTCTTCGGAAAGCAGAGTTGACAG	MT146044	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

JALV1 2	TTGCTACCTTATTAATTAAGTAGGAGGACGGAGGATTAATACGTGG GTGCCGGCGTCGCGGCTGGGGATAACGTTTGTGAGAGATGCTGTT TCCGAAGGTATCTGCTGTGTTTTGACATGTAGTAAAAGGCGCTTG GGCGGTTGCTAAAGTTGGATCCACGGGGCAGTAATTAGTTTGGTG GGGGAAGGCCTACCAAGACGATGGTGCGTATTCGATGTGAGAGA CTGATCGGCCGCGTTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGG GAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGG AGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCTGTAAAGCACT GTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGAC GGTACCATAACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGC GGTAAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGTTTTATTGGGCGTAA AGCGAGCGCAGACGGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAG CTCAACTCCCGGAATGGGCATATGGGAACTGGTTAACTTGAGTGC AGTAGAGGTAAGTGGGAACCTCTCATGTGTAGCGGTGGGAATGCGT AGATATATGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACT GCAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGGTAGCAAACAGGATT AGATACCCTGGTAGTCCACACCCGTAAACGATGAACACTAAGGTGT TAAGGAGGTTTCCGCCTCTTAGTGCCCGAGCTAACGCATTTAGTGT TCGCCTGGGGGAGTACGACCGCAGGTTGAACTCAAGGAATTGAC GGGACCCGGGCACAGCGGTGAGCATGTGGTTTAATTCGAGCACC GC GAAAACCTACCAGGTCTTGACATCCTTGAAGCCTTTAGAGATAGAAA TGTTCTCCTTTCGGAGACTAAATGACA	MT146045	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
MAD3	GGCTNCTTCTCTAAAAGGTTAGGCCACCGGCTTTGGGCATTACAAAC TCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATT CACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATG TAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAAGTACGACGTACTTTAAGAG ATTAGCTCACCTCGCGGGCTGGCAACTCGTTGTATACGCCATTGT AGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATCTGACGT CGTCCCCGCTTCTCCTCGGTTTTGTACCCGGCAGTCTCGCTAGAGT GCCATCTGAATGCTGGCAACTAACATAAGGGTTGCGCTCGTTGC GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACGACCATG CACCACCTGTCACTTTGTCTCCGAAGAGAACACTTCTATCTCTAAAA GCTTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCG AATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCC TTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCTGACTCCCCAGGCGGAACACTTAA TGCGTTAGCTTCGGCACTAAGAGGCGGAAACCTCCTAACACCTAGT GTTTCATCGTTTACGGTGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTG CTACCCACACTTTCGAGCCTCAACGTCAGTTGCAGTCCAGTAAGCC GCCTTCGGCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTCCACCGCTA CACATGGAGTTCCACTTACCTCTACTGCACTCAAGTTAACCAGTTTC CAATGCCATTCCGGAGTTGAGCTCCGGGCTTTCACATCAGACTTAA TAAACCGTCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCT CGGGACATACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTATTTAGCCGTC CCTTTCTGGTATGGTACCGTCAAACCTAAAATCATTTCCTATTCTAGC TGTTCTTCCATACAACAGTGCTTTACGACCCGAAAGCCTTCATNNAA CACGCGGCGTTGCTCCATCAGGCTTTCGCCCATTTGTGGA	MN636708	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
TOV12	CCTCGCGGCTGGGGATAACATGTGTGAGAGATGCTGATACCGAAG GAAACTTAGTGTGTCTTGACATGTAGTTAAAAGGCGCTTGGGCGGC TGCTAGAGTTGGATCCGCGGGGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAA GGCCTACCAAGACGATGGTGCGTAGCCGATGTGAGAGACTGGTCG GCCACGTTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCTG CAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACG CCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCTGTAAAGCACTGTTGTATG GGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTACCAT ACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATA CGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCG	MT146046	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

	CAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCG GAATGGCATTGGAACTGGTTAACTTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGT GGAATCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGGAAGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGGACTGCGACTGACGTTGAGG CTCGAAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA CAACCGTAACGATGACACTAGGTGTTAGGAGGTTTCCGCTTCTTAG TGCCGAAGCTACGCATTAAGTGTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCA GGTTGAAACTCAAGGAATGACGGGACCCGCGACAAGCGGTGGAGCA TGGTGTTTAATTCGAGCACGCGAGACCTTACCAGGCTTGACATCCT TTGAAGCTTTTAAGATAAAGTGTTCTCTCT			
