



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

**Potencial biotecnológico de bacterias
lácticas aisladas de productos fermentados
de Latinoamérica y su aplicación en
alimentos funcionales**



Alba Yépez Latorre

Tesis Doctoral

2018

Dirigida por: Dra. Rosa Aznar Novella

La presente tesis doctoral se centra en la identificación y estudio de las propiedades con interés funcional y tecnológico de una colección de nuevos aislados de BAL procedentes de tres productos fermentados tradicionales: *chicha*, bebida alcohólica fermentada a base de maíz del noroeste argentino, *atole*, bebida fermentada de México, y *tocosh*, patatas fermentadas de forma espontánea de los Andes peruanos. De cara a su posible aplicación en alimentos, aquellas cepas más prometedoras se evaluaron en cuanto a propiedades relacionadas con la seguridad y calidad alimentaria, determinando su actividad antimicrobiana y su perfil de resistencias a antibióticos. El estudio se complementó con la secuenciación del genoma completo de una selección de cepas de BAL con potencial biotecnológico. A continuación, se seleccionaron siete cepas productoras de riboflavina y se realizó el estudio de la tolerancia a estreses relacionados con procesos de producción de alimentos.

Debido a las cada vez más extendidas intolerancias a la leche, los cereales son una buena alternativa a los productos lácteos como matrices fermentables, aunque es común que requieran de un enriquecimiento en vitaminas, por tanto, con el objetivo de conseguir niveles de producción adecuados para el enriquecimiento de una matriz alimentaria, se recuperaron mutantes espontáneos súper-productores de riboflavina de las cepas de BAL seleccionadas. La cepa súper-productora de riboflavina *Lb. plantarum* M5MA1-B2, al igual que la cepa salvaje de la que deriva, presentó la mejor tolerancia a las condiciones de estrés ensayadas, por lo que fue utilizada para el desarrollo de un alimento funcional “tipo kéfir” a partir de los cereales avena, cebada y maíz, con dos tipos de estárter comercial, para kéfir de agua y para kéfir de leche.

Se observó que 100 g del producto tipo kéfir a base de avena fermentado con el estárter de leche y la cepa súper-productora de riboflavina, contenían el 11,4% de la cantidad diaria recomendada de la vitamina. Además, esta cepa *Lb. plantarum* M5MA1-B2, en combinación con el estárter de kéfir de agua, mejoraba el proceso de elaboración de los productos con base de avena y maíz, debido a que incrementaba la concentración de ácido láctico. Para elucidar la mejor de las combinaciones que permita valorar el potencial de los nuevos productos elaborados para entrar en el mercado de los alimentos funcionales, se realizó un análisis de perfiles de compuestos orgánicos volátiles, que requeriría del estudio complementario de las propiedades sensoriales y de pruebas de aceptación por el consumidor.





**Potencial biotecnológico de bacterias
lácticas aisladas de productos fermentados
de Latinoamérica y su aplicación en
alimentos funcionales**

Tesis doctoral

Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

Alba Yépez Latorre

Dirigida por: Dra. Rosa Aznar Novella

Octubre, 2018



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Dra. Rosa Aznar Novella, Catedrática del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia, y miembro del Claustro científico ampliado del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC, Valencia).

INFORMA:

Que Alba Yépez Latorre ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral **“Potencial biotecnológico de bacterias lácticas aisladas de productos fermentados de Latino América y su aplicación en alimentos funcionales”** en las instalaciones del Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos y autoriza la lectura y defensa de la misma.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma la presente en Burjassot a 28 de septiembre de 2018

Directora Tesis

Fdo.: Dra. Rosa Aznar Novella

Vº Bº Tutora Tesis

Fdo.: Dra. Isabel Pardo Cubillos

El presente trabajo de Tesis ha sido financiado con fondos procedentes de los siguientes proyectos y ayudas:

"Microbiota of Andean Food: tradition for healthy products" (Ref. 247650, acronym: μ -Andes, dentro del programa FP7-PEOPLE-2009-IRSES, IP Rosa Aznar)

"Exploración de la diversidad microbiana y de su potencial biotecnológico" Ref. PROMETEO/2012/040 (2012-2015, Conselleria de Educación Generalitat Valenciana, IP Rosa Aznar)

"ProInfant, Alimentos vegetales con funcionalidad probiótica para poblaciones infantiles desnutridas" (Ref. PCIN-2017-003, IP Rosa Aznar)

La autora del trabajo ha sido beneficiaria de una ayuda pre-doctoral (Ref. FPU13/03398) concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

AGRADECIMIENTOS

Cuando llegas a este punto es inevitable echar la vista atrás, recordar paso a paso el camino recorrido. Es de esta forma cómo empezáis a aparecer, mentalmente, todas las personas que habéis hecho esto posible y que habéis contribuido a este crecimiento, tanto académico como personal; siento, sinceramente, la necesidad de compartir esta meta con todos vosotros.

Rosa, muchas gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de trabajar contigo. Por tu ayuda, tu dirección, por poner todo lo necesario a mi disposición y contar siempre conmigo en todo lo que ha estado en tu mano. Gracias, sobre todo, porque has hecho posible la realización de este trabajo.

A toda la gente con la que inicié mis peripecias investigadoras. La gente del Enolab con la que aprendí los fundamentos de la "micro" y, definitivamente, a usar una pipeta. Gracias "Fashion Microbiology". Carmen, desde el principio sin perder contacto y el camino nos ha llevado hasta la inolvidable Foggia, muchas gracias por todos los momentos vividos, y Yaiza, gracias por tu valioso apoyo en aquel Agosto de las últimas horas de la Tesis de Máster; junto a Olga, Lidia, Sara, Lucía, Vero, gracias por ser tan geniales, por vuestra ayuda y hacer que lo pasáramos tan bien en los congresos que hemos compartido. Gracias Sergi e Isabel, por darme la oportunidad de empezar esta carrera.

Gracias a la gente con la que empecé en el IATA los primeros años. Gloria, Montse y Patri, por enseñarme tanto al principio y vuestra ayuda continua, junto a Alba y Vanessa, gracias, porque fuisteis unas increíbles compañeras de laboratorio, pero también de risas y de salidas, a las que no faltaba Rosana.

A todos los que rondabais la tercera planta por aquel entonces, David, María, Víctor, Ali, Eli, Jordi, Clara, Isaac, Lidia, Laura, Bea, por dar un ambiente único de trabajo y hacer los días tan amenos. A Irene, por tu gran compañía en el laboratorio los últimos años de la tesis. A todos los jefes de la tercera planta del IATA, gracias por vuestra ayuda y apoyo siempre que lo he necesitado, Sergi, Amparo, Eladio, José Manuel, Agustín, Emilia, Paqui, José Antonio, Andrew y Marga.

Gracias, Carmela, por darme la oportunidad, este último año, de no dejar de aprender cosas nuevas y por confiar en mí y, además, darme un sitio donde, a la vez, terminar este trabajo.

Muchas gracias a la gente de la CECT, Aurora, Amparo, Teresa, Laura, Chemi, Mari Joe, M^aJesús, por vuestra ayuda y por la alegre compañía que habéis supuesto en los congresos y

durante mis inicios de escritura de la tesis ocupando vuestro puesto de paquetes. A M Carmen, por tu atenta disposición a la hora de depositar las cepas. A David y a Lidia, gracias por vuestra ayuda con los genomas, y por hacer posible que esto siga saliendo adelante.

Gràcies als Biòlegs Biològicament Biològics. Pilar, Pau, Cris, Gemma, Rafa, Araceli, Sara, Sandra, Miquel, Álvaro, Josep, Lluís, Lucía, Víctor, Francesc. Heu fet que les classes i les llargues setmanes d'exàmens a la biblioteca hagen passat volant durant cinc anys de grans sopars i viatges que han fet que tot l'esforç mereixera la pena. I a tu Cesc, per haver estat sempre ahí, i pel teu suport descobrint el significat de la investigació.

Muchísimas gracias a los compis del máster del universo, Ángela, Rubén, Eva, Jaime, Óscar, Fani, Miguel, Coco, por hacer de aquel duro año, en el que ingenuamente pensábamos que ya había pasado lo peor con la licenciatura, un curso lleno de grandes momentos entre seminarios, fiestas y compañerismo.

Y qué afortunada fui ese año de máster porque me dio la oportunidad de conocer a mis pajaritos, mis inseparables compañeras de vida, de locuras, desde ese momento. Aunque la mayoría del tiempo no hayamos podido compartir las tres la misma ciudad, sabemos que eso no importa, cuando nos juntamos pasan cosas inexplicablemente maravillosas; gracias por ser simplemente vosotras, que puede parecer poco pero lo es todo. Ceci, gracias por tu apoyo incondicional y tu amistad sincera y generosa, siempre al pie del cañón en los buenos momentos y, por supuesto, un pilar fundamental en los un poco menos buenos; en todos los aspectos, no imagino esta tesis sin ti. Laurich, gracias, por ser la mejor ;) y la única, por toda esa energía inagotable que te hace estar siempre ahí, eres un ejemplo de fuerza, valentía y de amistad inquebrantable.

Llegó el momento de la aventura argentina (la primera), muchas gracias a toda la gente del CERELA, a la Dra. Graciela Vignolo, por acogerme en su grupo de investigación, así como Dr. Jean Guy LeBlanc, Dra. Graciela Rollán y Dra. Lucila Saavedra por las colaboraciones en los trabajos allí realizados. Gracias a todos los chicos y chicas, Paola, Gabi, Matías, Ale, Yanis, Patry, Anto, Sil, Marion, Lucía, Juliana, Lore, Julieta, Lucre, Nadia, Mariana, Jaime, Euge, fuisteis unos compañeros espectaculares de experimentos, juntadas, fútbol, excursiones y celebraciones. Gracias Male, por tu ayuda y consejos en el laboratorio. Gracias Luciana, por tu amistad, por las carreras con merienda incluida y por hacer posible celebrar aquel excelente cumpleaños tan lejos, y en primavera. Thanks Lucas, for being such a great roommate. Gracias Guillo, por tu amistad y hospitalidad, por todas las fiestas y momentos increíbles en Tucumán,

pero también, junto a Juli y Faber, gracias por aquellas inolvidables Fallas. Faber, un “gárgola” casi valenciano, gracias por todas las risas y momentos vividos, por hacer llegar el contrato de mi beca a tiempo al otro lado del charco ;). Gracias Migue, por darme un hogar y por tu valiosa ayuda, haciendo que todo fuera tan fácil y que me sintiera tucumana desde el primer día.

Gracias a los verdaderos compañeros de sufrimientos pre-doctorales, mi querida secta, ya seáis a los que echamos mucho de menos como a los que aquí seguís, dando apoyo día a día. Qué gran suerte que gente así se cruce en tu camino para contribuir, en tan gran medida, a hacer que estos últimos años sean los mejores de mi vida. Aurora, gracias por ser tan única, por los grandes momentos en los inicios de la tesis y por tus consejos. Anto, gracias por ser un ejemplo de actitud ante la vida, por mantenernos siempre unidos. Adri, gracias por todos los momentos vividos, nuestras conversaciones y por tu apoyo y cariño cuando todo esto empezó. Jiri, gracias por tu contagiosa alegría y tus genialidades, dejas marca allá donde vas. Fani, gracias por los momentos inolvidables vividos en sitios tan dispares, haciendo que todo saliera perfecto, y por todas nuestras noches. Lucía, gracias por ser la primera en bajar la media de edad de la secta ;), por tu bonita personalidad, sincera y guerrera, y por hacer posible que probásemos los mejores vinos de La Rioja. Walter, gracias por ser el mejor compi ever, por toda tu ayuda siempre, por ser un gran anfitrión siciliano y por mostrar tu mejor cara y sonrisa en todo momento. Ying, gracias por ser una persona tan especial, por tu bondad, por transmitir esa alegría y esa buena energía). Ric, gràcies per ser una persona tan genial, per fer-me riure sempre generant tan bons records, per la teua complicitat i amistat, i per compartir dos grans passions ;). Peris, gracias por compartir tu sabiduría, por ser un ejemplo de lucha, sobretodo en esta difícil profesión, por tu risa y buen rollo que levantan cualquier estado de ánimo. Sara, gràcies per ser una perla de persona que sempre veu el millor en les demás, per tindre eixa llum que atrau, per la teua generositat i pel teu suport escoltant totes les meues històries, per la teua valuosa amistat, per totes les aventures viscudes, i les que queden... Andrea Origone, gracias por tu cariño y tu amistad, por aquellos meses que durarán para siempre a pesar de la distancia. Daniela, aunque hayamos coincidido poco tiempo, gracias por tu carácter tan especial y por todas las risas y buenos ratos, por traerme un trocito de Tucumán. Miguel, gracias por tu carácter peleón y, a la vez, tan comprensivo y atento, se necesitan muchas personas como tú en esta sociedad. Laura, gracias por tu humildad y tu personalidad tan ingeniosa y única, por regalarnos esas grandes frases y por los momentos tan divertidos que hemos pasado que, seguro, son solo el principio. María, gracias por tu dulzura y tu simpatía, por tener siempre una sonrisa. Romain, gracias por ese humor tan característico y por todas las risas, incluso en la otra punta del mundo. Dolo, gracias

por esa energía y simpatía, junto al terremoto de Seba, gracias por contribuir a que los últimos meses hayan pasado volando. A los estudiantes tan estupendos que han pasado por el IATA: Josepin, Cristineta, Tania, Alba Contreras, Alba Guillén, Marcos, Andrea, Nuria, por mantener la juventud y frescura de este grupo.

Y los últimos coletazos de la tesis, los que dieron la forma final a todo el trabajo, no habrían sido posibles sin la estancia en Foggia. Grazie mille Prof. Giuseppe Spano, por acogerme en tu maravilloso grupo. Grazie Glenda, por recibirme desde el principio con los brazos abiertos. Gracias Pasquale, por tener un corazón español y hacerme sentir en el laboratorio como en casa, por todas las bromas y las risas, por toda tu valiosa ayuda y por ser un gran guía. Grazie Vitt, por todas tus ideas que han culminado y aportado tanto a esta tesis, por tu creatividad y generosidad, por hacer posible que conociera el maravilloso contraste entre el sur y el norte de Italia y que fuese una experiencia tan enriquecedora. Grazie, a la gente de Fondazione Edmund Mach di San Michele all'Adige, Dr. Franco Biasioli, por permitirme conocer el PTR-ToF-MS. Gracias Alberto, por acogerme y hacer únicos esos días, sabes que esto fue posible gracias a ti. Grazie Marianna, por ser la mejor profesora de italiano en los almuerzos y compañera de laboratorio y de aventuras pugliese. Junto con Antonio, Carmela, Luciano, Federica, grazie, las horas en las bancadas pasaban volando con vuestra alegría. Grazie a tutti i foggiani di l'ESN que me hicieron pasar momentos tan especiales: Serena, Sestilia, Francesco, Valentina, Tommaso, Giovanni, Alessandro. Gracias, Alessia e Imma, por todos esos momentos únicos, vuestra compañía y las aventuras vividas, por ser personas imprescindibles para mí en Foggia.

A mis compañeros del laboratorio 308, muchas gracias por haber sido un maravilloso apoyo este año, habéis hecho que pase volando. Gracias Laura, por compartir tantas cosas y por tu bondad, eres una persona genial con la que compartir mucho más que una bancada. Chantal, gracias por todas las risas y por tu valiosa ayuda. Carlos, guajillo, contigo hemos pasado muchos de los mejores momentos en el laboratorio, gracias por darnos la oportunidad de conocerte y, encima, repetir! ;)

Als meus tresors, la família que s'elegix, amb qui puc ser jo completament. Gràcies per haver-me acompanyat des del principi, sóc molt afortunada de comptar amb vosaltres i no hi ha distància que mai puga canviar-ho. Cerrillo, gracias por tu amistad tantísimos años, por tu generosidad y tu fuerza, y por regalarnos momentos tan divertidos. Joel, gracias por tu comprensión y tu amistad, por todas las historias que nos regalas; empezamos a generar grandes recuerdos sufriendo juntos los inicios de la biología, junto con Paula, gracias por tu sentido del humor tan genial y

porque no pasa el tiempo cuando nos reencontramos. Elena, gracias por tu energía y tu amistad llena de cariño, por ser un ejemplo de lucha por lo que una quiere. Maria, gràcies per estar sempre ahí, per ser tu, la teua amistat ha sigut i serà sempre fonamental, els quilòmetres no importen; tens una valentia admirable. Marina, gràcies per la teua amistat imprescindible i sincera, per haver estat ahí sempre de forma incondicional, ets una persona meravellosa i sempre has vist el millor de mi. Marta, la meua companya inseparable de carrera i d'aventures, gràcies per la teua amistat inspiradora i per tots els moments viscuts, pel teu suport i ajuda en totes les circumstàncies, eres un exemple de vocació allà on vas.

Gracias a mi familia xabiera, por todas esas vacaciones y desconexiones tan necesarias en el paraíso. Anna, mil gràcies per la teua complicitat i amistat, per ser una persona tan genial, són molts anys compartint moments inolvidables i sabem que açò ja és per a sempre. Gracias Lluna, mi hermana, por ser tan increíble, por haber crecido juntas y haber compartido cada paso conmigo, por tu amistad infinita y sincera, por escucharme siempre y hacerme sentir la seguridad de que, pase lo que pase, ahí estarás. Y a su madre, Amparo, gracias por hacer posible que estemos aquí las dos.

Al mejor compañero de vida, gracias por haberme enseñado tanto, por hacerme ver las cosas cuando no son como una se empeña, y ayudarme a evolucionar. Por compartir los momentos buenos y los malos, y darme aire para seguir, haciendo que hayamos llegado hasta aquí, que es muy lejos. Por calmarme y, a la vez, animarme. Por conocerme de verdad, agunatarme y, aún así, quedarte conmigo. Porque te elegiría cada día. Gracias, Javi.

A mi familia. Gracias a mis tíos, Rafa y Emilio, por toda vuestra ayuda. Seguir con mis iaias: Carmencín, gracias por ser mi inspiración, siempre estás en mi cabeza, y es que no he conocido a nadie más trabajadora que tú, aún en tus últimos años hablabas maravillas de tu profesión en el laboratorio, un poco distinto del mío, por el que siempre me preguntabas. Pilar, ¿de dónde habré sacado este carácter?, gracias por transmitir esa alegría y positividad que te hace atraer personas allá donde vas, por hablar hasta con las farolas y seguir enseñándome tanto. A mis padres, los principales responsables, los primeros, los únicos, a los que una no elije pero es imposible tener más suerte de la que he tenido yo. Gracias, una y mil veces, por apoyarme completamente en todas mis decisiones. Por darme esas fuerzas para todo lo que se ha interpuesto en el camino, por inculcarme lo imprescindible, que es poner esfuerzo en todo aquello que una hace. Por ser unos grandes ejemplos de trabajo pero, lo más importante, de las más bellas personas que conozco.

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
AcNa	Acetato de sodio
APS	Amina primaria-secundaria
BAL	Bacterias del ácido láctico
bp	Pares de bases
C18	Carbono 18
CAF	Medio Chalmers Agar con Fitato
CARD	“Comprehensive Antibiotic Resistance Database”
CDM	Medio Químicamente Definido
CDR	Cantidad diaria recomendad
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CERELA	Centro de Referencia para Lactobacilos
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CNS	Estafilococos coagulasa-negativos
CO ₂	Dióxido de carbono
cP	CentiPoise
CPS	Polisacáridos capsulares de superficie
DHPPP	Hidroximetil-7,8-dihidropterina fosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
EA	Etil acetato
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria
ELC	Extractos libres de células
EPS	Exopolisacáridos
EtOH	Etanol
FDA	“Food and Drug Administration”
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FFC	Centro de Alimentos Funcionales
FEEDAP	Panel de Aditivos y Productos o Sustancias usadas en Alimentación Animal
FAD	Flavin-adenina-dinucleótido
FMN	Flavin-mononucleótido
g/L	Gramos por litro
GRAS	“Generally Recognized As Safe”
GTP	Guanosina trifosfato

HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IATA	Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos
ISO	“International Organization of Standardization”
ISR	“Intergenic Spacer Region”
KA	Kéfir de avena
KC	Kéfir de cebada
KL	Kéfir de leche
KM	Kéfir de maíz
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas/masas
Log	Logaritmo en base 10
mg	Miligramos
MCB	Medio Chalmers modificado
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
min	Minutos
MRS	“De Man-Rogosa médium”
MS	Espectrometría de masas
MS-LIT	Espectrometría de masas lineal de trampa iónica
NaCl	Cloruro de sodio
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido deshidrogenasa
ng/mL	Nanogramos por mililitro
OMS	Organización Mundial de la Salud
PABA	Ácido para-aminobenzoico
PCA	Análisis de componentes principales
PEG	“Protein Encoding Gene”
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PTR	Reacción de transferencia de protones
Pi	Fósforo inorgánico
QPS	“Qualified Presumption of Safety”
RAPD	Polimorfismos del DNA al azahar
RC	Reactivo de color
REP	Elementos palindrómicos repetitivos
RFN	Región reguladora del operón de biosíntesis de riboflavina
RGI	“Resistance Gene Identifier”

RNAr	RNA ribosómico
SCSIE	Servicio Central de Soporte Experimental
SE	Solución de extracción
TCA	Solución de tricloroacético
TSB	Caldo de soja y tripticaseína
UVEG	Universitat de València-Estudi General
UFC	Unidades formadoras de colonia
VOC	Compuestos orgánicos volátiles
YPD	"Yeast Extract-Peptone- Dextrose"

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Taxonomía, clasificación e identificación de bacterias lácticas	3
1.1 Identificación bacteriana por secuenciación del gen RNAr 16S	7
1.2 Identificación de BAL por técnicas moleculares basadas en perfiles genéticos	8
2. Metabolismo y fisiología de las BAL	9
2.1 Metabolismo de los carbohidratos	9
2.2 Metabolismo de los ácidos orgánicos	11
2.3 Requerimiento de aminoácidos, vitaminas y minerales	12
2.4 Proteólisis y lipólisis	12
3. Ecología	13
4. Las BAL en las fermentaciones alimentarias	15
4.1 Productos fermentados basados en cereales	17
4.2 Productos fermentados vegetales	18
4.3 Tubérculos y raíces fermentados	18
4.4 Productos cárnicos fermentados	19
4.5 Productos lácteos fermentados	20
5. Aplicaciones biotecnológicas de las BAL en alimentos funcionales	21
5.1 Alimentos funcionales	22
5.2 Probióticos	23
5.3 Actividades enzimáticas importantes en las BAL	25
5.4 Producción de vitaminas en las BAL y su aplicación en alimentos	26
5.5 Producción de EPS en las BAL	28
5.6 Aspectos relacionados con la seguridad alimentaria de las BAL	29
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. Materiales	39
1.1 Cepas microbianas utilizadas	39
1.2 Oligonucleótidos	40
1.3 Medios de cultivo generales	42
1.4 Medios de cultivo para la caracterización biotecnológica	43
1.5 Soluciones de reactivos y otros materiales utilizados	47

2.	Métodos	50
2.1.	Condiciones de cultivo y de conservación de las cepas	50
2.2.	Identificación de las BAL	50
2.3.	Caracterización biotecnológica	54
2.4.	Propiedades relacionadas con la seguridad alimentaria	58
2.5.	Evaluación tecnológica de las cepas de BAL	63
2.6.	Elaboración de un modelo de alimento funcional vegetal	65
2.7.	Secuenciación y análisis genómico	68
CAPÍTULO 1. Identificación de cepas de BAL aisladas de productos fermentados tradicionales procedentes de Latinoamérica.....		71
1.	Identificación de los aislados de BAL recuperadas de chicha y su distribución durante el proceso de elaboración.....	79
2.	Identificación de los aislados de BAL recuperados de tocosh y su distribución en las muestras estudiadas.....	87
	Discusión	91
CAPÍTULO 2. Caracterización biotecnológica de los aislados de BAL.....		93
1.	Determinación cualitativa de actividades enzimáticas, producción de EPS y vitaminas del grupo B para la selección de cepas con potencial biotecnológico	104
2.	Determinación cuantitativa de la producción de vitaminas del grupo B y de la actividad degradadora de fitatos	109
2.1.	Cuantificación de la producción de folatos.....	109
2.2.	Cuantificación de la actividad degradadora de fitatos	111
2.3.	Cuantificación de la producción de riboflavina o vitamina B2	111
3.	Estudio genómico de las cepas de BAL en cuanto a la producción de vitaminas	113
3.1.	Análisis de los genes de la ruta de biosíntesis de riboflavina	113
3.2.	Análisis de los genes de la ruta de biosíntesis de folatos	116
	Discusión	119
CAPÍTULO 3. Determinación de las propiedades relacionadas con la seguridad y calidad alimentaria de los nuevos aislados de BAL.....		125
1.	Actividad antifúngica frente a microorganismos alterantes	132
2.	Actividad antibacteriana frente a patógenos transmisibles por alimentos	136
3.	Determinación preliminar de la naturaleza química de los agentes antimicrobianos	138
4.	Determinación y cuantificación de los compuestos antifúngicos.....	139
5.	Determinación de resistencias a antibióticos	140
6.	Análisis genómico de las cepas para garantizar la seguridad alimentaria	144

Discusión	145
CAPÍTULO 4. Evaluación tecnológica de las cepas productoras de riboflavina y su aplicación en la elaboración de un alimento funcional.	151
1. Comportamiento de las cepas de BAL seleccionadas en condiciones de estrés y frente a distintas fuentes de carbono	157
2. Selección de cepas superproductoras de riboflavina y análisis de la región reguladora RFN	162
3. Potencial de las cepas de BAL seleccionadas para su aplicación en un modelo de alimento funcional vegetal	163
3.1 Comportamiento de las cepas de BAL seleccionadas durante la fermentación de bebidas basadas en matrices vegetales	164
3.2 Ensayos de resistencia a condiciones de estrés relacionadas con la producción de kéfir	165
3.3 Determinación de los parámetros físico-químicos y microbiológicos del kéfir de leche y los productos tipo kéfir a base de cereales	167
3.4 Producción de riboflavina en los productos tipo kéfir	170
3.5 Perfil de los compuestos orgánicos volátiles (VOC) de los productos de kéfir elaborados	171
Discusión	173
CONCLUSIONES	177
BIBLIOGRAFÍA	181
ANEXO I	209
ANEXO II	215

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Taxonomía, clasificación e identificación de bacterias lácticas

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son microorganismos procariotas que han estado íntimamente asociados con la cultura humana y su bienestar a lo largo de la historia. La industrialización de las bio-transformaciones alimentarias en nuestros tiempos, así como las cualidades que estos microorganismos aportan a las características sensoriales, de calidad y de seguridad de los productos fermentados, han consolidado la consideración de las BAL como microorganismos beneficiosos (Holzapfel y Wood, 2014).

Pertenece al filo de bacterias Gram-positivas *Firmicutes*, incluyendo cocos, coco-bacilos o bacilos no esporulados y que presentan un DNA de bajo contenido en G+C (≤ 55 mol%). Son un grupo bacteriano normalmente catalasa-negativo y que necesita una fuente de carbono fermentable para crecer. Las BAL se agrupan en la Clase III del filo *Firmicutes*, es decir, en la clase *Bacilli*, compartiendo filo con los *Clostridia* (Clase I) y los *Mollicutes* (Clase II). Los análisis basados en la comparación de las secuencias del gen del RNA ribosómico 16S (RNAr 16S) diferencian claramente *Firmicutes* del otro filo de bacterias Gram-positivas, *Actinobacteria*, presentando los miembros que lo componen un DNA con alto contenido en G+C (≥ 55 mol%). Dentro de la clase *Bacilli*, las BAL están englobadas en el orden II, los *Lactobacillales* (Garrity y Holt, 2001; Ludwig et al., 2009).

Como se puede observar en la Tabla 1-1, las BAL son un grupo microbiano muy diverso compuesto por seis familias, 40 géneros y un creciente número de especies (más de 500 en la actualidad), por lo que se caracterizan por tener una rápida expansión, sobre todo considerando la tasa de publicación de nuevas especies de los géneros *Lactobacillus* (236) y *Streptococcus* (129). Además, las seis familias que componen las BAL también son diversas en cuanto a los géneros que las componen: *Aerococcaceae* (7 géneros), *Carnobacteriaceae* (18 géneros), *Enterococcaceae* (7 géneros), *Lactobacillaceae* (4 géneros), *Leuconostocaceae*, (5 géneros) y *Streptococcaceae* (3 géneros) (<http://www.bacterio.net/>).

Introducción general

Tabla 1-I. Visión general de las especies de BAL (adaptado de Vandamme et al., 2014)

Familia	Género	Especie tipo	Nº especies
Aerococcaceae	<i>Abiotrophia</i>	<i>A. defectiva</i>	1
	<i>Aerococcus</i>	<i>A. viridans</i>	8
	<i>Dolosicoccus</i>	<i>D. paucivorans</i>	1
	<i>Eremococcus</i>	<i>E. coleocola</i>	1
	<i>Facklamia</i>	<i>F. hominis</i>	6
	<i>Globicatella</i>	<i>G. sanguinis</i>	2
	<i>Ignavigranum</i>	<i>I. ruoffiae</i>	1
Carnobacteriaceae	<i>Agitococcus</i>	<i>A. lubricus</i>	1
	<i>Alkalibacterium</i>	<i>A. olivapovliticus</i>	10
	<i>Allofustis</i>	<i>A. seminis</i>	1
	<i>Alloiococcus</i>	<i>A. otitis</i>	1
	<i>Atopobacter</i>	<i>A. phocae</i>	1
	<i>Atopococcus</i>	<i>A. tabaci</i>	1
	<i>Atopostipes</i>	<i>A. suicloacalis</i>	1
	<i>Carnobacterium</i>	<i>C. divergens</i>	12
	<i>Desemzia</i>	<i>D. incerta</i>	1
	<i>Dolosigranulum</i>	<i>D. pigrum</i>	1
	<i>Granulicatella</i>	<i>G. adiacens</i>	3
	<i>Isobaculum</i>	<i>I. melis</i>	1
	<i>Jeotgalibaca</i>	<i>J. dankookensis</i>	3
	<i>Lacticigenium</i>	<i>L. naphtae</i>	1
	<i>Marinilactibacillus</i>	<i>M. psychrotolerans</i>	2
	<i>Pisciglobus</i>	<i>P. halotolerans</i>	1
<i>Trichococcus</i>	<i>T. flocculiformis</i>	8	

Tabla 1-I. Cont.

Familia	Género	Especie tipo	Nº especies
Enterococcaceae	<i>Bavariicoccus</i>	<i>B. seileri</i>	1
	<i>Catelliococcus</i>	<i>C. marimammalium</i>	1
	<i>Enterococcus</i>	<i>t. faecalis</i>	53
	<i>Melissococcus</i>	<i>M. plutonius</i>	1
	<i>Pilibacter</i>	<i>P. termitis</i>	1
	<i>Tetragenococcus</i>	<i>T. halophilus</i>	5
	<i>Vagococcus</i>	<i>V. fluvialis</i>	13
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. delbrueckii</i>	199
	<i>Pediococcus</i>	<i>P. damnosus</i>	12
	<i>Sharpea</i>	<i>S. azabuensis</i>	1
Leuconostocaceae	<i>Convivina</i>	<i>C. intestini</i>	1
	<i>Fructobacillus</i>	<i>F. fructosus</i>	5
	<i>Leuconostoc</i>	<i>L. mesenteroides</i>	15
	<i>Oenococcus</i>	<i>O. oeni</i>	3
	<i>Weissella</i>	<i>W. viridescens</i>	21
Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i>	14
	<i>Lactovum</i>	<i>L. miscens</i>	1
	<i>Streptococcus</i>	<i>S. pyogenes</i>	103

La diversidad biológica de las BAL incluye distintos aspectos: la diversidad taxonómica y genética (género, especie e incluso cepa), y la diversidad fenotípica. Estos conceptos están en relación con el ecosistema que habitan y la adaptación a las condiciones del medio, que se reflejan en su diversidad fisiológica y su presencia en una amplia gama de hábitats, a veces extremos, lo que avala el hecho de que las BAL no sea precisamente un grupo homogéneo (Holzapfel y Wood, 2014). No obstante, comparten muchos rasgos bioquímicos y su identificación en especies en muchos casos resulta conflictiva, por lo que la taxonomía polifásica es la mejor aproximación para la identificación de las BAL e implica la aplicación de métodos generales de taxonomía y algunos más concretos. En la taxonomía polifásica, los análisis comparativos del gen RNAr 16S generalmente sirven como un punto de partida para revelar los

Introducción general

vecinos más próximos de supuestas nuevas especies, pero carecen de resolución para la discriminación entre éstas. Por su parte, la caracterización fenotípica de las BAL típicamente incluye el análisis de los patrones de fermentación de carbohidratos y de los productos de fermentación de la glucosa, así como la producción de los isómeros D- y L- del ácido láctico. La determinación del contenido en G+C del DNA forma parte de la descripción estándar de nuevos taxones, mientras que el análisis de la estructura del peptidoglicano de la pared celular es más específica para la taxonomía de las BAL. Aun así, en general estas últimas características son bastante poco discriminatorias entre los taxones de BAL y su valor es principalmente descriptivo. No existen guías ni reglas estrictas de identificación, por tanto, el objetivo de la taxonomía polifásica es la recolección de la máxima información genotípica, fenotípica y filogenética posible y, de este modo, evaluar todos los resultados para obtener conclusiones que sean útiles a la hora de elaborar esquemas prácticos de identificación (Vandamme et al., 2014).

Tradicionalmente, los estudios de hibridación DNA-DNA se han realizado para proporcionar evidencias concluyentes sobre el estatus taxonómico de un organismo determinado. Sin embargo, en la actualidad existen suficientes evidencias experimentales para sustituir la tradicional técnica de hibridación por los estudios genómicos, ya que se encuentran respaldados por plataformas de secuenciación de DNA que generan datos de alto rendimiento con bajo coste y alta calidad, así como herramientas bioinformáticas adecuadas para la clasificación e identificación de los organismos procariontes (Chun et al., 2018).

Además, la relación entre un nuevo organismo y su vecino filogenéticamente más cercano puede lograrse mediante el uso de una gran variedad de técnicas, que incluyen el ribotipado, el análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos y los análisis de patrones al realizar reacciones de PCR de elementos palindrómicos repetitivos (REP) o de polimorfismos del DNA al azahar (RAPD). Por su parte, existe un número creciente de estudios que incluyen el análisis de marcadores filogenéticos menos conservados, como son los genes *pheS*, *dnaK*, *tuf* o *recA*.

1.1 Identificación bacteriana por secuenciación del gen RNAr 16S

El RNA ribosómico es la mejor diana para el estudio de las relaciones filogenéticas porque está presente en todas las bacterias, es permanentemente funcional y está compuesto por dominios altamente conservados, así como por otros más variables. Las secuencias del RNA ribosómico proporcionan un marco de referencia que sirve como columna vertebral para la taxonomía microbiana moderna (Ludwig y Klenk, 2009). Existen en la actualidad bases de datos públicas construidas con secuencias publicadas y no publicadas (Cole et al., 2009) que resultan de gran utilidad para los estudios filogenéticos, pero que, a su vez, han acumulado secuencias de baja calidad, secuencias imprecisas e incluso incorrectamente etiquetadas. Esta situación motivó que surgieran las iniciativas de Yarza et al. (2008) y Cole et al. (2009), entre otros autores, para proporcionar a la comunidad científica bases de datos RNAr 16S curadas y garantizar, de este modo, la calidad y trazabilidad de las secuencias, así como la fiabilidad de los resultados derivados de su análisis.

El árbol de la vida que se basa en los estudios comparativos del gen RNAr 16S, establece que hay algunas docenas de filos dentro del dominio Bacteria, y tres de ellos comprenden la gran mayoría de las especies bacterianas cultivables: *Firmicutes* (organismos Gram positivos con bajo contenido en G+C, que incluyen la mayoría de las BAL), *Actinobacteria* (organismos Gram positivos con alto contenido en G+C) y *Proteobacteria* (organismos Gram negativos).

En las últimas décadas, el análisis de las secuencias del RNAr 16S como referencia para la reorganización de la taxonomía bacteriana ha llevado a la revisión de muchas clasificaciones, causando multitud de cambios de nomenclatura. En concreto, la variabilidad en las secuencias del gen RNAr 16S se ha utilizado de forma extensiva en la taxonomía de las BAL permitiendo un análisis en profundidad de este grupo bacteriano. Algunos taxones, que habían sido clasificados en base a las características fenotípicas y filogenéticamente, no eran coherentes, mientras que a su vez se fueron detectando nuevos taxones de BAL (Holzapfel et al., 2001). No obstante, cabe destacar, que la resolución de los análisis de secuencias del gen RNAr 16S entre especies de BAL cercanas es muy baja y muchas de ellas comparten más del 97% de sus secuencias, por lo que no existe un valor umbral de similitud de esta secuencia para la diferenciación entre especies. En estos casos, existen otras aproximaciones moleculares que complementan la secuenciación del RNAr 16S resultando útiles en identificación y/o diferenciación intraespecífica.

1.2 Identificación de BAL por técnicas moleculares basadas en perfiles genéticos

Entre las técnicas moleculares que se han utilizado para tipificar las cepas de BAL están aquellas que generan perfiles genéticos derivados del genoma completo, ya sea de fragmentos de restricción, i.e. ribotipado (Lyhs et al., 2002), por amplificación por PCR de la región intergénica espaciadora de los genes de RNAr 16S-23S (ISR) (Chenoll et al., 2003) o PCR con un solo cebador, i.e. REP-PCR (Gevers et al., 2001) o RAPD-PCR (Aznar y Chenoll, 2006), entre otros. De todos ellos, cabe destacar que los perfiles de ISR permiten diferenciar entre géneros de BAL (Chenoll et al., 2003); junto al RAPD-PCR, son técnicas simples y rápidas que pueden llevarse a cabo a partir del lisado de una sola colonia, lo que las convierte en herramientas adecuadas cuando se quiere trabajar con un elevado número de cepas. Por esta razón, el RAPD-PCR se ha aplicado en muchos estudios de BAL, ya sea para su identificación (Chenoll et al., 2007; Elizaquível et al., 2015; Ruiz-Rodríguez et al., 2016) diferenciación de sub-especies (Pérez et al., 2002), en estudios de la distribución geográfica de las cepas (Oneca et al., 2003), o para la monitorización de BAL implicadas en la fermentación de alimentos, tanto cultivos iniciadores como no iniciadores (De Angelis et al., 2001; Plengvidhya et al., 2004), así como para caracterizar la diversidad de las poblaciones de BAL en alimentos fermentados (Coppola et al., 2006; Chao et al., 2008).

La identificación molecular se ha convertido en nuestros días en una herramienta de identificación precisa y fiable que se utiliza ampliamente en aproximaciones, tanto dependientes de cultivo como independientes de cultivo, para la identificación de microorganismos de alimentos fermentados (Giraffa y Carminati, 2008; Dolci et al., 2015). Además de las técnicas mencionadas, la PCR específica de especie, es decir utilizando oligonucleótidos dirigidos a secuencias diana específicas de una especie determinada, es otra aproximación que se ha utilizado ampliamente en la identificación de BAL aisladas de alimentos fermentados (Robert et al., 2009). En este caso, se requiere del conocimiento previo de las secuencias específicas, existiendo además su adaptación al formato de PCR en tiempo real (*Real-time PCR*) que permite detectar y cuantificar las especies de BAL en los alimentos fermentados (Park et al., 2009).

2. Metabolismo y fisiología de las BAL

Las BAL se caracterizan por ser microorganismos “delicados”, con requerimientos nutricionales complejos y que necesitan para su crecimiento hidratos de carbono, aminoácidos, vitaminas y minerales. Además, algunas BAL necesitan factores de crecimiento especiales o la utilización de medios de cultivo complejos que incluyan, por ejemplo, zumo de tomate o suero de leche. Estas bacterias son capaces de degradar varios tipos de hidratos de carbono y compuestos relacionados a través de distintas rutas metabólicas, generando ATP para el transporte de solutos a través de la membrana celular y también para usos biosintéticos.

2.1 Metabolismo de los carbohidratos

Respecto al metabolismo de las hexosas, y en función del tipo de catabolismo de la glucosa que tengan, las BAL se dividen en dos grupos fermentativos: las bacterias homolácticas y las bacterias heterolácticas (Endo y Dicks, 2014). Las primeras utilizan la glicólisis, o vía Embden-Meyerhof-Parnas, mientras que la vía de la fosfoacetolasa, o del 6-fosfogluconato, es la que se encuentra presente en las bacterias heterolácticas. El uso de una u otra vía está normalmente determinado a nivel de familia. La vía glicolítica está presente en las familias *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae* y *Streptococcaceae*, con excepción del conocido como grupo III del género *Lactobacillus*; en esta ruta fermentativa, una molécula de glucosa se convierte finalmente en dos moléculas de ácido láctico, y se generan 2 moléculas de ATP mediante fosforilación a nivel de sustrato, gracias al enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa.

Por su parte, los miembros de la familia *Leuconostocaceae*, y algunas especies del género *Lactobacillus*, pertenecen a las bacterias heterolácticas, y metabolizan la glucosa por la vía de la fosfoacetolasa que produce una molécula de ácido láctico, una de CO₂ y una de etanol, a partir de cada molécula de glucosa consumida. El paso de producción de etanol desde el acetil fosfato es importante para la oxidación de las moléculas de NAD(P)H a NAD(P)⁺. De hecho, esta reacción está estrechamente relacionada con la tasa de fermentación de la glucosa y, por tanto, con la

Introducción general

tasa de crecimiento de las BAL heterofermentativas (Maicas et al., 2002), obteniéndose la ganancia neta de una molécula de ATP por cada glucosa consumida, como resultado de la fermentación heteroláctica.

Las BAL producen normalmente los isómeros D (-) y L (+) del ácido láctico, en ratios casi idénticas en las cepas de una misma especie, siendo uno de los criterios que se aplican para clasificar las BAL en sub-grupos. Existen algunas excepciones, como por ejemplo en el caso de *Lactobacillus sakei* que es capaz de cambiar la ratio de estos isómeros en presencia o ausencia de acetato de sodio (Iino et al., 2001).

Además de la glucosa, la mayoría de BAL también son capaces de fermentar otras hexosas como son la fructosa, la galactosa y la manosa, siendo la fructosa también utilizada como aceptor de electrones y no solo como sustrato.

Con respecto al metabolismo de las pentosas, muchas BAL son capaces de metabolizar algunas de ellas como por ejemplo arabinosa, ribosa y xilosa. Normalmente, son transportadas al interior celular por permeasas y metabolizadas por la vía de la fosfocetolasa. Sin embargo, algunas especies de BAL, como es el caso de *Lactobacillus vini*, presentan la vía de las pentosas fosfato, que se trata de una ruta homoláctica de la fermentación de las pentosas y que produce solamente ácido láctico como producto final, siendo los enzimas claves la transcetolasa y la transaldolasa (Rodas et al., 2006).

En definitiva, las BAL se separan en tres grupos en base a las rutas metabólicas que utilizan para fermentar la glucosa y también a su capacidad de metabolizar las pentosas: i) el primer grupo se define como homofermentativo obligado, ya que fermentan la glucosa exclusivamente a ácido láctico por la vía glicolítica y las BAL que pertenecen a este grupo son incapaces de fermentar pentosas y compuestos relacionados, como el gluconato. Las cepas que presentan estas características están clasificadas como el grupo I de lactobacilos, según la clasificación de Kandler y Weiss (1986), y solamente algunas especies del género *Lactobacillus* forman parte de este grupo; ii) el segundo grupo son las llamadas BAL heterofermentativas facultativas, que fermentan la glucosa a ácido láctico mediante la glicólisis, y las pentosas y compuestos relacionados mediante la vía de la fosfocetolasa. Los géneros incluidos en este grupo son *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactovum*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* y *Lactobacillus* spp. del grupo II. Por su parte, los miembros de la familia *Carnobacteriaceae* metabolizan la glucosa a piruvato mediante glicólisis, el cual es metabolizado

dando lugar a los ácidos láctico, acético y fórmico, y a etanol, con o sin CO₂. Además, normalmente metabolizan pentosas (Ishikawa et al., 2009), por lo que también se incluyen en este segundo grupo metabólico de las BAL; iii) el tercer grupo está compuesto por las BAL heterofermentativas obligadas, que metabolizan la glucosa y las pentosas mediante la vía de la fosfocetolasa. Se incluyen los géneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* y el grupo III de *Lactobacillus* spp.

Las clasificaciones como BAL homofermentativas obligadas o heterofermentativas obligadas dependen de la presencia o ausencia de los enzimas claves para la glicólisis y para la vía de la fosfocetolasa, que son la fructosa 1,6-difosfato aldolasa y la 1,6-difosfato fosfocetolasa, respectivamente (Kandler, 1983). En el caso de las BAL heterofermentativas facultativas, éstas comparten características de ambos grupos, y presentan los enzimas para las dos rutas metabólicas descritas.

Por su parte, algunas BAL son capaces de metabolizar disacáridos, como la celobiosa, la lactosa, la maltosa, la melibiosa, la sacarosa, etc. Estos azúcares son transportados tanto libres como fosforilados y luego son divididos en dos monosacáridos (Axelsson, 1998), siendo los productos metabolizados por la vía glicolítica o la de la fosfocetolasa. Cabe destacar que algunas BAL prefieren disacáridos que monosacáridos, aunque la fermentación parezca más compleja; como ejemplos están las BAL de productos lácteos y las BAL de masas ácidas. También existen casos de BAL capaces de degradar polisacáridos, como por ejemplo el almidón, mediante la síntesis de enzimas endógenas, como son las amilasas (Olympia et al., 1995).

2.2 Metabolismo de los ácidos orgánicos

La fermentación de los ácidos orgánicos tiene un papel importante en el metabolismo energético de algunas BAL heterofermentativas. En el caso de la fermentación del malato, se trata de un proceso importante durante la fermentación secundaria del vino, ya que muchas BAL vínicas lo utilizan para producir L-lactato y CO₂ como productos finales, llevando a cabo la llamada fermentación malo-láctica que contribuye a la bajada de la acidez del vino, siempre a partir del L-malato. Las especies de BAL que presentan dicha capacidad son *Oenococcus oeni* (Dicks et al., 1995) y algunos representantes de otras especies de BAL, por ejemplo, *Enterococcus faecalis* y *Lb. casei*, que pueden usar L-malato como única fuente de energía (London, 1990).

El citrato, por su parte, se utiliza normalmente como precursor de un aceptor de electrones, el piruvato, en el co-metabolismo de otros azúcares (Zaunmüller et al., 2006). A través de esta vía,

se producen muchos compuestos responsables del aroma de productos fermentados, como el diacetilo, la acetoína y el ácido acético.

En el caso del lactato, su metabolismo es poco frecuente en las BAL. No obstante, *Lb. bifermans*, es capaz de metabolizar ácido láctico a acético, etanol, CO₂ y H₂ cuando se cultiva en condiciones limitantes de sustrato (Kandler et al., 1983), y algunas cepas de *Lb. buchneri* y *Lb. parabuchneri* también pueden fermentar el ácido láctico a ácido acético, 1,2-propanodiol y un poco de etanol bajo condiciones anaeróbicas, sin necesitar un aceptor de electrones externo (Oude Elferink et al., 2001).

2.3 Requerimiento de aminoácidos, vitaminas y minerales

Las BAL requieren de complejos que contengan aminoácidos y vitaminas para poder crecer, y para confirmar sus requerimientos específicos son necesarios los medios sintéticos. Generalmente, el ácido L-glutámico, la L-isoleucina, la L-leucina y la L-valina son aminoácidos necesarios para prácticamente todas las BAL, mientras que muchas de ellas requieren L-metionina, L-tirosina y L-triptófano (Ledesma et al., 1977).

En el caso de las vitaminas, se puede decir que el pantotenato y la niacina, como precursores del coenzima A y del coenzima NAD, respectivamente, son esenciales para todas las BAL (Rogosa et al., 1961).

Los minerales Fe²⁺, Fe³⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ and Zn²⁺ normalmente forman parte de los medios de cultivo de las BAL siendo necesarios para las reacciones enzimáticas (Archibald, 1986). No obstante, la mayoría de BAL no requieren iones de hierro para su crecimiento (Imbert y Blondeau, 1998). Generalmente, los requerimientos de estos metabolitos son dependientes de cepa por lo que es necesario su estudio en medios químicamente definidos (Endo y Dicks, 2014).

2.4 Proteólisis y lipólisis

Las BAL involucradas en las fermentaciones lácteas suelen presentar actividades proteolíticas debido a que la leche contiene escasos aminoácidos, de modo que estas bacterias los obtienen de la proteína principal de dicha matriz alimentaria, la caseína. La utilización de esta proteína se da gracias a proteinasas presentes en la capa externa de las BAL capaces de degradar la caseína a oligopéptidos que son introducidos en el interior celular y utilizados tras su degradación a péptidos más cortos mediante peptidasas intracelulares (Savijoki et al., 2006). La

proteólisis en las BAL es una actividad que, además, presenta interés industrial debido a su contribución en las propiedades organolépticas de los productos lácteos fermentados (Sridhar et al., 2005). Por su parte, la lipólisis llevada a cabo por algunas BAL, también tiene relevancia en el desarrollo del aroma y sabor de productos lácteos, especialmente en el proceso de maduración del queso; *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum* y *Lb. rhamnosus* son algunas de las especies de BAL en las que se ha descrito actividad lipolítica (Di Cagno et al., 2006; Abeijón Mukdsi et al., 2009).

3. Ecología

Las BAL son uno de los grupos bacterianos más importantes a nivel industrial ya que cuentan con una larga historia en su uso para los procesos fermentativos. Debido a sus capacidades biosintéticas limitadas y sus altos requerimientos en cuanto a fuentes de carbono y nitrógeno, los hábitats naturales de las BAL comprenden ambientes nutricionalmente ricos. De modo que están generalmente asociadas con materias primas crudas, tanto de origen animal como vegetal, incluyendo lácteos, carnes, vegetales y cereales en los que la fermentación puede llevarse a cabo, y sus respectivos productos fermentados derivados (Ravyts et al., 2012). Muchas especies de BAL también se aíslan de los tractos respiratorio, intestinal y genital de humanos y animales, siendo su amplia versatilidad metabólica la que permite la colonización de esta gran variedad de hábitats (Giraffa, 2014). De este modo, todas las especies de BAL tienen sus reacciones y nichos particulares, conformando un grupo muy diverso y con diversas capacidades metabólicas. Dicha diversidad metabólica las hace muy adaptables a los cambios de condiciones del medio haciendo posible su éxito en las fermentaciones ácidas de los alimentos. Bioquímicamente, las BAL llevan a cabo la conversión de los hidratos de carbono a ácido láctico y, como se ha descrito anteriormente, en algunos casos también a CO₂ y otros ácidos orgánicos, sin la necesidad de oxígeno. De hecho, han sido descritas como bacterias microaerófilas ya que necesitan de una pequeña cantidad de oxígeno para crecer de modo eficiente.

Introducción general

Además, se caracterizan por su alta tolerancia a pHs ácidos. Este rasgo confiere a las BAL una ventaja para competir con otras bacterias en una fermentación natural, ya que pueden aumentar la acidez por la producción de los ácidos orgánicos. Además, tanto el ácido láctico, como principal producto de su metabolismo, junto a otros metabolitos, son efectivos como inhibidores del crecimiento de otros microorganismos autóctonos o contaminantes que pueden comprometer la calidad y/o seguridad de los alimentos fermentados (Giraffa, 2014).

Como consecuencia, las BAL forman parte de numerosos alimentos, contribuyendo a su conservación en muchos casos, los cuales se consumen desde antaño de forma generalizada por los humanos. Esta circunstancia ha llevado a su consideración como organismos “Generally Recognized As Safe, GRAS” por la autoridad americana de alimentación FDA (Food and Drug Administration) (Klaenhammer et al., 2005).

El estatus GRAS de las BAL ha facilitado su utilización en numerosas aplicaciones industriales, abarcando su uso como cultivos iniciadores en la industria láctea, como probióticos en suplementos dietéticos, así como en la producción de macromoléculas, enzimas y metabolitos. Gracias a la intervención de las BAL, durante siglos se han obtenidos alimentos seguros, almacenables y organolépticamente aceptables. De hecho, se podría afirmar que las BAL son los microorganismos, únicamente superados por las levaduras, que más han aportado en sus servicios a la humanidad; el metabolismo aparentemente simple de las BAL se ha explotado a lo largo de la historia para la conservación de alimentos y bebidas en casi todas las sociedades desde los orígenes de la agricultura. La domesticación de las cepas de BAL se ha transmitido a través de diversas tradiciones culinarias que han dado lugar a culturas modernas capaces de llevar a cabo las fermentaciones (Giraffa, 2014).

Actualmente, las BAL tienen un papel distinguido a nivel global como suplementos alimentarios que dirigen y hacen posibles las bioconversiones en los productos lácteos, carnes y vegetales fermentados, siendo esenciales en la producción de vino, y las fermentaciones de café, ensilaje, cacao y masas ácidas, así como en numerosas fermentaciones de alimentos tradicionales indígenas (Makarova et al., 2006).

Como se ha comentado, la importancia de las BAL en la industria alimentaria se debe fundamentalmente a que se utilizan como cultivos iniciadores o como cultivos adyuvantes para la producción de alimentos fermentados y, además, juegan un reconocido papel en la conservación y en la seguridad microbiológica de los mismos, promoviendo la estabilidad de los productos

finales (Caplice y Fitzgerald, 1999). Sus efectos profilácticos se atribuyen a la producción de ácidos orgánicos, CO₂, etanol, peróxido de hidrógeno y diacetilo, así como a compuestos antimicrobianos más específicos, como los ácidos grasos, las bacteriocinas y otros compuestos proteicos relacionados (Lavermicocca et al., 2000; Atrih et al., 2001).

Durante los procesos fermentativos, las BAL también influyen en las propiedades sensoriales de los productos, como por ejemplo en el desarrollo de su aroma. Como se ha descrito en los apartados 2.1-2.4, los compuestos responsables se forman por diferentes procesos, como las conversiones de la lactosa y el citrato mediante la glicólisis y el metabolismo del piruvato, de los ácidos grasos mediante la lipólisis, y de las proteínas mediante la proteólisis (Van Kranenburg et al., 2002). Fruto de este metabolismo, se generan compuestos como el diacetilo, la acetoína y el ácido acético, y algunos de los cuales, en las cantidades adecuadas y bien equilibradas, contribuyen de una forma beneficiosa a los aromas fermentados típicos (Pastink et al., 2008).

Por todo ello, muchas especies de BAL encuentran amplias aplicaciones industriales, principalmente como cultivos iniciadores o cultivos complementarios, en varias fermentaciones alimentarias, y los géneros más comúnmente asociados a estos procesos alimentarios son *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus* y *Streptococcus* (Leroy y De Vuyst, 2004).

4. Las BAL en las fermentaciones alimentarias

La fermentación alimentaria se define como un método biotecnológico que ha surgido históricamente de la necesidad de preservar los alimentos. Puede llevarse a cabo por hongos filamentosos, levaduras y bacterias, o por una combinación de ellos, que convierten los hidratos de carbono en metabolitos finales como los ácidos orgánicos, alcoholes y CO₂ (Leroy y De Vuyst, 2004). Son muchos los alimentos que pueden ser fermentados, como es el caso de la leche, la carne, el pescado, los vegetales y los cereales (Ravyts et al., 2012).

Las BAL son de particular interés en las fermentaciones alimentarias por el hecho ya comentado de que producen ácido láctico como metabolito final en las mismas. Pero, además de las BAL,

existen otros grupos bacterianos que comparten con ellas el ecosistema de los productos fermentados. Este es el caso de las bacterias acéticas, que pueden presentar efectos beneficiosos, i.e. son responsables de la producción del vinagre y participan en la fermentación del cacao, pero también son conocidas por las alteraciones que producen en el vino (Raspor y Goranovič, 2008). Los estafilococos coagulasa-negativos (CNS), junto con miembros de *Kocuria* spp. y *Micrococcus* spp., forman parte de la microbiota natural de los productos cárnicos fermentados, a la vez que los lactobacilos y los pediococos (Leroy et al., 2006). Además de la carne, los CNS pueden encontrarse en distintos tipos de quesos ya que presentan una elevada tolerancia a las sales y al pH ácido (Irlinger, 2008). Otras grupos bacterianos que juegan un importante papel en las fermentaciones son las brevibacterias, corinebacterias y las popionibacterias, que se utilizan en la producción de quesos, así como la especie *Bacillus subtilis* implicada en la fermentación del haba de soja (Hutkins, 2006).

En los ambientes ricos en carbohidratos, las BAL crecen frecuentemente asociadas a levaduras que suelen estar en niveles más bajos. Las especies de los géneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Torula*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, entre otros, pueden proliferar en estos nichos causando fermentaciones alcohólicas espontáneas, como es el caso de las fermentaciones espontáneas de vino y de cerveza (Fleet, 2007). Sin embargo, el descubrimiento de los microorganismos en el siglo XIX hizo posible la mejora de las producciones de cerveza, vino, vinagre y productos de panadería mediante el uso de cultivos iniciadores específicos (Hansen, 2002); la adición de millones de células por gramo a las matrices alimentarias sin fermentar (en vez de las 100 o 1000 células por gramo que contienen de forma natural las materias primas), aceleran y dirigen las fermentaciones (Leroy y De Vuyst, 2004). A pesar de su carácter impredecible, la optimización de las fermentaciones espontáneas a lo largo de la historia fue posible mediante “reinoculación”, es decir, utilizando una pequeña porción de la fermentación espontánea, que previamente había resultado ser exitosa, como inóculo para la siguiente. Tras refrescar varias veces, la reinoculación da lugar a una microbiota estable, en la que solo permanecen las cepas mejor adaptadas (Tamang et al., 2016).

En la actualidad, se siguen utilizando las fermentaciones espontáneas generalmente como alternativas más económicas que los cultivos iniciadores. Este es el caso de las fermentaciones de alimentos tradicionales llevadas a cabo en países sub-desarrollados para proporcionar al alimento de forma natural las características particulares de una región concreta, pero también en algunos productos en los que la composición exacta de la microbiota y el papel de las

sucesiones microbianas no se conoce con exactitud. Desafortunadamente, estas fermentaciones presentan muchas veces el inconveniente de ser demasiado lentas, lo que permite el desarrollo de microorganismos no deseables que desencadenen la alteración del proceso.

De todos modos, la técnica de la reinoculación se sigue aplicando, no solo en alimentos fermentados indígenas de algunas culturas y países, sino también en muchos productos fermentados cuyo consumo se ha ido expandiendo en todo el mundo, como el chucrut, las masas ácidas y algunos productos lácteos fermentados, como el kéfir (Tamang et al., 2016).

Los alimentos fermentados se clasifican a nivel global en 9 grupos principales en función de los sustratos (materias primas) utilizados: i) cereales fermentados, ii) vegetales fermentados, iii) legumbres fermentadas, iv) tubérculos y raíces fermentadas, v) productos lácteos fermentados, vi) productos cárnicos fermentados y conservados, vii) productos de pescado fermentados, secados y ahumados, viii) productos fermentados varios y ix) bebidas alcohólicas (Steinkraus, 1997; Tamang, 2010). A continuación, se detallarán algunos de estos grupos y el papel que ejercen las BAL en las fermentaciones correspondientes.

4.1 Productos fermentados basados en cereales

En Europa, América y Australia, la mayoría de cereales tales como el trigo, el centeno, la cebada y el maíz se fermentan, o bien de modo espontáneo, o bien añadiendo levaduras panaderas comerciales en el caso de la masa para panificación (Guyot, 2010); sin embargo, concretamente en Europa, todavía es común preparar ciertos panes mediante la práctica tradicional, sin utilizar ninguna cepa comercial de levaduras panaderas, siendo las levaduras y las BAL propias de la materia prima las que conducen la fermentación de la masa; los productos resultantes se llaman generalmente “panes de masa ácida” debido a su alto contenido en los ácidos láctico y acético debidos al crecimiento bacteriano (De Vuyst et al., 2009), y se definen por ser una mezcla de la harina del cereal con agua, donde se produce la fermentación espontánea por, principalmente, levaduras y BAL. Las bacterias que con mayor frecuencia se aíslan de las fermentaciones de cereales están representadas por especies de BAL, concretamente por los géneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, y *Weissella* (De Vuyst et al., 2009; Guyot, 2010; Moroni et al., 2011).

Las fermentaciones de masas ácidas mejoran la textura y el aroma del pan, retardan su endurecimiento y previenen de las alteraciones por hongos y bacterias (Arendt et al., 2007). Sin embargo, en la estabilidad de una masa ácida influyen otros factores aparte de la microbiota

endógena, entre los que se encuentran las actividades metabólicas, tanto de los microorganismos como de la propia harina, y los parámetros tecnológicos del proceso, como la temperatura de fermentación y de almacenamiento, el tiempo de fermentación, el pH y la hidratación de la masa (Gobbetti et al., 2005). Como consecuencia de la heterogeneidad de los determinantes ecológicos, las masas ácidas difieren en su diversidad de especies, y las BAL y las levaduras más competitivas serán las que alcancen los niveles más altos en la microbiota. Durante las fermentaciones espontáneas de estas matrices, se ha detectado la presencia de los tres tipos metabólicos de BAL, descritos en el apartado 2.1., homofermentativas y heterofermentativas obligadas y heterofermentativas facultativas. Como se ha comentado más arriba, para conseguir un producto más estable a partir de fermentaciones espontáneas, se utilizan masas madre como inóculo para las siguientes masas, adicionándose más agua y harina, lo que normalmente resulta en la prevalencia de BAL heterofermentativas obligadas, como *Lb. sanfranciscensis* y *Lb. pontis* (De Vuyst y Neysens, 2005). La dominación de las BAL heterofermentativas se debe a su metabolismo especialmente adaptado a los carbohidratos. Por ejemplo, la maltosa, una fuente de energía muy abundante en las masas, se metaboliza mediante la vía de la maltosa fosforilasa, que deriva en la vía de las pentosas fosfato en las especies de BAL con este tipo de metabolismo (Gänzle et al., 2007).

4.2 Productos fermentados vegetales

Los vegetales perecederos y estacionales, como por ejemplo las verduras de hoja, los rábanos y los pepinos, se fermentan tradicionalmente en productos consumibles. Estas fermentaciones están principalmente dominadas por las especies de los géneros de BAL *Lactobacillus* y *Pediococcus*, seguidos de *Leuconostoc*, *Weissella*, *Tetragenococcus* y *Lactococcus* (Tamang et al., 2016). Existen trabajos en los que se ha estudiado el perfil microbiológico de las BAL en productos fermentados de vegetales, como son el *kimchi*, un alimento tradicional de Corea (Jung et al., 2011), o el chucrut, un producto de col fermentada de Alemania (Plengvidhya et al., 2004). Además, las BAL también constituyen las poblaciones nativas de muchos productos vegetales del Himalaya (Tamang y Tamang, 2005), así como productos fermentados de bambú de India y Nepal (Sonar y Halami, 2014).

4.3 Tubérculos y raíces fermentados

El producto fermentado más estudiado dentro de este grupo es la raíz de mandioca (*Manihot esculenta*), que se fermenta tradicionalmente en muchos países africanos, adquiriendo distintos nombres. Comúnmente, la etapa inicial de la fermentación está dominada por *Corynebacterium*

manihot (Oyewole et al., 2004) pero también se da una sucesión de especies de BAL, entre las que se encuentran *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. pentosus* y *Lb. plantarum* (Oguntoyinbo y Narbad, 2012).

4.4 Productos cárnicos fermentados

Existen dos categorías de productos cárnicos fermentados, aquellos elaborados de piezas enteras de carne o de cortes de ésta, como la carne desecada, y aquellos producidos por el corte o triturado de la carne, llamados generalmente salchichas (Adams, 2010). Los productos cárnicos tradicionales fermentados están bien documentados, como son las salchichas fermentadas y el salami (Toldra, 2007) de Europa, la carne desecada de América y África (Baruzzi et al., 2006), *nham* de Tailandia (Chokesajjawatee et al., 2009), y *nem chua* de Vietnam (Nguyen et al., 2013).

Los principales grupos microbianos implicados en la fermentación de la carne son las BAL (Cocolin et al., 2011; Nguyen et al., 2013) que crecen rápidamente y dominan el proceso de fermentación debido a las condiciones anaeróbicas de la pasta de carne y de la presencia de sal, así como por los nitratos y nitritos que son añadidos en el proceso de elaboración de estos productos. Las especies más comunes son *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* y, en menor proporción, *Lactobacillus plantarum*. Como segundo grupo más común, y en orden decreciente de prevalencia, se encuentran los pediococos, como *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidilactici*, y algunas especies de los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Weissella* y los enterococos, como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*.

También forman parte de la microbiota de los productos cárnicos fermentados los CNS que, a pesar de estar presentes en niveles mucho menores que las BAL y de ser muy poco competitivos frente a éstas, juegan un papel relevante en muchas de las reacciones deseables para estos productos, por lo que los miembros de la especie *Staphylococcus carnosus*, aun marginalmente presente en fermentaciones tradicionales de salchichas, es un cultivo iniciador recomendado y utilizado en Europa para la elaboración de estos productos (Leroy et al., 2006; Cocolin et al., 2011).

Dependiendo del producto, también se pueden encontrar algunas especies de levaduras en fermentaciones espontáneas, incluso dominando el proceso, como es el caso de *Debaryomyces hansenii* (Leroy et al., 2006). Por último, algunos hongos filamentosos pueden estar involucrados o utilizarse para el proceso de maduración de la carne (Lücke, 2015).

4.5 Productos lácteos fermentados

Los productos lácteos fermentados se pueden clasificar en dos grandes grupos en base a los microorganismos responsables del proceso. En un grupo se incluyen aquellos productos donde la fermentación láctica está dominada, o bien por especies de BAL termofílicas, como es el caso del yogur o la leche fermentada Búlgara, o por probióticos, como la leche fermentada con *Lb. acidophilus* y la leche con *Bifidus* spp., o bien por BAL mesofílicas, como las demás leches tradicionales fermentadas por BAL. En el otro grupo se incluyen los productos donde ocurre una fermentación “fúngica-láctica”, debido a que tanto las BAL como las levaduras son las responsables del proceso de producción, formando un consorcio en el alimento; en este grupo están las llamadas leches alcohólicas, como el kéfir o el *koumiss*, y las “leches mohosas”, como el *villi* (Mayo et al., 2010).

Dentro de la gran diversidad de productos lácteos fermentados cabe destacar los yogures, que son los más extendidos y consumidos a nivel mundial, y entre los cuales también existe mucha variedad en función del tipo de leche, el nivel de grasa, la adición de sabores, frutas y otros ingredientes. En general, la producción de este alimento se basa en la fermentación de la leche por dos especies de BAL termofílicas, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (Tamime, 2003). Según la normativa, el uso de la palabra “yogur” implica que estas dos especies deben encontrarse como cultivos vivos en el producto. Aunque ambos son capaces de fermentar la leche por separado, al estar juntos, obtienen un beneficio común debido a que sus maquinarias metabólicas se complementan. Dicho mecanismo cooperativo resulta en un crecimiento bacteriano más alto, así como en la producción de ácido láctico y de aromas. *S. thermophilus*, en comparación con los lactobacilos, es débilmente proteolítico, por lo que su crecimiento depende en gran medida del suministro de aminoácidos y péptidos proporcionados a través de la actividad proteasa extracelular de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a partir de la caseína de la leche. A su vez, la producción por *S. thermophilus* de los ácidos fórmico, pirúvico y fólico, y CO₂, estimula el crecimiento de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Sieuwerts et al., 2008).

Por otra parte, los quesos y los productos relacionados que derivan de la fermentación de la leche, son de gran importancia nutricional y comercial en todo el mundo. En ellos se distingue entre dos tipos de cultivos iniciadores: los cultivos primarios, que son principalmente *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. helveticus*, *Leuconostoc* spp. y *Streptococcus thermophilus* para

participar en la acidificación (Parente y Cogan, 2004); y los cultivos secundarios, que se usan en la fabricación de queso e incluyen otros microorganismos a parte de las BAL, como por ejemplo *Brevibacterium linen*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium camemberti* y *P. roqueforti*, utilizándose para el desarrollo del sabor y la textura durante la maduración del queso (Quigley et al., 2011). En la leche fermentada también suelen estar presentes y en niveles elevados algunas BAL de la microbiota que no forman parte de los cultivos iniciadores (conocidas como NSLAB) e incluyen las especies *Enterococcus durans*, *E. faecium*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. salivarius* y, además, *Staphylococcus* spp. (Briggiler-Marcó et al., 2007).

5. Aplicaciones biotecnológicas de las BAL en alimentos funcionales

Como se ha mencionado anteriormente, el hecho de que las BAL lleven tanto tiempo relacionadas con la alimentación humana ha facilitado la catalogación de muchas de sus especies como GRAS por la FDA. Además, varias especies de BAL también están avaladas por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) al incluirse en la lista QPS (“Qualified Presumption of Safety”) (Leuschner et al., 2010). Las BAL, presentes de forma natural en una amplia variedad de matrices alimentarias, llevan a cabo la fermentación en las mismas debido a su alta versatilidad metabólica (Tamang et al., 2016; Väkeväinen et al., 2018). Esta característica propia de su fisiología lleva aparejada, en muchos casos, una alta capacidad biosintética y, por lo tanto, durante las fermentaciones puedan sintetizar exopolisacáridos (EPS), vitaminas, péptidos bioactivos o presentar actividades enzimáticas de interés biotecnológico, como son las amilasas o la actividad degradadora de fitatos. Estas capacidades confieren a las BAL un papel importante ya que son capaces de enriquecer el valor nutricional de los productos fermentados en los que se encuentren (Steinkraus, 2002; Farhad et al., 2010; Tamang, 2015; Väkeväinen et al., 2018). Además, junto a las biofidobacterias, las BAL son los microorganismos más estudiados en cuanto a sus propiedades probióticas; los probióticos están disponibles comercialmente como suplementos alimentarios, pero también pueden ser componentes de alimentos y bebidas

funcionales, principalmente productos lácteos (Shiby y Mishra, 2013). Aunque la mayoría de los probióticos están aislados de microbiota intestinal (Bove et al., 2012), existen BAL aisladas de otros orígenes, como por ejemplo de fermentaciones de quínoa y amaranto, que han demostrado poseer potencial probiótico (Vera-Pingitore et al., 2016).

5.1 Alimentos funcionales

La importancia de la alimentación en la salud humana es un hecho conocido desde prácticamente toda la historia de la humanidad, y ya en el siglo V a.C., Hipócrates decía “que tu medicina sea tu alimento, y el alimento tu medicina”. Ha sido a lo largo del siglo XX cuando más evidencias científicas han surgido en cuanto a la relación que existe entre la nutrición y la salud, debido a hallazgos como la asociación de algunas enfermedades a ciertas carencias nutricionales, así como que el exceso de algunos nutrientes y la falta de una dieta equilibrada también dan lugar al aumento de la incidencia de otro tipo de alteraciones alimentarias.

El siglo XXI está representado por varias de estas enfermedades, pudiendo coexistir en la misma zona geográfica, como es el caso de América Latina y el Caribe, en las que se afronta la morbilidad, la malnutrición y la obesidad, según reporta la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (2013). La malnutrición se define por la FAO como un estado fisiológico anormal que se debe a un consumo insuficiente, desequilibrado o excesivo de nutrientes. Esta enfermedad incluye alteraciones como la desnutrición y la hipernutrición, así como las carencias de micronutrientes. Además, cabe destacar que la malnutrición está relacionada sinérgicamente con las enfermedades infecciosas, siendo estas últimas la causa principal de morbilidad y mortalidad en niños de la mayoría de países de África, Asia y América Latina. Esta relación se convierte en un círculo vicioso, ya que las infecciones empeoran la malnutrición y ésta aumenta la gravedad de las enfermedades infecciosas (Guerrant et al., 2008; Black et al., 2010). Por su parte, la obesidad, causada por un exceso de alimentos hipercalóricos y por el aumento del sedentarismo, es un gran problema de salud pública en los países desarrollados, aunque también se da en países en vías de desarrollo.

Como consecuencia, en los últimos años ha surgido en todos estos países el interés por los alimentos que promueven la salud al reducir el riesgo de padecer enfermedades, los conocidos como “alimentos funcionales”. El país pionero fue Japón que, en los años 80, promovió el desarrollo de este tipo de productos para tratar de reducir costes sanitarios frente al envejecimiento de la población (Henry, 2010). Para introducir el uso del término “alimento

funcional”, la Comisión Europea elaboró un documento consenso en el que se recogía qué se consideraba como alimento funcional (Consensus Document, 1999). Desde entonces, el concepto ha ido evolucionando hasta llegar a la definición más reciente proporcionada por el Centro de Alimentos Funcionales (FFC), que define a los alimentos funcionales como “aquellos alimentos, naturales o procesados, que contienen compuestos biológicamente activos, conocidos o desconocidos, y que, en cantidades definidas, efectivas y no tóxicas, tienen un beneficio para la salud clínicamente probado y documentado, ya sea para la prevención o para el tratamiento de enfermedades crónicas” (Martirosyan y Singh, 2015).

La alta demanda de alimentos funcionales ha coincidido durante la última década con un aumento de las reacciones adversas a los alimentos (intolerancia alimentaria, mala absorción y alergias), aumento de las enfermedades no transmisibles relacionadas con la dieta (enfermedades cardiovasculares) y nuevos estilos de vida del consumidor (vegetarianismo, veganismo, etc.), lo que ha llevado a una demanda creciente de sustitutos de los productos lácteos (Zannini et al., 2012). Las bebidas fermentadas a base de cereales o de zumos de vegetales y frutas tienen un enorme potencial como alternativas de consumo. Además, existen varios ejemplos de este tipo de productos que actúan como vehículos para el suministro de compuestos funcionales, tales como antioxidantes, fibras dietéticas, minerales, probióticos y vitaminas (Waters et al., 2015).

5.2 Probióticos

El concepto de probiótico según lo definieron la FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2001 es *“live microorganisms when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host”*, es decir, “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del hospedador”. Recientemente, un nuevo comité de expertos reunidos por la ISAAP (“International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics”) ha revisado la definición del año 2001, aceptándola tras un cambio gramatical menor: *“live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host”* (Hill et al., 2014).

El origen de los microorganismos utilizados como probióticos es fundamentalmente humano. El tracto digestivo humano alberga varios ecosistemas microbianos, que cuentan con una gran variedad nichos ecológicos, difiriendo entre ellos según la ubicación en el tracto. Muchas de las especies de BAL, así como de bifidobacterias, normalmente forman parte de este ecosistema.

Introducción general

Las BAL que principalmente se pueden encontrar en el intestino humano pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* spp. Por su parte, las especies de *Bifidobacterium* son las que dominan como primeras colonizadoras en los recién nacidos, y continúan persistiendo, en niveles más bajos, en adultos. Esta predominancia explica por qué se han usado especialmente los lactobacilos y las bifidobacterias como los principales probióticos.

En la actualidad existe mucha literatura acerca de los efectos beneficiosos para la salud de los probióticos; sin embargo, la mayor evidencia clínica está vinculada a su uso para mejorar la salud intestinal (Sanders et al., 2013) y solo unas pocas cepas, principalmente de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, han sido evaluadas mediante estudios de intervención (Tojo et al., 2014). Uno de los campos donde los probióticos se muestran más eficaces es en el tratamiento y prevención de diarreas, tanto las agudas como las causadas por antibióticos. Para tratar las infecciones es necesario utilizar antibióticos, lo que a su vez también conduce a alteraciones en la microbiota puesto que actúan frente a los patógenos, pero también frente a microorganismos comensales. Por ello, se plantea el uso de probióticos en estados de infección para tratar de restaurar el equilibrio de la microbiota alterada por la presencia de patógenos (Reid et al., 2010). Los mecanismos por los cuales un probiótico puede contrarrestar la acción de patógenos son múltiples; entre otros, se encuentran la competición por la adhesión al epitelio intestinal y por nutrientes, o la producción de compuestos antimicrobianos, así como la estimulación del sistema inmune del hospedador reforzando la barrera intestinal o induciendo una respuesta inmune adaptativa (Gareau et al., 2010).

Los alimentos que contienen microorganismos probióticos constituyen el tipo de alimento funcional pionero en este campo y ocupan un amplio sector económico en el mercado mundial. El auge de los probióticos se debe fundamentalmente al empuje de ciertas industrias multinacionales del sector alimentario, siendo los productos lácteos el vehículo de administración más habitual, i.e. leche pasteurizada, helados, leches fermentadas, quesos y leche de fórmula para recién nacidos (Reid, 2015). Sin embargo, existe actualmente un aumento de la demanda de productos no-lácteos por parte del consumidor que está llevando a investigar alternativas, por ejemplo, matrices de cereales, zumos de frutas e incluso mezclas de ellos, para actuar como vehículos de los microorganismos beneficiosos (Elizaquível et al., 2011; Waters et al., 2015; Enujiugha y Badejo, 2017). Dentro de las BAL, la mayoría de microorganismos probióticos pertenecen a las especies *Lb. acidophilus*, *Lb. gasseri*, *Lb. helveticus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. (para)casei*, *Lb. reuteri*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* y *Lb. fermentum* (Tamime et al., 2005).

5.3 Actividades enzimáticas importantes en las BAL

La microbiota autóctona de productos fermentados se caracteriza por presentar diferentes actividades enzimáticas que son útiles en las aplicaciones biotecnológicas. En concreto, las BAL procedentes de masas ácidas con frecuencia presentan actividades esterasa, lipasa, proteasa, amilasa o fitasa (Collar et al., 1992; Anastasio et al., 2010).

La actividad amilolítica no es común entre las BAL, pero en algunos estudios se ha reportado su aislamiento de matrices amiláceas fermentadas representando alrededor del 10% de la población total de BAL (Guyot, 2010). Esta propiedad es particularmente importante en aquellos procesos tradicionales que no incluyen un paso de pregelatinización (cocción) antes de la fermentación y que, por lo tanto, la concentración de azúcares libres en los cereales, es decir, mono y disacáridos accesibles, se encuentra en niveles muy bajos (Díaz-Ruiz et al., 2003; Tou et al., 2006). Dado que el almidón es una de las principales reservas de carbohidratos en los cereales, también es una de las fuentes de energía y de carbono más importante para apoyar la fermentación láctica tras su hidrólisis, lo que lleva a la hipótesis de que las BAL amilolíticas tendrían un papel muy relevante en la microbiota haciendo disponibles los sustratos necesarios para su crecimiento y el de las BAL no amilolíticas (Guyot, 2012).

Por su parte, las fitasas se encuentran naturalmente en las plantas, animales, bacterias, hongos, levaduras y protozoos, y son muy diferentes unas de las otras en cuanto a su estructura, mecanismo, temperatura y pH de acción. Su función específica es la degradación del fitato, un compuesto con muchas propiedades beneficiosas, ya que tiene poder antioxidante y anticancerígeno, pero que, a su vez, se describe como antinutriente (Gupta et al., 2013). Este carácter de antinutriente se debe a su afinidad por la unión a metales, proteínas y algunos oligoelementos, lo que provoca en los animales que no sintetizan fitasas, como los humanos, la imposibilidad de absorción de ciertos nutrientes unidos al fitato en el intestino (Bohn et al., 2008). Existen varias estrategias para la disminución de fitatos en alimentos como los cereales o las legumbres en los que es frecuente su presencia, siendo las más comunes el procesado de los alimentos, la activación de fitasas endógenas en semillas y las fermentaciones con microorganismos productores de fitasas. Mientras que las dos primeras o bien suponen la pérdida de otros componentes interesantes, como la fibra y algunos minerales, o son procesos lentos, respectivamente, la alternativa basada en el uso de microorganismos que poseen actividad degradadora de fitatos es muy prometedora, especialmente aquellos que son de grado alimentario como las BAL. La presencia de actividad específica fitasa se ha demostrado en

bifidobacterias; de hecho, García-Mantrana et al., (2014) describieron la disminución del contenido en fitato en productos de cereales con amaranto mediante el uso de fitasas provenientes de *Bifidobacterium longum* spp. *infantis* y *B. pseudocatenulatum*. Sin embargo, su dificultad de crecimiento no las hace buenas candidatas para su aplicación directa en alimentos. En BAL no se han descrito enzimas con actividad específica fitasa, sin embargo, sí presentan actividad degradadora de fitatos no específica, llevada a cabo por fosfatasas (Haros et al., 2008), siendo también efectivas eliminando los grupos fosfato del fitato por hidrólisis; esta actividad se ha observado en varias cepas de BAL aisladas de quínoa (Carrizo et al., 2016), queso (Sümmen et al., 2012), distintos tipos de masas (De Angelis et al., 2003; Anastasio et al., 2010) y alimentos tradicionales fermentados a base de maíz (Väkeväinen et al., 2018).

5.4 Producción de vitaminas en las BAL y su aplicación en alimentos

Las vitaminas son micronutrientes que se clasifican en dos grupos, las liposolubles y las hidrosolubles. Generalmente, las vitaminas hidrosolubles actúan como coenzimas, siendo esenciales para el metabolismo de los organismos vivos. Los seres humanos no pueden sintetizar las vitaminas por lo que deben obtenerlas de la dieta o por la microbiota intestinal. En concreto, las vitaminas del grupo B están normalmente presentes en distintos alimentos crudos pero pueden ser fácilmente destruidas durante su cocinado o procesado. Como se puede observar en la Tabla 2-1, los cereales son una fuente importante de vitaminas del grupo B, encontrándose en concentración más alta en las capas externas de los cereales (Capozzi et al., 2012) y se pierden fácilmente tras el molido, procesado y cocinado de las partes aprovechables de los cereales. Por ello, los programas de fortificación de este tipo de alimentos con vitaminas son necesarios para contribuir al aporte diario recomendado de vitaminas en la dieta de ciertos grupos de población. Los procesos biotecnológicos de bio-fortificación en vitaminas de los alimentos utilizando microorganismos productores son más respetuosos con el medio ambiente que la adición tras su síntesis, además de ser una alternativa atractiva a la síntesis química de vitaminas, ya que incluyen el uso de fuentes renovables y el resultado en cuanto a la calidad del producto es igual o superior (Capozzi et al., 2011b). Esta estrategia es una forma natural y económicamente viable de obtener productos alimenticios enriquecidos, que debe de permitir la producción de alimentos con mayores concentraciones de vitaminas y sin efectos secundarios indeseables, como es el caso del enmascaramiento de la deficiencia en vitamina B12 que puede producir la fortificación con ácido fólico, lo cual no ocurre con los folatos naturales, tales como el 5-metil-tetrahidrofolato, presentes en los alimentos y producidos por los microorganismos (LeBlanc et al., 2011).

Algunas BAL de grado alimentario son capaces de sintetizar vitaminas del grupo B y, junto con su adaptabilidad a los procesos fermentativos y su capacidad biosintética unida a la alta versatilidad metabólica, las convierten en buenas candidatas para el desarrollo de nuevas bebidas o productos funcionales bio-fortificados con vitaminas. Este concepto ha fomentado la búsqueda de BAL con propiedades funcionales y tecnológicamente interesantes en diversos nichos ecológicos, para su potencial incorporación a alimentos funcionales. De hecho, con respecto a las vitaminas del grupo B, se ha estudiado en las especies de BAL relevantes en la industria alimentaria, como *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus*, demostrándose su capacidad de sintetizar ácido fólico (vitamina B9), así como de aumentar naturalmente su contenido en el producto final, cuando se utilizan como cultivos iniciadores en la elaboración de yogur (Laiño et al., 2013). En el caso de la riboflavina (vitamina B2), muchos estudios se han centrado en los genes implicados en su biosíntesis para aumentar el contenido de la vitamina en productos fermentados lácteos y de origen vegetal mediante la utilización de cepas de BAL superproductoras (Burgess et al., 2006; Capozzi et al., 2011b). La síntesis de cobalamina (vitamina B12) ha sido demostrada por Taranto et al. (2003) en una cepa probiótica de *Lactobacillus reuteri*. Otra fuente de BAL capaces de producir vitaminas del grupo B que está siendo explorada en los últimos años son los alimentos fermentados tradicionales (Carrizo et al., 2016; Pacheco Da Silva et al., 2016).

La selección y explotación adecuada de las BAL productoras de vitaminas es una buena estrategia para generar nuevos alimentos fermentados con mayores propiedades nutricionales. Con este objetivo, este grupo bacteriano ha captado la atención de la comunidad científica impulsando el desarrollo de diferentes estrategias para lograr la superproducción de vitaminas por cepas de BAL, utilizando o no ingeniería metabólica.

Cabe destacar el uso de la roseoflavina para seleccionar mutantes espontáneos de superproductores de riboflavina. Tratándose de organismos no modificados genéticamente (no OMG) serían adecuados para su aplicación en alimentos aumentando el contenido de la vitamina *in situ* (Burgess et al. 2006). Este hecho explicaría el aumento de trabajos publicados en los últimos años sobre producción de vitaminas en BAL para su aplicación en productos funcionales fermentados (Capozzi et al., 2011b; Laiño et al., 2013; Juárez del Valle et al., 2014; Russo et al., 2014; Pacheco Da Silva et al., 2016; Albuquerque et al., 2017).

Introducción general

La producción de vitaminas en BAL difiere considerablemente entre especies, siendo en la mayoría de los casos un rasgo dependiente de cepa. En este contexto, el análisis comparativo de los genomas de distintas cepas y especies de BAL revela que, cuando se observa un fenotipo deficiente en la producción de la vitamina, generalmente está relacionado con alguna interrupción en la ruta de la biosíntesis de la misma a nivel genético (Capozzi et al., 2012). Por tanto, el estudio genómico centrado en los genes, los operones y las regiones reguladoras implicados en la producción de vitaminas es crucial para seleccionar buenos candidatos productores de vitaminas y también para desarrollar estrategias que aumenten su contenido en el producto final.

Tabla 2-I. Contenido en vitaminas del grupo B de granos no procesados de cereales (en 100 g)

Vitaminas (mg)	Trigo	Maíz	Arroz	Cebada	Sorgo	Avena	Centeno
B1	0,38	0,39	0,40	0,65	0,24	0,76	0,32
B2	0,12	0,20	0,09	0,29	0,14	0,14	0,25
B3	5,47	3,63	5,09	4,60	2,92	0,96	4,27
B6	0,30	0,62	0,51	0,32	n.d.	0,12	0,29
Folatos	38,2	19,0	19,5	19,0	n.d.	56,0	59,9
Ác. pantoténico	0,95	0,42	0,28	0,28	n.d.	1,35	1,46

No se han descrito cantidades detectables de vitamina B12 (Capozzi et al., 2012)

n.d. datos no disponibles

5.5 Producción de EPS en las BAL

Los biopolímeros de azúcares se llaman polisacáridos y pueden producirlos muchos organismos entre los que se incluyen las plantas, las algas, las levaduras, los hongos y las bacterias. Debido a que estos polímeros sirven como protección frente a algunas condiciones de estrés, juegan un papel muy importante durante la adaptación al medio ambiente (Caggianiello et al., 2016). Las bacterias pueden sintetizar polisacáridos intracelulares que actúan como polisacáridos de almacenamiento citoplasmático (glucógeno o almidón bacteriano), así como polisacáridos extracelulares, que pueden asociarse a los polisacáridos capsulares de la superficie celular (CPS, como el antígeno O K30) o liberarse al medio, como es el caso de los EPS (Zeidan et al., 2017). Los EPS son polisacáridos de cadena larga, compuestos por unidades repetitivas de azúcares (glucosa, galactosa, manosa, fructosa, ramnosa) lineales o ramificadas, o derivados de azúcares (N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina) en diferentes proporciones (Patel et al.,

2012), aunque también pueden incluir componentes que no son carbohidratos (Ibarburu et al., 2015). Concretamente, las BAL sintetizan una amplia variedad de EPS funcionales, algunos de los cuales se han utilizado en la producción de yogur, queso y productos lácteos, debido a que contribuyen a mejorar la reología y textura de estos alimentos (Zeidan et al., 2017). Los EPS producidos por BAL tienen además otras aplicaciones fuera de la industria alimentaria como compuestos de filtración en gel para columnas de cromatografía (Sephadex), sustitutos del plasma sanguíneo (Dextran 70), protección contra la actividad biliar y efectos prebióticos, entre otros (Torino et al., 2015; Caggianiello et al., 2016). También se ha demostrado que ejercen efectos beneficiosos en la salud humana, principalmente por sus actividades antitumorales, inmunomoduladoras y de adhesión en el intestino, características que proporcionan a los EPS un alto valor añadido a sus potenciales aplicaciones industriales (Ruas-Madiedo et al., 2006; Wang et al., 2014; Pérez-Ramos et al., 2017).