GUA1	TTCGTTTTGATGGGCGGGTTACGGTGGTGTGATGGATGGACCGC CGGTGCATTTTCTAGGTGGTGAGGGAACGGGTACCAAGGCCACG ATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGCGCGACGTTGGGACTGA TACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCG GCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAA GGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGGTGA GAGTAACTGTTTACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGC TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGT CTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAAC TGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAG CGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACTAGTGGCGAAGGCG GCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAG CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCTACGTCGTAAACGATGAGT GCTTAGTGTTGGAGGGTTTCCGTCCTTCAATGCTGCAGCTAACGCA TTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGACCGCAGGTTGAACTCAAGGA ATTGACGGGGCCTACCCAGCGGTGGAGCATGTGGTTTATTTTCGAG CAACGCGAAGACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTTGACTACTCTA GAAAATAAACTTTCTCCTCCGGGGGC	MT1460 47		Enterococcus mundtii
JAV8	GGAAAAAGAAGAAGAGGGTTCGGGTGTGAGCGGGTGCGTAACGTG CCTTTCAGAAGGGAATATGCGGTTTAGCTGGTGTAAGGCCTTAGCA CAAGCTAAACCGTGTGGTTTCGTTTTGATGGGCGGTTTACGGTGCC GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGGTGGTGAGGGAAC GGCTCACCAAGGCCACGGTGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAG CAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACG CCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAG AGAAGAACAAGGGTGAGAGTAACTGTTTACCCCTTGACGGTATCTA ACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA CGTAGGTGGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGGCGTAAAGCGA GCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAAC CGGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGG GAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGA GGAACACCAGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGGTCTGTAAGTACGCG CTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG TAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGTGTTGAAGGGTTCCGC CCTTCATGGCTGCAGCTAACGCATAGCACTCCGCCTGGGAGTCCG ACCGCCAGGTTGAACTCCAAGGATTGGACGGGGCCTCGCCCAAGC GGTTGGAGCATGGTGGTTTTATTTCCGAGGCACGCGCGAGAACCTT ACTCAGGTCTTGACCATCCT	MT14604 8		Enterococcus mundtii
GUA6	TTAATCGGAAGACGTGTGCGCATGTACTGTGAGTGCTCTGGTAGCGG TAGGCTTTCCGCTGCTTTCTGATGCACGGGGGATTAATCTCTAGGT GACGCCGAAGCGCCTTTTAACTTTGTGTGTGCGACACTCTGTTTCC TTAGGTCCTGCATGTGTTTCGACATGTAGTTACAAGGCGTGTTGGGC GGTTGTAAAGTGGGATTCGCGGGGGCGTCGTTAGTTGGTGGGGTA AAGGCCTACCCAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATC	--		

	GGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCT GCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAAC GCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTAT GGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTACCA TACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA CGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCG CAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCG GAATGGCATTGGAAACTGGTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTG GAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACAC CAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCTC GAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTACATACCCTGGTAGTCCACAC CGTAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTCTCCGCCTCTTACTGC CGAAGCTAACGCATTAAGTGTTTCGCCTGGGGAATACGACCGCAAG GTTGAAACTCAAAGGATTGACGGGACCCGCACCAGCGGTGAGCAT GTGTTAATTCGAGGCACGCGAAAACCTTACCAGGTCTTGACATCCT TGAAGCTTCTAAGATAGAAGTGTTCTCCTTCCGGAGACAAAGGTGA CAGGGGATGCATGTCGTCGTCAGCCTCTGACCTGAGAATGTAGGC TAAGTCTCGCACACGAGCCGCAACCCTATTTGTTCAAGTTGGCCAGT CATTCCAAATGGCACATCTTACGCGAACTGCCGGTGAACAAACGAA GAAGGCGGGGGGAACCAAGTTCAGAATCATCATGCCTCTTATTGACT GGGGGGATTTCTAGCGTCGCGGAAGCTAGCTCAAAGGAGAAAGCG -- GAGAAAAGGGGGGAAAAAAGAGTAGCGGTGTTTCTCCCTGCCCAT CAGGGAGAAAAAATAATTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAAC AATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCG CTGATGGATGGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC GGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAG CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACCGACCAACG CCGCGTGAGTGAAAAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAG AGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACCGGT TGCAGTCGAACGCTTCTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGGAA AAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCA TCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACA ATCGAAACCGCATGGTTTCGTTTTGAAAGGCGCTTACGGTGCCGC TGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG CTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC CACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCA GTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCC GCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACCTGTTGTTAGAG AAGAACAAGGGTGAGAGTAACTGTTACCCCTTGACGGTATCTAAC CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT AGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCA GGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGG AGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTG GAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACAC CAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTC GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG CCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGT GCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGC AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG GAGCATGTGTTTAATTCCAAGCAACGCAA		
ELO3 B	GGTTTGGGGCCCAACGAACGTAGAGCCGGCTACGTATCATCGTCC TGGTAGGGCTTTACTCACAGTAATACTACGAGGGGGGATCATAAGA AGTGATTGTTTGTGCCCCATTTCAACAAAAAAGCGGATTTTGT TGTAATGCGGGCTTTGCCGTAGTTCACAGTGTCCTCATGGGTTTCG TTTGAGAGGTGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGGCGT	--	
NAR1	GGTTTGGGGCCCAACGAACGTAGAGCCGGCTACGTATCATCGTCC TGGTAGGGCTTTACTCACAGTAATACTACGAGGGGGGATCATAAGA AGTGATTGTTTGTGCCCCATTTCAACAAAAAAGCGGATTTTGT TGTAATGCGGGCTTTGCCGTAGTTCACAGTGTCCTCATGGGTTTCG TTTGAGAGGTGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGGCGT	MN636722	<i>Enterococcus mundtii</i>
MAD1	GGTTTGGGGCCCAACGAACGTAGAGCCGGCTACGTATCATCGTCC TGGTAGGGCTTTACTCACAGTAATACTACGAGGGGGGATCATAAGA AGTGATTGTTTGTGCCCCATTTCAACAAAAAAGCGGATTTTGT TGTAATGCGGGCTTTGCCGTAGTTCACAGTGTCCTCATGGGTTTCG TTTGAGAGGTGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGGCGT	--	--

	ATTAGTTAGTTGGTGAGGTAGAGGCCACCAAGACGATGATACGTA GCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGC CCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGA CGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCG GCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAACTG TTCAAGGGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT GCCAGCAGCTGCGGTAATACGTAGGTGGCAAAGCGTTGTCCGGAT TTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGA AAGCCTTCGGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAACTGGGAGAC TTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAATCCATGTGTAGCGGGTGA ATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAAGCGGCTGTCTA GTCTGTAACCTGACGCTGAAGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGG ATTAATAATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGTG TTTGGAGGGTTTCCGCCCTTTTATTGCTGCACCTAACGCATTAGCC ACTCCGCCCTGGGGAGTACCACCGCCAAGGTTGAAACTCCAAAGG AATTGACGGGGGCCCGCACCAGGCGGTGGGAACATGTGGTTAAATT CGAAGCTACGCGAAGACCTTAACAAGTCTTGACTCCTTCTGCCAT TCTTAAAAATAAAACGTTTCTTCCGGGACACAATGTACCGTTGTTG CATTGGTTGTTCTTACCTCCTGTCCTGAAATGTATTGGTTAAATTC CCGCACGACGCGACCCTTTATATACATTTGCCGACATTTCCATTGG CACCTCGTGTAAGTGCCTGTCAAAAGCCGAGAGAGTGGGGGATA GAGCCTCATAAACTCTAC		
TOV2	ATCAGGCATAGTTCAAGGTGTGGTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCG ACGGGGGGGTAAACGTGGGGCGGGTCCCCGCTGGGGAAAAA AAAAAGATGCTGATACCGAATAAACTTAGTGTGCATGACAAAA GTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAAAGATGGATCCGCGGTGCA TTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAG CCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC CAAACCTCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGC GAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGG GTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATG ATTTTAGTTTGACGGTACCATAACAGAAAGGGACGGCTAAATACGT GCCATCACCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTA TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAA CCCGGAGCTCAACTCCGGAATGCCTTTGGAACTGGTTAACTTGAG TGCAGTACAGGGTAGTGGAATCCCATGTTGTAGCGGTGGAATGC GTAGATTTATGAGAAAAACCCCGTGGGCGAAG	--	--