No obstante, en determinados procesos alimentarios la producción de EPS por BAL es un atributo negativo, asociado a la alteración del producto, por conferirle propiedades reológicas indeseables como es el caso de la sidra y del vino (Dueñas et al., 1995; Lonvaud-Funel, 1999).

5.6 Aspectos relacionados con la seguridad alimentaria de las BAL

Como se ha comentado anteriormente, muchas de las especies de BAL tienen el estatus GRAS según la FDA, y se incluyen en la lista QPS de la EFSA, en base al largo historial de consumo de alimentos fermentados en los que están presentes. No obstante, la detección de cepas de BAL resistentes a antibióticos ha llevado a proponerlas como posible reservorio de genes de resistencia que podrían transmitirse horizontalmente a patógenos a través de la cadena alimentaria (Devirgiliis et al., 2013). El aumento de resistencias a antibióticos es actualmente uno de los principales problemas de salud pública debido al incremento exponencial de las mismas en patógenos bacterianos humanos. De hecho, ya en 2014 el informe anual de la OMS reveló evidencias que relacionaban el uso de antibióticos en animales de explotación ganadera y la aparición de resistencias en los patógenos bacterianos. Esta situación ha ido empeorando y, a principios de 2017, la OMS publicó una lista de los patógenos resistentes a antibióticos que se habían priorizado por presentar un riesgo elevado para la salud humana. En consecuencia, recientemente la OMS ha publicado unas directrices encaminadas a la reducción del uso de antimicrobianos de importancia clínica en animales de granja para ayudar a preservar la efectividad de los mismos en los tratamientos humanos (Aidara-Kane et al., 2018). En la misma línea, EFSA ha elaborado una guía como soporte para la puesta en el mercado de nuevos

aditivos en alimentación animal que contengan microorganismos, o que han sido producidos mediante la fermentación por éstos. Dicha guía establece la caracterización de los microorganismos en cuanto a identificación taxonómica, sensibilidad a antibióticos, producción de antimicrobianos, producción de metabolitos tóxicos (i.e. aminas biógenas), toxicidad y patogenicidad, y propone el análisis del genoma como herramienta de diagnóstico inequívoco (Guido et al., 2018).

En el caso de las BAL en alimentación humana, sólo se contemplan las especies utilizadas como cultivos iniciadores que se consideran ingredientes alimentarios en el reglamento de la Unión Europea. No obstante, se exige que los alimentos sean seguros y, por tanto, también los microorganismos que se encuentran en ellos (Laulund et al., 2017). Los niveles de resistencias a antibióticos y la presencia de genes transferibles se han estudiado con profundidad en muchas especies patógenas, pero no ocurre así con los microorganismos para aplicaciones alimentarias. El hecho de que, para estas cepas que se ingieren en grandes cantidades, sea crucial la ausencia de genes de resistencias a antibióticos transferibles en el intestino a microorganismos patógenos, ha promovido su consideración por parte de EFSA y se ha determinado la necesidad de que las nuevas cepas de BAL, con aplicaciones alimentarias, cumplan una serie de premisas. Por ello, a título orientativo, se siguen las directrices de EFSA (2012, 2018), resumidas en la Figura 1-I. Por una parte, se requiere la determinación fenotípica de la susceptibilidad a antibióticos clínicamente relevantes por parte de estas cepas de BAL. Para ello es necesaria una correcta identificación de la especie bacteriana del microorganismo a evaluar, ya que las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) frente a los antibióticos establecidos para cada especie de BAL deben ser inferiores a los valores de corte publicados para cada antibiótico (EFSA, 2012). La mayoría de cepas utilizadas en alimentación pertenecen a especies que pueden evaluarse mediante el método descrito en la ISO 10932:2010, en el que se incluye la determinación de susceptibilidad a antibióticos para las bifidobacterias y BAL. Por otra parte, en el caso de que se observe o bien un fenotipo de resistencia a antibióticos y/o, mediante el análisis genético, la presencia de genes de resistencia a antibióticos, el análisis genómico de la cepa en estudio es la mejor estrategia para investigar si el gen responsable de la resistencia observada es o no transferible, determinar su probabilidad de activación, y, en definitiva, concluir si se trata de una cepa segura para su uso en alimentación (EFSA, 2018).

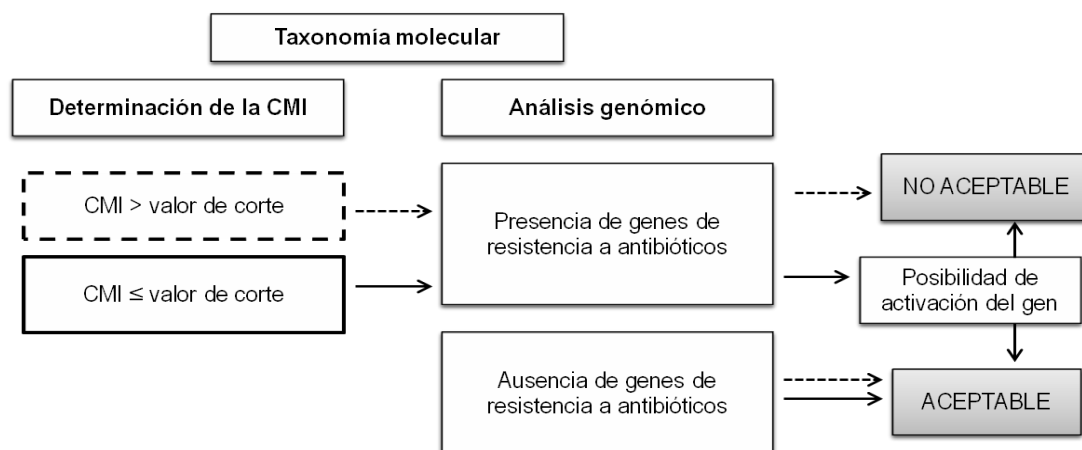


Fig. 1-I. Esquema para la determinación de resistencias a antibióticos en cepas bacterianas con aplicación alimentaria (adaptado de EFSA, 2018). (CMI: Concentración Mínima Inhibitoria). Las flechas con líneas discontinuas muestran las posibilidades ante una CMI mayor al valor de corte, mientras que las flechas con líneas continuas las posibilidades ante una CMI inferior o igual al valor de corte establecido.

OBJETIVOS

1. Identificar una colección de BAL aisladas de productos fermentados tradicionales procedentes de Latinoamérica: dos bebidas a base de maíz, *Chicha* del Noroeste de Argentina y *Atole* de México, y *Tocosh*, patatas fermentadas de la región central de los Andes peruanos.
2. Caracterizar biotecnológicamente los nuevos aislados de BAL determinando su capacidad para producir enzimas y vitaminas con interés en la industria de los alimentos funcionales.
3. Determinar las características de los nuevos aislados relacionadas con calidad y seguridad alimentaria: resistencia a antibióticos y producción de antimicrobianos.
4. Evaluar la capacidad tecnológica de las cepas seleccionadas considerando tanto la mejora en los aspectos tecnológicos y nutricionales del alimento, como la calidad y seguridad alimentaria.
5. Diseñar un nuevo alimento modelo con base vegetal bio-fortificado que incluya una cepa final seleccionada superproductora de riboflavina.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1 Cepas microbianas utilizadas

En el presente trabajo se han estudiado 779 cepas de BAL aisladas de tres productos fermentados tradicionales de Latinoamérica: 393 cepas de dos producciones distintas de “chicha”, 147 de la producción “M” (Maimará) y 246 cepas de la producción “T” (Tumbaya) (Elizaquível et al., 2015), 152 cepas de “tocosh” (Jiménez, Yépez et al., 2018) y 234 cepas de “atole” (Pérez-Cataluña et al., 2017).

Se incluyeron en el estudio 28 cepas de referencia suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España) que se utilizaron en los siguientes ensayos:

- Identificación de los aislados de BAL: *Enterococcus faecium* CECT 410^T, *Enterococcus gallinarum* CECT 970^T, *Enterococcus casseliflavus* CECT 969^T, *Enterococcus faecalis* CECT 481^T, *Lactobacillus brevis* CECT 4121^T, *Lactobacillus pentosus* CECT 4023^T, *Lactobacillus plantarum* CECT 748^T, CECT 6000, CECT 4674, CECT 4219, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CECT 219^T, *Lc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* CECT 912^T, *Leuconostoc lactis* CECT 4173^T y *Weissella viridescens* CECT 283^T.

- Determinación de la actividad amilolítica: *Lb. amylophilus* CECT 4133^T.

- Determinación de la actividad antimicrobiana: *Meyerozyma guilliermondii* CECT 1021 (sinónimo de *Pichia guilliermondii*), *Penicillium roqueforti* CECT 2905^{NT}, *Aspergillus oryzae* CECT 2094^{NT}, *Aspergillus niger* CECT 2807, *Aspergillus parasiticus* CECT 2681, *Penicillium expansum* CECT 2278, *Fusarium verticilloides* CECT 2987, *Escherichia coli* O157:H7 CECT 5947, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi CECT 4138 (referida como *Salmonella* Typhi de ahora en adelante) y *Listeria innocua* CECT 910^T.

Materiales y métodos

- Determinación de la resistencia a antibióticos: *Lb. plantarum* CECT 748^T se utilizó como control de las condiciones de crecimiento para asegurar la reproducibilidad y precisión del ensayo.

- Determinación de la producción de vitaminas del grupo B: para folatos se utilizó la cepa *Lb. rhamnosus* CECT 278^T y para riboflavina se utilizó la cepa equivalente *Lb. rhamnosus* CRL 932 (= CECT 278^T) proveniente de la colección del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA, San Miguel de Tucumán, Argentina).

1.2 Oligonucleótidos

La empresa Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EEUU) sintetizó y purificó los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del DNA. Se resuspendieron en agua ultrapura para obtener la concentración adecuada según las instrucciones del fabricante. El nombre, secuencia y características de los oligonucleótidos empleados en el presente trabajo se describen en la Tabla 1-M.

Tabla 1-M. Oligonucleótidos utilizados.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Utilización	T ^a hibr (°C)	Amplificado (pb)	Referencias
1387V	GCCTTGACACWCCGCC C	ISR para identificación	56	-	Chenoll et al., 2003
118R	GTTNCCCCATTCRGA				
M13	GAAACAGCTATGACCAT G	RAPD para identificación	45	-	Aznar y Chenoll, 2006
P2	GATCGGACGG	RAPD para identificación	36	-	Samaržija et al., 2002
P16	TCGCCAGCCA	RAPD para identificación	36	-	Samaržija et al., 2002
616Valt	AGAGTTTGATYMTGGCT CAG	Amplificación/se cuenciación RNAr 16S para identificación	56	1600	Chenoll et al., 2003
630R	CAKAAAGGAGGTGATCC				

Tabla 1-M. Cont.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Utilización	T ^a hibr (°C)	Amplificado (pb)	Referencias
planF	CCGTTTATGCGGAACACC TA	PCR específica <i>Lb. plantarum</i> / <i>Lb. pentosus</i> para identificación	60	318	Torriani et al., 2001
pentF	CAGTGGCGCGGTTGATAT C			218	
preV	TCGGGATTACCAAACATC AC				
Brevdir	CTTGCACTGATTTAACA	PCR específica <i>Lb. brevis</i> para identificación	40	1340	Guarneri et al., 2001
Brevrev	GGGCGGTGTGTACAAGG C				
LcmesS	CCAGTTGTAATGCGTTATT ACC	PCR específica <i>Lc. mesenteroides</i> para identificación	63	130	Elizaquível et al., 2008
LcmesA	CACAGCTTGTCTTATAG AAAA				
Efaecium F	GCAAGGCTTCTTAGAGA	PCR específica <i>E. faecium</i> para identificación	54	550	Dutka-Malen et al., 1995
Efaecium R	CATCGTGTAAGCTAACTT C				
CA1B	ACAGTTGAAGAATTATTAG CAGACTTTT	PCR específica <i>E. casseliflavus</i> para identificación	55	269	Layton et al., 2010
CA2	GCTAGTTTACCGTCTTTAA CG				
GA1	TACTTGCTGATTTTGATT CG	PCR específica <i>E. gallinarum</i> para identificación	55	190	Layton et al., 2010
GA2	TGAATTCTTCTTTGAAATC AG				
ribF	CTTCRGGGCAGGGTG	Detección operón <i>rib</i>	52	2300	Capozzi et al., 2011b
ribR	GGRAADABRTGNCCNGG				
ribA F	CAAGAACACGGGGTTGAT AC	Detección gen GTP ciclohidrolasa II	58	500-700	Juárez del Valle et al., 2014
ribA R	CCCTCCGTTAGTGTGAGT TG				
ribB F	TGTAGTGGTGATGCCTGA AA	Detección gen riboflavina sintetasa	58	500-700	Juárez del Valle et al., 2014
ribB R	CGTCAAACCTAACCCCATC AA				
ribC F	TCTTTGATGGTGTGCATC AG	Detección gen kinasa/adenil transferasa	58	500-700	Juárez del Valle et al., 2014
ribC R	CATTCAACCCGACAAGGT AA				

Tabla 1-M. Cont.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Utilización	Tª hibr. (°C)	Amplificado (pb)	Referencias
ribG F	GGTCAATTAGATCCCCATCC	Detección gen uracil transferasa	58	500-700	Juárez del Valle et al., 2014
ribG R	TGAAACTGTGACCGTAAGCA				
ribH F	AGATTCCACTGACGGTCAA	Detección gen 6,7-dimetil-8-ribitol-lumazina sintetasa	58	500-700	Juárez del Valle et al., 2014
ribH R	TCTAACAAACTGACCGCACA				
RFNFfm	GTATTGAGCAACCAGCG	Amplificación/se cuenciación región reguladora RFN	53	576	Russo et al., 2014
RFNR	TGGCCGTCTTTGACTA				

1.3 Medios de cultivo generales

1.3.1. MRS modificado (De Man et al. 1960)

Compuesto	Concentración (g/L)
Peptona bacteriológica	10
Extracto de carne	8
Extracto de levadura	4
Acetato sódico	5
Fosfato dipotásico	2
Citrato amónico	2
Tween 80	1
Sulfato de magnesio	2
Sulfato de manganeso	0,05

El pH se ajustó a 6,5. Las cepas se incubaron de 24 a 48 horas a 30 °C.

1.3.2. Caldo de soja y tripticaseína (TSB) (Conda, Madrid, Spain)

Compuesto	Concentración (g/L)
Digestión pancreática de caseína	17
Cloruro de sodio (NaCl)	5
Papaína digerida de soja	3
Glucosa	2,5
Fosfato dipotásico	2,5

Las cepas se incubaron de 24 a 48 horas a 37 °C.

1.3.3. Caldo Malta

Compuesto	Concentración (g/L)
Extracto de malta	20
Glucosa	20
Peptona micológica	1

La incubación de las cepas en este medio se realizó durante 7 días a 25 °C.

1.3.4. Caldo “Yeast Extract-Peptone- Dextrose” (YPD, Oxoid)

Compuesto	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	3
Extracto de malta	3
Peptona	5
Glucosa	10
Cloranfenicol	0,01

La temperatura de incubación en este medio fue de 25 °C durante 48 horas.

Todos los medios de cultivo generales se esterilizaron en el autoclave, durante 20 minutos a 121 °C. Para realizar cultivos en placa se añadió agar bacteriológico (Pronadisa, Madrid, España) al 1,5%, y al 0,7% para los ensayos en medio con agar semisólido.

1.4 Medios de cultivo para la caracterización biotecnológica

Para algunos ensayos de la caracterización biotecnológica y para los ensayos de tolerancia a estreses tecnológicos de las cepas de BAL estudiadas, se realizaron una serie de modificaciones

en el medio MRS descrito en el apartado (1.3.1.). En el caso de los ensayos de resistencia a etanol, el medio MRS se suplementó con 2%, 8%, 10% y 12% del mismo. En la determinación de la actividad amilolítica, la glucosa se sustituyó por almidón soluble a una concentración de 5 g/L. En la determinación de producción de dextranos, se sustituyó la glucosa por 20 g/L de sacarosa. En los ensayos de tolerancia a pH ácido, se ajustó el medio a pH 3 y 4. Para determinar la tolerancia a la presión osmótica, el MRS se suplementó con 2% y 4% de NaCl.

1.4.1 Medios de cultivo para el ensayo de la actividad degradadora de fitatos

Para el cribado de las cepas de BAL en la determinación de la actividad degradadora de fitatos se utilizó el medio Chalmers modificado (MCB), cuya composición es:

Compuesto	Concentración (g/L)
Peptona de soja	5
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Glucosa	20
Lactosa	20

El medio se utilizó tanto líquido como con 1,5% de agar para el ensayo en placa, y se ajustó a pH 6. Se suplementó con 1 g/L de fitato de sodio, y/o con 1 g/L de fitato de calcio (SIGMA, St. Louis, MO, EEUU) en el caso del medio sólido (CAF).

1.4.2 Medios de cultivo para la determinación de la producción de vitaminas

La producción de vitaminas del grupo B por parte de las BAL se estudió con dos medios comerciales: "Riboflavin Assay Medium" libre de riboflavina y "Folic Acid Casein Medium" libre de folatos, ambos de la empresa Difco (Sparks, MD, EEUU).

1.4.3 Medios de cultivo para la determinación de resistencias a antibióticos

En el estudio de las resistencias a antibióticos, las cepas de BAL se cultivaron en el medio estandarizado LSM, según el protocolo de la normativa correspondiente a "International Organization of Standardization" (ISO 10932:2010(E); IFD 223:2010(E)), consistente en la mezcla de medio ISO-Sensitest (ITS) al 90% (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y MRS al 10%. El pH se ajustó a 6,7 (Klare et al., 2007).

1.4.4 Medio químicamente definido (CDM)

Este medio se utilizó para el estudio del crecimiento de las cepas en distintas fuentes de carbono, incluyendo en cada caso glucosa, lactosa o sacarosa. También se utilizó en los experimentos para la obtención de mutantes superproductores de riboflavina, suprimiendo la vitamina de su formulación. La composición se muestra en la Tabla 2-M.

Tabla 2-M. Ingredientes del medio CDM (químicamente definido) (adaptado de Terrade et al., 2009). El medio se esterilizó en el autoclave durante 15 minutos a 121 °C, excepto los componentes indicados (*), los cuales se prepararon por separado a concentraciones 100X y se esterilizaron por filtración.

Compuesto	Concentración (g/L)
Glucosa	20
Tween 80	1
Acetato de sodio	5
Citrato de amonio	1
CuSO ₄ ·5 H ₂ O*	1.50·10 ⁻⁵
FeSO ₄ ·7 H ₂ O*	2·10 ⁻²
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O*	1.35·10 ⁻⁴
MnSO ₄ ·4 H ₂ O	0.1
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.1
K ₂ HPO ₄	1
CaCl ₂	0.44
Ácido 4-aminobenzoico	1·10 ⁻⁴
Biotina	2 10 ⁻³
Cloruro de colina*	2 10 ⁻³
Cianocobalamina*	1·10 ⁻⁴
Ácido fólico*	2 10 ⁻³
Ácido nicotínico*	2 10 ⁻³
Ca-D-pantotenato	2 10 ⁻³
Piridoxina HCl*	2 10 ⁻³
Riboflavina*	2 10 ⁻³
Tiamina HCl*	1 10 ⁻³

Tabla 2-M. Cont.

Compuesto	Concentración (g/L)
Adenina sulfato	1·10 ⁻²
Guanina HCl	1·10 ⁻²
Citosina	1·10 ⁻²
Timina	1·10 ⁻²
Uracilo	1·10 ⁻²
Xantina	5·10 ⁻³
L-Alanina	0.2
L-Arginina	0.75
L-Asparagina	0.15
Ácido L-aspártico	0.35
L-Cisteína*	0.2
Ácido L-glutámico*	0.5
L-Glutamina*	0.2
L-Glicina	0.5
L-Histidina	0.5
L-Isoleucina	0.2
L-Leucina	0.2
L-Lisina HCl	0.25
L-Metionina	0.15
L-Fenilalanina	0.2
L-Prolina	0.5
L-Serina	0.4
L-Treonina	0.35
L-Triptófano*	0.2
L-Tirosina	0.2
L-Valina	0.2

1.5 Soluciones de reactivos y otros materiales utilizados

1.5.1. Reactivos para la purificación y electroforesis del DNA

Para la extracción y purificación del DNA: lisozima (50 mg/mL), reactivo de GES (tiocinato de guanidino 5 M, EDTA disódico 0,1 M y sarcosil al 30%), acetato de amonio (7,5 M), isopropanol puro, cloroformo isoamílico en una proporción 24:1 y etanol al 70%.

Para la electroforesis de DNA: tampón TAE (Tris Base 20 mM pH 8,3, CH₃COOH 10 mM y EDTA 0,5 mM) al 0,5x.

Como marcador de peso molecular se utilizó el GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) que consta de 14 fragmentos de DNA individuales de tamaños en pares de bases (pb): 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100.

Como tampón de carga 6X Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) que está compuesto por 10mM Tris-ácido clorhídrico (HCl) (pH 7,6), azul de bromofenol al 0,03%, cianol xileno al 0,03%, glicerol al 60% y 60mM de EDTA.

1.5.2 Reactivos para la determinación de la actividad amilolítica

La solución de lugol (yodo-yoduro al 4%) para el revelado de la degradación del almidón.

1.5.3 Reactivos para la determinación de la actividad degradadora de fitatos

- Cloruro de cobalto al 2%, para el revelado de las placas de CAF.
- Tampón acetato de sodio (AcNa) 0.2M, pH5, para obtener el extracto celular.
- Solución de tricloroacético (TCA) al 20%, para la reacción enzimática.
- Reactivo de color (RC) que se compone de 4 volúmenes de FeSO₄ 2,7% y 1 volumen de NH₄Mo preparado en ácido sulfúrico, para la reacción enzimática.
- K₂HPO₄ a diferentes concentraciones (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 50 µg/mL) para la curva patrón de fósforo inorgánico (Pi).
- Reactivo de Bradford (VWR, Barcelona, Spain) preparado en agua a una concentración del 20%, para determinar la concentración de proteína total en las muestras.
- Soluciones de seroalbúmina bovina (0,0625; 0,125; 0,5 mg/mL), para la curva patrón de proteína.

1.5.4 Reactivos para los ensayos de producción de vitaminas del grupo B

Para la determinación de folatos, el tampón PB, o tampón fosfato 0,1 M, consiste en la mezcla de dos soluciones, una $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M y la segunda $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2 M. La proporción utilizada de cada una determina el valor de pH 6,8 en este caso. Se suplementó con ácido ascórbico (SIGMA) a una concentración del 1,5%.

Las curvas patrón de las vitaminas se prepararon a partir de ácido fólico comercial ("HPLC grade Folic Acid", SIGMA, St. Louis, MO, EEUU) y riboflavina comercial (Fluka, Biochemika, Alemania).

1.5.5 Reactivos para la determinación de las resistencias a antibióticos

Los antibióticos utilizados pertenecen a la casa SIGMA (St. Louis, MO, EEUU). Se prepararon todos a una concentración de 5120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se almacenaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso. A partir de ésta, se hicieron las diluciones pertinentes para obtener las concentraciones requeridas. Ampicilina, vancomicina, gentamicina, estreptomina y kanamicina se disolvieron en agua miliQ estéril, mientras que cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina y clindamicina se prepararon en etanol al 95% (v/v).

1.5.6 Reactivos para los ensayos de actividades antimicrobianas

Los solventes utilizados para la extracción QuEChERS y para el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fueron: etil acetato (EA) y acetonitrilo (ACN), el agente secante sulfato de magnesio (MgSO_4), el carbono 18 (C18), la amina primaria-secundaria (APS) y la pancreatina, que también provienen de Sigma-Aldrich (Dublin, Ireland). El ácido fórmico (99%) de Fluka (Alemania). La solución de extracción (SE) contenía 1% de ácido fórmico, 0,4% de MgSO_4 y 0,1% de NaCl en 10 mL de EA. Para filtrar los solventes cromatográficos se utilizó un filtro de celulosa de 0,22 μm (Scharlau, Barcelona, España). Para identificación y caracterización de los compuestos antifúngicos producidos por las cepas de BAL se utilizaron una serie de compuestos de referencia. De la casa Sigma-Aldrich (Dublin, Ireland) se obtuvieron: ácido propanoico 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil); ácido sinápico; 2-Deoxicitidina; Ciclo (L-His-L-Pro); Ciclo (L-Tyr-L Pro); ácido fenilpirúvico; ácido cis-Caftárico; ácido protocatechuico hexósido; ácido cafeico derivativo; ácido hidroxicinámico derivativo (ácido p-cumárico); quercetin pentósido; ácido quínico derivativo; cafeoilhexosa-deoxihexósido y ácido 3,5-Di-O-cafeoilquinico. El ácido feniláctico de la casa BaChem (Weil am Rhein, Alemania). Todos los analitos tenían una pureza del 95%.

1.5.7 Reactivos para la obtención de mutantes superproductores de riboflavina

Se utilizaron las concentraciones crecientes del agente químico roseoflavina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU), 10 mg/L, 50 mg/L and 100 mg/L para la obtención de mutantes resistentes.

1.5.8 Reactivos para la extracción de la riboflavina de matriz alimentaria

La solución enzimática para el tratamiento de las muestras alimentarias en el proceso de extracción de la riboflavina estaba compuesta por:

- 420 unidades de α -amilasa
- 12 unidades de papaína
- 22 unidades de fosfatasa ácida
- 0,1% de glutatión, todos adquiridos de la casa Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EEUU).

1.5.9 Matrices alimentarias y cultivos iniciadores comerciales

Para los ensayos preliminares de crecimiento de las cepas de BAL en matrices alimentarias vegetales se utilizaron bebidas comerciales de soja y avena “YoSoy” (Liquats Vegetals, Girona, España). No presentan azúcares añadidos y la información nutricional se presenta en la Tabla 3-M.

Tabla 3-M. Información nutricional de las bebidas comerciales de avena y soja.

	Avena	Soja
Grasas saturadas	0,2%	0,3%
Grasas insaturadas	0,3%	0,4%
Grasas poliinsaturadas	0,3%	1,1%
Azúcares asimilables	5,4%	0,6%
Fibra alimentaria	0,4%	0,5%
Proteína	1,4%	3,6%
Sal	0,04%	0,06%
Betaglucanos	0,3%	-

Para la elaboración de los productos “tipo kéfir” basados en cereales se utilizaron harinas de avena, cebada y maíz (Molino Rosetto SpA, Padova, Italia) como materias primas para las fermentaciones.

Los microorganismos encargados de realizar la fermentación fueron dos cultivos iniciadores comerciales “Kefir fai da te” (BioNova snc, Villanova sull’Arda, Italia), referidos de ahora en adelante como “estárter de kéfir de agua” y “estárter de kéfir de leche”. Según el fabricante, constan de microorganismos característicos de los granos de kéfir como son BAL de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*, levaduras *Saccharomyces* spp., y bacterias acéticas del género *Acetobacter*.

2. Métodos

2.1. Condiciones de cultivo y de conservación de las cepas

Todas las cepas de BAL se cultivaron rutinariamente en MRS a 30 °C, excepto *Lb. rhamnosus* que se incubó a 37 °C, 24-48 horas. En el caso de los patógenos bacterianos transmisibles por alimentos, se cultivaban en TSB a 37 °C durante 24 horas. La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se realizó preparando suspensiones en medio de cultivo diluido al 10% a partir de cultivos crecidos en placa. A continuación, se les añadió glicerol a una concentración final del 20% y se guardaron a – 20 °C.

Los hongos utilizados se cultivaron en medio Malta a 25 °C. En el caso de la levadura *M. guilliermondii*, el tiempo de incubación fue de 48 horas, mientras que los hongos filamentosos se incubaron hasta observar la esporulación (de 5 a 7 días). La conservación de las cepas fúngicas se realizó también a – 20 °C, en un 10% del medio de cultivo suplementado con glicerol al 15%.

2.2. Identificación de las BAL

En el presente trabajo se realizó parte de la identificación de los aislados provenientes de chicha y de tocosh, utilizando varios cebadores universales. La identificación se realizó mediante

técnicas moleculares basadas en amplificación por PCR: perfiles ISR, perfiles RAPD, secuenciación del gen del RNAr 16S y PCR específica de especie.

2.2.1. Extracción, cuantificación y amplificación del DNA

La extracción del DNA de las cepas de BAL se realizó siguiendo el método descrito por Pitcher et al. (1989). A partir de cultivos crecidos en medio sólido MRS, se recuperó una porción del tamaño de un grano de arroz que se resuspendió en tampón de lisis con lizozima y se incubó durante un mínimo de 30 min a 37 °C para la ruptura de la pared celular. A continuación, se lisaron las células añadiendo 0,5 mL de reactivo de GES e incubando a temperatura ambiente durante 30 min. Para la precipitación química del DNA, se añadieron 0,25 mL de acetato de amonio y la mezcla se mantuvo en hielo durante al menos 10 min. Para arrastrar los restos celulares, se añadieron 0,5 mL de cloroformo isoamílico y se agitó hasta conseguir la emulsión de las dos fases. La mezcla se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min y se añadió isopropanol frío (0,54 volúmenes) a la fase acuosa para recuperar el precipitado de DNA, que posteriormente se lavó con etanol al 70%, tres veces. Finalmente, el DNA se secó utilizando un "Speedvac" y se resuspendió en agua ultrapura.

La calidad y cuantificación del DNA extraído se determinaron midiendo la absorbancia de la solución a $\lambda = 260$ nm en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), para poder realizar las diluciones pertinentes del DNA. Las soluciones de DNA obtenidas se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Todas las amplificaciones de DNA por PCR realizadas con el objetivo de la identificación de los aislados de BAL se realizaron en un volumen final de reacción de 50 μ L, empleando como molde 200 ng de DNA genómico, con una concentración final de los componentes de la reacción de: 100 μ M de los cuatro dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), tampón 1X para la polimerasa, 0,5 μ M de cada oligonucleótido y 1,25 U de DNA polimerasa DreamTaq (Thermo Fisher Scientific).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el termociclador GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, Norwalk, CT, EEUU).

2.2.2 Perfiles electroforéticos obtenidos por amplificación de DNA (ISR, RAPD)

Las características de los cebadores utilizados para la amplificación y obtención de los perfiles ISR y de RAPD se describen en la Tabla 1-M. Las condiciones de reacción para dichas amplificaciones fueron:

- Para la ISR: un ciclo de 5 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 56 °C y 45 s a 72 °C, y un ciclo final de 10 min a 72 °C.
- Para el RAPD con el cebador M13: un ciclo de 5 min a 94 °C, 5 min a 40 °C y 5 min a 72 °C, seguido de 33 ciclos de 20 s a 94 °C, 30 s a 45 °C y 45 s a 72 °C, y un ciclo final de 10 min a 72 °C.
- Para los RAPD con los cebadores P2 y P16: un ciclo de 5 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 36 °C, 60 s a 72 °C y un ciclo final de 7 min a 72 °C.

2.2.3 Amplificación, secuenciación y análisis de secuencias del gen de RNAr 16S

Se amplificó el gen completo del RNAr 16S utilizando los cebadores indicados en la Tabla 1-M. Las condiciones de PCR fueron las mismas que para la obtención de los perfiles ISR. A continuación, los fragmentos de DNA amplificados se secuenciaron en el Servicio Central de Soporte Experimental (SCSIE) de la Universitat de València (España) y las secuencias obtenidas se compararon mediante la herramienta RDP (“Ribosomal Database Project” <http://rdp.cme.msu.edu/>) para la identificación de las cepas a nivel de especie.

2.2.4 Amplificación por PCR con cebadores específicos de especie

Se utilizaron los cebadores indicados en la Tabla 1-M y las condiciones para las reacciones de amplificación fueron:

- Para la distinción de *Lb. plantarum*/*Lb. pentosus* se realizó una PCR múltiple con un ciclo de 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 30 s a 94 °C 10 s a 56 °C y 30 s a 72 °C, con un ciclo final de 5 min a 72 °C.
- Para *Lb. brevis*: un ciclo de 2 min a 94 °C, 25 ciclos de 1 min a 94 °C for, 1 min a 40 °C y 1 min a 72 °C, y un ciclo final de 10 min a 72 °C.

- Para *E. faecium*: un ciclo de 2 min a 94 °C, 30 ciclos con 1 min a 94 °C, 1 min a 54 °C, 1 min a 72 °C, y un ciclo final de 10 min a 72 °C.

- Para la distinción de *E. casseliflavus*/ *E. gallinarum* se realizó una PCR múltiple con un ciclo inicial de 4 min a 95 °C, 30 ciclos con 30 s a 95°C 1 min a 55 °C, y un ciclo de final de 1 min a 72 °C.

- Para *Lc. mesenteroides*: un ciclo de 5min a 94 °C, 35 ciclos con 30 s a 94 °C, 45 s a 63 °C y 45 s a 72 °C, con un ciclo final de 10 min a 72 °C.

2.2.5 Electroforesis de DNA

Para las comprobaciones rutinarias de todas las PCR, alícuotas de los productos de amplificación suplementados con tampón de carga que incluía el agente de tinción del DNA, Gel Red Nucleic Acid Gel Stain® (Biotium Inc., Hayward, CA, EEUU) al 1X, y se sometieron a electroforesis a un voltaje de 100 V durante 30 min en geles de agarosa a una concentración del 1,5 %, utilizando tampón TAE 0,5X. En cambio, a la hora de realizar las electroforesis para obtener las imágenes que se utilizarían en el análisis e identificación de los aislados, los amplificadores de ISR se sometieron a un voltaje constante de 80 V durante 105 min con una concentración del gel de agarosa del 2,5 %, y las electroforesis de los productos de RAPD se llevaron a cabo a un voltaje de 80 V durante 90 min en un gel de agarosa a una concentración del 1,8 %. En ambos casos, se realizaron en tampón TAE 1X y el Gel Red para la tinción del DNA se añadió a una concentración de 0,01% a la solución de agarosa antes de que solidificase.

Tras las electroforesis, los geles se revelaron bajo luz UV y las imágenes obtenidas se digitalizaron mediante una cámara de vídeo (Gelprinter Plus, TDI, Madrid, España), y se guardaron como archivos TIFF.

2.2.6. Análisis bioinformático de los perfiles electroforéticos

Las imágenes de electroforesis digitalizadas se normalizaron, analizaron y combinaron utilizando el programa BioNumerics 4.61 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Para normalizar los patrones de bandas obtenidos, se incluyeron marcadores de peso molecular cada siete muestras. Los niveles de similitud por pares del perfil de bandeo electroforético se calcularon mediante el coeficiente de Jaccard para los patrones de ISR y para los perfiles de RAPD se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson, que proporciona la similitud basada en las curvas de densitometría. Los

datos obtenidos se agruparon utilizando el algoritmo UPGMA ("Unweighted Pair Group Method with Arithmetic"). La identificación de los perfiles obtenidos de cada cepa se llevó a cabo con la ayuda del mismo programa, mediante la comparación de los mismos con una base de datos generada previamente (IATA-UVEG) que contiene perfiles de ISR y RAPD correspondientes a 132 cepas de BAL de referencia (Chenoll et al., 2007).

2.3 Caracterización biotecnológica

Para la selección de cepas con interés biotecnológico se investigaron la capacidad de producir enzimas con interés industrial, vitaminas del grupo B y EPS.

2.3.1. Actividad amilolítica

De acuerdo con el protocolo descrito por Díaz-Ruiz et al. (2003), la capacidad de las cepas de BAL para degradar el almidón se realizó con cultivos los activos tras su crecimiento en medio MRS durante 24 h. Alícuotas de 5 μ L del cultivo se inocularon en placas de MRS-almidón y se incubaron a 30 °C durante 48 h. La actividad amilolítica se reveló al verter sobre el cultivo crecido la solución de lugol y observar una decoloración del medio alrededor del mismo. La cepa *Lb. amylophilus* CECT 4133^T se utilizó como control positivo con actividad amilolítica.

2.3.2. Actividad degradadora de fitatos

Se realizó en dos pasos, en primer lugar se determinó la capacidad de degradación de fitatos siguiendo el procedimiento descrito por Anastasio et al. (2010) y, a continuación, se cuantificó la producción de las cepas que resultaron positivas.

a) Capacidad de degradación de fitatos:

Para ello, se activaron las cepas en caldo MRS durante 24 h y se realizaron dos pases en el medio MCB. A continuación, el cultivo se ajustó previamente a una DO de 0,5 a $\lambda = 600$ nm y se sembraron 5 μ L de cada cepa en placas de CAF. Tras 4 días de incubación a 30 °C, se revelaron las placas observando si aparecía un halo translúcido. Para descartar falsos positivos, se eliminaron primero las colonias de la superficie del medio sólido con agua destilada y se hicieron dos lavados de 20 min cada uno con cloruro de cobalto al 2%. Si el halo translúcido se mantenía, se consideraron como cepas positivas para la degradación de fitatos.

b) Cuantificación de la actividad degradadora de fitatos:

Para la cuantificación de la actividad degradadora de fitatos se realizaron tres pases del cultivo de BAL en el medio MCB. Del último, se centrifugaron 10 mL del cultivo en fase exponencial lavando los “pellets” de células en 1 mL de solución fisiológica y añadiendo el mismo peso de perlas de vidrio que de biomasa y el doble en volumen de tampón AcNa. Las células se rompieron con el equipo Ball MillMix 20 Tehnica (Domel, Železniki, Eslovenia) en 5 ciclos de 2 min cada uno. Tras centrifugar 10 min a 10000 rpm y a 4 °C se obtuvo el extracto celular.

La determinación de la actividad se realizó mediante una reacción colorimétrica que se produce en dos pasos. En primer lugar, se llevó a cabo la reacción enzimática, que libera Pi a partir del fitato de sodio (sustrato de la reacción). Se incubó a 45 °C durante 15 min, y se detuvo la reacción añadiendo un volumen de TCA al 20% y dejando en hielo durante 10 min. A continuación, se centrifugó 5 min a 10000 rpm. Las mezclas de reacción que se usaron para cada cepa se muestran en la Tabla 4-M.

Tabla 4-M. Composición de los blancos utilizados para el ensayo enzimático de la cuantificación de la actividad degradadora de fitatos.

	Fitato de Na 3 mM (μL)	Extracto celular (μL)	Tampón AcNa 0,2 M (μL)
Blanco	200	0	50
Muestra	200	50	0

En segundo lugar, para poder cuantificar el fósforo liberado, se hizo reaccionar el producto de la primera reacción con un volumen de RC, obteniéndose un producto coloreado que se midió espectrofotométricamente a $\lambda = 700$ nm, tras incubar a temperatura ambiente la reacción durante 20min. La lectura se realizó por triplicado para cada cepa en una microplaca de 96 pocillos. La cuantificación del fosfato liberado se realizó añadiendo una curva patrón en triplicado en cada microplaca de K_2HPO_4 . Para el cálculo de los valores de la curva, a cada punto se le restó el valor obtenido en el blanco.

Para poner a punto el cálculo de la actividad enzimática, primero se tuvieron en cuenta dos blancos posibles (Tabla 4-M): B1, medio sin extracto libre de células (sin enzima), y el B2, blanco

sin fitato de sodio (sustrato de la reacción). Una vez realizadas las determinaciones, se tomó el blanco de mayor valor para el resto de los ensayos.

Para el cálculo de la actividad degradadora de fitatos (A) se siguió la fórmula descrita a continuación, teniendo en cuenta que 1 µg de P tiene 31 µmoles y el tiempo de reacción fueron 15 min; siendo ΔDO la diferencia entre la densidad óptica (DO) medida para de cada muestra y la DO del blanco, B la pendiente obtenida de la curva patrón, V_{final} el volumen final de la reacción y $V_{muestra}$ el volumen de la muestra en mL, expresada en µmol de Pi liberado por unidad de tiempo (min):

$$A = \frac{(\Delta DO \times 1/B \times 1/31 \times V_{final}/V_{muestra})}{15}$$

Además, de todas las muestras de extracto celular se cuantificó la cantidad de proteína mediante el método de coloración con el reactivo de Bradford para el cálculo de la actividad enzimática específica. Para ello, se añadieron 10 µL de muestra diluida 5 veces o de estándar de la curva patrón, y 200 µL de reactivo de Bradford. Una vez cuantificada la proteína total de cada muestra, la actividad específica (A_{esp}) se calculó siguiendo la fórmula siguiente, expresada como Pi liberado por unidad de tiempo (min) y por cada mg de proteína total:

$$A_{esp} = A/mg \text{ proteína}$$

2.3.3. Producción de EPS

Para determinar la capacidad para producir EPS se siguió el procedimiento descrito por Notararigo et al., 2013. Se cultivaron las cepas en caldo MRS durante 24 h y, a continuación, se sembraron en placas de medio sólido MRS-Sacarosa mediante el método triple estría. Tras incubación a 30 °C durante 48 h, se consideraron positivas para la producción de EPS aquellas cepas que daban lugar a la aparición macroscópica del polisacárido, dando un aspecto mucoso a las colonias.

2.3.4. Producción de vitaminas del grupo B: folatos y riboflavina

La capacidad para producir folatos y riboflavina se estudió, en primer, lugar observando su capacidad de crecimiento en medios de cultivo libres de las correspondientes vitaminas ("Riboflavin Assay Medium" y "Folic Acid Casein Medium", respectivamente) y, a continuación, se realizó la cuantificación de las vitaminas producidas mediante un ensayo microbiológico

utilizando la cepa de *Lb. rhamnosus* indicadora correspondiente (apartado 1.1.). Dichos ensayos fueron adaptados de los protocolos descritos por Laiño et al. (2013) y Juárez del Valle et al. (2014).

a) Producción de vitaminas:

Para el cribado preliminar, se tomó una alícuota de 1 mL de medio MRS tras 24 h de crecimiento de las cepas de BAL y se centrifugó a 8000 rpm durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y se lavó el "pellet" de células con 1 mL de NaCl (0,85%) estéril. Se realizaron un total de 3 lavados para eliminar restos de la vitamina correspondiente en el medio. A continuación, se inocularon 200 µL de la suspensión celular en 3 mL del medio libre de la vitamina a ensayar y se incubó a 30 °C durante 24 h. Para cada cepa, se repitió el proceso de lavado, resuspensión en NaCl (0,85%) e inoculación en nuevo medio libre de vitamina siempre que se observaba turbidez debida al crecimiento, y así hasta un máximo de 7 pases.

b) Recuperación de las vitaminas producidas por las cepas de BAL:

El primer paso consistió en liberar y recuperar las vitaminas a partir de las suspensiones bacterianas, tanto del interior como del exterior celular. Para ello, se tomaron 500 µL de la muestra y el mismo volumen del tampón "Protecting Buffer" en el caso de la determinación de folatos o de ácido acético al 1% para la determinación de riboflavina, siendo ambas soluciones estabilizadoras de la vitamina correspondiente. A partir de este momento, se trabajó en condiciones reducidas de luz debido a que ambas vitaminas son fotosensibles. La mezcla se calentó a 100 °C durante 5 min y se centrifugó a 13000 rpm 5 min, para separar el sobrenadante de los restos celulares. Todos los extractos se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

c) Cuantificación de la producción de vitaminas mediante bioensayo.

Las cepas indicadoras *Lb. rhamnosus* CECT 278^T y *Lb. rhamnosus* CRL 932, incapaces de crecer en ausencia de folatos y de riboflavina, se cultivaron por dos pases en el medio libre de la vitamina a cuantificar y, a continuación, se inoculó cada una de ellas, al 4% en el medio correspondiente libre de la vitamina, preparado al 2X con 20 µg/mL de cloranfenicol. La determinación de vitaminas en las muestras se realizó siempre en condiciones de luz reducida, por triplicado, en una microplaca de 96 pocillos, añadiendo 100 µL del extracto obtenido en el paso b) y el mismo volumen del cultivo de cepa indicadora. Las microplacas se

incubaron en oscuridad durante 48 h a 37 °C y el crecimiento de la cepa indicadora se evaluó midiendo la DO a una absorbancia $\lambda = 600$ nm.

Se construyeron las correspondientes curvas patrón representando DO respecto a concentración. Para la curva estándar de folatos, el ácido fólico se diluyó en tampón "Protecting Buffer" hasta conseguir las concentraciones 0,02; 0,1; 0,2; 1 y 2 ng/mL. Para la de riboflavina, las soluciones se prepararon en ácido acético al 1% a las concentraciones 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 y 400 ng/mL. En el caso de la determinación de folatos, los extractos se diluyeron 40 veces y, por esta razón, los valores de la curva patrón se encuentran en un rango menor a los puntos de la curva de riboflavina.

2.4. Propiedades relacionadas con la seguridad alimentaria

Entre las propiedades relacionadas con la seguridad alimentaria, se ensayaron la actividad antimicrobiana y la resistencia a antibióticos para una selección de cepas de BAL.

2.4.1. Actividad antimicrobiana

a) Actividad antifúngica de cultivos en placa.

La actividad antifúngica de las cepas de BAL se ensayó siguiendo el protocolo descrito por Magnusson et al. (2003), frente a los hongos *M. guilliermondii*, *A. oryzae*, *A. niger* y *P. roqueforti*. En primer lugar, se inocularon dos estrías de las cepas de BAL sobre placas de MRS y se incubaron a 30 °C durante 48 h. Por su parte, una vez se obtuvo crecimiento de los hongos en el medio sólido agar Malta, se prepararon las suspensiones de esporas añadiendo la solución NaCl (0,85%) estéril suplementada con Tween80 al 30% para evitar la agregación de las esporas. En el caso de la levadura *M. guilliermondii* se incubó en medio líquido hasta obtener crecimiento. De dichos cultivos fúngicos, se inoculó 1 mL de suspensión, a una concentración de 10^4 esporas o células de levadura por mL, a 10 mL de medio Malta agar semisólido, y se vertió uniformemente sobre las placas de MRS que contenían las cepas de BAL, una vez se observó el crecimiento de las mismas.

Tras la incubación a 25 °C durante otras 48 h, la actividad antifúngica se determinó por la formación de un halo de inhibición alrededor de las estrías de las cepas de BAL ensayadas. Los criterios establecidos para evaluar el nivel de actividad, según el tamaño del halo de inhibición, fueron:

	0 mm
Sin actividad	
Actividad débil	> 1 mm
Actividad fuerte	20-30 mm
Actividad muy fuerte	> 30 mm

b) Actividad antibacteriana de cultivos en placa.

La capacidad de las cepas de BAL de inhibir a los patógenos alimentarios *Salmonella* Typhi, *E. coli* O157:H7 y *L. innocua* se ensayó siguiendo el método descrito por Gaudana et al. (2010). Tanto los patógenos bacterianos indicadores como las cepas de BAL ensayadas se activaron durante 24 h antes de las pruebas, en medio TSB a 37 °C y en MRS a 30 °C, respectivamente. De cada cepa de BAL, se depositó una gota de 5 µL, a una concentración aproximada de 10⁸ UFC/mL, en la superficie de placas de medio MRS; tras secarse, las cepas de BAL se incubaron a 30 °C durante 24 h. A continuación, se inocularon 150 µL provenientes de cultivos de 18 h de las bacterias patógenas o indicadoras, con una concentración de 10⁶ UFC/mL, a 15 mL de medio agar TSB semisólido, y se vertieron sobre las placas de MRS, donde ya se observaba el crecimiento de las cepas de BAL. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C. La actividad antimicrobiana se consideró positiva por la aparición de un halo de inhibición, y se valoró el nivel de actividad antibacteriana de las cepas de BAL ensayadas en función del tamaño de dicho halo:

Actividad débil	≤ 5 mm
Actividad fuerte	6-9 mm
Actividad muy fuerte	≥ 10 mm

c) Actividad antimicrobiana de extractos libres de células (ELC).

Los ELC procedentes de BAL crecidas en caldo MRS se prepararon como describen Saladino et al. (2016). Para ello los cultivos de BAL se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 min y alícuotas de 2, 5 y 10 mL, y los ELC obtenidos se filtraron utilizando un filtro de 0,22 µm, se neutralizaron y se concentraron por liofilización. Se resuspendieron de nuevo en

medio MRS, y a continuación, se evaluó su actividad frente a los hongos toxigénicos *A. parasiticus*, *P. expansum* y *F. verticilloides*, y contra los patógenos bacterianos *E. coli* O157:H7, *L. innocua* y *Salmonella* Typhi. Para ello, se prepararon 10 mL del medio semisólido en función del microorganismo diana, agar malta o TSA, en el que se inocularon los microorganismos indicadores, y se vertieron en placas Petri. Una vez solidificado, se excavaron los pocillos en los que se depositaron 100 µL de los ELC de las cepas de BAL, por triplicado. En el caso de los hongos, las placas se incubaron a 25 °C durante 20 días, mientras que los patógenos bacterianos se incubaron durante 48 h a 37 °C.

2.4.2. Extracción, identificación y cuantificación de los compuestos presuntamente antifúngicos

Con el objetivo de evaluar la posible naturaleza proteica de los compuestos antimicrobianos producidos por las cepas de BAL, los ELC se sometieron a hidrólisis con pancreatina (30 unidades/mg) y, posteriormente, se ensayaron en paralelo los ELC tratados y los no tratados con pancreatina, mediante el ensayo de difusión en agar descrito en el apartado 2.4.1.c). En todos los ensayos se incluyó como control negativo un pocillo con MRS liofilizado y resuspendido de nuevo en MRS.

El perfil de compuestos con actividad antifúngica se caracterizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas/masas (LC-MS/MS). Para ello, los ELC correspondientes se trataron mediante la metodología QuEChERS para la extracción y cuantificación de los compuestos responsables de la actividad observada como se describe a continuación: se añadieron 10 mL de la solución de extracción a 10 mL de cada ECL y se agitó la mezcla durante 1 min. A continuación, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min y el sobrenadante que contenía los solventes orgánicos se recuperó en un tubo de capacidad 15 mL. A dicho sobrenadante se le añadieron 150 mg de APS, 150 mg de C8 y 885 mg de MgSO₄, se agitó la solución durante 1 min y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. El solvente se desecó mediante un flujo de nitrógeno a 35 °C en un equipo evaporador (Turbovap, Uppsala, Suecia), y se reconstituyó añadiendo 1 mL de una solución acuosa con 10% de ACN. Por último, se filtró en los viales para LC con 1,5 mL de capacidad. Este proceso de extracción se realizó por triplicado para cada cepa de BAL, y 20 µL de cada muestra se inyectaron en el sistema LC-MS/MS.

El proceso de separación de los ácidos fenólicos se llevó mediante el sistema LC (CMB-20A/LC-10AT, Shimadzu, Kioto, Japón) equipado con una columna Gemini C18 (150 x 2 mm, 5 µm;

Phenomenex, Madrid, España) y con una columna de seguridad (Security Guard™ Gemini C18 cartridge AF0-8497; 4 x 3 µmID; Phenomenex, Madrid, España).

La composición de la fase móvil constaba de dos soluciones: i) el solvente A, una solución acuosa con 0,1% de ácido fórmico y ii) el solvente B, una solución de ACN con 0,1% de ácido fórmico. Para asegurar la correcta separación de los compuestos, se utilizó un flujo en gradiente (0 min-5% B; 5 min-10% B; 10 min- 30% B; 20 min-30% B; 30 min-40% B; 35 min- 40% B; 40 min-95% B; 45 min-95% B), a una tasa de flujo de 0,2 mL/min, manteniéndose la temperatura a 30 °C.

Para detectar la presencia de los compuestos antifúngicos se utilizó un espectrómetro de masas de trampa iónica LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, Reino Unido). Se operó en el modo “ionización negativa” a una resolución de 30000 con las siguientes condiciones: la temperatura de los capilares era de 300 °C, el voltaje de los capilares de 50 V, la lente de tubo a 110 V, el gas de envoltura a 45 unidades arbitrarias y el gas auxiliar a 15 unidades arbitrarias. Además, semanalmente se realizaba una calibración según las instrucciones del fabricante para asegurar una alta exactitud (≤ 2 ppm) y robustez en el espectro de masas y confirmar la presencia de todos los compuestos.

2.4.3. Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos de las cepas de BAL se evaluó utilizando el método de la microdilución para determinar la CMI siguiendo el protocolo de la “International Organization of Standardization” (ISO 10932:2010(E); IFD 223:2010(E)). En el presente trabajo se incluyeron todos los antibióticos recomendados por EFSA (2012) para detectar cepas bacterianas con resistencias potencialmente adquiridas. Para preparar los inóculos de las cepas de BAL ensayadas se obtuvieron colonias aisladas en medio MRS de cada una y se resuspendieron en 3 mL de solución NaCl (0,85%) estéril. La turbidez de la suspensión celular se ajustó a una DO de 0,16-0,2 a $\lambda = 625$ nm y se diluyó 500 veces en el medio LSM descrito en el apartado 1.4.3. Para cada antibiótico se ensayaron i) la concentración estipulada como valor de corte (ver Tabla 5-M), ii) esta concentración diluida un cuarto, iii) diluida a la mitad y, por último, iv) doble concentrada. Los ensayos se realizaron en microplacas de 96 pocillos y se añadieron 50 µL de la solución de antibiótico para cada concentración evaluada más 50 µL de la suspensión celular, por duplicado.

Se incluyeron tres controles por cada placa por triplicado: i) un control de crecimiento de la cepa de BAL ensayada o control positivo (50 µL cepa + 50 µL agua miliQ), ii) un control de precisión y

Materiales y métodos

reproducibilidad de los ensayos (50 µL cepa *Lb. plantarum* 748^T en medio LSM + 50 µL agua miliQ) y iii) un control del medio o control negativo (50 µL agua miliQ + 50 µL del medio LSM sin inocular). Las microplacas se incubaron en anaerobiosis durante 48 h a 30 °C. A continuación, se determinó el crecimiento de las cepas por DO a $\lambda = 600$ nm, y se consideraron resistentes aquellas que eran capaces de crecer a la concentración del valor de corte establecido para cada antibiótico y grupo de BAL según el “Panel de Aditivos y Productos o Sustancias usadas en Alimentación Animal” (FEEDAP) (EFSA, 2012). Dichos valores de corte se muestran en la Tabla 5-M.

Tabla 5-M. Valores de corte (mg/L) para determinar la resistencia a antibióticos en las especies y géneros de BAL (EFSA, 2012).

	Amp	Van	Gen	Kan	Str	Ery	Cli	Tet	Chl
<i>Lactobacillus</i> Homofermentativos obligados	1	2	16	16	16	1	1	4	4
<i>Lactobacillus</i> Heterofermentativos obligados ^a	2	n.r.	16	32	64	1	1	8	4
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2	n.r.	8	64	64	1	1	16	4
<i>Lactobacillus</i> Heterofermentativos facultativos	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4
<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	2	n.r.	16	64	n.r.	1	2	32	8
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	4	n.r.	32	64	64	1	1	4	4
<i>Pediococcus</i>	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4
<i>Leuconostoc</i>	2	n.r.	16	16	64	1	1	8	4
<i>Lactococcus lactis</i>	2	4	32	64	32	1	1	4	8
Otros Gram +	1	2	4	16	8	0.5	0.25	2	2
<i>Enterococcus faecium</i>	2	4	32	1024	128	4	4	4	16

Amp, ampicilina; Van, vancomicina; Gen, gentamicina; Kan, kanamicina; Str, estreptomina, Ery, eritromicina; Cli, clindamicina; Tet, tetraciclina; Chl, cloranfenicol.

^aIncluye *Lb. fermentum*, n.r. no requerido.

2.5. Evaluación tecnológica de las cepas de BAL

2.5.1. Tolerancia a estreses tecnológicos

Para valorar las posibles aplicaciones de las BAL en la elaboración de nuevos alimentos funcionales se estudiaron aspectos relacionados con los procesos tecnológicos de producción de alimentos y con la sobreproducción de vitaminas.

Como estreses relacionados con procesos de producción de alimentos se ensayó la capacidad de crecimiento a pH ácido (3 y 4), a altas temperaturas (37 °C y 42 °C), a bajas temperaturas (10 °C y 20 °C), a alta presión osmótica (2% y 4% de concentraciones de NaCl) y en presencia de etanol (2, 8, 10 y 14%).

Los cultivos de BAL activados en caldo MRS durante 24 h se inocularon al 2% del volumen final en los medios o condiciones correspondientes a los cuatro tipos de estrés, sumando un total de 12 condiciones, en microplacas de 96 pocillos por triplicado, para cada tiempo, condición y cepa: MRS con pH ácido (3 y 4), MRS a altas temperaturas (37 °C y 42 °C), MRS a bajas temperaturas (10 °C y 20 °C), MRS con alta presión osmótica (2% y 4% de concentraciones de NaCl) y, por último, MRS con diferentes concentraciones de etanol (2, 8, 10 y 14%).

La tolerancia de las cepas de BAL a las condiciones de estrés se evaluó mediante la monitorización del crecimiento por medida de la DO a $\lambda = 600 \text{ nm}$ ($DO_{600\text{nm}}$) ajustándose la frecuencia de las medidas a cada condición ensayada, durante un intervalo de 24 a 60 h en función del estrés evaluado.

Para estudiar el comportamiento de las cepas frente los distintos estreses en base a las medidas de $DO_{600\text{nm}}$ obtenidas, se utilizó la ecuación Gompertz propuesta por Zwietering et al. (1990) que proporciona una estimación de los parámetros del crecimiento de las cepas, entre ellos, la duración de la fase lag (λ) y la velocidad máxima específica (μ_{max}) de las cepas en las distintas condiciones.

$$y = D \times \exp \left\{ -\exp \left[\left(\frac{\mu_{\text{max}} \times e}{D} \right) \times (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

Donde $y = \ln (DO_t/DO_{t=0})$, $DO_{t=0}$ es la DO inicial y DO_t es la DO a un tiempo determinado, D es equivalente a $\ln (DO_{\text{max}}/DO_{t=0})$, μ_{max} se mide en h^{-1} y λ en h. Para obtener estimaciones de los parámetros estadísticamente significativas, se utilizó el mínimo de la suma de los cuadrados de

la diferencia entre los datos experimentales y el modelo ajustado a la ecuación, mediante el programa informático Statistica 7.0 (Stat-Soft, Inc., Tulsa, OK, EEUU).

Las cepas de BAL se analizaron en cuanto a las diferencias significativas entre ellas mediante el análisis ANOVA de un factor, utilizando el parámetro de la máxima DO_{600nm} alcanzada como variable dependiente. Los valores de las medias se agruparon utilizando el test de Tukey HSD, con un intervalo de confianza de $\alpha = 0.05$.

2.5.2. Crecimiento en distintas fuentes de carbono

Se determinó realizando curvas de crecimiento en medio CDM (descrito en el apartado 1.4.4) con glucosa, lactosa o sacarosa. El crecimiento se monitorizó mediante: i) la medida de la absorbancia a $\lambda = 600 \text{ nm}$, ii) el recuento de viables en placa de MRS, y iii) la medida del pH a distintos tiempos de incubación, al inicio, a las 4 h, 8 h, 12 h y 24 h.

2.5.3. Obtención y caracterización de mutantes naturales resistentes a la roseoflavina

Con el fin de obtener cepas superproductoras las cepas productoras de riboflavina fueron tratadas con el agente químico roseoflavina, análogo estructural de la riboflavina que generalmente resulta tóxico; dicho tratamiento permite seleccionar mutantes resistentes.

- a) Obtención de mutantes resistentes a la roseoflavina. Para ello, las cepas de BAL crecidas en caldo MRS durante 24 h, se inocularon en medio CDM sin riboflavina (descrito en el apartado 1.4.4.) y se expusieron a niveles sub-inhibitorios de roseoflavina, en concentraciones crecientes (10 mg/L, 50 mg/L y 100 mg/L), durante 2 a 4 días mediante la suplementación del medio con dicho agente químico (Burgess et al., 2006). mediante el uso de de roseoflavina.

Las cepas que mostraron crecimiento a la mayor concentración de roseoflavina ensayada (100 mg/mL) se sembraron en placas de MRS para obtener las colonias de mutantes. Se escogieron al azar 5 colonias por cepa, que se inocularon de nuevo en CDM, sin riboflavina, y para cada cepa, se seleccionaron aquellos mutantes que tras crecer cambiaron el color del medio a un amarillo más intenso.

- b) Caracterización de los mutantes superproductores. Se realizó mediante amplificación, secuenciación y comparación de la región RFN de las cepas silvestres y de los mutantes

derivados del tratamiento con roseoflavina. Para amplificación y secuenciación se utilizaron los oligonucleótidos descritos en la Tabla 1-M que amplifican un fragmento de 576 bp que incluye la región reguladora “rib” del RFN (Russo et al., 2014). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de reacción de 25 µL que contenían 20 ng de DNA, 0,2 nM de cada oligonucleótido, 2,5 unidades/µL de la DNA polimerasa HotStar HiFidelity (Qiagen) y 5 µL del tampón 5X para la DNA polimerasa. El programa de PCR consistió en 95 °C durante 5 min, 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, 53 °C durante 45 s y 72 °C durante 1 min, y un último ciclo a 72 °C durante 7 min. Las secuencias de los productos de amplificación de las cepas silvestres y las mutantes se alinearon para su comparación utilizando el Software Mega, con el objetivo de encontrar las diferencias entre ellas.

2.6. Elaboración de un modelo de alimento funcional vegetal

2.6.1. Ensayos de crecimiento en matrices vegetales

Se realizaron los ensayos de crecimiento en dos bebidas vegetales comerciales, soja y avena (YoSoy) que se inocularon a partir de cultivos de 24 h en MRS. Se centrifugó 1 mL del cultivo a 8000 rpm durante 5 min y el “pellet” se lavó y resuspendió en una solución de NaCl (0,85%) estéril para conseguir una concentración final de 10^7 UFC/mL en el alimento, y se incubaron a 30 °C, monitorizándose el pH y el crecimiento por recuento de viables en placa de MRS a 4, 8 y 24h.

2.6.2. Producción de un alimento vegetal (a base de cereales) fermentado

Los productos fermentables basados en cereales se obtuvieron a partir de harina de avena, cebada y maíz siguiendo el método previamente descrito por Coda et al. (2012), con algunas modificaciones. Se prepararon las mezclas de harina al 12% en agua destilada a un volumen final de 600 mL en recipientes estériles. Para alcanzar la gelatinización del almidón en las mezclas, se calentaron a 95 °C en un baño durante 10 min, agitándose manualmente cada 2 min.

Las fermentaciones de las tres matrices se realizaron con dos cultivos iniciadores comerciales de kefir, mencionados en el apartado 1.5.9, y se incluyó otra matriz, la leche, como control de una producción estándar de kéfir.

La preparación de los dos cultivos iniciadores se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante: las mezclas liofilizadas de microorganismos 25X se resuspendieron en agua al 6,25%

y se mantuvieron 1 h a temperatura ambiente para facilitar su rehidratación. A continuación, se inoculó cada uno de los cultivos iniciadores en recipientes estériles conteniendo 75 mL de la matriz correspondiente, a la concentración recomendada por el fabricante (aproximadamente 10^6 UFC/mL) y la cepa BAL productora de riboflavina se inoculó a una concentración final de aproximadamente 10^8 UFC/mL, para asegurar y seguir su viabilidad en el alimento.

Las fermentaciones se realizaron por duplicado, incluyendo las cuatro matrices sin inocular como controles negativos, a 25 °C durante 48 h.

La monitorización de los niveles BAL y de levaduras en todos los productos se llevó a cabo mediante recuento en placa de MRS y en YPD con cloranfenicol, respectivamente, al tiempo inicial y a las 48 h.

2.6.3. Parámetros físico-químicos

Para la caracterización de los productos de cereales tipo kéfir se realizó un seguimiento de los parámetros físico-químicos, tales como la concentración de los ácidos acético y láctico, la pérdida de CO₂, como medida indirecta de la producción de etanol, y la viscosidad, así como un estudio preliminar de las propiedades sensoriales de los productos.

- Ácidos acético y láctico: Las concentraciones de los ácidos acético y láctico se determinaron al inicio y tras las 48 h del proceso de fermentación, mediante kits comerciales basados en ensayos colorimétricos (Biogamma S.l.r., Italia), siguiendo las instrucciones del fabricante.
- CO₂: La producción de CO₂ se determinó indirectamente a través de la medida de pérdida de peso durante la fermentación, y se expresó en g/25 mL. Se tomaron medidas cada 4 h.
- Viscosidad: Las medidas de viscosidad se llevaron a cabo con un viscosímetro rotacional (Brookfield LV, DV-II-Pro, Harlow, Inglaterra) al final de la fermentación. Para ello, se utilizaron 50 mL de cada muestra y la medida se realizó con el huso nº 3, aplicando una velocidad de 40 g por cada 30 s. La viscosidad se expresó en centipoise (cP).

El análisis estadístico en cuanto a diferencias significativas entre todos los productos se realizó mediante ANOVA de un factor con el programa informático Statistica 7.0. Como variables dependientes se introdujeron los recuentos microbianos en MRS e YPD al final de las fermentaciones, la variación de los ácidos acético y láctico entre el inicio y las 48 h de

fermentación, la pérdida total de CO₂ y la medida de viscosidad a las 48 h. Las medias se agruparon utilizando el test de Tukey HSD con un intervalo de confianza de $\alpha = 0,1$.

La evaluación sensorial se llevó a cabo mediante la comparación del aroma de las matrices cereales (avena, maíz y cebada) fermentadas con el kéfir comercial de agua o de leche, con el kéfir convencional utilizado como control.

2.6.4. Extracción y cuantificación de la riboflavina por HPLC acoplada a un detector de fluorescencia

La extracción de la riboflavina de los nuevos productos a base de cereales, elaborados con cultivos iniciadores de kéfir, para su determinación por HPLC, se realizó mediante el procedimiento descrito por Jakobsen (2008). Para ello, se partió de 5 g de muestra a los que se añadieron 25 mL de HCl y la mezcla se autoclavó a 121°C durante 30 min. A continuación, el pH se ajustó a 4,5 añadiendo AcNa 4 M y las muestras se sometieron a un tratamiento enzimático añadiendo 5 mL de la solución descrita en el apartado 1.5.8. Las muestras se diluyeron hasta un volumen final de 50 mL con HCl 0,01 M y fueron cuantificadas por HPLC en el servicio de la Università degli Studi di Foggia (Foggia, Italia).

El equipo de HPLC constaba de un sistema desgasificador con nitrógeno, una bomba binaria y un detector de fluorescencia (Agilent-1100 Series, Palo Alto, CA, USA). Para la determinación de la riboflavina se utilizó una columna analítica Zorbax Eclipse Plus C 18 (4.6×150 mm, con 5µm de diámetro interno) y una pre-columna Zorbax ODS (4.6×12.5 mm, con 5µm de diámetro interno) (Agilent Technologies). Para el análisis por HPLC realizó una elución isocrática a 1 mL/min con una fase móvil compuesta por la mezcla metanol/ agua (35:65 v/v). Para la detección de la riboflavina en el producto de elución, también en este caso se utilizó un detector de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 440 nm y una longitud de onda de emisión a 520 nm, y se añadieron controles de espectros de muestras estándar y muestras reales para verificar la selectividad del método. Los datos obtenidos se registraron mediante el Software ChemStation (Agilent, Palo Alto, CA, USA).

2.6.5. Análisis del perfil de los compuestos orgánicos volátiles (VOC) de los productos elaborados

La monitorización de los procesos fermentativos para detectar y cuantificar la producción de VOC a lo largo del tiempo se realizó mediante un muestreador automático provisto de un brazo

robótico (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Alemania). Todas las combinaciones de cultivos iniciadores de kéfir (2), matrices alimentarias (4) que incluían o no la cepa superproductora de riboflavina (2), más los cuatro controles de matrices sin inocular, se analizaron con 5 réplicas cada una, dando lugar a un total de 100 viales, que se situaron al azar en el analizador. Los productos kéfir y tipo kéfir se monitorearon durante 48 h y el experimento se realizó dos veces, en dos días separados. El espacio de cabeza de los productos fermentados.

La detección y cuantificación de los VOC producidos en los espacios de cabeza de los productos de kéfir y tipo kéfir elaborados se realizó en la Fundación EDMUND MARCH (San Michele all'Adige, Italia). Se utilizó el procedimiento descrito por Benozzi et al. (2015) mediante la tecnología de reacción de transferencia de protones (PTR) acoplada a tiempo de vuelo (ToF) y espectrometría de masas (MS) con un aparato comercial PTR-ToF-MS 8000 (Ionicon Analytik GmbH, Innsbruck, Austria), en su configuración estándar (modo V). El aire proveniente del espacio de cabeza se inyectaba directamente en el tubo de corriente sin ningún tratamiento. Las condiciones de ionización del tubo de corriente fueron 110 °C, 2,30 mBar de presión y 550 V. La línea de entrada consistió en un tupo capilar PEEK con un diámetro interno de 0,04 in. calentado a 110 °C. El flujo de entrada se estableció a 40 sccm.

El análisis estadístico de la totalidad de los datos adquiridos se realizó con el programa informático R Studio, y se estudió mediante el análisis de componentes principales (PCA) con el objetivo de investigar aquellos compuestos que explicaban la mayor variabilidad entre todas las muestras evaluadas.

2.7. Secuenciación y análisis genómico

Previamente a la secuenciación, para obtener una extracción de los DNA genómicos de las cepas de BAL con un alto rendimiento y pureza se utilizó un kit comercial (Bacteria DNA Preparation kit, Jena Bioscience, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del DNA genómico obtenido se comprobó mediante la electroforesis en gel de agarosa al 2% y la concentración se midió con el espectrofotómetro NanoDrop.

La secuenciación genómica se realizó mediante el sistema MiSeq® de Illumina en el SCSIE de la Universitat de València. La calidad de las lecturas obtenidas se analizó mediante la herramienta FastQC y se ensamblaron utilizando la herramienta SeqMan NGen 12.0.1 que se encuentra libremente disponible en la aplicación BaseSpace, obteniéndose así los contigs del boceto del genoma.

A continuación, se realizó una anotación automática mediante la herramienta web Prokaryotic Genomes Annotation Pipeline del NCBI, descrito por Angiuoli et al., (2008) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/Pipeline.html>). Además, para la anotación y análisis del genoma también se utilizó el servidor RAST, descrito por Aziz et al., (2008) (<http://rast.nmpdr.org/>).

Para la detección de genes de resistencia a antibióticos, se utilizó la herramienta Resistance Gene Identifier (RGI) de la Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (<https://card.mcmaster.ca/>). Por último, se observó el entorno génico de los genes detectados también mediante el servidor RAST.

CAPÍTULO 1.

Identificación de cepas de BAL aisladas de productos fermentados tradicionales procedentes de Latinoamérica.

Existe una gran variedad de alimentos fermentados tradicionales originarios de países pertenecientes a África, Asia, América y Europa del este, entre otros, obtenidos en su mayoría a partir de cereales, plantas leguminosas, tubérculos y frutas (Abriouel et al., 2006; Chen et al., 2006; Botes et al., 2007; Escalante et al., 2008; Lacerda Ramos et al., 2010; Yousif et al., 2010; Schoustra et al., 2013; De Vuyst et al., 2014;) originados principalmente debido a la necesidad de preservar la materia prima, tras la cosecha y almacenamiento, y en cuya elaboración están involucrados cultivos mixtos de bacterias, levaduras y/o hongos (De Vuyst et al., 2014).

En Latinoamérica, durante siglos se han elaborado productos fermentados a partir de cereales y, en concreto, los derivados de maíz, tienen gran relevancia y se siguen consumiendo en la actualidad, algunos en medicina tradicional o en ceremonias religiosas.

Entre ellos, la “chicha” es una de las bebidas fermentadas más importantes que se produce desde tiempos pre-hispánicos en regiones del noroeste de Argentina y en las regiones andinas de Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú. La elaboración de la chicha es una actividad comunitaria y se consume normalmente por las poblaciones nativas durante festividades religiosas y agrícolas así como en eventos familiares y sociales (Lorence-Quiñones et al., 1999; Delibes Mateos y Barragan Villena, 2008). Durante su elaboración, los métodos para el tratamiento inicial de la harina de maíz pueden variar mucho, tratándose de un paso esencial dado que es cuando se produce la hidrólisis del almidón para obtener los azúcares fermentables. Entre estos métodos se utiliza, o bien el malteado (germinación) de los granos de maíz en el caso de la chicha de jora, o bien un paso de pre-fermentación en el que tradicionalmente se añadía saliva. El proceso de elaboración de la chicha se detalla en la Figura 1-C1 (Figura 1 del Capítulo 1).

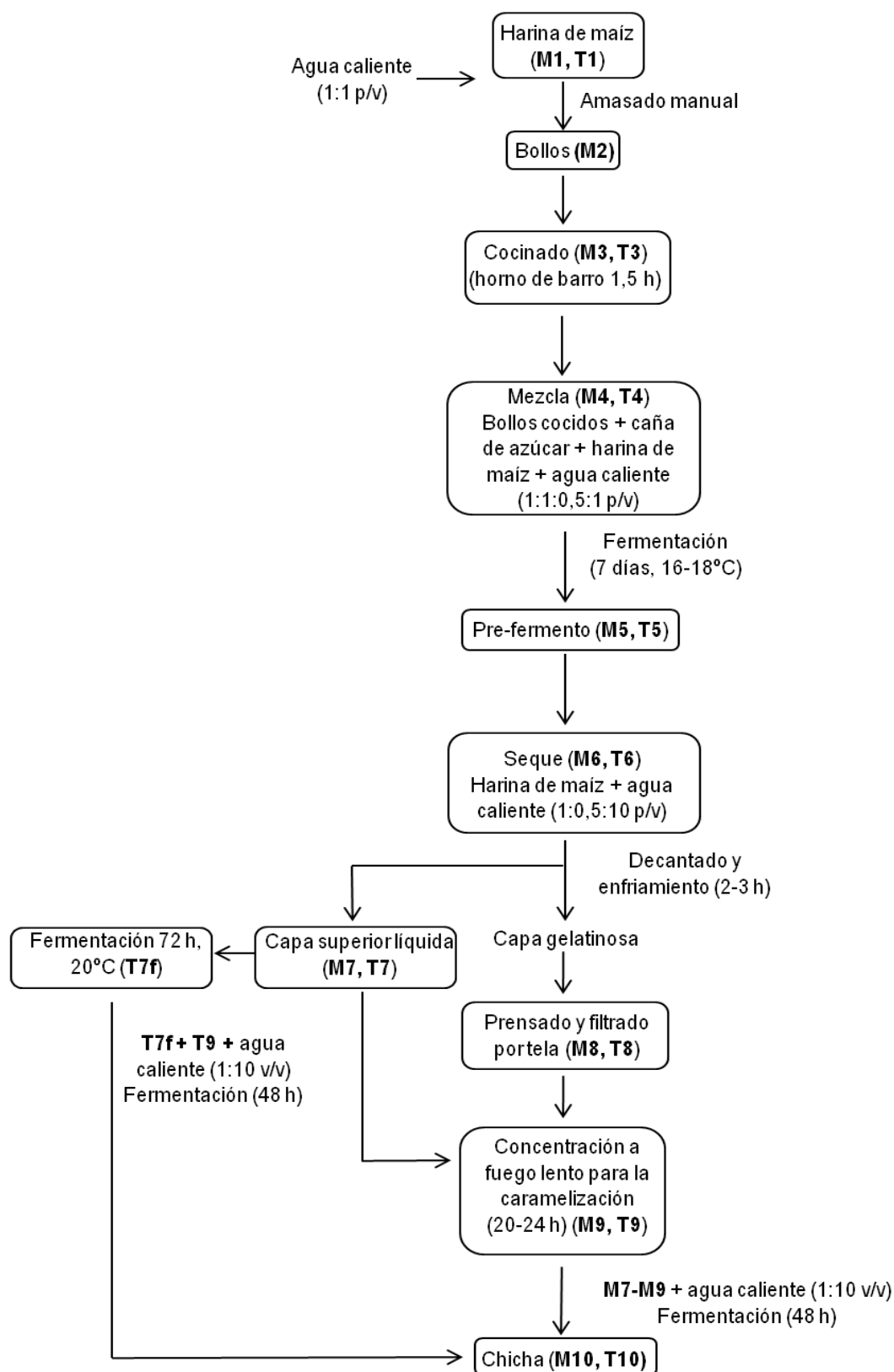


Fig. 1-C1. Diagrama de flujo de la elaboración de la chicha de las dos producciones locales de Maimará (M) y Tumbaya (T). M1-M10 y T1-T10 indican las distintas muestras analizadas.

El producto resultante es una bebida amarillenta, efervescente y alcohólica, que contiene entre 2 y 12% de etanol, y se puede obtener a partir de diferentes variedades locales de maíz (Lorence-Quiñones et al., 1999). En cuanto a los estudios microbiológicos, trabajos previos sobre los microorganismos implicados en la fermentación de la chicha de jora revelaron que las BAL y las levaduras son las poblaciones nativas dominantes. Cuando se caracterizaron mediante técnicas fisiológicas y bioquímicas, se observó que *Lactobacillus* era el género predominante (Quillama y Liendo, 1995), y también se describieron bacterias del género *Leuconostoc* como microorganismos fermentativos en el alimento (Steinkraus, 2002).

Otro alimento tradicional fermentado de Latinoamérica es el “atole agrio”, comúnmente elaborado en el centro y sur de México. Se trata de una bebida regional ácida, no alcohólica y fermentada, preparada con una masa elaborada a partir de maíz de dobla; este nombre se debe a que el tallo de la planta se dobla a la mitad, alrededor de treinta días antes de su cosecha, con el fin de que el maíz pierda la humedad y evitando así la acción de microorganismos alterantes. Por tanto, esta bebida se elabora únicamente en el período de dobla (de mayo a septiembre). Al igual que la chicha, su consumo tiene fines diversos. Por una parte, tiene fines nutricionales, ya que es habitual que la consuman mujeres en período de lactancia, pero también medicinales, para combatir la diarrea, y, además, fines ceremoniales, ya que se toma como ofrenda a los difuntos en la celebración del Día de los Muertos. En el proceso de elaboración del atole agrio, se parte de maíz de dobla desgranado que se muele hasta obtener una masa blanca. A partir de este punto, la fermentación se lleva a cabo de dos formas. En la fermentación sólida, tras el amasado a mano, se forman bolas que se dejan fermentar a temperatura ambiente durante 24 h, mientras que, en la fermentación líquida, se añade agua para homogeneizar la masa dejándola fermentar a temperatura ambiente, también durante 24 h. Se trata de una fermentación ácida, y se ha observado que las BAL presentes en el producto producen diacetilo, lo que contribuye a las propiedades organolépticas características del atole (Escamilla-Hurtado et al., 1993). En ambos tipos de fermentaciones, al finalizar dicho proceso, se hierva el producto hasta conseguir una consistencia espesa.

Otro de los cultivos nativos de gran relevancia en Latinoamérica son las patatas. Se originaron hace aproximadamente 8000 años en los Andes, siendo la región peruana la que abarca una de las reservas más importantes del tubérculo, tanto de patatas silvestres como de las variedades que se han ido obteniendo con el paso del tiempo (Velásquez-Milla et al., 2011). El llamado “tocosh” surgió como una estrategia natural de preservar las patatas gracias a su fermentación.

Se trata de un alimento ancestral que sigue preparándose en pequeñas comunidades del altiplano en los Andes centrales peruanos por los campesinos locales (Horkheimer, 1973). El método tradicional de preparación se esboza en la Figura 2-C1 y consiste en excavar un pozo (aprox. 0,70 m x 1,50 m) en las proximidades de un curso de agua. En su interior se colocan las patatas, normalmente las desechadas, en capas separadas por paja. Además, se utilizan rocas para cubrir la pila con el fin de evitar que los tubérculos sean arrastrados por la ligera corriente de agua que pasa a través de la zanja; las patatas permanecen en el agua corriente hasta tiempos que pueden llegar hasta los 12 meses. Es entonces cuando los lotes de patatas, oscurecidas debido a reacciones que consisten principalmente en la conversión enzimática de los compuestos fenólicos a melaninas (Zvitov-Ya'ari y Nussinovitch, 2014), se extraen y colocan en un área seca y sombreada para permitir que el agua drene. Desde un punto de vista microbiológico, solamente se han llevado a cabo estudios preliminares que demuestran que el tocosh es el resultado de la fermentación microbiana, llevada a cabo principalmente por BAL pertenecientes al género *Lactobacillus*. Además de ser un alimento básico para la población local, se cree que los compuestos generados por estos microorganismos beneficiosos son responsables de la gran diversidad de propiedades medicinales atribuidas a este producto conocido como el "antibiótico natural de los Incas".



Fig. 2-C1. Producción tradicional del tocosh. (A) Pozo excavado cerca de un manantial donde las patatas se sitúan entre capas de rastrojos; (B) Patas sacadas de un pozo tras ocho meses de almacenamiento (tocosh).

Capítulo 1. Introducción

La presente tesis doctoral se centra en el estudio de 779 nuevos aislados de BAL procedentes de estos tres alimentos fermentados tradicionales de Latinoamérica de los cuales, en este trabajo, se han identificado 393 de chicha y 152 de tocosh. Los aislados se consideraron como pertenecientes al grupo de BAL ya que todos ellos procedían de placas de MRS o YGLP y resultaron ser Gram-positivos, y oxidasa y catalasa negativos (Björkroth y Holzapfel, 2006; Devriese et al., 2006; Hammes y Hertel, 2006).

En el caso de la chicha, las 393 cepas de BAL se recuperaron a partir de dos producciones elaboradas en las localidades de Maimará y Tumbaya, ambas situadas al noroeste de Argentina. De ellas, 147 proceden de la elaboración de Maimará, denominada producción “M”, y 246 de la de Tumbaya, la producción “T”; y los detalles del aislamiento se recogen en el trabajo de Elizaquível et al., 2015 (Anexo II).

En cuanto a las cepas de BAL del atole, se obtuvieron un total de 234 aislados a diferentes tiempos de la fermentación (hasta 24 h), tanto de la fermentación sólida como líquida del producto, y los detalles del aislamiento e identificación aparecen en el trabajo de Pérez-Cataluña et al., 2017.

Para el estudio del tocosh, se incluyeron un total de 152 cepas cuyo aislamiento se describe en el trabajo de Jiménez, Yépez et al., 2018 (Anexo II). Las muestras de tocosh se obtuvieron de pozos preparados de modo tradicional por los productores locales de la comunidad de Tambogán (Huánuco, Perú), localizada a 2500 m sobre el nivel del mar. Debido a la dificultad de acceso a dicha localización, todas las muestras se tomaron a la vez, en el verano de 2012, y éstas fueron: i) patatas frescas recolectadas antes de colocarse en el pozo, ii) patatas tras un mes de almacenamiento en el pozo y iii) patatas tras ocho meses de almacenamiento en el pozo.

1. Identificación de los aislados de BAL recuperadas de chicha y su distribución durante el proceso de elaboración

La identificación de los aislados se realizó mediante técnicas moleculares basadas en amplificación por PCR: perfiles ISR, perfiles RAPD, secuenciación del gen de RNAr 16S y PCR específica de especie.

En primer lugar, para la adscripción de los aislados a nivel de género, se amplificó la región ISR que se encuentra entre los genes de RNAr 16S y 23S (Chenoll et al., 2003). Se obtuvieron perfiles que constaban de una a cinco bandas, con tamaños moleculares entre 300 y 1000 pb y se compararon con los perfiles de 132 cepas de referencia existentes la base de datos del laboratorio (IATA-UVEG) (Chenoll et al., 2007) lo que permitió su adscripción a los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus/Pediococcus*, *Weissella*, *Lactococcus* y *Enterococcus*. A continuación, se determinaron los perfiles RAPD de los aislados de cada género, incluyendo cepas de referencia de diferentes especies de los géneros identificados (ver apartado 2.2.2 de la sección Material y Métodos), y se realizaron los agrupamientos para la adscripción a especie y la diferenciación a nivel intraespecífico.

El análisis de los agrupamientos obtenidos por la combinación de los perfiles electroforéticos de ISR y RAPD-M13 de BAL de las dos producciones de chicha se muestra en la Figura 3-C1, para la producción M, y en la Figura 4-C1, para la producción T.

En la chicha M, los 27 aislados del género *Enterococcus* quedaron agrupados en tres grupos, con 3, 6 y 17 aislados, más un aislado sin agrupar (Fig. 3-C1 A), solo el grupo de 6 cepas incluía la cepa tipo *E. faecium* CECT 410^T. Los 34 aislados de *Lactobacillus* se agruparon en cinco grupos, de los cuales tres incluían cepas de referencia de las especies *Lb. plantarum* (CECT 748^T, CECT 6000, CECT 4674 y CECT 4219), *Lb. brevis* (CECT 4121) y *Lb. pentosus* (CECT 4023^T) (Fig. 3-C1 B). Por su parte, los aislados adscritos al género *Leuconostoc* se agruparon en

Capítulo 1. Resultados

cinco grupos (Fig. 3-C1 C) de los cuales uno incluía la cepa tipo de *Lc. mesenteroides*, 219^T, y otro la cepa de referencia de *Lc. lactis* (CECT 4173^T). Para los aislados adscritos a *Weissella* se obtuvieron tres grupos y uno de ellos contenía la cepa tipo *W. viridescens* CECT 283^T (Fig 3-C1 D).

En la chicha T, los 196 aislados del género *Enterococcus* quedaron agrupados en ocho grupos más un aislado no agrupado (Fig. 4-C1 A) y sólo uno incluía la cepa tipo *E. faecium* CECT 410^T. Por su parte, los aislados adscritos al género *Leuconostoc* se agruparon en tres grupos (Fig. 4-C1 B), de los cuales uno incluía la cepa tipo de *Lc. mesenteroides* (CECT 219^T). Los únicos dos aislados del género *Pediococcus* (Fig. 4-C1 C) no se agruparon entre ellos.

De este modo, "a priori" se asumió que los aislados que quedaron agrupados con alguna cepa de referencia, eran miembros de la especie correspondiente.

Como tercer paso, se realizó la secuenciación del gen de RNAr 16S de al menos un representante de cada tipo de perfil electroforético por agrupamiento. Se analizaron un total de 21 secuencias de RNAr 16S de los aislados de chicha M y 19 de los aislados de chicha T y todas ellas mostraron niveles de semejanza del 99% al compararse con las secuencias públicas de las especies descritas de BAL. En las Figuras 3-C1 y 4-C1 se indica el número de cepas secuenciadas por grupo. Cuando el porcentaje de similitud de secuencia no permitió diferenciar entre especies próximas, se realizó la amplificación por PCR específica con los cebadores descritos para cada especie.