GUA1 3	TGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTAGTTTGACGGTACC ATACGAGAAAGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT ACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGC GCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCC GGAATGGCATTGGAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGT GGAATCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACA CCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCT CGAAAGTGTGGGTAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACA CCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTTTCCGCCTCTTAGT GCCGAAGCTAACGCATTAAGTGTTCGCTGGGGAGTACGACCGC AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTG GAGCATGTGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTC TTGACATCCTTTGAAGCTTTTAGAGATAGAAGTGTCTCTTCCGAGA CAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAG ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAATTG CCACCATTCCAATGGGGACTCA	MN636709	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
MR14	ACCCAAGGGCGGTTCCCTCTACAGGTGGGCTATGCATCGTGGTC CTTGGTGAGCCGTTACCTCCCATCTAGCTAATGCACGGGGGGTCC ATCCATGAGCGGCACCGTCAAGCGCCTTTCTAACGAAATATGCGG	--	--

	TTTCGCTTGTTATACGGTCTTAGCACGTGTTTCCTGTGTTATCCCGT TCTGATGGGCGGGTTACCCACGTGTTACTCACGCGTTCGCCACGC GTCTTTGCTGGGTGGTGAGGGCTCCGGTGGGAAGAGAAGCGTTGC GTAGCGGAGCTGAGAGGGTGATGCGCCACATTGGGACTGAGACA CGGCCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAAT GGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTT TCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGGTGAGAGTA ACTGTTACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGAT GTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGA GACTTGAGTGCAAGACGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTG AAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCT CTGGTCTGTAACGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGGTAAACGATGAGTGCTAG TGTTGCAGGGTATCCGCCCTTCAATGCTGCAGCTAACGCATTAAGC ACTCCCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACCTCAAAGGAC TCGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGTGTAGCATGTGGTTAAATCCAAA CCACGCCAAAACCTTACAGGTCTGAACATCCTTTGACCACTCTAAAA ATAGAGCTACCCCTTCGGGGCAAAGGACAGGTGGGCATGGTGCCG TCCGCTCCGGTCGGGAATGTCGCTAAAG		
GUA1 1	GAGGGTTTTCCGCTCCCCAACTCGGGCTATGCATCTCGTCTTGGT AGGCTTTACTTTCTACCCTTCTGATGCACGGGGGATAAATCTCTA GGTGACGCCGAAGCGCCTTTTAAATTTGTATCATGCGATACTAAGTT TCATTCGGTATTAGCATCTGTTTCGAAATGTTATCCACAGCCTTGAG GCCGGTTGTCCAAGTGTTATTCACGCGTTCGTAATTAAGTTGAGGG TGAAAGGCCTTTTAGACGAGCGTGCGTCTTCGATGTGAAAGACTGA TCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGG CTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCA ACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCCGGTCGTAAAGCACTGTTGT ATGGGAAGAAGAGCCTAGAAATAGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTA CCATACCAGAAAGGGACGGCTAAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGTATGTCCCGAAGCGTTATCCCGGATTTATTGGGCGTAAAG CGAGCGCAGACGGTTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGAGCT CAACTCCGGAATTGCATTTGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAG AGGTAAGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATAT GGAAGAACACCAAGTGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGAC GTTGAGGCTCGAAAGTGTTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACTCTGG TTAGTCCACACCGTAAACGATGGACACTAGGTGTTAGAGGTTTTCC GCCTCTAATGGCCGAAGCTAACGCATTAAGTTGTTCCCGCCTGGGA AGTACGACCGCCAGGGTGGAACCTCAAAGGAATTGACCGGGGACC CGCCACAAGCTGGTGAGCCATTGTGGTTTATCCGAAGCAACGGCC AAGACCTTACGCAGGTCCTGGACATCCTTGAGCTTTAAGATAGAAG TGTCCTCCTTCGAACCAATGACACGGGGTGATGGTCTCGTCAGCT CCGCCTGGAGATGGTTGGGTAAGTCCCCACCAGCGCAACCCCTT ATTGTTGAGTTGGCCAGCATC	--	--
MAV1 3	AGGATAAGGCTTTTCTGTTCTTCAACTCGGCTATGCTCATTGTCTT GGTAGGCCTTTACCCTTCTTCTTACTAATGCACCGCGGATCCATCT CTAGGTGACGCCGAAGCGCCTTTTAACTTTTTGTCATGCGACACTA AGTTTTATTCCGTATTAGCATCTGTTTCCACATGTTATCCCCAGCCT TGAGGCAGGTTGTCCACGTGTTACTCACGGGTTCTGTAATTAAGTTG AGGGTGCAAGGCCACCAAGACGTGGGTGCGTCTTGATGTGAGA GACTGGTTCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTAC GGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGAT GGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTTCGTAAAGCA CTGTTGTATGGGAAGAAGACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGA	--	--

	CGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTATGTCCCAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAA AGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGC TCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAG AGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATG GAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGGACTGCAACTGAC GTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTG GGTAGTTCAACACCGTAAACGATGACACTAGGTGTTAGGAGGTTTC CGCCTCTTAGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTGTTCGCTGGGGA GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAATGACGGGGACCTCG CACAGGCGGTGGAGCATGTTGGTTTAATTCGAAGCACCGCGAAGA ACCTACCAGGTCTGACATTCTTTGAAGCTTTTAAGAGAATAGAGTG TTCTCTTTCGGAACAAGTGACAGTGGTGCATGGTCGTCGCTCACC TCTGTCCTGGAATGTTGGGTAAGTCCCGCACCGAGCGCAACCCTTA TTGTAGTTGCCCAGCATTCA		
MR13	TTAACCAAAAGGAGGCGTCGGCCCCAAACTCGCGATTGATGCTGT CCAGGGGGTTGCACCTTTCAGTGAGTGGCGAAGGGGGGAGAAACA CGTGACACCTGCCTCCCGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGAT GCTAATACCGAATAAACTTAGTGTCGCATGACAAAAAGTTAAAAGG CGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTT GGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGA GAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAACTCCT ACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTG ATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAG CACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTT GACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGC CGCGGTAATACGTATGTCCCAGCGTTATCCGGATTTATTGGGGCG TAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTTAGTCTGATGTGAAAGCCCGGG AGCTCAAACCTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGC AGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAACCGGTGGAATGCGTAGA TATATGGAAGAACCACAGTGGCAAAGGCGGCTTACTGGA	--	--
ELO4	CTTAACATTCCGGGGGCGCGGTGCCAATACTCGGATACGCATGTT GTCTTGGTAGGTTGCACTTTCATTTGAGTGGCGAACGGGGGAGTAA CACGTGGACAACCTGCCTCCAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACA GATGCTGATACCGAATAAACTTAGTGTCGCATGACACAAAGTTAAA AGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGGGCGATTAGTT AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAG TTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAAAC TCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAG CCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGT AAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTA GTTTGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAG CAGCCCCGCGGTAATACGTATGTCCCAGCGTTATCCGGATTTATTG GGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCC CGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTG CAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAG ATATATGGAAGACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGACTGGACTGCAA CTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATAC CTGGTAGTCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGTTTC CGCTTCTTAGTGCCGAAGCTACGCATTAAGTGTCCCGCCTGGGGG AGTACGACCGCAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCCGC CACAGCGTGGAGCATGTGGTTTATTCGAAGCAACCCGAAGAACCTT ACCAGGTCTGGACATCCCTTGGAGCTTTAAAAGAATAAAGTGTCCT CTCGGAGACAAAT	--	--
GUA1 4	CCCGCAAAGGCTTCTTCCCCCTCTAATCGCGCTTGCATCGTTGGGT CTTGGTTGGCCTGTTACCTACTTCTTTCGTAAAGGACCGGGGATTC	--	--

	ATTTCTAGGTGCCGCCGTGCGCGCTTTTTCTTTTTGTGTGCGCGAG GAGTTTGTGAAGGGGTCTGCGTACGTGTTGAATGTGTTCTAAGGCT TGAGGGGGGGTTTCCGCGTGTGTTGCGCGGGATTGATTAGTTGG TGGGGTAAAGGCCTACCAAGACGCTGATGCATAGCCGAGTTGAGA GACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCTGAGCTCCTAC GGGAGGCTGCAGTAGAGAATCTTCCACGATGGCTTAAAGCCTGAT GGAGCTCGCACCAGCAGTGCCGAGGAGTCGGGTGCTAAAGCAC AGTTGTATGTCAGGTATAGCTAGAATACGAAGGATTTTAGTTTGACG GTACCTACCGAAACGGACCCTAATACCTGCCAACTGCCGCCAAAA CCATGTACGAGCGTATCCAAATTTTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGA CGGATATAGTCTGACGTGAATCCCTAGCTAACCCGGATGCTTGAAC TGGTTGTTGATGCAATTAATACAGAATCCAGTGATTGTGGAATCGTA AAAATGGAAGACACCGTGGACACCGGGTACTGGCTCTATTGACCTG AACTCCAAGAGGGTCAAAAACGGGTAAACAACCCTGTAATCCCCCG AAACATGAAACAAGTGAAGGAGGTTTCTCCACGTATTCCCATTTCAAC CCTTAATGGTCCCTCCGGGCAAGACGACGGAAGGTTAACTAAAAG AATTCAAGGAAGTCAAAAAGGCCGGAACATGGGTGTAATTCGAATT AATTGAAAACCTTCCAGACTTGACACCTTTTAACCTTTTGAACG CATGGTCTTTGGAACAATCGCGAG		