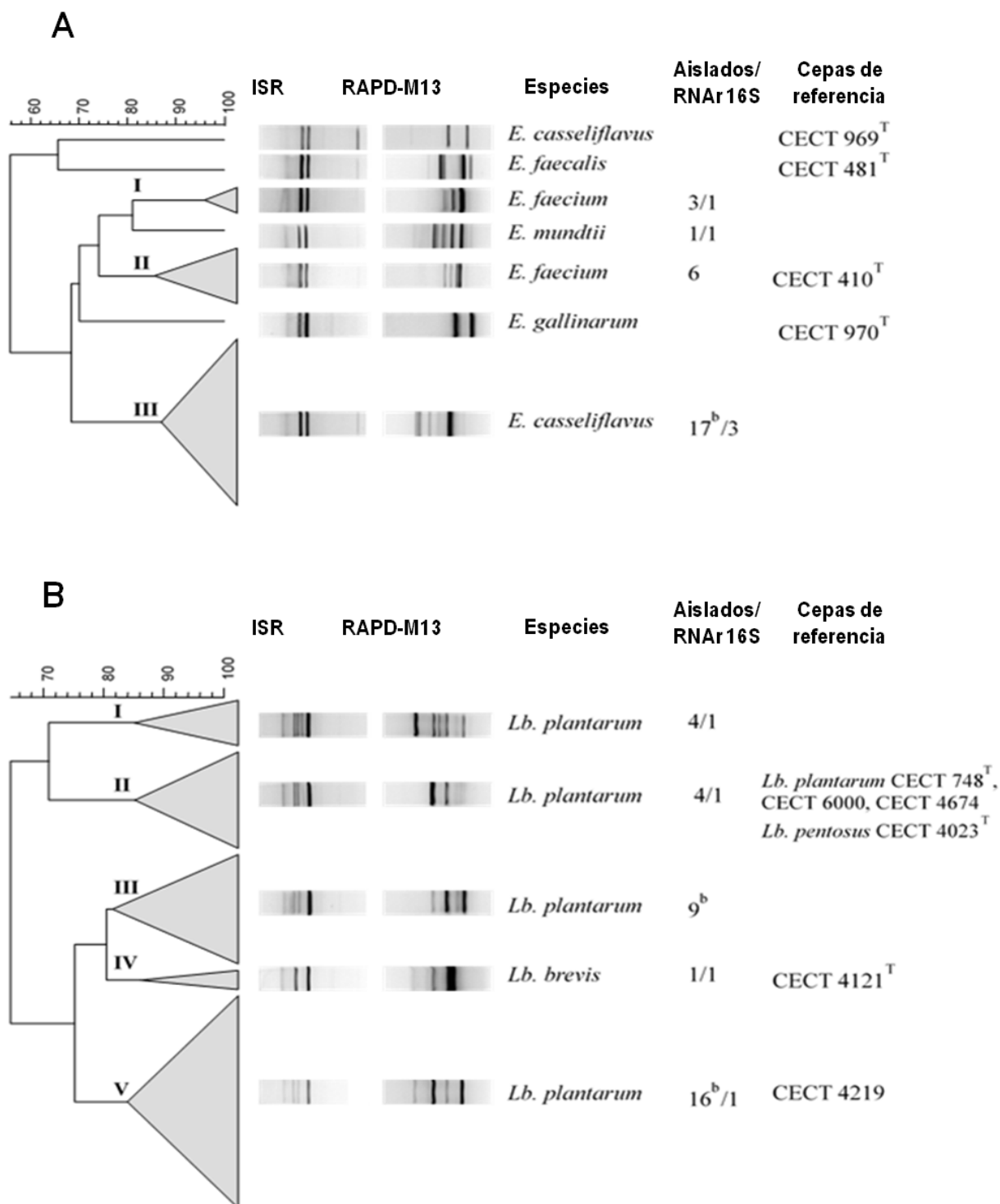


Fig. 3-C1. Dendrogramas derivados de los análisis de agrupamientos UPGMA basados en la matriz de similitud obtenida a partir de los perfiles ISR-PCR y RAPD-M13 de los aislados estudiados de la chicha M y las cepas de referencia utilizadas. Las bandas muestran el perfil representativo para cada grupo o cepa. La escala indica el porcentaje de similitud. ^bGrupo que incluye cepas en las que se ha realizado una PCR específica de especie.

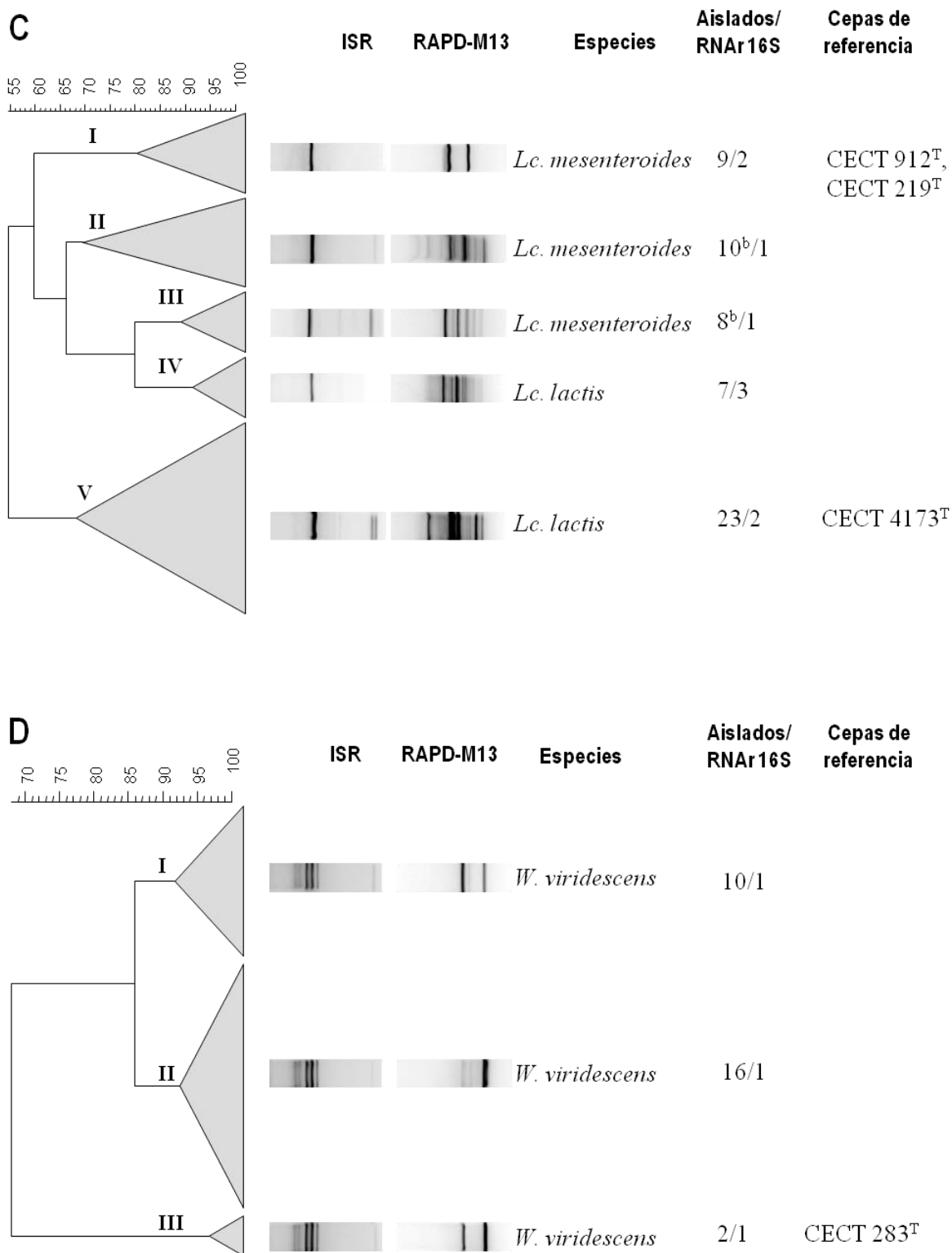


Fig. 3-C1 Cont.

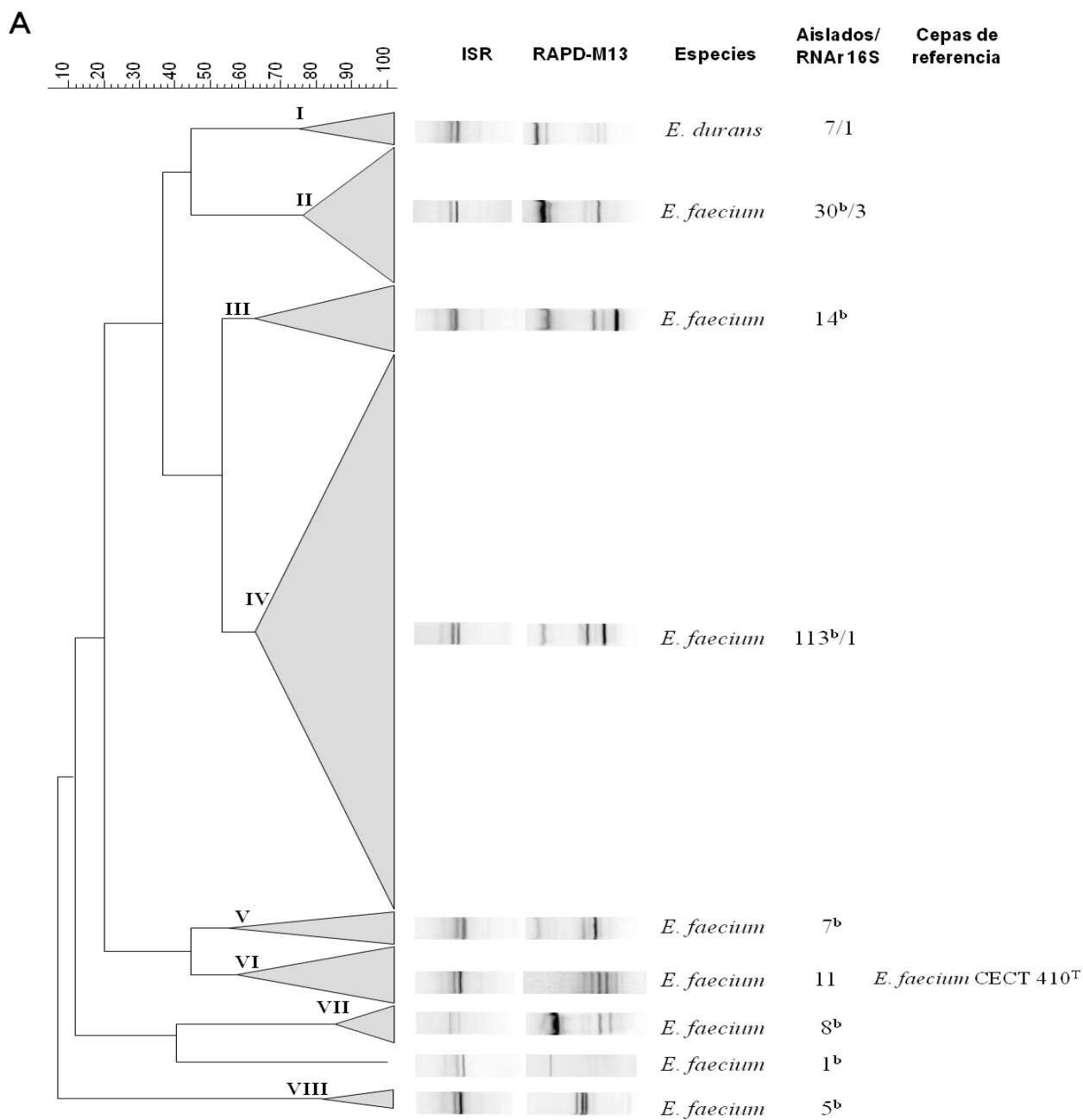


Fig. 4-C1. Dendrogramas derivados de los análisis de agrupamientos UPGMA basados en la matriz de similitud obtenida entre los perfiles ISR-PCR y RAPD-M13 de los aislados estudiados de la chicha T y las cepas de referencia utilizadas. Las bandas muestran el perfil representativo para cada grupo o cepa. La escala indica el porcentaje de similitud. ^bGrupo que incluye cepas en las que se ha realizado una PCR específica de especie.

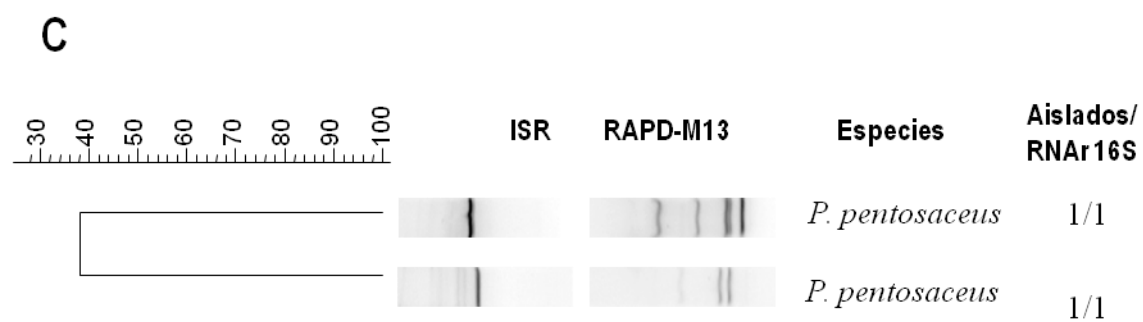
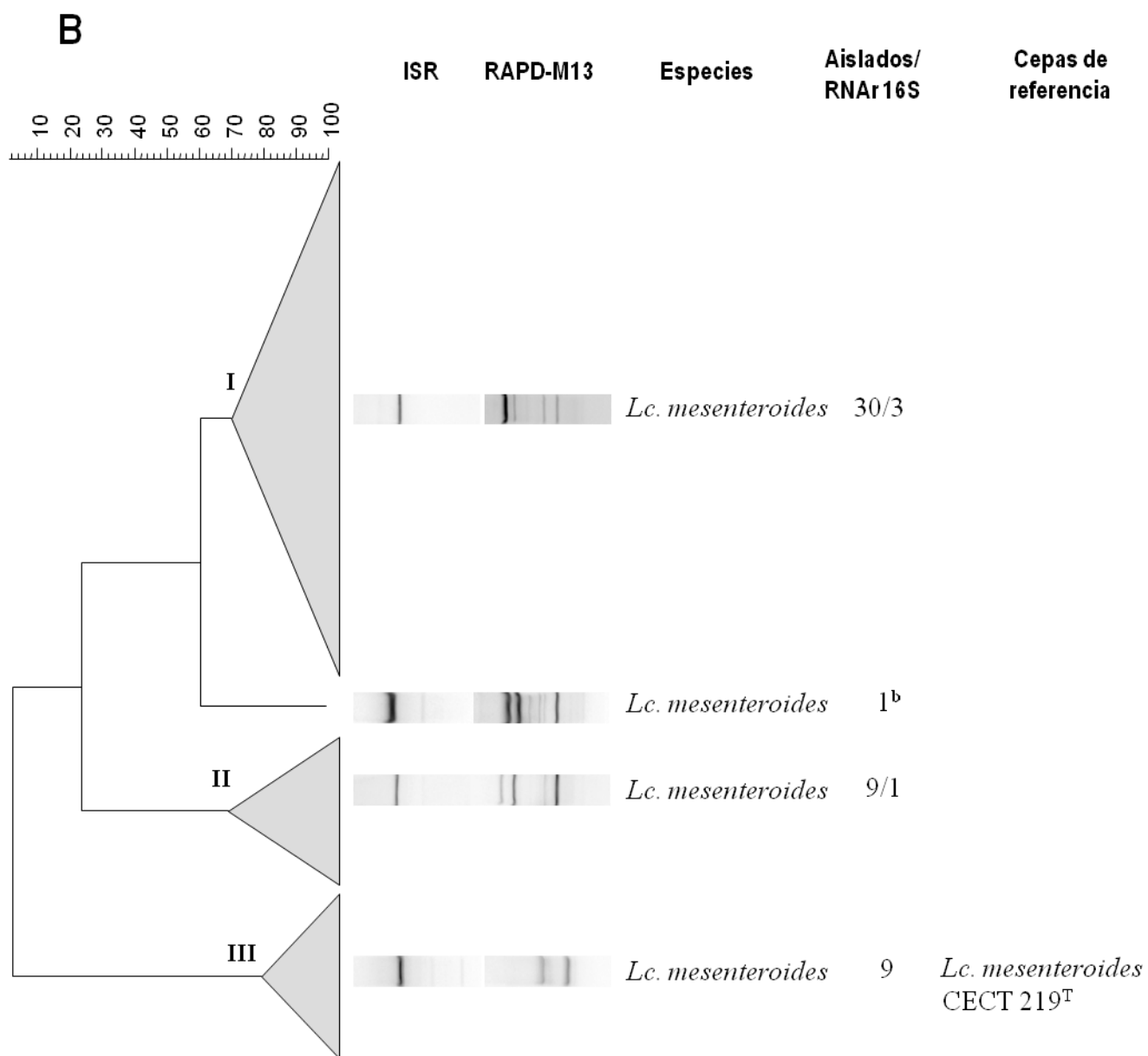


Fig. 4-C1. Cont.

Con todo ello, durante la producción de chicha M, 58 aislados resultaron pertenecer al género *Leuconostoc* y fueron identificados como *Lc. mesenteroides* (28) y *Lc. lactis* (30), 34 aislados al género *Lactobacillus* y se identificaron como *Lb. plantarum* (33) y *Lb. brevis* (1), 27 aislados pertenecían al género *Enterococcus* entre los que se identificaron las especies *E. casseliflavus* (17), *E. faecium* (9) y *E. mundtii* (1), y por último, 28 aislados del género *Weissella* se identificaron todos ellos como *W. viridescens*. Por su parte, durante la producción de chicha T, se recuperaron 196 aislados del género *Enterococcus* que pertenecían principalmente a la especie *E. faecium* (189 aislados) y una pequeña proporción a *E. durans* (7 aislados), y también se recuperaron 48 aislados del género *Leuconostoc*, todos ellos identificados como *Lc. mesenteroides*. Además, 2 aislados se identificaron como *Pediococcus acidilactici* mediante secuenciación del gen RNAr 16S.

El proceso de elaboración de las dos producciones de chicha estudiadas se distribuyó en un total 10 pasos (Figura 1-C1) y los resultados obtenidos en cuanto al número de aislados de cada especie y su distribución a lo largo de dicho proceso de producción de las dos chichas estudiadas se resume en la Tabla 1-C1.

En el caso de la chicha M, por orden de abundancia se encontraron los géneros *Leuconostoc* (39%), *Lactobacillus* (23%), *Weissella*, con una sola especie, *W. viridescens* (20%) y *Enterococcus* (18%). Los aislados de *Lactobacillus* se obtuvieron principalmente tras el paso de pre-fermentación (M5) y en la capa gelatinosa (M8). Por su parte, en la capa superior del líquido (M7) y en la capa gelatinosa (M8) se recuperaron muchos aislados del género *Leuconostoc*. En cuanto a los representantes de la especie *W. viridescens*, se recuperaron sobre todo en los momentos en que se añadía harina de maíz (muestras M2 y M6). Los aislados pertenecientes al género *Enterococcus* se recuperaron al principio (M1) y en el producto final (M10).

En el caso de la producción de chicha T, los aislados de BAL recuperados en mayor número pertenecían a las especies del género *Enterococcus*, comprendiendo el 79% de los mismos, y la especie *E. faecium* se encontró en todas las muestras, a excepción de la última (T10). Asimismo, el 20% del total de aislados se asignaron a la especie *Lc. mesenteroides* que se detectó en todas las muestras del proceso de elaboración. Los únicos dos aislados de la especie *P. acidilactici* representaron el 1% de los aislados de chicha T y se recuperaron de las muestras T1 y T7f.

2. Identificación de los aislados de BAL recuperados de tocosh y su distribución en las muestras estudiadas

Para la identificación de los aislados de BAL provenientes de tocosh se siguió la misma aproximación descrita para los de chicha. En primer lugar, la amplificación por PCR de la ISR dio lugar a perfiles de una a cinco bandas con tamaños desde 300 a 1000 pb, que correspondían a los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus*.

A continuación, se realizó el análisis de agrupamiento correspondiente a la combinación de los perfiles electroforéticos de ISR y de RAPD-P2 y RAPD-P16 (Samaržija et al., 2002), para cada género, cuyo resultado se muestra en la Figura 5-C1.

Todos los aislados adscritos al género *Leuconostoc*, excepto uno, quedaron agrupados en tres grupos (Fig. 5-C1 A) y cada uno de ellos incluía la cepa tipo de una de las sub-especies de la especie *Lc. mesenteroides*: *Lc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* CECT 912^T, *Lc. mesenteroides* subsp. *cremoris* CECT 872^T y *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CECT 219^T.

En el caso de los aislados adscritos al género *Lactobacillus*, se agruparon en cinco grupos, más otros cinco aislados que quedaron sin agrupar (Fig. 5-C1 B). Solo un aislado se agrupó con la cepa tipo de la especie *Lb. sakei* (CECT 906^T).

En base a los agrupamientos se seleccionaron 66 aislados, como representantes de los diferentes perfiles de RAPD observados, para la secuenciación del gen RNAr 16S. Todas las secuencias mostraron niveles de semejanza del 99% al compararse con las bases de datos públicas de las especies descritas de BAL.

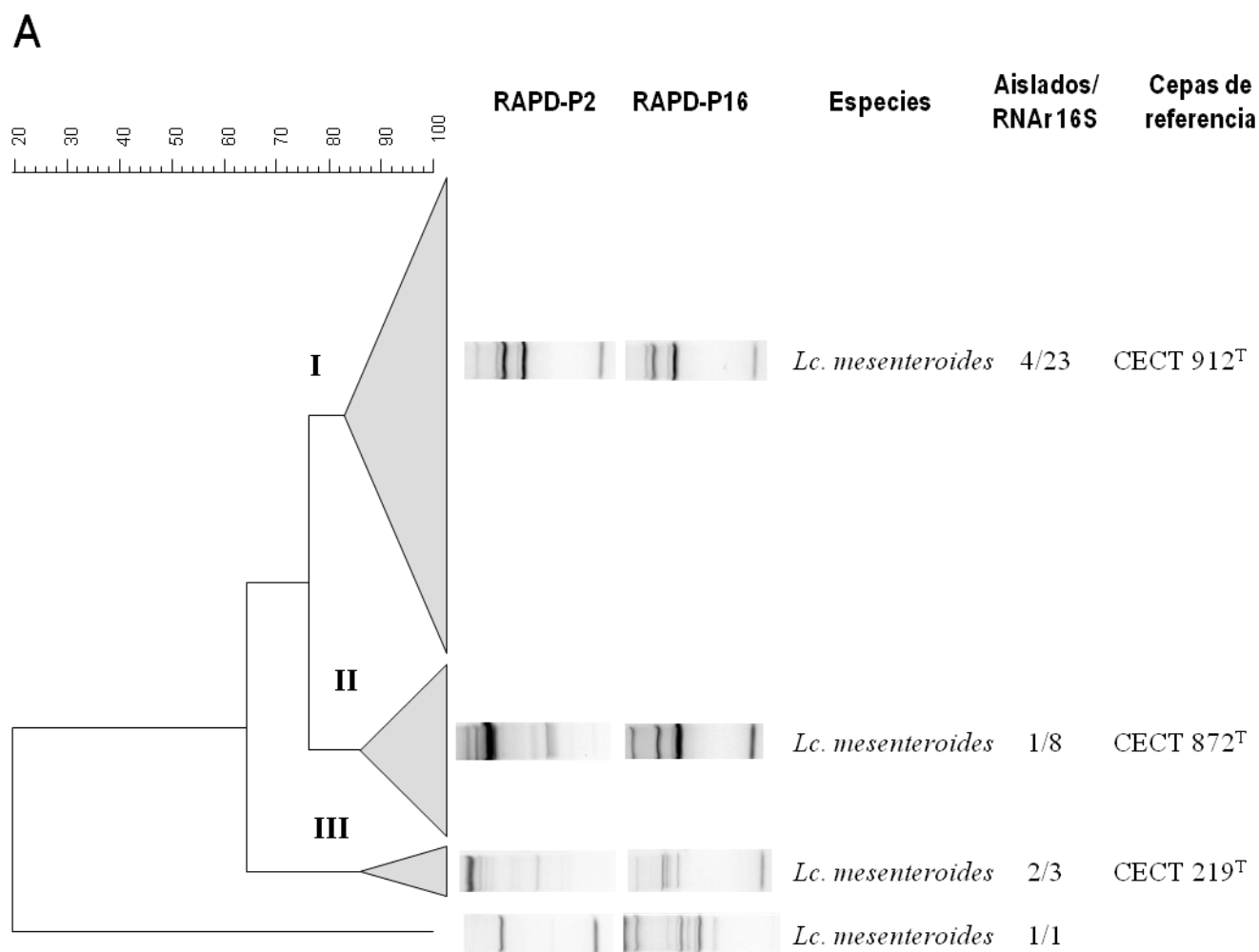


Fig. 5-C1. Dendrogramas derivados de los análisis de agrupamientos UPGMA basados en la matriz de similitud obtenida a partir de los perfiles ISR-PCR, RAPD-P2 y RAPD-P16 de los aislados estudiados de tocosh y las cepas de referencia utilizadas. Las bandas muestran el perfil representativo para cada grupo o cepa. La escala indica el porcentaje de similitud.

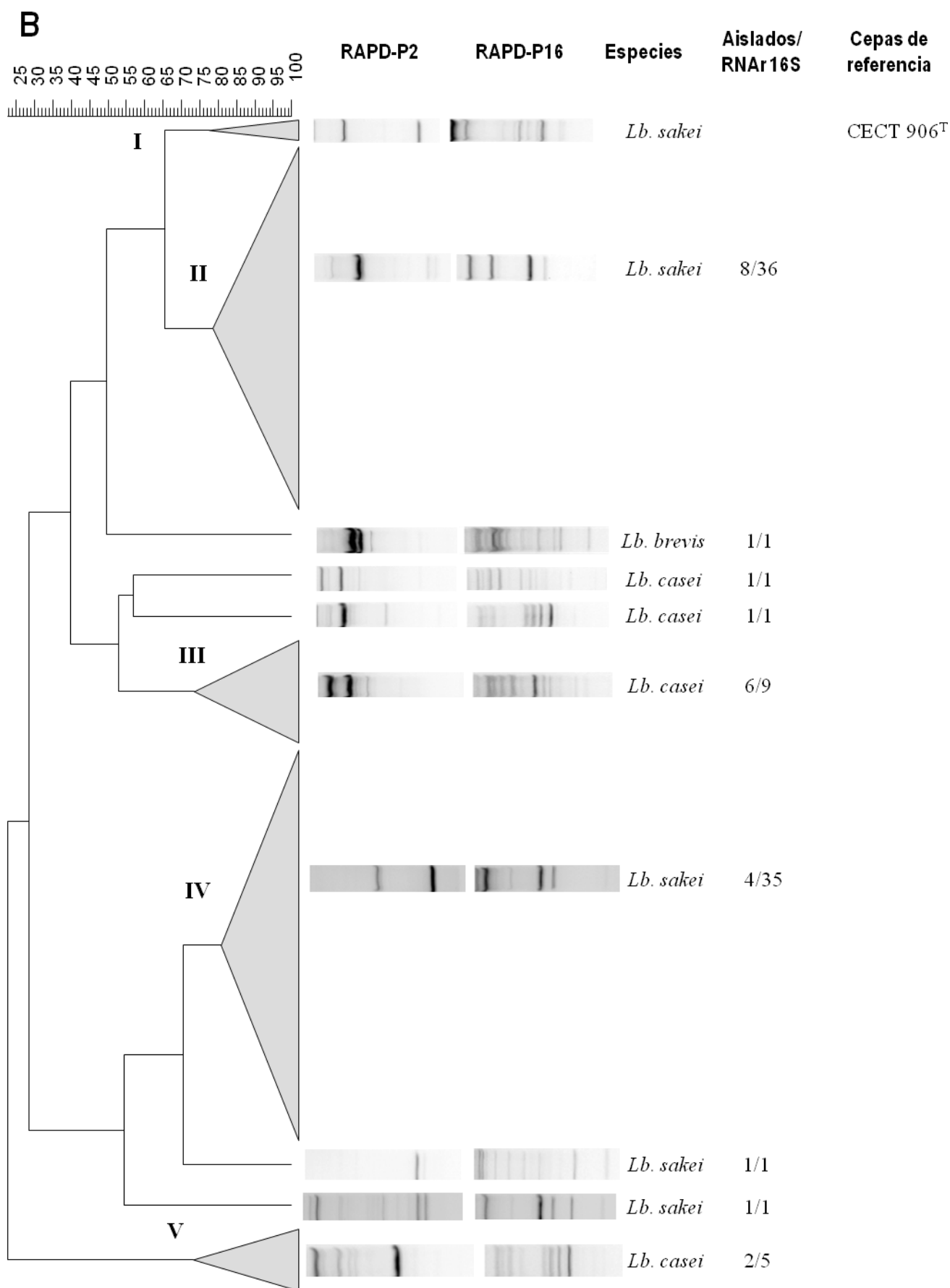


Fig. 5-C1. Cont.

Capítulo 1. Resultados

Como resultado, los 93 aislados pertenecientes al género *Lactobacillus* se identificaron como miembros de las especies *Lb. brevis* (1), *Lb. casei* (16), *Lb. farciminis* (1), *Lb. fermentum* (1) y *Lb. sakei* (74). Por su parte, todos los aislados asignados al género *Leuconostoc* (59) fueron identificados como *Lc. mesenteroides*.

La distribución de las especies identificadas en las tres muestras de tocosh se detalla en la Tabla 2-C1. Como se puede observar, los aislados de *Lc. mesenteroides* procedían fundamentalmente de las patatas frescas y de la muestra de un mes de almacenamiento, de la que también se recuperó *Lb. sakei*. En la muestra de tocosh de 8 meses, la mayoría de los aislados pertenecían a especies del género *Lactobacillus*, entre las que se encontraban *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. farciminis* y *Lb. fermentum*, mientras que sólo se recuperó un aislado de *Lc. mesenteroides*.

Tabla 2-C1. Aislados de BAL recuperados de patatas frescas, 1 mes y 8 meses de lotes de tocosh.

Muestras	T1	T2	T3	
Tiempo de almacenamiento (meses)	0	1	8	TOTAL
Número de aislados	41	46	64	152 (%)
<i>Lactobacillus</i>	10	19	64	93 (61)
<i>Lb. brevis</i>			1	1 (0.7)
<i>Lb. casei</i>			16	16 (11)
<i>Lb. fermentum</i>			1	1 (0.7)
<i>Lb. sakei</i>	10	19	45	74 (49)
<i>Lb. farciminis</i>			1	1 (0.7)
<i>Leuconostoc</i>	31	27	1	59 (39)
<i>Lc. mesenteroides</i>	31	27	1	59 (39)

Discusión

Al analizar las especies de BAL identificadas en las dos producciones de chicha que se incluyen en el presente trabajo, se encontraron evidentes diferencias entre la chicha M y la T que pueden deberse a distintas prácticas durante el proceso de elaboración, así como a los materiales de partida utilizados por los productores locales. Se observó que los aislados pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* fueron los más numerosos de la chicha M, mientras que en la chicha T fueron los aislados de *Enterococcus*. En el caso del tocosh, al inicio de la producción, también se recuperaron representantes de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* en las patatas frescas y en las muestras de un mes de almacenamiento de tocosh. Son varios los estudios que han descrito la dominancia del género *Lactobacillus* en fermentaciones espontáneas de alimentos a base de maíz (Abriouel et al., 2006; Schoustra et al., 2013; De Vuyst et al., 2014; Pérez-Cataluña et al., 2017) y en otras fermentaciones espontáneas de sustratos amiláceos (Ruiz-Rodríguez et al., 2016; Jiménez, Yépez et al., 2018), mientras que las especies del género *Leuconostoc* se han encontrado como poblaciones secundarias en otros productos fermentados tradicionales basados en vegetales (Jung et al., 2011; Schoustra et al., 2013; De Vuyst et al., 2014).

En la elaboración de la chicha, tras el paso de concentración y hervido de la capa gelatinosa (M9), *Lb. plantarum* resultó ser la especie mayoritaria lo que sugiere la buena adaptación de dicha especie a las condiciones cambiantes a lo largo de la elaboración de la chicha, y concuerda con el hecho de que la región genómica descrita en el trabajo de Kleerebezem et al. (2003), responsable del metabolismo de carbohidratos, presente una elevada adaptabilidad en esta especie bacteriana. La elevada diversidad intraespecífica observada entre las cepas de *Lb. plantarum* aisladas en de chicha (Fig. 3-C1) está también en consonancia con su rápida adaptabilidad, como se muestra en el trabajo de Molenaar et al. (2005).

En la producción de chicha M, las especies *Lc. lactis* y *Lc. mesenteroides* forman una parte importante de los aislados recuperados, junto a *Lc. mesenteroides* en la producción de chicha T. Esta especie también se ha descrito en productos vegetales como masas ácidas (De Vuyst et al.,

2014), bebidas alcohólicas fermentadas (Escalante et al., 2008) y otros productos fermentados vegetales (Amoa-Awua et al., 2005; Jung et al., 2011). Otro de los miembros de la familia *Leuconostacaceae* encontrado es el género *Weissella*. Las especies de este género se encuentran en hábitats diversos como el suelo, vegetales frescos y fermentados, así como en productos cárnicos (Koort et al., 2006; Justé et al., 2014). Concretamente, la presencia de la especie *W. viridescens* en la chicha M pone de manifiesto una posible contaminación cruzada durante el molido de los cereales, ya que es una especie que se aísla habitualmente de productos cárnicos (Koort et al., 2006). Además, *Lb. sakei* y *Lc. mesenteroides* fueron las dos especies de BAL con más aislados provenientes del tocosh, siendo ambas frecuentemente aisladas de materiales amiláceos como harinas de cereales, masas ácidas y vegetales tradicionales fermentados de África (De Vuyst et al., 2014).

Cabe destacar que el mayor número de aislados recuperados en la producción de chicha T fueron los enterococos, con *E. faecium* como la especie principal, que también se halló en la chicha M, en la que además se recuperaron las especies *E. casseliflavus*, *E. durans* y *E. mundtii*. La presencia de este grupo bacteriano puede deberse a contaminaciones ambientales y a la manipulación de los cereales durante el molido. De hecho, se han descrito como bacterias mesófilas comúnmente aisladas de aguas, suelos, harinas de cereales y otros materiales vegetales (De Vuyst y Neysens, 2005; Abriouel et al., 2006; Van der Meulen et al., 2007). En particular, *E. casseliflavus* y *E. mundtii* se describen como bacterias asociadas a plantas (Devriese et al., 2006). Además, la presencia de *E. faecium* podría explicarse por la adición de agua caliente al final del proceso de elaboración, ya que los enterococos se encuentran con frecuencia como contaminantes en aguas, siendo de las bacterias más termotolerantes dentro del grupo de no-esporulados. La habilidad de los enterococos para crecer en ambientes con condiciones arduas, tales como la presencia de etanol, ha sido también descrita por Capozzi et al. (2011a).

Las cepas aisladas pertenecientes a las distintas especies identificadas probablemente forman parte de aquellas que se han adaptado mejor a las condiciones del ambiente, es decir, a la disponibilidad de nutrientes, enzimas endógenos y competencia con la microbiota autóctona, siendo su capacidad competitiva la que les permite prosperar en el ecosistema (De Vuyst et al., 2014). Se trata, por tanto, de buenas candidatas para investigar su potencial biotecnológico.

CAPÍTULO 2.

**Caracterización biotecnológica de los
aislados de BAL.**

Las BAL son los microorganismos responsables de la fermentación láctica en numerosos alimentos y bebidas fermentadas (Stiles y Holzapfel, 1997; Tamang et al., 2016), la cual constituye un mecanismo seguro y económico de preservar matrices alimentarias altamente perecederas, que ha sido utilizado tradicionalmente, dando lugar a una amplia variedad de alimentos fermentados. Además, gracias a la acción de las BAL, dichas fermentaciones proporcionan otros beneficios, como son la mejora de sabor, de textura y del valor nutricional de los productos resultantes (Leroy y De Vuyst, 2004; Waters et al., 2015).

Entre las actividades metabólicas con interés biotecnológico que presentan las BAL están: la producción de enzimas, amilasas y fitasas, la producción de EPS y la producción de vitaminas, como los folatos y la riboflavina. Dichas capacidades son de especial interés para la industria agroalimentaria lo que promueve la caracterización biotecnológica de BAL procedentes de alimentos fermentados a la búsqueda de cepas con propiedades destacables para la formulación de nuevos alimentos i.e. con propiedades beneficiosas para la salud desde un punto de vista nutricional (Díaz-Ruiz et al., 2003; Anastasio et al. 2010; LeBlanc et al. 2011; Capozzi et al., 2012).

La actividad amilolítica ha sido descrita en cepas del género *Lactobacillus* aisladas de productos fermentados tradicionales de diferentes tipos y orígenes, entre ellos, un alimento fermentado de pescado y arroz de Filipinas (Olympia et al., 1995) o, más recientemente, de alimentos tradicionales africanos basados en fermentación de yuca y granos de maíz (Sanni et al., 2013). La búsqueda de BAL con actividad amilolítica se realiza habitualmente en alimentos fermentados provenientes de materias primas vegetales con alto contenido en almidón. No obstante, teniendo en cuenta que la hidrólisis del almidón puede dar lugar a la liberación de nutrientes esenciales en las fermentaciones naturales de sustratos amiláceos, el estudio de la fisiología de BAL no lácteas es importante con vistas al desarrollo de nuevos cultivos iniciadores específicos para su uso en procesos, tanto a pequeña escala como a nivel industrial, que impliquen materias primas amiláceas (Oguntoyinbo y Narbad, 2012).

Otra de las actividades interesantes desde el punto de vista biotecnológico es la capacidad que tienen muchas BAL para sintetizar polisacáridos extracelulares o EPS, los cuales pueden ser liberados al ambiente dando lugar a un aspecto viscoso o mucoso. Aunque la mayoría de las BAL sintetizan hetero-exopolisacáridos normalmente compuestos por galactosa, glucosa y ramnosa (Welman y Maddox, 2003), otras son productoras de homo-exopolisacáridos, como por ejemplo los α -glucanos (el dextrano, el reuterano o el mutano) que contienen únicamente glucosa en su composición (Monsan et al., 2001), y son sintetizados, a partir de sacarosa, por enzimas llamados glucan-sacarasas extracelulares, difiriendo entre ellos en el tipo de enlace α -glicosídico que contienen (Kralj et al., 2004). Los EPS producidos por BAL tienen un papel importante en la reología y textura de productos lácteos fermentados (Welman y Maddox, 2003), en masas de sorgo (Galle et al., 2012) y, concretamente los homo-EPS, se han utilizado principalmente en fermentaciones de productos no-lácteos, como es el caso de los dextranos producidos por *Lc. mesenteroides* y *Weissella* ssp., los cuales afectan positivamente a la reología de la masa y a la textura del pan (Di Cagno et al., 2006; Waldherr y Vogel, 2009). Además, para algunos EPS producidos por BAL también se han descrito efectos prebióticos (Hongpattarakere et al., 2012) así como otros efectos beneficiosos para la salud, como la inmunoestimulación y la reducción de los niveles de colesterol en sangre (Welman y Maddox, 2003).

El papel de las BAL en la reducción de fitatos es otra de las actividades relevantes que puede resultar interesante para el diseño de alimentos funcionales. El ácido fítico (o ácido hexa fosfórico de inositol) es un compuesto orgánico que se encuentra en muchos granos de cereales, semillas y legumbres. La forma iónica, el fitato, es una molécula muy estable con afinidad por componentes de los alimentos que tienen cargas positivas, como los minerales y las proteínas, de modo que afecta a las características nutricionales de los mismos. La presencia de fitato en la dieta puede tener un efecto adverso en la asimilación de muchos minerales (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y Mn^{2+}) (López et al., 2000), ya que se forman complejos insolubles entre el fitato y los minerales, pasando a formas no absorbibles por el tracto gastrointestinal (Bohn et al., 2008). Además, el fitato interacciona inespecíficamente con enzimas como la tripsina, la α -amilasa, la pepsina o la β -galactosidasa, disminuyendo su actividad. Por todo ello, es considerado como un antinutriente. En las fermentaciones ácido lácticas de alimentos basados en cereales se ha constatado una reducción significativa del fitato, así como la consecuente mejora de la solubilidad de los minerales presentes (López et al., 2000). El fitato se degrada específicamente por una familia de enzimas llamadas fitasas, que son producidas por algunos seres vivos, como

es el caso de algunas plantas y microorganismos (Sandberg y Andlid, 2002). No obstante, aunque hasta el momento no se ha descrito en la literatura la presencia de fitasas en ninguna cepa de BAL, sí se han realizado diversos estudios sobre la capacidad de las BAL para degradar el fitato (Sreeramulu et al., 1996; De Angelis et al., 2003; Carrizo et al., 2016), en forma de actividades degradadoras de fitato extracelulares. Sin embargo, también se ha sugerido que la reducción del contenido en fitato causada por la fermentación láctica de alimentos vegetales pueda deberse, en gran medida, a las fitasas endógenas de las plantas que, a su vez, presentan un rango de pH de reacción (4,5-5,5) alcanzable gracias a la acción de las BAL. Otro trabajo, llevado a cabo por Kayodé et al. (2007), describió la reducción del contenido de fitato por acción de una co-fermentación de levaduras y BAL en la producción de cerveza africana de sorgo, mediante la degradación del fitato a penta-fosfato de inositol y orto-fosfato inorgánico. En definitiva, estas evidencias sugieren que las BAL producen un ambiente adecuado para la hidrólisis de compuestos de tipo anti-nutriente y, además, contribuyen a esta degradación en algunos casos con enzimas de su propio metabolismo.

Por su parte, las vitaminas son un grupo diverso de compuestos que los animales son incapaces de sintetizar pero, al ser esenciales, deben ser adquiridas a partir de una fuente exógena, como lo es la microbiota intestinal o, asimismo, la dieta. Se encuentran clasificadas en dos grupos, las liposolubles (vitaminas A, D, E y K), y las hidrosolubles, que incluyen la vitamina C, la biotina (vitamina H o B7) y el grupo de vitaminas B, tiamina o B1, riboflavina o B2, niacina o B3, ácido pantoténico o B5, piridoxina o B6, ácido fólico o B9 y cobalamina o B12. A modo general, las vitaminas hidrosolubles actúan como coenzimas, frecuentemente como transportadores de un grupo químico particular (Basu y Dickerson, 1996). Aunque una dieta equilibrada cubre los requerimientos de vitaminas, en la actualidad se siguen diagnosticando, incluso en los países desarrollados, casos de deficiencias nutricionales frecuentemente debidas a la ingesta reducida de ciertas vitaminas, lo que puede causar alteraciones en la salud de los grupos de población más susceptibles (Mensink et al., 2013). A pesar de que muchos organismos procariotas presentan requerimientos nutricionales en cuanto a estas vitaminas, la capacidad de sintetizar vitaminas del grupo B es común entre las bacterias y, esta habilidad natural, puede ser potencialmente explotada, ya sea para reemplazar la costosa síntesis química de vitaminas para la fortificación de alimentos o para realizar un enriquecimiento en el propio alimento mediante la fermentación del mismo. Por tanto, a la hora de caracterizar nuevas cepas bacterianas, su capacidad de sintetizar vitaminas se suma a las propiedades tecnológicas y funcionales de

interés para la determinación en estos microorganismos, con vistas a su aplicación en la formulación de un alimento nutricionalmente mejorado.

La riboflavina, también conocida como vitamina B2, es de tipo hidrosoluble y se trata de un componente central y crucial en el metabolismo celular ya que actúa como precursor del flavin-mononucleótido (FMN) y del flavin-adenina-dinucleótido (FAD), dos coenzimas claves en el transporte de poder reductor en las reacciones tipo redox de enzimas como la nicotinamida-adenina-dinucleótido deshidrogenasa (NADH) (LeBlanc et al., 2011).

La cantidad diaria recomendada (CDR) media de riboflavina es alrededor de 1,3 mg/día (Institute of Medicine, 1998; "European Food Information Council", 2006; Capozzi et al., 2012). En las dietas occidentales, la leche y los productos lácteos contribuyen, principalmente, a la ingesta diaria de riboflavina, además de la levadura, los cereales, las carnes, los pescados grasos y los vegetales de hoja. Los productos provenientes de cereales contienen niveles bajos en riboflavina debido a la pérdida de la vitamina durante el procesado de los granos. No obstante, las prácticas de fortificación hacen de algunos panes y cereales buenas fuentes de riboflavina (Powers, 2003). Por tanto, al igual que para otras vitaminas, el contenido de riboflavina en los productos lácteos y de origen vegetal dependerá de las tecnologías de procesado de los alimentos, pero también de la acción de los microorganismos utilizados durante las fermentaciones alimentarias (LeBlanc et al., 2011).

La deficiencia de riboflavina o arriboflavinosis se asocia con alteraciones de la visión, alteraciones del desarrollo de los huesos durante el crecimiento, aumento de riesgo cardíaco (Moat et al., 2003) y anemia (Shi et al., 2014), entre otros desórdenes. La deficiencia de riboflavina puede generar daños hepáticos y dérmicos, así como cambios en el metabolismo de la glucosa a nivel cerebral (LeBlanc et al., 2011). A pesar de la gran variedad de fuentes de vitaminas, la arriboflavinosis persiste tanto en los países en vías de desarrollo, por una ingestión insuficiente de alimento (Blanch et al., 2002), como en los países más industrializados por el seguimiento de dietas no equilibradas en las que no se ingieren carne ni productos lácteos (LeBlanc et al., 2011). Al menos en estos casos, y para grupos específicos de la población, sería recomendable la ingestión de riboflavina como suplemento en su dieta diaria.

En la ruta biosintética de la riboflavina, la guanosina trifosfato (GTP) y la D-ribulosa 5'-fosfato son los precursores de la biosíntesis microbiana de la riboflavina que ocurre a través de siete pasos enzimáticos (Bacher et al., 2002) que se muestran en la Figura 1-C2 (Fig. 1 del Capítulo 2) en un modelo de bacteria Gram positiva (*Bacillus subtilis*). En las BAL, los genes responsables de la síntesis de la vitamina B2 forman un operón único con el mismo orden que la ruta biosintética: una deaminasa específica y reductasa (*ribG*), la subunidad alfa de la riboflavina sintasa (*ribB*), un enzima bifuncional que también cataliza la formación de la 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato desde la ribulosa 5'-fosfato (*ribA*) y la subunidad beta de la riboflavina sintasa (*ribH*). Las formas biológicamente activas de la riboflavina se encuentran en los coenzimas FMN y FAD, y la conversión a las formas coenzimáticas se lleva a cabo por una flavoquinasa/FAD sintetasa bifuncional, que está codificada por el gen *ribC*.

Los análisis comparativos de genomas, realizados sobre diferentes cepas y especies de BAL, muestran que la información genética para la biosíntesis de la riboflavina no es un carácter de especie sino que depende de la cepa en cuestión (Capozzi et al., 2012).

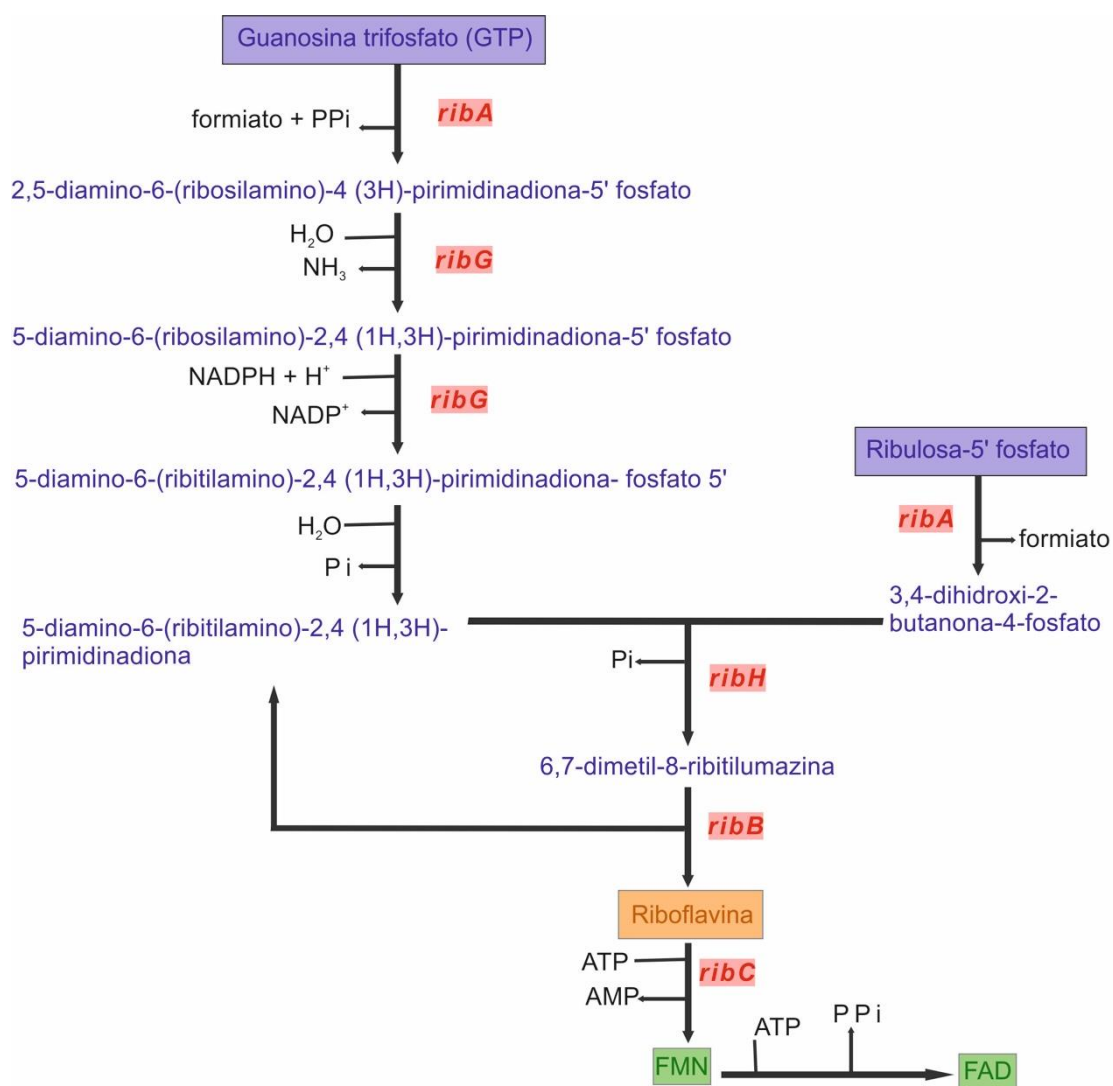


Fig. 1-C2. Ruta biosintética de la riboflavina en procariotas. Los genes codificantes de cada actividad enzimática se basan en los genes correspondientes en *B. subtilis*. Adaptado de Burgess et al., (2009).

El folato, también conocido como vitamina B9, es el descriptor general para el ácido fólico (ácido pteroilmonoglutámico) y forma parte de un grupo que contiene todos los derivados naturales del folato, incluyendo el 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) y los folilglutamatos, los cuales se encuentran de forma natural en los alimentos. En cambio, el ácido fólico es la forma sintética del folato que se utiliza para la fortificación de los alimentos y como suplemento nutricional. La actividad biológica del folato contempla funciones esenciales del metabolismo celular, tales como la replicación del DNA, la reparación, metilación y síntesis de nucleótidos, y la síntesis de algunas vitaminas y aminoácidos. De hecho, la deficiencia de folato se ha relacionado con muchas enfermedades, desde el Alzheimer hasta alteraciones coronarias, osteoporosis, aumento del riesgo de cáncer colon-rectal, pérdida de audición y defectos del tubo neural, entre otros desórdenes (Rossi et al., 2011).

Las fuentes principales de folato son los vegetales verdes de hoja, los productos lácteos y los cereales. No obstante, antes de su comercialización, la mayoría de ellos sufren procesos industriales que pueden dar lugar a la pérdida de la vitamina, por lo que varios países introdujeron fortificaciones obligatorias de ácido fólico en los alimentos (LeBlanc et al., 2011). A pesar de que dicha fortificación ha mostrado efectos beneficiosos, los suplementos sintéticos se metabolizan en el hígado y lo saturan, a diferencia de los folatos naturales que son digeridos en el intestino; el ácido fólico no metabolizado puede llegar a provocar diversos problemas de salud, entre ellos, el enmascaramiento de manifestaciones hematológicas debidas a la deficiencia en vitamina B12 (Iyer y Tomar, 2009).

Por su parte, los folatos naturales producidos por algunas bacterias, como los tetrahidrofolatos, pueden considerarse como una alternativa válida a los programas de fortificación con ácido fólico, ya que, ante las deficiencias en vitamina B12, no provocan el efecto mencionado. Concretamente, el 5-MTHF se encuentra frecuentemente en alimentos lácteos fermentados, incluyendo el yogur, que contienen concentraciones de folatos más elevadas cuando se comparan con leches no fermentadas. Dado que este fenómeno está asociado a los procesos de fermentación láctica, ha sido investigado durante los últimos años y varios estudios han reportado la producción de folatos por parte de distintas especies BAL. A pesar de que *Streptococcus thermophilus* es la especie de referencia en la síntesis de folatos, también se ha observado dicha capacidad en cepas de *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lactococcus lactis* y *E. faecium*, entre otras bacterias lácticas, e incluso en bifidobacterias (Crittenden et al., 2003; LeBlanc et al., 2010; Laiño et al., 2013).

Capítulo 2. Introducción

Se han observado diferencias en la capacidad de sintetizar folatos a nivel de cepa que pueden ser explicadas, por una parte, porque algunas cepas retienen el folato intracelularmente mientras que otras son capaces de excretar la vitamina casi por completo (Iyer et al., 2010) y, por otro lado, porque la producción de folatos en las BAL parece, además, estar determinada por la composición del medio de cultivo y las condiciones de crecimiento (Meucci et al., 2018).

La ruta biosintética del folato se ha descrito en BAL e incluye siete pasos consecutivos que se detallan en la Figura 2-C2. Al igual que para la riboflavina, el precursor es la GTP y, en este caso, deriva en el intermediario hidroximetil-7,8-dihidropterina fosfato (DHPPP). No obstante, la producción final del tetrahidrofolato necesita que la DHPPP se una al ácido para-aminobenzoico (pABA, o vitamina B10), de modo que la síntesis de folato *de novo* requiere también de la presencia de vitamina B10 que puede obtenerse, en plantas y bacterias, de la ruta de las pentosas fosfato. La identificación de los genes responsables de la síntesis de folato por Sybesma et al. (2004) hizo posible que se desarrollaran estrategias para incrementar el nivel de producción de la vitamina, concretamente en *Lc. lactis*, mediante el control de la sobreexpresión del gen *folKE*, que codifica para la 6-hidroximetil-dihidropterina pirofosfatasa (*folK*) y para la GTP ciclohidrolasa (*folE*), aumentando hasta 10 veces la producción de folato extracelular.

En el presente capítulo se describe la caracterización de un grupo de aislados de BAL para investigar su potencial biotecnológico, considerando propiedades con interés funcional y tecnológico. Por una parte, se estudió la presencia de las actividades enzimáticas, amilasa y degradadora de fitatos y, por otra, la producción de EPS y de vitaminas del grupo B, como el folato (vitamina B9) y la riboflavina (vitamina B2). Además, el estudio de las propiedades funcionales se complementó con la secuenciación del genoma completo de las cepas seleccionadas.

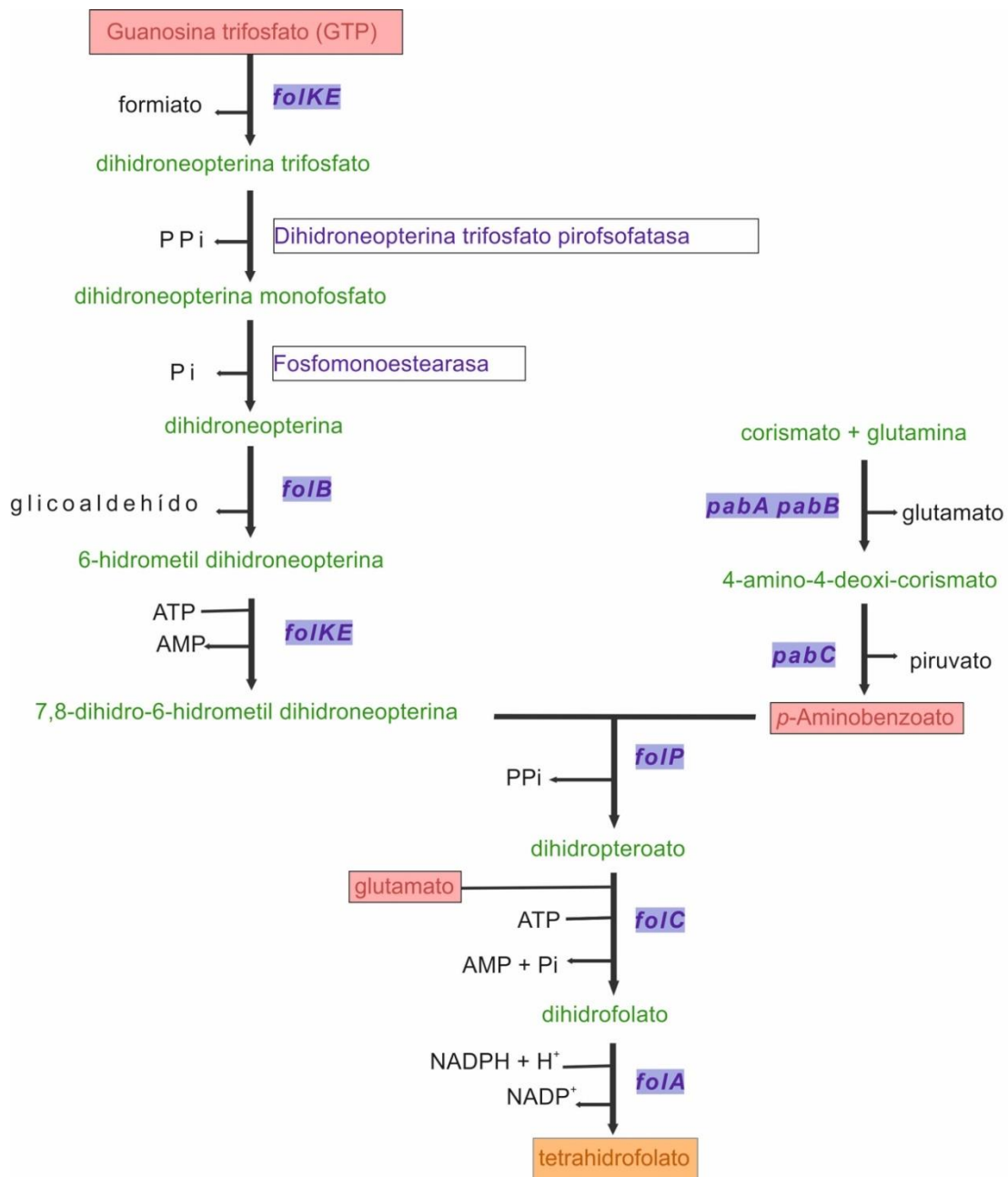


Fig. 2-C2. Ruta biosintética del folato en procariotas. Los genes codificantes de cada actividad enzimática se basan en los genes correspondientes en *B. subtilis*. Adaptado de Burgess et al., (2009).

1. Determinación cualitativa de actividades enzimáticas, producción de EPS y vitaminas del grupo B para la selección de cepas con potencial biotecnológico

Para abordar la caracterización biotecnológica de las 779 cepas, identificadas inicialmente como BAL, se realizó una selección de 311 en base a sus perfiles genéticos (RAPD) e incluyendo representantes de las diferentes especies recuperadas en cada uno de los tres alimentos fermentados tradicionales: la chicha, el tocosh y el atole.

Las cepas seleccionadas fueron: 186 de chicha (32 *Lactobacillus plantarum*, 1 *Lb. brevis*, 30 *Leuconostoc lactis*, 53 *Lc. mesenteroides*, 24 *Enterococcus faecium*, 1 *E. mundtii*, 17 *E. casseliflavus*, 2 *Pediococcus pentosaceus* y 26 *Weissella viridescens*), 62 cepas de tocosh (1 *Lb. brevis*, 7 *Lb. casei*, 1 *Lb. farciminis*, 1 *Lb. fermentum*, 30 *Lb. sakei* y 22 *Lc. mesenteroides*) cuya caracterización biotecnológica está descrita en parte en el trabajo de Jiménez, Yépez et al. (2018) (Anexo II), y 63 cepas de atole (17 *Lb. plantarum*, 4 *Lb. brevis*, 7 *Lc. pseudomesenteroides*, 15 *P. pentosaceus*, 14 *W. confusa* y 6 *W. paramesenteroides*).

Para el cribado inicial de las cepas, en primer lugar, se consideraron los resultados que se recogen en la Tablas 1-C2, 2-C2 y 3-C2, para las cepas ensayadas de cada uno de los alimentos. Dichos resultados se componen de i) los ensayos de detección en placa, consistentes en la detección de las actividades amilasa y degradadora de fitatos, ii) la capacidad de producir EPS a partir de sacarosa, y iii) los primeros pasos en la determinación de la capacidad de producir vitaminas del grupo B (folato, o vitamina B9, y riboflavina, o vitamina B2), incluyendo la detección por PCR del operón de síntesis de riboflavina.

Tabla 1-C1. Resultados obtenidos de las cepas de BAL seleccionadas para las pruebas de caracterización biotecnológica y aisladas de chicha.

Cepas (n° de totales)	Cepas positivas (%)				
	Especie	Actividad amilolítica	Producción de EPS	Actividad degradadora de fitatos	Producción de folatos
<i>Lactobacillus</i> (33)	-	1 (3)	21 (64)	30 (91)	13 (39)
<i>Lb. brevis</i> (1)	-	-	-	-	1 (100)
<i>Lb. plantarum</i> (32)	-	1 (3)	21 (66)	30 (94)	12 (38)
<i>Leuconostoc</i> (83)	-	58 (70)	37 (45)	62 (75)	10 (12)
<i>Lc. lactis</i> (30)	-	5 (17)	3 (10)	21 (70)	1 (3)
<i>Lc. mesenteroides</i> (53)	-	53 (100)	34 (64)	41 (77)	8 (15)
<i>Enterococcus</i> (42)	-	1 (2,3)	28 (67)	10 (24)	-
<i>E. casseliflavus</i> (17)	-	-	4 (24)	-	-
<i>E. faecium</i> (24)	-	1 (4,1)	23 (96)	10 (42)	-
<i>E. mundtii</i> (1)	-	-	1 (100)	-	-
<i>Pediococcus</i> (2)	-	-	1 (50)	1 (50)	1 (50)
<i>P. pentosaceus</i> (2)	-	-	1 (50)	1 (50)	1 (50)
<i>Weissella</i> (26)	-	-	-	26 (100)	2 (8)
<i>W. viridescens</i> (26)	-	-	-	26 (100)	2 (8)
Total (186)	-	60 (32)	87 (47)	129 (69)	26 (14)

*Determinado por PCR

Tabla 2-C2. Resultados obtenidos de las cepas de BAL seleccionadas para las pruebas de caracterización biotecnológica y aisladas de atole.

Cepas (n° de totales)	Cepas positivas (%)				
	Especie	Actividad amilolítica	Producción de EPS	Actividad degradadora de fitatos	Producción de folatos
<i>Lactobacillus</i> (21)	-	-	19 (90)	20 (95)	7 (33)
<i>Lb. brevis</i> (4)	-	-	4 (100)	4 (100)	-
<i>Lb. plantarum</i> (17)	-	-	15 (88)	16 (94)	7 (41)
<i>Leuconostoc</i> (7)	-	3 (43)	4 (57)	6 (86)	-
<i>Lc. pseudomesenteroides</i> (7)	-	3 (43)	4 (57)	6 (86)	-
<i>Pediococcus</i> (15)	-	1 (7)	6 (40)	13 (87)	2 (13)
<i>P. pentosaceus</i> (15)	-	1 (7)	6 (40)	13 (87)	2 (13)
<i>Weissella</i> (20)	-	18 (90)	15 (75)	20 (100)	5 (25)
<i>W. confusa</i> (14)	-	12 (86)	12 (86)	14 (100)	5 (36)
<i>W. paramesenteroides</i> (6)	-	6 (100)	3 (50)	6 (100)	-
Total (63)	-	22 (35)	44 (70)	59 (94)	14 (22)

*Determinado por PCR

Tabla 3-C2. Resultados obtenidos de las cepas de BAL seleccionadas para las pruebas de caracterización biotecnológica y aisladas de tocosh.

Cepas (n° de totales)	Cepas positivas (%)				
	Especie	Actividad amilolítica	Producción de EPS	Actividad degradadora de fitatos	Producción de folatos
<i>Lactobacillus</i> (40)	2 (5)	5 (13)	18 (45)	34 (85)	25 (63)
<i>Lb. brevis</i> (1)	-	-	-	-	-
<i>Lb. casei</i> (7)	-	-	2 (29)	2 (29)	5 (71)
<i>Lb. farciminis</i> (1)	-	-	-	1 (100)	1 (100)
<i>Lb. fermentum</i> (1)	-	-	-	1 (100)	1 (100)
<i>Lb. sakei</i> (30)	2 (6)	5 (17)	16 (53)	30 (100)	18 (60)
<i>Leuconostoc</i> (22)	5 (23)	22 (100)	14 (64)	16 (73)	19 (86)
<i>Lc. mesenteroides</i> (22)	5 (23)	22 (100)	14 (64)	16 (73)	19 (86)
Total (62)	7 (11)	27 (44)	32 (52)	50 (81)	44 (71)

*Determinado por PCR

Capítulo 2. Resultados

La presencia de actividad amilasa en las cepas de BAL estudiadas se observó en el 11% de cepas aisladas de tocosh y en ninguna de las provenientes de chicha y atole. Las cepas positivas pertenecían cinco a la especie *Lc. mesenteroides* y dos a la especie *Lb. sakei*.

Al comparar la capacidad de sintetizar EPS en las cepas estudiadas, en función del alimento de origen, las provenientes de tocosh presentaron la mayor proporción de cepas positivas (44%), observándose que todas las representantes de la especie *Lc. mesenteroides* eran capaces de producir el EPS, mientras que solamente el 17% de *Lb. sakei* fueron positivas. En segundo lugar, el 35% de cepas aisladas de atole fueron positivas, concentrándose principalmente en las cepas pertenecientes al género *Weissella*, ya que el 90% mostraron dicha capacidad, contando con las especies *W. confusa* y *W. paramesenteroides*. El 43% de los aislados de atole pertenecientes al género *Leuconostoc* mostraron la capacidad de producir EPS, todos ellos identificados como *Lc. pseudomesenteroides*, mientras que ninguno de los *Lactobacillus* aislados de dicho alimento presentó dicha propiedad. Por su parte, el 32% de las cepas de chicha son productoras de EPS, a destacar el 100% de las cepas de *Lc. mesenteroides* estudiadas, aunque también unas pocas (5%) de la especie *Lc. lactis*. Además, se observó esta capacidad puntualmente en aislados de chicha de otros géneros de BAL, en concreto en una cepa de *Lb. plantarum* y en una de *E. faecium*.

La actividad degradadora de fitatos se observó en el 70% de los aislados del atole, siendo positivos al menos el 50% de cada especie, excepto en el caso de *P. pentosaceus* con un 40% de positivos. En el caso de las cepas aisladas de tocosh la proporción no fue tan alta (52% del total), pero la mencionada actividad se observó en representantes de los dos géneros identificados en este alimento, *Lactobacillus* (45%) y *Leuconostoc* (64%). En cuanto a las cepas de chicha, la proporción total de positivos fue del 47% presentándose en miembros de la mayoría de las especies.

Por su parte, la producción de folatos resultó ser la capacidad con mayor presencia en las BAL analizadas, observándose en el 94% de cepas de atole, el 81% de cepas de tocosh y el 69% de cepas de chicha. De hecho, a excepción de las cepas de *Enterococcus* y *Pediococcus* aisladas de chicha, las cepas positivas para la producción de folatos superaron el 70% de los representantes de todos los géneros aislados.

En cuanto a la presencia de genes para la síntesis de riboflavina que fue determinada mediante amplificación por PCR del operón, resultó ser positiva en un alto porcentaje de las cepas provenientes de tocosh, observándose en el 63% de los *Lactobacillus* y en el 86% de los *Leuconostoc*. En cambio, solamente lo presentaron el 14% de las cepas de chicha y el 22% de las de atole correspondiendo, en ambos alimentos y de forma mayoritaria, a cepas de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Weissella*.

2. Determinación cuantitativa de la producción de vitaminas del grupo B y de la actividad degradadora de fitatos

Con el objetivo de evaluar, de una forma más exhaustiva, las capacidades mostradas por las cepas de BAL y seleccionar las mejores candidatas, se procedió a cuantificar la producción de vitaminas del grupo B estudiadas, el folato y la riboflavina. Además, esta evaluación también incluyó la cuantificación de la actividad degradadora de fitatos.

2.1 Cuantificación de la producción de folatos

De las propiedades estudiadas, la capacidad de producir folato resultó ser la más extendida entre las cepas de chicha, atole y tocosh. Por tanto, se procedió a la cuantificación de la producción de esta vitamina por las 138 cepas que resultaron positivas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3-C2. Las cepas que presentaron mayores niveles de producción de folato total provenían de chicha y de tocosh, determinándose concentraciones de alrededor de 90 y 100 ng/mL, en algunos casos. En cambio, las cepas de atole producían, como máximo, alrededor de 50 ng/mL. Las cepas de tocosh con mayor producción pertenecen a las especies *Lc. mesenteroides* y *Lb. sakei*, con niveles entre 30 y 115 ng/mL. Por detrás, se encuentran las cepas aisladas de chicha pertenecientes a las especies *Lc. lactis* y *Lc. mesenteroides*, con valores de producción entre 30 y 90 ng/mL, seguidas de las cepas de *E. faecium* y *Lb. plantarum* que presentaron una producción de folato de 30 a 75 ng/mL.

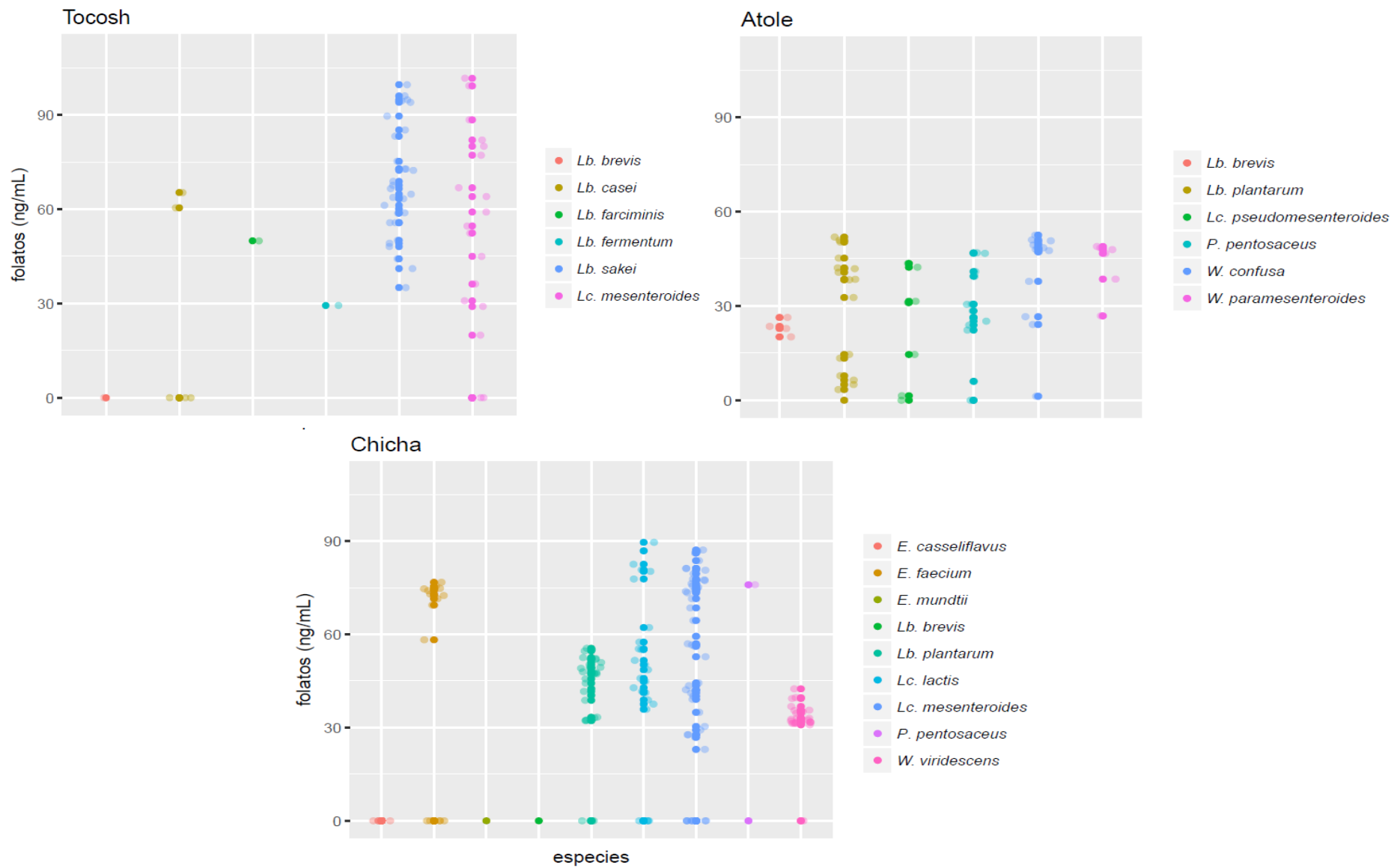


Fig. 3-C2. Niveles de producción de folato en las 311 cepas analizadas según especie y alimento de origen.

2.2 Cuantificación de la actividad degradadora de fitatos

La cuantificación de la actividad degradadora de fitatos se realizó en una selección de 70 cepas, atendiendo a los resultados obtenidos en el apartado 1 del presente capítulo, así como por ser las más prometedoras para la producción de folato. Las cepas seleccionadas provienen de tocosh y de chicha y pertenecen a las siguientes especies: 1 *Lb. brevis*, 7 *Lb. casei*, 1 *Lb. farciminis*, 1 *Lb. fermentum*, 7 *Lb. plantarum*, 30 *Lb. sakei* y 23 *Lc. mesenteroides*.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4-C2. Como puede observarse, las cepas que presentaron una importante actividad degradadora de fitatos pertenecían principalmente a las especies *Lc. mesenteroides*, *Lb. plantarum* y *Lb. sakei*. No obstante, los valores determinados abarcaban un amplio rango, siendo desde, prácticamente, nulos en algunas cepas de *Lc. mesenteroides* y *Lb. sakei* hasta de casi 400 $\mu\text{moles de Pi/min}$ en una cepa de *Lb. plantarum*. Por su parte, de las siete cepas de *Lb. casei*, sólo una presentó una elevada actividad degradadora de fitatos. En el caso de las cepas pertenecientes a las especies *Lb. brevis*, *Lb. farciminis* y *Lb. fermentum*, no se observó actividad degradadora de fitatos en este estudio.

2.3 Cuantificación de la producción de riboflavina o vitamina B2

A su vez, la producción de riboflavina por las cepas de BAL se cuantificó en la mismas 70 seleccionadas para la cuantificación de actividad degradadora de fitatos, y los resultados se muestran en la Figura 5-C2.

Las cepas con una mayor producción de la vitamina pertenecían también a las especies *Lc. mesenteroides*, *Lb. plantarum* y *Lb. sakei*. Las cepas de *Lb. plantarum* y *Lb. sakei* mostraron niveles de producción de riboflavina en un rango desde 0 a 150 ng/mL, estando, las cepas de *Lb. plantarum*, siempre por encima de los 100 ng/mL. Cabe destacar el amplio rango de valores de producción de vitamina B2 mostrado por las cepas de *Lc. mesenteroides*, desde la ausencia de producción hasta más de 450 ng/mL.

Por su parte, ninguna de las cepas de *Lb. casei* superó los 100 ng/mL para la producción de riboflavina. En el caso de las cepas pertenecientes a las especies *Lb. brevis*, *Lb. farciminis* y *Lb. fermentum*, la producción de vitamina B2 tampoco fue destacable, pues no superó los 50 ng/mL en ningún caso.

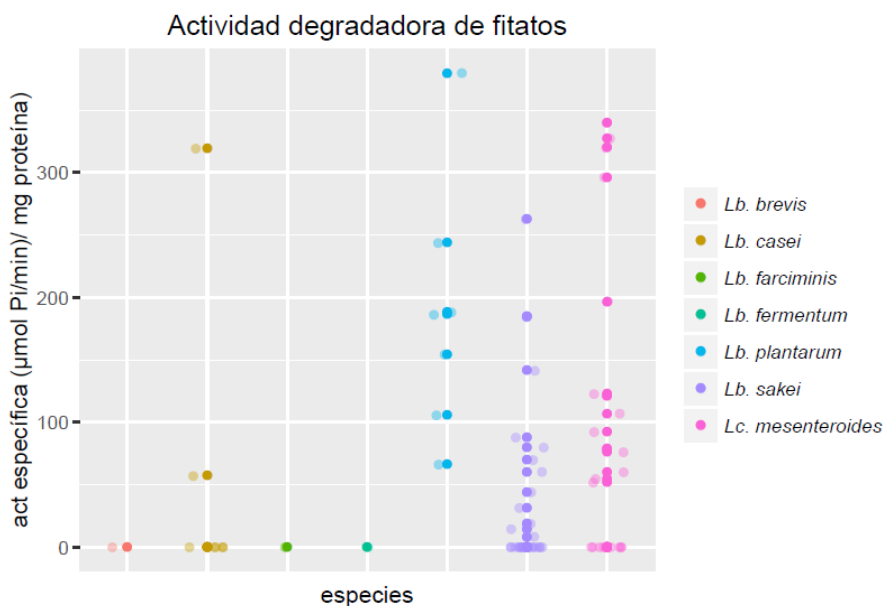


Fig. 4-C2. Niveles de la actividad degradadora de fitatos, expresada en moles de fosfato inorgánico producido por unidad de tiempo y por cantidad de proteína total, en las 70 cepas seleccionadas de chicha y tocosh según especie

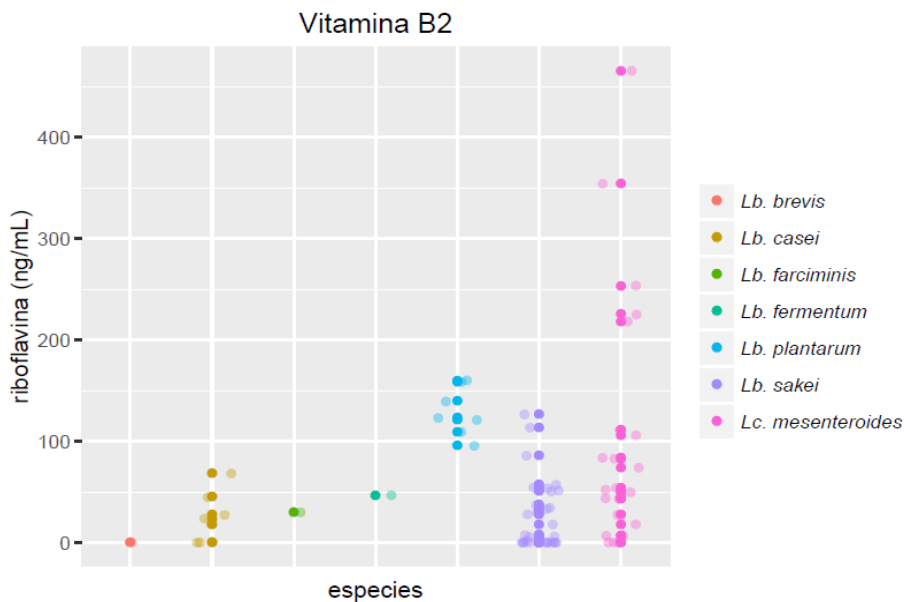


Fig. 5-C2. Niveles de producción de riboflavina en las 70 cepas seleccionadas de chicha y tocosh según especie.

3. Estudio genómico de las cepas de BAL en cuanto a la producción de vitaminas

Tras obtener los resultados de la caracterización biotecnológica de las cepas, y teniendo en cuenta las propiedades relacionadas con la calidad y seguridad alimentaria descritas más adelante en los Capítulos 3 y 4 de la presente tesis doctoral, se seleccionaron 14 cepas de BAL para la secuenciación de su genoma complet: 5 *Lb. plantarum* de chicha (M5MA1, M9MG6, M9MM1, M9MM4 y M9Y2), 3 *Lc. mesenteroides* de chicha (M8MG2, M8Y1, M9MG2b) y 3 *Lc. mesenteroides* de tocosh (T1M3, T2MM5 y T2MM6), y 2 *Lb. sakei* (T3M7, T3M3a) y un *Lb. fermentum* (T3M3b) de tocosh.

Tras la anotación de los genomas por la plataforma RAST (“Rapid Annotation using Subsystem Technology”), el estudio genómico de la producción de vitaminas consistió en determinar la presencia de los genes responsables de las rutas biosintéticas de la riboflavina y del folato, y en localizar su posición según el número PEG (“Protein Encoding Gen”) obtenido. Además, la herramienta “The SEED Viewer 2.0” permitió realizar la comparación de las secuencias de dichos genes entre las distintas cepas estudiadas. Los resultados se muestran en la Tabla 3-C2.

3.1. Análisis de la presencia de genes de la ruta de biosíntesis de riboflavina

Las cepas provenientes de chicha de *Lb. plantarum* y de *Lc. mesenteroides* presentan los cuatro genes que son necesarios para la biosíntesis de la vitamina B2: *ribH*, *ribA*, *ribB*, *ribG* (Tabla 3-C2); además, también se ha observado la presencia del gen *ribC*, que codifica para una flavoquinasa/FAD sintetasa bifuncional responsable de la conversión a las formas coenzimáticas de la riboflavina, FMN y FAD, y del gen *ypaA/ribU*, necesario para el transporte de la vitamina al interior celular (resultados no mostrados). Lo mismo ocurre con la cepa de *Lb. fermentum* y las de *Lc. mesenteroides* provenientes de tocosh. En todas las cepas positivas, la posición de los genes aparece correlativa según el número PEG, lo que confirma su localización en el mismo operón. Sin embargo, las dos cepas de *Lb. sakei* no presentan ninguno de los genes del operón de biosíntesis de la vitamina, aunque sí el gen para el transporte de la riboflavina y el gen *ribC*.

Capítulo 2. Resultados

Respecto a la concentración de riboflavina producida, todas las cepas de *Lb. plantarum* de chicha producen cantidades notables de la vitamina, superando los 100 ng/mL, siendo esto coherente con la presencia de todos los genes de biosíntesis. No obstante, a pesar de presentar el operon completo, los niveles de producción de las cepas de *Lc. mesenteroides* y *Lb. fermentum* estaban alrededor de 50 ng/mL, con la excepción de *Lc. mesenteroides* T1M3 que superó los 460 ng/mL.

Al comparar las secuencias de los genes del operón entre las cinco cepas de *Lb. plantarum* de chicha, se observó que los genes de todas ellas compartían una similitud del 100%, excepto la cepa M5MA1 en la que los valores de similitud con las demás eran: 98,11% para el gen *ribH*, 99,5% para el gen *ribA*, 99,5% para el gen *ribB* y 99,72% *ribG*, siendo la cepa M5MA1 la única que provenía de una etapa distinta del proceso de elaboración de la chicha. Al comparar con la cepa de *Lb. fermentum*, los porcentajes de similitud fueron muy bajos: 47,14% para el gen *ribH*, 55,64% para el gen *ribA*, 46,67% para el gen *ribB* y 41,36% para *ribG*.

En el caso de las cepas de *Lc. mesenteroides* de chicha, las secuencias de todos los genes presentaron una similitud del 100% entre ellas. Sin embargo, la comparación con los *Lc. mesenteroides* de tocosh mostró valores inferiores de similitud entre las secuencias, aunque nunca por debajo del 90%, excepto para el gen *ribG* que resultó ser del 67,16%. Cabe destacar que, tras el análisis del genoma, se desveló la reubicación de las cepas de chicha, inicialmente clasificadas como *Lc. mesenteroides* ssp *suionicum*, a la especie *Lc. suionicum*, lo que explicaría dichas diferencias. A pesar de que la producción de riboflavina era muy dispar entre la cepa T1M3 y las demás (Tabla 3-C2), los *Lc. mesenteroides* de tocosh también presentaron una similitud de secuencia, para todos los genes de biosíntesis de la riboflavina, del 100%.

Tabla 3-C2. Localización de los genes biosíntesis de las vitaminas riboflavina y folato y su producción por las cepas de BAL secuenciadas

Origen	Especie y cepa	Biosíntesis de riboflavina					Biosíntesis de folatos							
		<i>ribG</i>	<i>ribB</i>	<i>ribA</i>	<i>ribH</i>	(ng/mL)	<i>folE</i>	<i>folQ</i>	<i>folB</i>	<i>folK</i>	<i>folP</i>	<i>folC</i>	<i>folA</i>	(ng/mL)
Chicha	<i>Lb. plantarum</i> M5MA1	946 ^a	945	944	943	158,61	2023	2025	2021	2022	2026	2024	158/1395	54,66
	<i>Lb. plantarum</i> M9MG6	127	126	125	124	139,29	2303	2305	2301	2302	2306	2304	1389/2292	32,43
	<i>Lb. plantarum</i> M9MM1	122	121	120	119	109,17	2240	2242	2238	2239	2243	2241	2229/3123	51,96
	<i>Lb. plantarum</i> M9MM4	122	121	120	119	160,08	2193	2195	2191	2192	2196	2194	1976/2182	41,63
	<i>Lb. plantarum</i> M9Y2	122	121	120	119	122,92	2257	2259	2255	2256	2260	2258	1387/2125	40,37
	<i>Lc. mesenteroides</i> * M8MG2	703	702	701	700	ND ^b	1503	1504	1501	1502	1505	1063	769	77,27
	<i>Lc. mesenteroides</i> * M8Y1	704	703	702	701	ND	1503	1504	1501	1502	1505	1064	770	86,7
	<i>Lc. mesenteroides</i> * M9MG2b	835	834	833	832	49,67	1633	1634	1631	1632	1635	1193	901	52,12
Tocosh	<i>Lb. sakei</i> T3M7	-	-	-	-	ND	1986	1982	1988	1987	1983	1985	710/1235	63,76
	<i>Lb. sakei</i> T3M3a	-	-	-	-	ND	493	496	491	492	495	494	592/1622	49,13
	<i>Lb. fermentum</i> T3M3b	852	851	850	849	46,67	1291	1289	1293	1292	1288	1290	1619	29,37
	<i>Lc. mesenteroides</i> T1M3	632	633	634	635	465,89	-	-	-	-	-	268/542	566	26,40
	<i>Lc. mesenteroides</i> T2MM5	731	732	733	734	53,93	-	-	-	-	-	369/642	666	29,04
	<i>Lc. mesenteroides</i> T2MM6	232	231	230	229	43,57	-	-	-	-	-	321/595	297	36,18

^a Número correspondiente a “protein encoding gen” (PEG) tras la anotación de los genomas

^b No determinado

* Reclasificados como *Lc. suionicum*

3.2 Análisis de la presencia de genes de la ruta de biosíntesis de folatos

Como se observa en la Tabla 3-C2, todas las cepas de chicha, tanto los *Lb. plantarum* como los nuevos *Lc. suionicum*, presentan los seis genes necesarios para la síntesis *de novo* del tetrahidrofolato. En el caso de las cepas de tocosh, dichos genes solo están presentes en las dos cepas de *Lb. sakei* y en la cepa de *Lb. fermentum*, mientras que se encuentran ausentes en las cepas de *Lc. mesenteroides* de tocosh.