NAR7	TCCCCTTTTTTTTTCCCGGCTAAGTGGAGTGGGGGTGCGTGTGATG TAGCGCGGTGGGTAACGTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGA AACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCGTGGTTTCGTT TTGAAAGGCGCTTTACGGTGCCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGC ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATA GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGC CCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGA CGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCG GATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGGTGAGAGTAACT GTTCACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG TGCCAGCAGCCGCGGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA TTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGA CTTGAGTGCAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAA ATGCGTAGATATATGGAGGGAACACCAGTGGCCGAAGGCGGCTCT CTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAA CAGGATTAAGATACCCTGGTAAGTCCACGCCGTAAACGATGGAGTG CTAAGTGTGGGAGGGTTTTTCCGCCCTTCAAGTGTGCTGAGCTAAACG CATTAAGCCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGGCAAGGTGGAAC TCCAAGGAATTGACGGGGCCCGCACCAGCCGGTGGAGCATGTGGT TTAATTGAGCAACCCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACTTCCTTTT GAACCATCTCTAAAGATAAGAGCCTTCCCTTTGCGGGGCAAGTGAC ATAGTGGTGCATTGGTTGTGCGC	--	--
SOY1 A	ATTTTTTTTCGGGACAAAAAGAAGAAAAAAATTGAAGAGTGTTTTTCC GGGTGAGTAAAAAGAAGAAGAAAAAAACCTCTTAGCAGGGGATAAC ACTTGGAACAAGTGCTAATACCGTATAACACTAATCCCCGCATGG TTATTAGTTAAAAGATGGTCTTGCTATCACTAAGAGATGGTCCCGCG GTGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCAATGATA CATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACA CGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAA TGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGGT TTCGGCTCGTAAACACTGTTGTAAGAGAAGAATGACATTGAGAGT AACTGTTCAAGTGTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGAAACGGCTAA ATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTCCAAGCGTTATCC GGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTAAGTCCGA AGTGAAAGCCCACAGCTTACTGTGGAAGTGCTTTGGAACTGGATA CCTTGAGTGCAGTAGAGGAGAGTGGAACCTCCCATGTGTAGCCGGT	--	--

PEP12	GAAATGCGTAGATATATGGGAGACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCT CCTGGACTGTAAGTACTTTGAGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAACAG ATTAGATACCCTGGTAGTCACACCGTAAACGATGATGGCTAGATGT TTTGAGGTTTTCCGCCCTTAGTGTCCCAGCTACCGCATTAAAGCACTC CGCCTGGGGGAGTACGACCGCAAGTTGAACTTCAAGGAATGAACG GGGACCCCCCAGCCGGTGGACCTGGGTTTATTCAAAGCACGCG GGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCAGATC CGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTA CAATCCGAAGTGAAGACGTACTTTAAGAGATTAGCTCACCTCGCGG GCTGGCAACTCGTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAG GTCATAAGGGGCATGATGATCTGACGTCGTCCCCGCCTTCCTCCG GTTTGTACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCATCTGAATGCTGGCA ACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCT CACGACACGAGCTGACGACGACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCT CCGAAGAGAACACTTCTATCTCTAAAAGCTTCAAAGGATGTCAAGA CCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAATTAAACCACATGCTCCA CCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAACCTTGCG GTCGTAATCCCCAGGCGGAACACTTAATGCGTTAGCTTCGGCACTA AGAGGCGGAAACCTCCTAACACCTAGTGTTTCATCGTTTACGGTGTG GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCACACTTTTCGAGCC TCAACGTCAGTTGCAGTCCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTT TTCCATATATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTTCCACTTAC CTCTACTGCACTCAAGTTAACCAGTTTCCAATGCAATTCCGGAGTTG AGCTCCGGGCTTTTACATCAGACTTAATAAACCGTCTGCGCTCGCT TTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTCGGGACATACGTATTACCG CGGCTGCTGGCACGTATTTAGCCGTCCCTTTCTGGTATGGTACCGT CAAATAAAATCATTTCTATTCTAGCTGTTCTTCCCATACAACAGN GCTTTACGACCGGAAAGCCTTCAT	MN636720	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
-------	---	----------	--------------------------------------