Cabe destacar que el gen *fol C* presenta dos copias en lugares distintos del genoma, ya que se encarga de dos pasos enzimáticos de la ruta de biosíntesis de los folatos y, uno de ellos, es independiente de la síntesis *de novo* de la vitamina; por tanto, dicho gen sí que se halla en las cepas que no presentan los otros cinco genes de la biosíntesis, al igual que el gen *folA*. Además, en el caso de las cepas secuenciadas pertenecientes al género *Lactobacillus*, los seis genes necesarios para la síntesis *de novo* del tetrahidrofolato se encuentran correlativos, sin embargo, en las tres cepas de *Lc. suionicum* de chicha el gen *folC* se encuentra en una localización distinta a los demás.

Al prestar atención al folato producido, parece que no hay una relación clara entre la diferencia de localización de los genes y el grado de producción de la vitamina. Por su parte, al comparar las secuencias de los genes mencionados en las cepas de la misma especie, se observó un 100% de identidad en los de *Lc. suionicum* de chicha. Lo mismo ocurría en las cepas de *Lb. plantarum* de chicha, con la excepción de la cepa M5MA1 que solo presentó 100 % de identidad para los genes *folB* y *folK*, mientras que, en la mayor parte de los genes de la ruta de síntesis *de novo* de folato, se observó un porcentaje de identidad alto (alrededor del 99%), siendo el más bajo el correspondiente a *folQ*, con un 96,84%.

En las dos cepas de *Lb. sakei* de tocosh la comparación de las secuencias de estos genes mostró que la identidad entre ellas era alta, pero menor a la de *Lb. plantarum* M5MA1 con las demás cepas de su especie, y que la identidad más baja entre las cepas de *Lb. sakei* fue, de nuevo, la correspondiente al gen *folQ*, con un 93,33%. Además, también se compararon las secuencias de todas las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus*, independientemente de su alimento de origen y se observó que, en general, presentaban porcentajes de identidad bajos; la cepa de *Lb. fermentum* de tocosh presentaba unas secuencias más similares con las cepas de *Lb. plantarum* de chicha, del 30 al 56%, que con los *Lb. sakei* del mismo origen. Además, seguía

siendo el gen *fo/Q* el que presentaba una mayor diversidad de secuencia en las cepas de *Lactobacillus*.

Como también se observó al realizar el análisis comparativo del genoma total entre las cepas secuenciadas (Fig. 6-C2), la diversidad genética ha resultado ser más evidente en las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus*. Además, se observó que los *Lb. plantarum* diferían en su genoma, significativamente, de una muestra a otra de la producción de chicha, al igual que las dos cepas de *Lb. sakei* provenientes de tocosh. Por otro lado, las cepas del género *Leuconostoc* de ambas especies se parecen más entre ellas, pero aquellas provenientes de tocosh y pertenecientes a la especie *Lc. mesenteroides* difieren más, entre ellas, que las *Lc. suioinicum* de chicha.

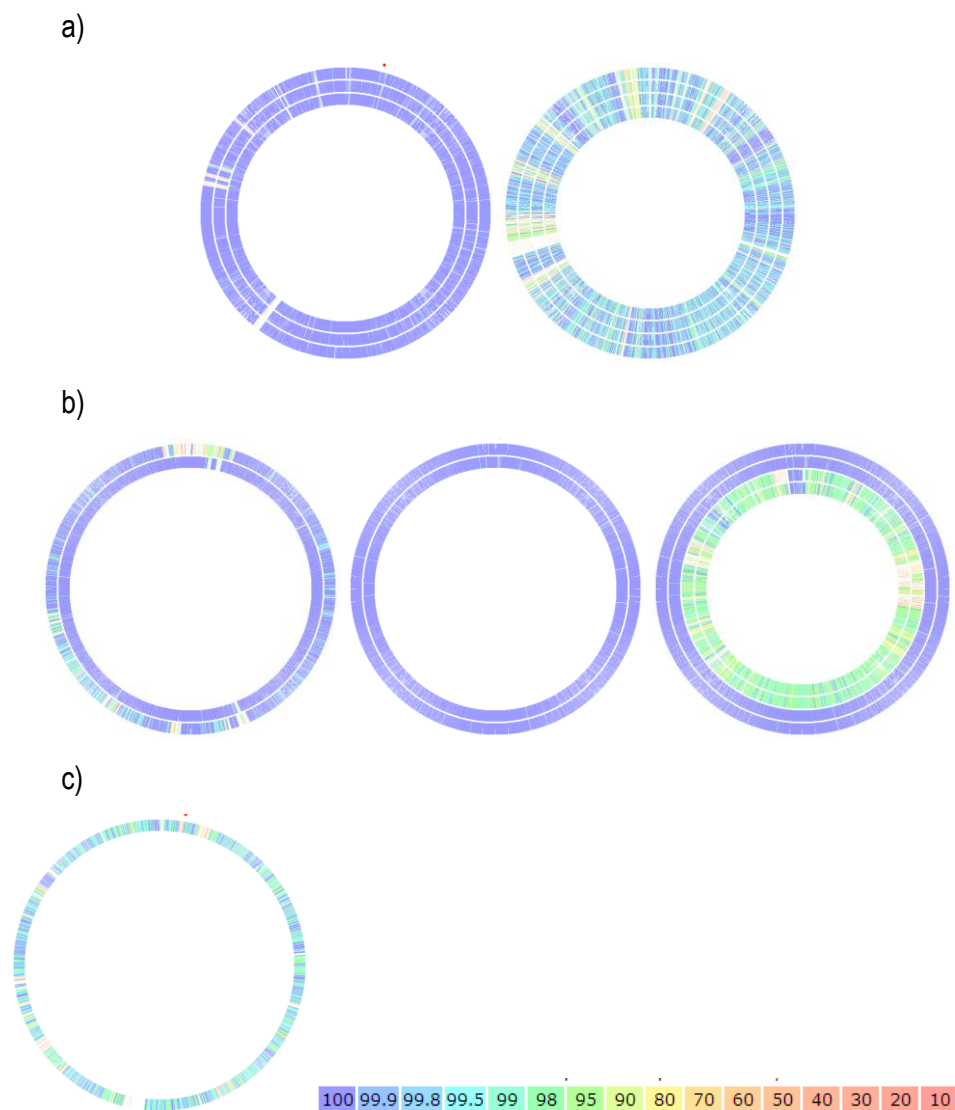


Fig. 6-C2. Comparación de los genomas secuenciados de las cepas de BAL; la escala de colores muestra el porcentaje de identidad de secuencia de los genes anotados para cada genoma.

a) Comparación de las cepas de *Lb. plantarum* de chicha M9MG6, M9MM1, M9MM4 y M9Y2, sin (izquierda) y con (derecha) *Lb. plantarum* M5MA1. b) De izquierda a derecha, comparación de i) cepa T2MM5 con T1M3 y T2MM6 (*Lc. mesenteroides* de tocosh), ii) cepa M8MG2 con M8Y2 y M9MG2b (*Lc. suionicum* de chicha) y iii) cepa de *Lc. suionicum* M8MG2 con *Leuconostoc* de ambos alimentos. c) Comparación de las cepas de *Lb. sakei* de tocosh, T3M7 con T3M3a.

Discusión

Las características estudiadas para evaluar el potencial biotecnológico de las BAL han sido en parte descritas para las cepas de tocosh en el trabajo de Jiménez, Yépez et al., (2018) (Anexo II). En general, han demostrado ser más bien dependientes de cepa que de especie, corroborando lo previamente descrito por otros autores (Capozzi et al., 2012).

De todos los aislados de BAL de los que se ha realizado la caracterización biotecnológica en el presente trabajo, solamente algunas cepas de tocosh, pertenecientes a las especies de *Lb. sakei* y *Lc. mesenteroides*, exhibieron actividad amilolítica, lo que coincide con lo descrito para aislados de estas mismas especies procedentes de tubérculos y cereales (Reddy et al., 2008). Sorprendentemente, esta actividad no se encontró en ninguna otra cepa de BAL de chicha ni de atole, aun tratándose de sustratos amiláceos. Esto podría deberse a la acción de otro tipo de microorganismos o a las amilasas endógenas de origen vegetal sobre el almidón, lo que facilitaría la liberación de fuentes de carbono simples aprovechables por los microorganismos no amilolíticos.

Por otra parte, la producción de EPS de los aislados de BAL se observó mayoritariamente en los géneros *Leuconostoc* y *Weissella*. Se trata de una característica usualmente encontrada en la bibliografía para dichos géneros bacterianos, aislados de distintos alimentos, como es el caso de las cepas de *Leuconostoc* productoras de dextrano procedentes de masa ácida (Bounaix et al., 2010) o de carne (Notararigo et al., 2013), y también de aislados de *W. confusa* de origen vegetal (Kajala et al., 2016). En cambio, la producción de EPS no resultó ser muy común entre las cepas pertenecientes a los demás géneros de BAL encontrados en el presente trabajo, hallándose solo unos pocos casos en cepas de *Lactobacillus* (*Lb. sakei* y *Lb. plantarum*), *P. pentosaceus* y *E. faecium*. Fueron por primera vez Kralj et al. (2004) quienes describieron la capacidad de varias cepas de *Lactobacillus* para producir distintos α -glucanos, incluyendo también cepas de *Lb. sakei* que sintetizaban dextrano. Además, en concordancia con los

resultados obtenidos en el presente trabajo, otros grupos han reportado sobre cepas productoras de EPS pertenecientes a la especie *Lb. plantarum* aisladas de masa ácida (Di Cagno et al., 2006) y cepas de *P. pentosaceus* de savia de palma datilera fermentada (Abid et al., 2018).

La actividad degradadora de fitatos ha resultado ser una capacidad presente, de forma generalizada, en las cepas de atole y, en una parte importante, en las de chicha y tocosh. Pertenecen, en su mayoría, a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus*, coincidiendo con las recientemente descritas por otros autores; Carrizo et al. (2016) hallaron cepas degradadoras de fitatos aisladas de quínoa, pertenecientes a especies del género *Enterococcus* y a la especie *Lc. mesenteroides*, con importantes niveles de actividad degradadora de fitatos de (900 y 600 U/mL, respectivamente) y Anastasio et al. (2010) estudiaron el nivel de degradación de fitatos por cepas de BAL aisladas de masa ácida, encontrando cepas de la especie *Lb. plantarum* que presentaron actividades de hasta 710 U/mL. Asimismo, las cepas con mayores niveles de actividad del presente trabajo también pertenecen a algunas de las especies descritas en estos estudios, como *Lc. mesenteroides* y *Lb. plantarum*, alcanzando los 400 U/mL de actividad. Dado que el fitato se considera un anti-nutriente, debido a la afinidad del ácido fítico por componentes de los alimentos cargados positivamente como minerales y proteínas, las cepas de BAL con una elevada actividad degradadora de fitatos son unas buenas candidatas para mejorar las características nutricionales de los alimentos fermentados.

Por su parte, la capacidad de producir vitaminas del grupo B también resultó ser una propiedad ampliamente distribuida entre las cepas de BAL estudiadas. El cribado inicial mostró que, la mayoría de las cepas, eran capaces de producir folatos, independientemente del alimento fermentado tradicional de procedencia.

Los niveles más elevados de folato corresponden a las cepas provenientes de chicha y de tocosh, desde los casi 60 ng/mL de muchos *Lb. plantarum*, 75 ng/mL de *E. faecium*, 90 ng/mL de *Lc. lactis* y alcanzando los más de 100 ng/mL en algunas cepas de *Lc. mesenteroides* y *Lb. sakei*. Estos valores superan los reportados por autores como Crittenden et al. (2003) que, para enriquecer alimentos fermentados, utilizaron, como cultivos iniciadores de yogures, cepas productoras de hasta 50 ng/g y probióticos de la especie *E. faecium*, que no llegaban a los 20 ng/g. En el caso del trabajo de Hugenschmidt et al. (2010), se realizó el estudio de cepas productoras de folato aisladas de diferentes productos fermentados y, la mayoría de las cepas de

Lactobacillus, producían alrededor de 100 ng/mL, con excepción de una cepa de *Lb. plantarum* que supera con creces lo obtenido en el presente trabajo (más de 300 ng/mL); valores muy elevados de producción de folato también se obtuvieron en las cepas de *W. paramesenteroides* descritas por Pacheco Da Silva et al. (2016) aisladas de leche de cabra, las cuales alcanzaban hasta concentraciones de 400 ng/mL. A raíz de resultados como los aquí discutidos, varios grupos de investigación se han centrado en incrementar, de forma natural, la cantidad de folatos en los alimentos gracias al uso de cepas BAL seleccionadas productoras de la vitamina (Laiño et al., 2013, 2015; Pacheco Da Silva et al., 2016, Albuquerque et al., 2017), lo que puede contribuir, significativamente, en el cumplimiento de la ingesta diaria recomendada de folato.

Como primera aproximación para determinar la presencia del operón responsable de la síntesis de riboflavina, se realizó la amplificación por PCR de una parte importante de dicho operón (especificada en el apartado de Material y Métodos), ya que la falta de esta información genética está normalmente asociada a la incapacidad de producir riboflavina en BAL (Kleerebezem et al., 2003). Por tanto, se utilizaron oligonucleótidos que habían sido diseñados por Capozzi et al. (2011b) para cepas de las especies *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri*, *Lc. mesenteroides* y *P. pentosaceus*, entre otras. El mayor número de cepas positivas para PCR pertenecían a las distintas especies del género *Lactobacillus* analizadas, y también a *Lc. mesenteroides*, *P. pentosaceus*, *W. confusa* y *W. viriscenscens*. Las concentraciones de riboflavina producida cubrían un rango muy amplio, sobretodo en el caso de las cepas de *Lb. sakei* (0-120 ng/mL) y *Lc. mesenteroides* (0-450 ng/mL). Sin embargo, todas las cepas de *Lb. plantarum* mostraban valores de producción de la vitamina entre 100 y 160 ng/mL. El amplio rango de valores de producción natural de riboflavina por cepas de BAL aisladas de alimentos de origen vegetal, en función de la cepa, ha sido previamente descrito en otros estudios (Carrizo et al., 2016; Pacheco Da Silva et al., 2016). Los niveles de vitamina registrados para las cepas de *Lb. plantarum* del presente trabajo están próximos a los descritos por Juárez del Valle et al. (2014) para cepas de la misma especie, superiores a 200 ng/mL, y son mayores a los descritos por Capozzi et al. (2011b), alrededor de 50 ng/mL para cepas de *Lb. plantarum* aisladas de masas ácidas italianas, previamente al tratamiento para la superproducción de la vitamina.

Como se puede observar, la producción de vitaminas por las BAL varía considerablemente y parece ser una característica dependiente tanto de especie como de cepa. Este hecho está relacionado con la interrupción parcial o completa de la información genética para la biosíntesis de las vitaminas. Por tanto, estudiar los genes y operones implicados es esencial para

Capítulo 2. Discusión

seleccionar cepas de BAL adecuadas para la producción de vitaminas. En el presente estudio, el análisis genómico de las rutas biosintéticas de la riboflavina y del folato en las cepas de BAL secuenciadas confirmó, en la mayoría de los casos, lo que se había observado fenotípicamente, es decir, su capacidad para producir dichas vitaminas.

En el caso de los genes de la ruta biosintética de la vitamina B₂, o riboflavina, todas las cepas secuenciadas presentaban el operón completo e ininterrumpido, excepto las dos cepas de *Lb. sakei* que presentan una ausencia total de los genes de la ruta. Los genes *ribG*, *ribB*, *ribA* y *ribH* se han identificado en varias especies de BAL y los análisis comparativos existentes en la bibliografía sugieren que la presencia del operón de biosíntesis de la riboflavina es también una característica dependiente tanto de especie como de cepa (Capozzi et al., 2012). El primer caso parece ocurrir para *Lb. sakei* ya que, en ninguno de los genomas completos que están disponibles en las bases de datos públicas para esta especie (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/microbes/>), al igual que en las cepas aquí estudiadas, se encuentra ninguno de los genes mencionados (Chaillou et al., 2009). La falta completa de dicho operón lleva a la incapacidad de producir riboflavina (Burgess et al., 2006), por lo que los niveles observados de producción por las dos cepas de *Lb. sakei* podrían considerarse cercanos al umbral de error del método utilizado para la cuantificación de la vitamina.

En cuanto a la capacidad de las cepas de BAL para sintetizar folatos, ésta varía considerablemente entre las especies, e incluso entre las cepas, siendo también variable la presencia o no de los genes implicados en la biosíntesis de la vitamina en el presente trabajo. Los análisis genómicos han mostrado que las cepas de BAL secuenciadas presentaban los genes necesarios para la síntesis *de novo* de la vitamina B₉, o folato, (*folE*, *folK*, *folQ*, *folB*, *folP*) con la excepción de las cepas pertenecientes a la especie *Lc. mesenteroides* provenientes de tocosh. En concordancia con esto último, Capozzi et al. (2012) describieron la presencia de los genes necesarios para la biosíntesis de folato, en distintas especies y cepas de BAL, y también observaron la ausencia de los genes necesarios para la síntesis *de novo* en la cepa *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293. Dicha ausencia también se ha observado en todos los genomas anotados bajo las denominaciones de *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Lc. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Lc. mesenteroides* subsp. *cremoris* y *Lc. mesenteroides* subsp. *jonggajibkimchii* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/microbes/>). Sin embargo, en todas estos genomas, así como en los de las cepas de *Leuconostoc* secuenciadas en el presente trabajo, sí que aparecen los genes independientes de la ruta *de novo* del folato

(*folC* y *folA*). Además, cabe destacar que la reclasificación de la subespecie *Lc. mesenteroides* subsp. *suionicum* a la especie *Lc. suionicum* (Jeon et al., 2017), ha incluido, dentro de esta especie, a las cepas de chicha M8MG2, M8Y1 y M9MG2b, lo cual explica que, a diferencia de *Lc. mesenteroides* y sus subespecies, las cepas nombradas sí que presenten los genes necesarios para la síntesis *de novo* de folato, al igual que todas los genomas disponibles pertenecientes a la, anteriormente clasificada, subespecie *Lc. mesenteroides* subsp. *suionicum*.

Por otra parte, la falta completa de los genes para la síntesis *de novo* lleva a la incapacidad de producir folato (Sybesma et al., 2004), por lo que los niveles observados de producción por las dos cepas de *Lc. mesenteroides* de tocosh deberían considerarse cercanos al umbral de error del método utilizado para la cuantificación de la vitamina.

En definitiva, tras las pruebas realizadas en el presente capítulo, las cepas que resultaron destacables fueron: cinco cepas de *Lb. plantarum*, un *Lc. suionicum* y un *Lc. mesenteroides* productoras de vitaminas del grupo B, ya que podrían ser adecuadas para aplicaciones industriales en cuanto al bio-enriquecimiento de productos, en línea con lo que ha sido propuesto en otros estudios tanto para *Lb. plantarum* como para otras especies de BAL (Capozzi et al., 2011b; Laiño et al., 2013; Russo et al., 2014; Juarez del Valle et al., 2014; Pacheco Da Silva et al., 2016).

CAPÍTULO 3.

Determinación de las propiedades relacionadas con la seguridad y calidad alimentaria de los nuevos aislados de BAL.

Las BAL se encuentran presentes en una amplia variedad de productos y bebidas fermentadas, y tienen un importante papel en alimentos, tanto tradicionales y ancestrales, como en los más industrializados. Durante el proceso de fermentación contribuyen a la transformación de alcoholes superiores y carbohidratos, principalmente, en ácido láctico, lo que constituye una estrategia natural de conservación; además, han demostrado un papel muy importante como bioconservantes mediante la producción de otros compuestos en muchos alimentos y procesos fermentativos, como productos lácteos, carnes, vegetales, masas ácidas y ensilajes (Gobbetti et al., 2005).

Tradicionalmente, los productos fermentados, elaborados por poblaciones nativas mediante procedimientos ancestrales, son buenos ejemplos en los que la fermentación láctica es todavía la forma natural de conservación (Ravyts et al., 2012; Nguyen et al., 2013; Tamang et al., 2016). Por tanto, estos alimentos pueden ser una fuente importante de cepas de BAL con potencial como bioconservantes. En el presente trabajo de tesis doctoral se han analizado, con esta finalidad, los aislados de BAL procedentes de chicha (Elizaquível et al., 2015), tocosh (Jiménez, Yépez et al., 2018) y atole (Pérez-Cataluña et al., 2017), descritos en el Capítulo 1.

La conservación de los alimentos requiere, por un lado, impedir el deterioro de la materia prima debido al crecimiento de los microorganismos que forman parte de su microbiota natural y, por otro, inhibir el crecimiento de posibles microorganismos contaminantes, toxigénicos y/o patógenos, que constituyen una amenaza para la salud.

En concreto, la aplicación de BAL por sus propiedades antimicrobianas frente a bacterias relevantes en seguridad alimentaria, i.e. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* o *Escherichia coli* entero-toxigénicas, es bien conocida y continúa estudiándose en los últimos años (Stoyanova et al., 2012; Cizeikiene et al., 2013; Cálix-Lara et al., 2014; Arena et al., 2016). Así mismo, actualmente está cobrando interés el potencial antifúngico de las BAL, especialmente, para su

aplicación en alimentos en los que son frecuentes las contaminaciones por hongos, lo que da lugar al deterioro de los productos (Crowley et al., 2013; Hugenholtz, 2013; Russo et al., 2017).

Los hongos alterantes de alimentos pueden crecer en una amplia variedad de sustratos. Los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Meyerozyma* son ejemplos que se aíslan comúnmente de cereales, vegetales, frutas y productos de panadería (Valerio et al., 2009; Cizeikiene, et al., 2013; Crowley et al., 2013). Su crecimiento produce consecuencias indeseables, tales como la producción de malos sabores y la putrefacción de los alimentos, lo que afecta a la calidad y acorta la vida útil de los mismos. Por ejemplo, el síntoma denominado “moho azul”, causado por *Penicillium expansum*, es una de las enfermedades post-cosecha con mayor importancia en China y Europa (Qin y Tian, 2004), sucediendo, tanto durante el almacenamiento post-cosecha, como durante el transporte y comercialización de las frutas, dando lugar a serias pérdidas económicas. Por su parte, las especies pertenecientes al género *Fusarium* son patógenos de plantas ampliamente distribuidos y, en concreto, *F. verticillioides* es responsable de varias de las enfermedades mayoritarias en los cultivos de maíz (Reyes-Velázquez et al., 2011). Además de las alteraciones causadas en los alimentos, el crecimiento de especies tales como *Aspergillus parasiticus*, *F. verticillioides* y *P. expansum* puede dar lugar a la producción de micotoxinas, lo que supone una gran preocupación en el ámbito de la seguridad alimentaria.

El potencial de las BAL para extender la vida útil de los alimentos se ha evaluado en una amplia variedad de ellos, como frutas y verduras, pan, piensos y productos lácteos (Pawlowska et al., 2012; Crowley et al., 2013). Entre los compuestos a los que se ha asignado la actividad antifúngica de las BAL, se encuentran los ácidos orgánicos y compuestos de bajo peso molecular, los ácidos grasos y fenilacéticos, los dipéptidos cíclicos y compuestos proteicos u otros compuestos variados, como las lactonas (Peyer et al., 2016). Los estudios reportados hasta la fecha sugieren que la actividad antifúngica no suele recaer en un único compuesto; por el contrario, lo más probable es que esta actividad se deba el efecto sinérgico de varios compuestos (Ndagano et al., 2011).

Profundizar en el análisis de los compuestos antifúngicos que se derivan del crecimiento de las BAL requiere de procedimientos de recuperación optimizados, como por ejemplo el método “QuEChERS” recientemente validado por Brosnan et al. (2014), en combinación con técnicas analíticas sensibles, como por ejemplo el sistema de cromatografía líquida de alta resolución o

HPLC, equipado con un detector de red de diodos ultravioleta (UV/DAD o UV/PDA) (Axel et al., 2015; Peyer et al., 2016).

Respecto a los patógenos bacterianos transmisibles por alimentos, cabe destacar que los brotes asociados con productos frescos de origen vegetal han aumentado durante los últimos años. Da Silva Felício et al. (2015) describieron que las combinaciones más frecuentes alimento/patógeno son los casos de verduras crudas de hoja verde y algunas frutas asociadas a brotes de *Salmonella* spp., seguidos por *Escherichia coli* en vainas frescas, legumbres y cereales. Además, *Listeria monocytogenes* es una especie que requiere una atención especial ya que es un microorganismo ubicuo, con alta probabilidad de encontrarse en las áreas de procesamiento de los alimentos, siendo un patógeno causante de enfermedades de transmisión alimentaria con una alta tasa de mortalidad.

La aplicación de BAL productoras de agentes antimicrobianos *in situ* se trata de una estrategia de inhibición de patógenos en los alimentos muy prometedora, con vistas a garantizar la seguridad alimentaria (Mills et al., 2011; Cáliz-Lara et., 2014).

A este respecto, son muchas las especies de BAL que tienen el status de GRAS de la FDA, en base al largo historial de consumo de alimentos fermentados por ellas y, además, se incluyen en la lista QPS de la EFSA (Leuschner et al., 2010). No obstante, la detección de cepas de BAL resistentes a antibióticos ha llevado a proponerlas como un posible reservorio de genes de resistencias que pueden transmitirse horizontalmente a patógenos a través de la cadena alimentaria, lo que supone una creciente preocupación para la seguridad alimentaria (Marshall et al., 2009; Devirgiliis et al., 2013). De hecho, la cadena alimentaria se reconoce como una de las rutas clave para la transmisión de poblaciones bacterianas de animales a humanos y, por lo tanto, la aplicación de BAL en alimentación requiere de la determinación de resistencias a antibióticos adquiridas (EFSA, 2012).

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 y la introducción de las primeras sulfonamidas antimicrobianas en 1930 (Davies y Davies, 2010), los antibióticos han jugado un papel crucial en la salud humana y en la esperanza de vida. Sin embargo, la presencia de resistencias a los mismos por parte de bacterias patógenas ha generado una gran preocupación. El informe anual de 2014 de la OMS ya reveló evidencias que establecían una conexión entre el uso de antibióticos en animales de explotación ganadera y la aparición de resistencias en los patógenos bacterianos, lo que supone una amenaza creciente y generalizada para el tratamiento de las

infecciones más comunes. Más recientemente, y tras el aumento de la gravedad del problema, a principios de 2017 la OMS publicó una lista de patógenos resistentes a antibióticos que se habían priorizado por presentar un gran riesgo para la salud humana y, a finales de este mismo año, las directrices sobre la reducción del uso de antimicrobianos médicamente importantes, en animales productores de alimentos, para ayudar a preservar la efectividad de los antibióticos que son importantes para la medicina humana (Aidara-Kane et al., 2018).

La resistencia a antibióticos es una característica eventual en los biomas bacterianos y puede ser interpretada como una adaptación que ocurre fácilmente bajo el efecto de un cambio ambiental (Rodríguez-Rojas et al., 2013). La capacidad de las bacterias para sobrevivir y crecer en presencia de un antibiótico determinado puede deberse a la presencia de genes de resistencia que permitirán la supervivencia por diversos mecanismos. Los mecanismos de defensa a los antibióticos se clasifican como “intrínsecos” cuando están, en la mayoría de los casos, relacionados con dianas de baja afinidad o ausencia de las mismas, con la producción innata de enzimas que inactivan al antibiótico por parte de la bacteria o con la falta de accesibilidad del mismo a la célula bacteriana por una incorporación reducida del compuesto o por su extrusión mediante una bomba de flujo (Kumar y Schweizer, 2005). De este modo, la resistencia a un antibiótico concreto será considerada intrínseca o natural cuando sea inherente a una especie bacteriana, estando presente en la mayoría sus cepas. Por otro lado, se entiende por “resistencia adquirida” aquella presente en una cepa de una especie normalmente susceptible a un antibiótico concreto y que, por tanto, se ha vuelto resistente al mismo. Este hecho puede deberse, o bien a la adquisición de genes mediante la ganancia de DNA exógeno, o bien por una mutación de los genes nativos (Ammor et al., 2008). Los genes que otorgan resistencias a antibióticos pueden propagarse de una bacteria a otra mediante la transferencia horizontal de material genético, y parece que la conjugación es el mecanismo que podría ser el principal responsable, como se describe en la revisión de Fraqueza (2015). Además, las resistencias adquiridas se considera que tienen mayor potencial de diseminación horizontal cuando los genes causantes de la resistencia están situados en elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones (Devirgiliis et al., 2013), siendo menos probable cuando son genes cromosómicos.

A pesar de que se ha demostrado la existencia de los genes de resistencia a antibióticos con anterioridad al uso humano de estos medicamentos (Bhullar et al., 2012), el principal problema surge ante la posibilidad de que su aumento se deba al mal uso de los antibióticos, así como a

otras actividades humanas. Las causas mayoritarias son: el incremento del uso de antibióticos en medicina y en veterinaria, sobre todo en los países desarrollados (Van Boeckel et al., 2014); el uso excesivo de antibióticos en animales para la explotación ganadera, que contribuye a la selección de bacterias resistentes en la cadena alimentaria (Teale, 2002); y la creciente contaminación de antibióticos provocada por los humanos, que ha favorecido la adquisición de resistencias a antibióticos por la microbiota ambiental (Martínez, 2009). Todos estos escenarios llevan al aumento de bacterias que actúan como reservorios de genes de resistencias a antibióticos presentes en elementos genéticos móviles, lo que supone una gran amenaza para la salud pública.

Por tanto, en el presente capítulo, y tras los ensayos realizados para la caracterización biotecnológica de las 311 cepas de BAL descritos en el Capítulo 2, aquellas cepas más prometedoras se evaluaron en cuanto a propiedades relacionadas con la seguridad y calidad alimentarias, cubriendo los siguientes objetivos, la mayor parte de los cuales se recogen en el trabajo de Yépez et al. (2017) (Anexo II): i) determinar las actividades antimicrobianas de una selección de cepas de BAL aisladas de chicha y de tocosh, ii) profundizar en el análisis de la actividad antimicrobiana de las cepas positivas a partir de extractos libres de células (ELC) iii) determinar los compuestos antimicrobianos presentes en los ELC positivos, mediante la extracción QuEChERS acoplada a la identificación y cuantificación de los compuestos activos por cromatografía líquida asociada a la detección por espectrometría de masas lineal de trampa iónica (MS-LIT), y iv) determinar el perfil de resistencias a antibióticos en las BAL así como la posible presencia de genes de resistencias a antibióticos en los genomas de las cepas secuenciadas.

1. Actividad antifúngica frente a microorganismos alterantes

Se determinó la actividad antifúngica a un total de 191 cepas (68 provenientes de chicha, 62 de tocosh y 63 de atole) mediante inoculación sobre medio sólido que contenía cada uno de los cuatro hongos alterantes de alimentos vegetales: *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium roqueforti* y *Meyerozyma guilliermondii*, utilizando este ensayo en placa como método de cribado. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 1-C3 (Tabla 1 del Capítulo 3).

Al comparar las actividades antifúngicas de las cepas de BAL en función del alimento de origen, las cepas aisladas de tocosh mostraron una mayor actividad, presentando el mayor nivel de inhibición (un halo de más de 3 cm) en el 35 % de las cepas, mientras que dicha actividad se observó en el 27 % de las cepas de atole y solo en el 8 % de las de chicha. Las cepas pertenecientes a las mismas especies, pero aisladas de distintos alimentos, también presentaron algunas diferencias en su actividad antifúngica; los aislados de atole de *Lb. plantarum* y de *P. pentosaceus* mostraron una mayor actividad que las cepas de estas dos especies aisladas de chicha y, por su parte, las cepas de *Lc. mesenteroides* aisladas de tocosh presentaron mayor inhibición de los hongos estudiados que las cepas de chicha de esta misma especie. Por su parte, las cepas de BAL que inhibieron al menos a uno de los hongos estudiados pertenecían a las especies *Lb. brevis* (100%), *Lb. plantarum* (100%), *W. confusa* (100%), *Lb. sakei* (96.43 %), *P. pentosaceus* (94,11%), *W. paramesenteroides* (92,30%), *Lb. casei* (90%), *E. faecium* (86,67%), *Lc. mesenteroides* (84,21%) y *Lc. pseudomesenteroides* (50%).

Tabla 1-C3. Actividad antifúngica de los aislados de BAL de chicha, tocosh y atole contra hongos alterantes

Alimento/Especie/Cepas	<i>A. niger</i> CECT ^a 2807	<i>A. oryzae</i> CECT 2094 ^{NT}	<i>P. roqueforti</i> CECT 2905 ^{NT}	<i>M. guilliermondii</i> CECT 1021
Chicha				
<i>E. faecium</i>				
S4MM7, S4Y8, S5M2, S9MS2, S9Y7, S10MM6, S11Y7	- ^b	++	-	-
S1Y5a, S1Y6, S3Y2, S3Y5, S10Y7, S11Y1	-	+	-	-
S8MS4, S9MS1	-	-	-	-
<i>Lb. plantarum</i>				
M2MG4	-	+	-	++
M5MA1	-	+++	++	++
M5MA4, M5MG1, M5MG6, M9MG3, M9MG5	-	++	-	++
M5MG2, M5MM1	-	++	-	-
M9MG6, M9MM1	-	++	-	+
M9MM2	+	-	-	-
M9MM4	+	+	-	-
M9MM5	-	+++	-	-
M9Y2	-	+++	-	+
<i>Lc. mesenteroides</i>				
M2Y6, M8MM2, M8Y1, M8Y2, S1M5b, S1M7b, S1MS4b, S4Y1, S5MM5, S5MS3, S10MS7b	-	++	-	-
M5MA2, M7MM1, M8Y5, M9Y3, S1Y7b, S4MM5, S10M4, S11sM5, S13MM5	-	-	-	-
M8MG2, M8MG6, S4MS3, S4MS4, S5M3	-	++	-	+
S1M6b	-	-	-	+
S1MS2b, S1MS6b, S3MS5	-	+++	-	-
S3MM7	-	+	-	-
S5M5, S5MM6	+	++	-	-
M9MG2b, S5MS2, S11sMM1	-	++	-	++
S10MS5b	-	-	-	+
<i>P. pentosaceus</i>				
S1M4	-	++	-	-
S11sM1	-	-	-	-

^aCECT, Colección Española de Cultivos Tipo; ^b -, no inhibición; +, zona de inhibición ≤ 1 cm; ++, > 2-3 cm; +++, > 3 cm.

Capítulo 3. Resultados

Tabla 1-C3. Cont.

Alimento/Especie/Cepas	<i>A. niger</i> CECT 2807	<i>A. oryzae</i> CECT 2094 ^{NT}	<i>P. roqueforti</i> CECT 2905 ^{NT}	<i>M. guilliermondii</i> CECT 1021
Tocosh				
<i>Lb. brevis</i>				
3T3R2	-	+	-	-
<i>Lb. farciminis</i>				
T3Y6	-	+++	-	+
<i>Lb. fermentum</i>				
T3M3b	-	-	-	-
<i>Lb. casei</i>				
3T3MS1, 3T3MS2, 3T3MS7, 3T3MS10, T3MS12	-	+	-	-
3T3MS11, 3T3MS13, 3T3M2	-	++	-	-
3T3M3	-	-	-	-
3T3R1	-	++	-	++
<i>Lb. sakei</i>				
T2M3, T3MM1	-	+++	-	+
T3Y2, T3Y4, T3M1, T3MS2	-	+++	-	-
T3Y3, 2T2MS4, 3T1MS1	-	+	-	-
T3Y7	-	-	-	++
T3M2, T3MM4	-	+++	-	++
T3M7	-	+++	++	+
T3MM2	-	-	+	-
T3MS4, T3MS5, T2MM9, 2T2MM10, 2T3Y5, 2T2Y6, 2T3MS3, 2T3MS8	-	-	-	-
2T1MM5, 2T2M2	-	+	-	+
2T2MM5, 2T3MM10, 2T3MS6, 2T3MS9	-	-	-	+
<i>Lc. mesenteroides</i>				
T1M3, T1M4, T1M8, T2Y6, T2M1	-	+++	-	+
T1M5, T2Y7, T2M4	-	+++	-	+++
T2Y4, T2MM6, 2T1Y2, 2T1MM3, 2T2M5, 2T2M9, 2T2MS7	-	+	-	+
T2Y5, T2MM1, T2MS1	-	+++	-	-
T2MM3	-	+++	++	+
T2MM5	-	++	-	++
2T1Y7	-	-	-	+
2T3Y9	-	+	+	+

Tabla 1-C3. Cont.

Alimento/Especie/Cepas	<i>A. niger</i> CECT 2807	<i>A. oryzae</i> CECT 2094 ^{NT}	<i>P. roqueforti</i> CECT 2905 ^{NT}	<i>M. guilliermondii</i> CECT 1021
Atole				
<i>Lb. brevis</i>				
A2SY8, A5LMS1	-	+++	-	++
A5LM7	-	+	-	+
A5LY5	+	+++	-	+
<i>Lb. plantarum</i>				
A1MM10, A2SMM4, A9LMM9	-	++	-	+
A2LY9	-	++	-	++
A9LM2	-	+++	-	++
A1M10	-	+	-	++
A1MM4, A3SY3, A4SMM9, A5SMS5	+	+++	-	++
A1M5, A1Y6	+++	+++	-	++
A2SMS4	++	++	-	++
A2SY9	++	+++	-	+
A1Y8, A9SMS5	+	++	-	-
A3LM8	+++	+++	+	++
<i>Lc. pseudomesenteroides</i>				
A4LY1	-	+	-	+
A2LMS2	-	+	-	-
A4LY4	-	-	-	+
A1MM5, A3LMM4, A3SY8, A5SY8	-	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i>				
A9LMM1, A4SMS4, A9LMS9, A9SM2	-	++	-	+
A1Y1, A3LMM9	-	+	-	+
A1MS4, A3LMM8	+	+	-	+
A2SMS1, A2SMS6	+	++	-	+
A4LY2, A9SM7	+	+++	-	++
A4LM10, A3SY6	-	+	-	-
A4SMS2	-	-	-	+
<i>W. confusa</i>				
A2LM9, A3SMS8	+	+	-	++
A1M9, A2LMM10, A4SM7, A1M2	-	++	-	-
A4SY2	-	+++	-	-
<i>W. paramesenteroides</i>				
A1MS10	-	++	-	++
A1M1, A2LMM8	++	++	-	+
A3SMS10, A4SMM6	+++	+++	-	+
A3SMS3	++	-	-	+
A2SM1, A5SM10	+	-	-	-
A4LMM9, A4SM10, A9SMM9	+	++	-	-
A5SM5	-	+	+	-
A3LM6	-	-	-	-

Respecto a los hongos estudiados, se observó que, de forma generalizada, las cepas inhibían el crecimiento de *A. oryzae* y de *M. guilliermondii*, siendo positivas para ambos en su mayoría. Cabe destacar que la capacidad de inhibir a *A. niger* fue del 50 % en las cepas aisladas de atole, del 5 % en las cepas de chicha y no se observó en ninguna cepa de tocosh. Por su parte, la inhibición de *P. roqueforti* solo se ha observado en 7 cepas del total: dos pertenecientes a *Lb. plantarum*, una de chicha y otra de atole, dos *Lb. sakei* y dos *Lc. mesenteroides* de tocosh y una *W. paramesenteroides* de atole. Entre las cepas de BAL aisladas de cada alimento, muchas cepas provenientes de atole destacaron por mostrar actividad antagonista frente a tres de los cuatro hongos estudiados con un nivel alto de inhibición, así como una cepa de chicha, *Lb. plantarum* M5MA1, y dos de tocosh, *Lb. sakei* T3M7 y *Lc. mesenteroides* T2MM3, que mostraron inhibición frente a *P. roqueforti*, *A. oryzae* y *M. guilliermondii*. Sin embargo, sólo una de las 191 cepas incluidas en este estudio, *Lb. plantarum* A3LM8 de atole, fue capaz de inhibir a todos los hongos ensayados.

2. Actividad antibacteriana frente a patógenos transmisibles por alimentos

La actividad antibacteriana se determinó en 32 cepas (21 de chicha y 11 de tocosh) seleccionadas en base a los resultados previos de actividad antifúngica, presencia o ausencia, y resistencias a antibióticos, sensibilidad o resistencia a menos antibióticos (ver apartado 5 del presente capítulo). Se ensayaron, como modelo, tres patógenos bacterianos transmisibles por alimentos, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria innocua* y *Salmonella* Typhi. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2-C3.

Se observó que todas las cepas, a excepción de *Lb. sakei* T3M7, eran capaces de inhibir a los tres patógenos estudiados. En cuanto a los niveles de actividad, las cepas de *E. faecium* inhibieron moderadamente a los tres patógenos, mientras que los *Lc. mesenteroides* procedentes de tocosh y los *Lb. plantarum* de chicha mostraron la mayor actividad antibacteriana frente a los tres patógenos investigados.

Tabla 2-C3. Actividad antibacteriana de las cepas de BAL seleccionadas contra patógenos bacterianos transmisibles por alimentos (+, zona de inhibición ≤ 5 mm; ++, 6-9 mm; +++ ≥10 mm; -, no inhibición).

Alimento/Especie/Cepas	<i>E. coli</i> O157:H7 CECT 5947 ^a	<i>L. innocua</i> CECT 910 ^T	<i>Salmonella</i> Typhi CECT 4138 ^T
Chicha			
<i>E. faecium</i>			
S3Y2, S10Y7	+	+	+
S11Y1	+	++	+
<i>Lb. plantarum</i>			
M5MA1	+++ ^a	++ ^a	+++ ^a
M9MG6	+++ ^{a,b}	+++ ^a	+++ ^{a,b}
M9MM4	+++ ^a	+++ ^a	+++ ^a
M9MM2, M9MM5	+++	+++	+++
M9MM1	++ ^{a,b}	+++ ^a	+++ ^{a,b}
M9Y2	++ ^a	+++ ^a	+++ ^a
<i>Lc. mesenteroides</i>			
M8MG2	+	++	+++
M8MG6	+	++	++
M8MM2	++	+	++
M8Y1	+	+	++
M8Y2, S4MS3, S5MM6	++	++	+++
M9MG2b	+++ ^a	++ ^a	+++ ^a
S1MS2b	++	+	+++
S4Y1	-	++	++
S5M5	++	++	++
Tocosh			
<i>Lb. farciminis</i>			
T3Y6	++	+	+++
<i>Lb. fermentum</i>			
T3M3b	+++ ^a	+++ ^a	+++ ^a
<i>Lb. casei</i>			
3T3MS2	++	++	+++
<i>Lb. sakei</i>			
T3Y3	++	++	+++
T3M7	-	-	-
<i>Lc. mesenteroides</i>			
T1M3	+++ ^{a,b}	+++ ^a	+++ ^{a,b}
T1M5, T2MM3	++	+++	+++
T2MM5, T2MM6	+++ ^a	++ ^a	+++ ^a
T2MS1	++	++	+++

^a Actividad de los ELC

^b Pérdida de la actividad tras la hidrólisis de los ELC

ELC: Extractos libres de células (recuperados de cultivos de 18 h en MRS), neutralizados y concentrados.

3. Determinación preliminar de la naturaleza química de los agentes antimicrobianos

Con el objetivo de profundizar en el estudio del potencial antimicrobiano de las cepas de BAL, se seleccionaron 11 cepas: cinco *Lb. plantarum* (M5MA1, M9Y2, M9MM1, M9MM4, M9MG6), cuatro *Lc. mesenteroides* (M9MG2b T1M3, T2MM5, T2MM6), un *Lb. fermentum* (T3M3) y un *Lb. sakei* (T3M7), como representantes de las especies / alimentos / actividad antifúngica y antibacteriana, y se ensayaron sus ELC frente a los hongos toxigénicos *A. parasiticus*, *P. expansum* y *Fusarium verticilloides* y frente a las bacterias patógenas *E. coli* O157:H7, *L. innocua* y *Salmonella* Typhi. Los resultados de la actividad de los ELC se muestran en las Tablas 2-C3 y 3-C3.

Los ELC de siete cepas de BAL resultaron efectivos frente a los hongos micotoxigénicos estudiados; cinco de ellas (*Lb. plantarum* M5MA1, M9Y2, M9MM1, *Lc. mesenteroides* T1M3 y *Lb. fermentum* T3M3) inhibieron el crecimiento de *A. parasiticus*, *P. expansum* y *F. verticilloides*, mientras que las otras dos cepas de *Lb. plantarum* (M9MM4 y M9MG6) inhibieron solo a *F. verticilloides*. Las cepas restantes, *Lc. mesenteroides* M9MG2b, T2MM5 y T2MM6, y *Lb. sakei* T3M7 no mostraron ninguna actividad frente a los hongos micotoxigénicos ensayados.

Además, se realizó el ensayo tras la hidrólisis de los ELC con pancreatina para elucidar si los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana observada, tanto frente a los hongos micotoxigénicos como a los patógenos bacterianos, tenían naturaleza proteica. La actividad antifúngica no se modificó tras el tratamiento de los ELC con el enzima proteolítico, observándose los halos de inhibición antes y después de dicha hidrólisis. Sin embargo, sí que se observó una pérdida de la actividad antibacteriana de los ELC hidrolizados de tres cepas (*Lb. plantarum* M9MG6, M9MM1 y *Lc. mesenteroides* T1M3) frente a los tres patógenos alimentarios ensayados (Tabla 2-C3).

Tabla 3-C3. Actividad antifúngica contra los hongos micotoxigénicos detectada en los ELC obtenidos de las cepas de BAL seleccionadas

Alimento/Especie/Cepas	<i>A. parasiticus</i> CECT 2681	<i>P. expansum</i> CECT 2278	<i>F. verticilloides</i> CECT 2987
Chicha			
<i>Lb. plantarum</i>			
M5MA1, M9MM1, M9Y2	+	+	+
M9MM4	-	-	+
M9MG2	-	-	-
M9MG6	-	-	+
Tocosh			
<i>Lb. fermentum</i>			
T3M3b	+	+	+
<i>Lb. sakei</i>			
T3M7	-	-	-
<i>Lc. mesenteroides</i>			
T1M3	+	+	+
T2MM5, T2MM6	-	-	-

ELC: Extractos libres de células (recuperados de cultivos de 18 h en MRS), neutralizados y concentrados.

4. Determinación y cuantificación de los compuestos antifúngicos

A continuación, los ELC que mostraron actividad se analizaron mediante la combinación de la extracción QuEChERS con la detección por LC-MS-LIT, lo que permitió la identificación y cuantificación de hasta 15 compuestos antifúngicos. Tres de las siete cepas de BAL con actividad antifúngica (*Lb. plantarum* M5MA1, M9MG6 y *Lb. fermentum* T3M3b) producían ácidos fenólicos (Tabla 4-C3). En el caso de *Lb. plantarum* M5MA1, se identificaron hasta once compuestos fenólicos en concentraciones que iban desde 2,95 mg/L, para deoxi-hexosido de cafeoil-hexosa, hasta 90 mg/L, para el ácido fenil-láctico; por su parte, en la cepa *Lb. fermentum* T3M3b se identificaron cinco compuestos en concentraciones entre 0,85 mg/L, para el ácido fenil-pirúvico, hasta 18 mg/L, para el ácido 3,5-Di-O-cafeoil-quínico. En *Lb. plantarum* M9MG6 se identificaron diez ácidos fenólicos, siendo la concentración más baja 0,95 mg/L, para el ciclo-(L-Tyr- L-Pro), y las más alta 65 mg/L de ácido fenil-láctico. De entre todos los compuestos, el ciclo-(L-Tyr- L-Pro), el ácido fenil-pirúvico, el deoxi-hexosido de cafeoil-hexosa y el ácido 3,5-Di-O-cafeoil-quínico se detectaron en las tres cepas en concentraciones medias de 5,82, 4,97, 2,82 y

Capítulo 3. Resultados

21,55 mg/L, respectivamente. El ácido fenil-láctico fue el compuesto producido en mayor concentración, tanto por *Lb. plantarum* M5MA1 como por *Lb. plantarum* M9MG6, seguido del ácido 3,5-Di-O-cafeoilquinico, el ácido hidroxicinámico, el ácido quínico y el pentósido de quercetino. Las concentraciones registradas para otros compuestos fenólicos fueron menores a 20 mg/L en las tres cepas de BAL.

Tabla 4-C3. Compuestos antifúngicos identificados en los ELC obtenidos de las cepas *Lb. plantarum* M5MA1 y M9MG6, y *Lb. fermentum* T3M3b (expresados en mg/L)

Compuestos	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. fermentum</i>
	M5MA1	M9MG6	T3M3
Ácido fenil-láctico	90,00±5,63	65,00±5,13	-
Ácido 3-propanoico	7,50±2,24	-	-
Ácido sinápico	-	9,50±1,27	-
2-Desoxicitidina	15,00±3,48	15,50±2,57	-
Ciclo (L-His-L Pro)	4,45±1,52	-	-
Ciclo (L-Tyr-L Pro)	6,50±1,84	0,95±0,34	10,00±2,64
Ácido fenilpirúvico	4,55±1,69	9,50±1,69	0,85±0,25
Ácido cis-Caftárico	-	1,37±1,28	-
Ácido protocatecuico-hexosa	-	1,65±0,89	0,95±0,52
Ácido cafeico derivado	5,50±1,74	-	-
Ácido hidroxicinámico derivado	-	24,00±3,56	-
Quercetina-pentosa	20,00±3,28	-	-
Ácido quínico derivado	22,50±3,94	-	-
Cafeoilhexosa-desoxihexosa	2,95±1,21	2,75±1,84	2,75±0,91
Ácido 3,5-Di-O-cafeoilquinico	24,15±4,27	22,50±5,32	18,00±5,63

5. Determinación de resistencias a antibióticos

De las 191 cepas ensayadas, 127 (41 de chicha, 21 de tocosh y 65 de atole) fueron seleccionadas por presentar actividad antifúngica y, como paso previo a su posible aplicación en alimentos, se determinó la resistencia a antibióticos según los dictámenes de EFSA en la

“International Organization for Standardization” de 2010 ISO 10,932:2010/ IDF 223:2010 (EFSA, 2012). En la Tabla 5-C3 se resumen los patrones de resistencias a antibióticos, en base a los valores de corte de CMI establecidos por EFSA para cada especie bacteriana y antibiótico. Mientras que la gran mayoría de las cepas de chicha y tocosh, alrededor del 70% en ambos casos, eran sensibles a los antibióticos probados, las cepas de atole resultaron ser, en el 90% de los casos, resistentes, al menos, a un antibiótico, siendo sensibles a todos los antibióticos únicamente 6 cepas de la especie *Lb. plantarum*. Además, las cepas de BAL multirresistentes (resistentes a dos o más antibióticos) fueron más del 50% en el caso del atole, encontrándose cepas resistentes hasta a 5 antibióticos a la vez; sin embargo, las cepas multirresistentes de chicha y tocosh nunca presentaron resistencias a más de dos de los antibióticos probados y eran una pequeña parte de las cepas analizadas (7% de chicha y 19% de tocosh).

En cuanto a la distribución de las cepas resistentes por grupo taxonómico, la mayor proporción de cepas sensibles a todos los antibióticos pertenecen al género *Lactobacillus*, a excepción de *Lb. brevis* y *Lb. sakei*, junto con las cepas de *Lc. mesenteroides* y *E. faecium*. Por otra parte, la mayor proporción de cepas resistentes a 2 e incluso más antibióticos, pertenecen a especies del género *Weissella*, junto con *Lc. pseudomesenteroides* y *P. pentosaceus*.

Las resistencias a antibióticos detectadas difieren en su frecuencia de aparición. La resistencia frente a ampicilina fue la más extendida entre las cepas de los tres alimentos, siendo la más frecuente en las cepas de chicha y tocosh; mientras que la resistencia a tetraciclina fue la más frecuente en las cepas aisladas de atole. En cuanto a la distribución por especie, de los aislados de *E. faecium* una sola cepa presentó doble resistencia a vancomicina y a ampicilina. Por su parte, todos los *Lb. brevis* presentaron resistencia a clindamicina o a ampicilina, e incluso a ambos al mismo tiempo; algunos *Lb. plantarum* presentaron estas mismas resistencias e incluso, al menos una cepa, también a la tetraciclina, al igual que algunos *Lb. sakei*. También las cepas de *Lc. mesenteroides* fueron en su mayoría resistentes a ampicilina, a excepción de algunas cepas de chicha, ya que presentaron, además, resistencia a tetraciclina y a kanamicina. Las cepas aisladas de atole y pertenecientes a las especies *Lc. pseudomesenteroides*, *P. pentosaceus*, *W. confusa* y *W. mesenteroides* eran todas resistentes a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol, clindamicina y/o tetraciclina, presentando, en su mayoría, multirresistencias a dichos antibióticos.

Capítulo 3. Resultados

Tabla 5-C3. Perfil de resistencias a antibióticos de las BAL seleccionadas de chicha, tocosh y atole.

Alimento/Especie/Cepas	Resistencia a antibiótico /sensibilidad ^a
Chicha	
<i>E. faecium</i> S3Y2, S8MS4, S9Y7, S10Y7, S11Y1 S11Y7	S Amp/ Van
<i>Lb. plantarum</i> M2MG4, M5MA1, M5MA4, M5MG1, M5MG2, M5MG6, M5MM1, M9MG2, M9MG3, M9MG5, M9MG6, M9MM1, M9MM2, M9MM5 M9MM4, M9Y2	S Amp
<i>Lc. mesenteroides</i> M5MA2, M7MM1, M8MG6, M8Y1, M8Y5, M9Y3, S4Y1, S5M3, S5M5 M8MG2, S4MS3, S10M4, S10MS5b, S11sMM1, S13MM5 M2Y6 S1M5b	S Amp Tet Amp/ Kan
<i>P. pentosaceus</i> S1M4 S11sM1	Ery Amp/ Tet
Tocosh	
<i>Lb. brevis</i> 3T3R2	Amp/ Cli
<i>Lb. farciminis</i> T2Y2	S
<i>Lb. fermentum</i> T3M3b	S
<i>Lb. casei</i> 3T3MS2, 3T3MS7, 3T3MS11, 3T3M2	S
<i>Lb. sakei</i> T3MM1, T3Y3, 3T1MS1 T3M2 T3M7 T3Y4, T3MM4 T3M1	S Gen Amp Amp/ Cli Gen/ Tet
<i>Lc. mesenteroides</i> T1M3, T1M5, T2Y6, T2MM3, T2MM6 T2MM5	S Amp

Tabla 5-C3. Cont.

Alimento/Especie/Cepas	Resistencia a antibiótico /sensibilidad ^a
Atole	
<i>Lb. brevis</i> A5LMS1, A5LY5, A5LM7 A2SY8	Cli Amp/Cli
<i>Lb. plantarum</i> A1M10, A2SY9, A3SY3, A1MM4 A9LM2, A4SMM9, A1Y8 A2SMS4 A2LY9 A1MM10, A9LMM9, A1Y6, A9SMS5, A2SMM4, A1M5	Cli Amp Amp/Cli Cli/Tet S
<i>Lc. pseudomesenteroides</i> A4LY1 A3SY8, A5SY8, A3LMM4 A4LY4 A2LMS2 A1MM5	Chl Cli Chl/Kan Amp/Kan/Tet Amp/Cli/Kan/Tet
<i>P. pentosaceus</i> A1MS4, A9SM2 A4SMS2, A3SY6 A2SMS6, A2SMS1, A9LMM1, A4LM10, A9SM7 A4LY2 A1Y1, A3LMM8, A3LMM9, A4SMS4, A9LMS9	Tet Chl Amp/Tet Str/Tet Amp/Chl/Tet
<i>W. confusa</i> A4SY2 A1M2 A4LM6 A1M9, A3LM6 A2LMM10, A9SMM9, A2SM1, A4SM8, A4LMM9 A2LM9, A3SMS8 A4SM7, A5SM5 A5SM10 A4SM10	Kan Chl Chl/Tet Chl/Kan Chl/Kan/Tet Amp/Kan/Tet Chl/Cli/Kan/Tet Amp/Chl/Cli/Tet Amp/Chl/Cli/Kan/Tet
<i>W. paramesenteroides</i> A1M1 A4SMM6 A3SMS10 A1MS10 A3SMS3 A2LMM8	Cli/Tet Chl/Tet Amp/Kan/Tet Chl/Cli/Tet Amp/Cli/Kan/Tet Amp/Kan/Chl/Cli/Tet

^a S, sensible; Amp, ampicilina; Chl, cloranfenicol; Cli, clindamicina; Ery, eritromicina; Gen, gentamicina; Kan, kanamicina; Str, Streptomycin; Tet, tetraciclina; Van, vancomicina.

6. Análisis genómico de las cepas para garantizar la seguridad alimentaria

Siguiendo las recomendaciones de EFSA sobre caracterización de microorganismos que se pretenden utilizar como aditivos en alimentación animal o como microorganismos productores (Guido et al., 2018), se realizó el análisis genómico de las 14 cepas seleccionadas por poseer características biotecnológicas interesantes (ver Capítulo 2). En dichos genomas también se realizó el análisis de seguridad alimentaria mediante la búsqueda de genes implicados en las resistencias a antibióticos.

El programa RGI de CARD predijo el gen *aadA* de resistencia a los aminoglucósidos estreptomycin y espectinomycin en todas las cepas y, cuando se indagó sobre la localización gen *aadA* en el genoma anotado mediante el servidor RAST, se observó que, efectivamente, se encontraba siendo el único gen del contig (o acompañado de un gen de proteína hipotética).

Discusión

En el presente capítulo se recoge la caracterización de los aislados de BAL en cuanto a propiedades relacionadas con la seguridad alimentaria. El estudio se ha centrado en las cepas que presentaron las características biotecnológicamente relevantes descritas en el Capítulo 2 y en la determinación de sus actividades antimicrobianas, que repercuten en la calidad y seguridad de los alimentos, y de sus resistencias a antibióticos, factor a tener en cuenta por su implicación en la salud del consumidor.

Considerando los resultados globales de actividad antifúngica, de las cepas de chicha, tocosh y atole, frente a cuatro hongos alterantes de alimentos, *A. oryzae*, *A. niger*, *P. roqueforti* y *M. guilliermondii*, cabe destacar que la inhibición generalizada del hongo *A. oryzae* observada en este estudio coincide con lo descrito para varias especies de BAL. Entre otras, la actividad frente a este hongo se ha observado en *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, *Lb. sakei*, *Lc. mesenteroides*, *Lc. citreum*, *P. pentosaceus*, *Lb. casei* y *Lb. rhamnosus*, aisladas de salvado de trigo (Manini et al., 2016), masas de quínoa (Ruiz-Rodríguez et al., 2016a) y de amaranto (Ruiz-Rodríguez et al., 2016b), y frutas de Malasia y otros alimentos fermentados (Muhialdin y Hassan, 2011), lo que coincide con la actividad observada para cepas *Lb. brevis* de atole y tocosh y de *P. pentosaceus* de chicha y atole en el presente estudio. La actividad frente al hongo *A. niger* fue la segunda en frecuencia en las cepas estudiadas y destacó entre los *Lb. plantarum* aislados de atole, lo que concuerda con el trabajo de Lavermicocca et al. (2000), en el que caracterizaron nuevos compuestos antifúngicos, activos contra ésta y otras especies fúngicas, producidos por una cepa de *Lb. plantarum* proveniente de masa ácida. Por el contrario, la actividad frente a *P. roqueforti* se detectó en un bajo número de cepas del presente estudio, de las *Lb. plantarum*, *Lb. sakei* y *Lc. mesenteroides*; no obstante, a estas especies también pertenecen las cepas con actividad frente a *P. roqueforti*, descritas en trabajos previos, y aisladas de productos vegetales como la masa de quínoa (Ruiz-Rodríguez et

al., 2016a), la sémola (Valerio et al., 2009) y el “kimchi”, nombre que reciben un grupo de vegetales fermentados originarios de Corea (Yang y Chang, 2010).

Como resultado del presente estudio, cabe destacar que disponemos de cepas con actividad antimicrobiana múltiple, frente a los hongos *A. niger*, *A. oryzae* y *M. guilliermondii*, e incluso a los cuatro hongos estudiados. Dichas cepas pertenecen a las especies *Lb. plantarum*, principalmente, y también a *Lb. sakei* y *Lc. mesenteroides*, y presentan un gran potencial para su aplicación como bioconservantes.

La actividad antibacteriana ha sido ampliamente descrita para los géneros de BAL estudiados en el presente trabajo, como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, contra los patógenos transmisibles por alimentos *Listeria* spp., *Salmonella* Typhi y *E. coli* (Cálix-Lara et al., 2014; Manini et al, 2016). Las especies del género *Listeria* son ubicuas y se han aislado de una gran variedad de ambientes alimentarios y plantas de producción, desde los cuales pueden introducirse en la cadena alimentaria. Por su parte, la presencia de *Salmonella* Typhi y *E. coli* se ha descrito en algunos casos en trigo y en harinas (Sperber, 2007), así como en productos que se consumen crudos (Cizeikiene et al., 2013; Da Silva Felício et al., 2015), por lo que representan un continuo peligro para la salud pública. Los resultados de inhibición de las cepas de BAL del presente estudio mostraron una extensa actividad frente a los tres patógenos ensayados. En cuanto a los compuestos responsables de dicha inhibición, a pesar de que las principales moléculas que han sido estudiadas como agentes antimicrobianos son las bacteriocinas (Vignolo et al., 2012), existen otros metabolitos producidos por las BAL a los que se les atribuye una fuerte inhibición del crecimiento de patógenos alimentarios (Arena et al., 2016). En comparación con las bacteriocinas, que son principalmente activas frente a bacterias Gram positivas como *Listeria*, los ácidos orgánicos producidos por las BAL presentan una actividad antimicrobiana con espectro de acción más amplio. Por tanto, la inhibición de *Salmonella* Typhi y *E. coli* O157:H7 por cepas de BAL, pertenecientes concretamente a la especie *Lb. plantarum*, podría asociarse a la producción de ácidos orgánicos como describen Arena et al. (2016).

El análisis de los ELC tras ser neutralizados, concentrados e hidrolizados con pancreatina reveló que tres de las cepas ensayadas (*Lb. plantarum* M9MG6 y M9MM1, y *Lc. mesenteroides* T1M3) perdían la actividad contra los patógenos bacterianos ensayados; este resultado indica que podría haber ocurrido la degradación del compuesto antimicrobiano por la pancreatina en el ELC,

por lo que se puede sugerir la naturaleza proteica del mismo y, por tanto, la producción de bacteriocinas u otros derivados proteicos del metabolismo de estas cepas. Por el contrario, la hidrólisis con pancreatina no modificó la actividad frente a los hongos micotoxigénicos *A. parasiticus*, *P. expansum* y *F. verticilloides*, lo que sugiere que la actividad antifúngica de estas cepas no se debe a compuestos proteicos. No obstante, para aquellos ELC que no perdían su actividad tras dicho tratamiento, no se descarta la posibilidad de que estén interviniendo pequeños péptidos no hidrolizados, ya que la mayoría de los péptidos con actividad antifúngica están compuestos por aminoácidos de cadena corta (Dashper et al., 2007); en este escenario, la actividad antimicrobiana se derivaría de las interacciones entre los péptidos y la membrana de los microorganismos diana.

Existen estudios que evidencian las propiedades antimicrobianas de productos fermentados por BAL frente a distintos hongos micotoxigénicos. Peyer et al. (2016) describieron el control del crecimiento de *Fusarium culmorum* durante la fermentación de un sustrato a base de malta de cebada, en concreto mediante metabolitos producidos por las cepas *Lb. brevis* R2D y *Lb. plantarum* FST1.7, y la inhibición más fuerte se observó con la primera de ellas, mientras que con la segunda solo se redujo el crecimiento del hongo. Sin embargo, en el presente estudio, cinco de las seis cepas de *Lb. plantarum* inhibieron el crecimiento de *F. verticilloides*, otra especie del mismo género. En otro estudio, Gerez et al., 2009 describen el efecto antifúngico de la cepa *Lb. plantarum* CRL 778 aislada de masa ácida, en concordancia con los estudios anteriores y con los resultados del presente estudio.

El método de extracción de los compuestos antifúngicos utilizado en este estudio, llamado QuEChERS, fue previamente descrito por Brosnan et al. (2014) como una técnica novedosa para mejorar la recuperación de compuestos antifúngicos a partir de cultivos de BAL; fue validado en cepas de BAL que habían mostrado actividad antifúngica particularmente elevada, pertenecientes a las especies *Lb. plantarum*, *Lb. amylovorus* y *Weissella cibaria*. Este método proporcionó un aumento en el número de compuestos detectados, tanto conocidos como desconocidos hasta el momento. Los compuestos detectados se confirmaron por cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas cuadrupolar con trampa iónica linear (LC-FTMS), e incluían 1,2-dihidroxibenceno, ácido DL-β-hidroxi-fenil-láctico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido Di-hidroxicinámico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico, ácido fenil-láctico, ácido p-cumárico, ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) propanoico, ácido benzoico, ácido ferúlico, ácido salicílico, ácido hidroxicinámico, ácido metilcinámico, entre otros. En otro estudio,

la técnica HPLC-UV/DAD se aplicó con éxito para el análisis de compuestos antifúngicos presentes en extractos de masa ácida fermentados con la cepa antifúngica *Lb. amylovorus* DSM19280, lo que permitió determinar mayor número de compuestos en la masa ácida con esta cepa que en el producto fermentado sin ella (Axel et al., 2015). En un estudio posterior, Peyer et al. (2016) utilizando el método QuEChERS acoplado a un sistema HPLC-UV/PDA identificaron y cuantificaron hasta un total de trece ácidos fenólicos, entre los que se incluían varios del estudio anterior.

En el presente estudio y, al igual que en otros trabajos reportados en la bibliografía (Axel et al., 2015), la especie *Lb. plantarum* resultó ser la mayor productora de compuestos antifúngicos, siendo el ácido fenil-láctico y el 3-propanoico los producidos de modo generalizado y en mayor concentración, coincidiendo con los trabajos de Gerez et al. (2009) y Valerio et al. (2009).

Las cepas de BAL investigadas pertenecientes a las especies *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *Lb. casei*, *Lc. mesenteroides* y *P. pentosaceus* son, *a priori*, buenas candidatas para su aplicación en alimentos, ya que estas especies se encuentran incluidas en la lista QPS (Leuschner et al., 2010). Sin embargo, para garantizar la seguridad del consumidor es necesario determinar el perfil de resistencias a antibióticos de cada cepa, aun cuando pertenezca a una especie con el estatus de QPS. La presencia de BAL en la microbiota de los vertebrados las convierte en potenciales transmisoras de resistencias a antibióticos a bacterias patógenas con las que pueden compartir el mismo nicho ecológico (Robredo et al., 2000). No obstante, se debe diferenciar entre resistencias intrínsecas y adquiridas. En el caso del género *Lactobacillus* aunque se ha descrito como sensible a las penicilinas (Danielsen y Wind, 2003), esta resistencia fue la encontrada con mayor frecuencia entre las cepas de BAL del presente estudio y, en varias ocasiones, estaba acompañada por la resistencia a clindamicina, como es el caso de dos *Lb. brevis* de atole y de tocosh, un *Lb. sakei* de tocosh y un *Lb. plantarum* de chicha. La resistencia a la ampicilina en cepas de la especie *Lc. mesenteroides* del presente trabajo, así como la frecuente presencia de resistencias al cloranfenicol y a la tetraciclina en las cepas de *W. confusa* y *W. paramesenteroides* de atole, coincide con los resultados reportados por Jeong y Lee (2015) sobre las resistencias a antibióticos de cepas pertenecientes a los géneros *Leuconostoc* y *Weissella* aisladas de kimchi. La alta incidencia de cepas con resistencia a la tetraciclina en las cepas provenientes de atole está en concordancia con los resultados del estudio de Gevers et al. (2003), realizado en cepas de BAL pertenecientes a las especies *Lb. curvatus*, *Lb. reuteri*, *Lb.*

plantarum, *Lb. sakei* y *P. pentosaceus*, entre otras, aisladas del proceso de fermentación de salchichas.

Cabe mencionar que el atole analizado se elaboró en un ámbito familiar con maíz obtenido de un mercado local, por lo que se presupone mayor influencia por el uso de antibióticos. En cambio, la chicha y el tocosh proceden de elaboraciones realizadas por poblaciones nativas en puntos geográficamente aislados y con muy poco, o ningún, contacto con antibióticos. Sorprendentemente, todas las cepas de *E. faecium* analizadas, excepto una, mostraron sensibilidad a todos los antibióticos ensayados. Numerosos estudios en las últimas décadas han reportado una alta frecuencia de enterococos resistentes a la vancomicina, aislados de distintos ambientes, con el consiguiente riesgo que entraña su potencial en la transmisión de estas resistencias al ser humano a través de los alimentos (Robredo et al., 2000).

El análisis genómico en cuanto a la búsqueda de genes de resistencias a antibióticos desveló que todas las cepas de BAL secuenciadas presentaban el gen *aadA* de resistencia a los aminoglucósidos espectinomicina y estreptomycin. Aunque el primer antibiótico no se encontraba dentro de la lista establecida por EFSA (2012) y, por tanto, no se determinó la CMI, sí que fue determinada la CMI para la estreptomycin, pero ninguna de las cepas de BAL secuenciadas presentó resistencia a este último antibiótico. La bibliografía muestra que el gen *aadA* se dispone en “cassettes” y son parte de un gran número de integrones, plásmidos y transposones (Ramirez y Tolmasky, 2010). La última guía EFSA determina que, aunque la CMI de una cepa frente a determinado antibiótico sea inferior al corte definido, si se encuentran genes de resistencia en su genoma, debe evaluarse la posibilidad de su activación (Guido et al., 2018). En el presente trabajo, la localización aislada del gen *aadA*, como único gen anotado del “contig”, impide determinar con certeza la probabilidad de dicha activación y de su transferencia horizontal.

En definitiva, las cepas seleccionadas *Lb. plantarum* M5MA1 y M9MM1 de chicha y *Lb. fermentum* T3M3b y *Lc. mesenteroides* T1M3 de tocosh presentan un importante potencial como agentes antimicrobianos, inhibiendo bacterias patógenas transmisibles por alimentos, así como hongos alterantes y micotoxigénicos. Además, la determinación de resistencias a antibióticos, refrendada por el análisis genómico, sugiere que son buenas candidatas para la aplicación en alimentos.

CAPÍTULO 4.

Evaluación tecnológica de las cepas productoras de riboflavina y su aplicación en la elaboración de un alimento funcional.

Las fermentaciones y las conversiones microbianas de las materias primas son cruciales para la producción de metabolitos funcionales (De Vos, 2005). En este contexto, las BAL son un grupo microbiano relacionado con los aspectos funcionales de los alimentos, pero conocido inicialmente por su papel en los bioprocesos que dan lugar a numerosos productos fermentados. El crecimiento y la supervivencia en estos ambientes dependen de la capacidad de los microorganismos para responder a las condiciones cambiantes como la temperatura, el pH, la congelación, la disponibilidad de nutrientes, la densidad de población, la presencia de etanol o la presión osmótica, entre otras (Klaenhammer et al., 2005; Ferrando et al., 2015). Estas condiciones de estrés también se presentan en los procesos de elaboración de alimentos pudiendo afectar significativamente a la viabilidad y/o rendimiento tecnológico de las BAL (Ferrando et al., 2015; Capozzi et al., 2016; Laureys, et al., 2017). Todo ello promueve la prospección de nichos ecológicos para el aislamiento y la caracterización de BAL, como microorganismos de grado alimentario, que presenten propiedades tecnológicas y funcionales interesantes para su explotación en la formulación de nuevos alimentos fermentados. El presente capítulo se centra en la selección y aplicación de BAL productoras de riboflavina, procedentes de alimentos fermentados andinos, “chicha” y “tocosh”, para el desarrollo de un alimento funcional bio-fortificado.

Los alimentos funcionales son un sector en auge de la industria alimentaria debido a la creciente demanda, por parte del consumidor, de alimentos que confieran beneficios para la salud y reduzcan el riesgo de padecer enfermedades. Las leches fermentadas son las bebidas funcionales más populares en la Europa occidental y en Norte-América (Marsh, et al., 2014). Entre éstas, el yogur es la mejor conocida y aceptada a nivel mundial, así como el kéfir, que también llegó a ser muy popular durante el siglo XX debido a su potencial contribución a la mejora de la salud en comunidades del Cáucaso (De Oliveira Leite et al., 2013). El kéfir es una bebida de leche ácida, viscosa, algo efervescente y ligeramente alcohólica. La base del proceso fermentativo se encuentra en una combinación simbiótica de bacterias (varias especies de BAL y también bacterias acéticas) y distintas levaduras, estando, todos los microorganismos, unidos

por una matriz polisacáridica conocida como “granos de kéfir” (Garrote et al., 2001; Bourrie et al., 2016). En el kéfir de agua, la fermentación llevada a cabo por el consorcio de bacterias y levaduras, incluidas, en este caso, en granos de dextrano, se lleva a cabo en agua azucarada con limón, lo que mejora el sabor y el contenido nutricional. Aunque la composición del kéfir de leche puede variar y no está estandarizado como ocurre en el caso de los cultivos iniciadores que se utilizan para la producción del yogur, se sabe que contiene principalmente BAL y bifidobacterias (*Bifidobacterium* spp.) (Marsh et al., 2014). En los últimos años, algunos trabajos han desafiado la formulación de productos llamados “tipo kéfir” elaborados utilizando matrices no-lácteas, como la leche de soja (Liu y Lin, 2000), zumo de pulpa de coco (Puerari et al., 2012), leche de cacahuete (Cui et al., 2013) y zumos de frutas mediterráneas (Randazzo et al., 2016). No obstante, hasta el momento no hay estudios publicados sobre la producción de alimentos tipo kéfir que estén basados en cereales.

Las bebidas funcionales no-lácteas son particularmente atractivas cuando se pretende evitar las alergias e intolerancias producidas por el consumo de leche y sus derivados, así como para reducir el consumo de colesterol o respaldar las dietas alternativas, cada vez más extendidas entre la población (Prado et al., 2008; Kandyliis et al., 2016). Es el caso de las conocidas bebidas de soja, avena o arroz, así como la leche de coco, entre muchas otras. Además, las matrices alimentarias diferentes a la leche pueden proporcionar combinaciones valiosas de antioxidantes, fibras, minerales y vitaminas, lo cual aumenta los atributos saludables de los productos finales. De hecho, los productos fermentados basados en cereales tienen una buena cabida en este campo emergente ya que, entre otras matrices vegetales, son una fuente económica y natural de moléculas prebióticas, como por ejemplo los beta-glucanos (Russo et al., 2016; Pérez-Ramos et al., 2017). No obstante, se ha determinado una pérdida de vitaminas como la riboflavina durante la molienda del grano previa a su incorporación en el procesado de alimentos (Capozzi et al., 2012). Por ello, en los últimos años se están abordando numerosos estudios en el campo de la bio-fortificación *in situ* de vitaminas del grupo B mediante el uso de cepas de BAL (Capozzi et al., 2011b; Molina et al., 2012; Juárez del Valle et al., 2014; Laiño et al., 2015).

Una dieta equilibrada, normalmente, aporta la CDR de riboflavina para un adulto, que va desde 0.9 a 1.6 mg/día (Institute of Medicine, 1998). Sin embargo, estudios recientes han reportado que la ingestión de la vitamina B2 está disminuyendo en algunos grupos de la población (Mensink et al., 2013), dando lugar a riesgo de deficiencias en la vitamina en las personas con edades

avanzadas (Fabian et al., 2012). De este modo, puede ser recomendable, para grupos específicos de individuos, una suplementación de su ingestión diaria de riboflavina.

La riboflavina o vitamina B2 es una vitamina que juega un importante papel en el metabolismo energético de la célula y se encuentra implicada en distintas reacciones redox, ya que actúa como precursor de los flavin-coenzimas FMN y FAD. El operón *rib*, también estudiado anteriormente en el presente trabajo (ver Capítulo 2, apartado 3.1), codifica para los enzimas catalíticos de la síntesis de riboflavina, desde el GTP a ribulosa-5-fosfato; la inspección de la región reguladora de dicho operón reveló una secuencia con la capacidad de plegarse dando lugar a una estructura de RNA característica y bien conservada evolutivamente, de 140 pb aproximadamente, conocida como elemento RFN (Abbas y Sibirny, 2011). La función reguladora del elemento RFN se desarrolla mediante la unión directa de su mRNA naciente con el coenzima FMN, complejo que se conoce como “riboswitch”. Esta estructura es muy importante para la regulación del operón de síntesis de la riboflavina, ya que lleva a la formación de una horquilla terminadora que atenúa la transcripción del mismo. En cambio, en ausencia de FMN, la conformación del elemento RFN forma una estructura anti-terminadora que permite la transcripción del operón (Winkler et al., 2002). Existen muchos análogos de las flavinas en la naturaleza y, en concreto, la roseoflavina es un análogo estructural de la riboflavina. La roseoflavina resulta tóxica por ser un precursor de derivados de FMN y de FAD que son inactivos como coenzimas en la célula (Abbas y Sibirny, 2011) y, además, se ha observado que, en cepas de *Bacillus subtilis* sensibles a la roseoflavina, ésta se une al “riboswitch” formado entre el FMN y la región reguladora RFN, lo que inhibe la transcripción del operón de síntesis de la riboflavina (Ott et al., 2009).

Burgess et al. (2006) describieron un método basado en el uso de roseoflavina para la selección de cepas superproductoras de riboflavina de las especies *Lb. plantarum* y *Lc. mesenteroides*, que consistía en exponer la cepa productora al análogo estructural y aislar las variantes naturales que presentaban un incremento significativo de producción de riboflavina. Observaron que todas las mutaciones analizadas en estas cepas superproductoras se localizaban en la zona donde se produce el “riboswitch” del elemento RFN, lo que posiblemente estaría impidiendo la unión del FMN-roseoflavina y, por tanto, la atenuación en la síntesis de riboflavina, obteniéndose de este modo las variantes de las cepas desreguladas en cuanto a la producción de la vitamina. En los casos de mayor superproducción, este fenotipo se manifiesta por una coloración amarillenta del medio de cultivo, procedimiento que ha sido aplicado con éxito en otros trabajos

(Russo et al., 2014). Recientemente y mediante el uso de roseoflavina, varios autores han obtenido variantes naturales de cepas de BAL capaces de aumentar significativamente el contenido de la vitamina en diversos alimentos fermentados, consiguiendo así la bio-fortificación de los mismos (Capozzi et al., 2011b; Juárez del Valle et al., 2014; Russo et al., 2014).

Además, el desarrollo de alimentos funcionales debe tener en cuenta el hecho de que, durante la producción y almacenamiento de los alimentos, las BAL se encuentran expuestas a condiciones adversas derivadas de los procesos de elaboración, que pueden afectar significativamente a su viabilidad y/o rendimiento tecnológico y, por tanto, a su producción a nivel industrial (Ferrando et al., 2015; Capozzi et al., 2016; Laureys, et al., 2017). En el presente capítulo, se describe la caracterización tecnológica de siete cepas productoras de riboflavina *Lc. mesenteroides* T1M3 de tocosh, *Lb. plantarum* M5MA1, M9MG6, M9MM1, M9MM4 y M9Y2 de chicha y *Lc. suionicum* M9MG2b de chicha, seleccionadas, además, por reunir otras características relevantes como son la actividad degradadora de fitatos (Capítulo 2) o propiedades interesantes relacionadas con la seguridad alimentaria (Capítulo 3), con el objetivo de determinar aquellas que presenten mejores aptitudes tecnológicas, y obtener su aplicación en el desarrollo de un alimento funcional a base de cereales. Los resultados de este Capítulo se recogen en la publicación Yépez et al. (2018) (Anexo II).

1. Comportamiento de las cepas de BAL seleccionadas en condiciones de estrés y frente a distintas fuentes de carbono

Para determinar la idoneidad de las cepas seleccionadas en cuanto a su aplicación en la industria alimentaria, se ha estudiado la tolerancia a distintos estreses relacionados con procesos de producción de alimentos, así como su capacidad de crecimiento en distintas fuentes de carbono.

Las condiciones de estrés estudiadas fueron: pH ácido (3 y 4), altas temperaturas (37 °C y 42 °C), bajas temperaturas (10 °C y 20 °C), alta presión osmótica (2% y 4% de concentraciones de NaCl) y resistencia a la presencia de etanol (8% y 10%). El comportamiento de las cepas a los distintos estreses se muestra en la Figura 1 del Capítulo 4 (Fig. 1-C4), en la que se representan los valores de densidad óptica a una absorbancia $\lambda = 600 \text{ nm}$ ($DO_{600\text{nm}}$), estimados como máximos durante el ensayo.

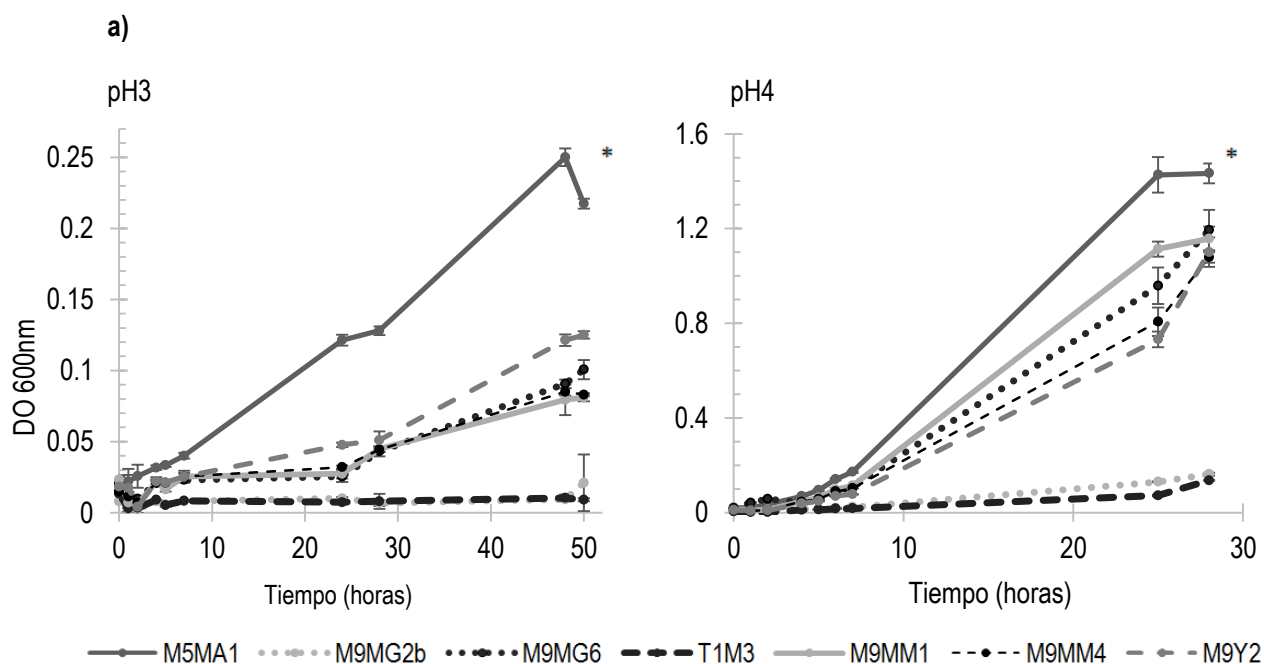


Fig. 1-C4. Crecimiento de las cepas de *Lb. plantarum*, *Lc. suionicum* y *Lc. mesenteroides* bajo las distintas condiciones de estrés a: a) pH ácido, b) bajas y altas temperaturas, c) distintas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) (p/v), y d) presencia de etanol (EtOH) (v/v). El incremento en la $DO_{600\text{nm}}$ se muestra en función del tiempo (horas) y se monitorizó hasta alcanzar la fase estacionaria. Los datos expuestos son medias \pm el error estándar de medidas por triplicado. Los valores de $DO_{600\text{nm}}$ máximas para cada cepa se obtuvieron mediante el ajuste a la ecuación de Gompertz (Zwietering et al., 1990). Se realizó un análisis ANOVA de una vía y los valores significativamente más altos de acuerdo con el test Tukey HSD ($\alpha = 0,05$) están marcados con un asterisco. Se realizó con el software Statistica 7.0.

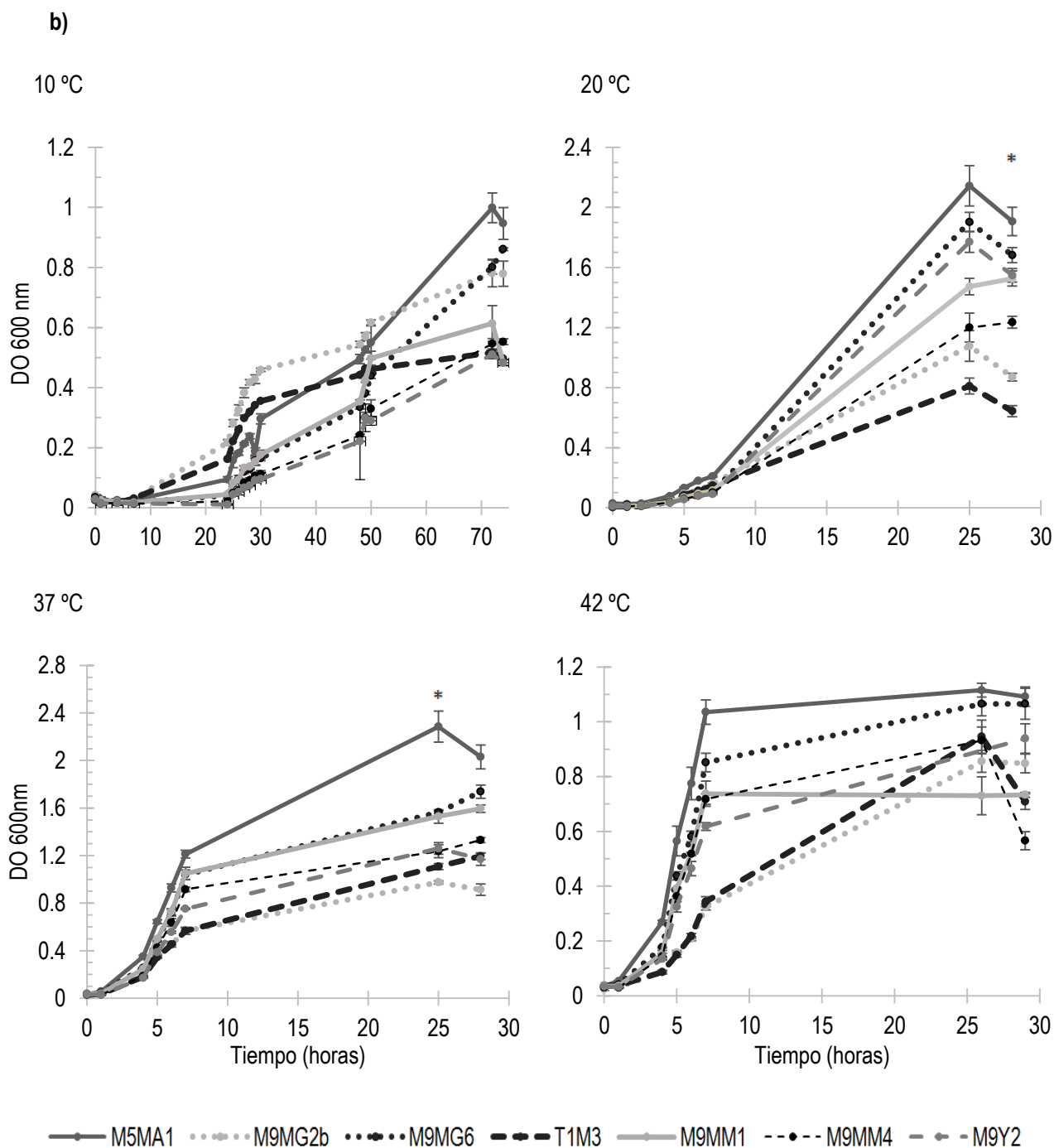


Fig. 1-C4. Cont.

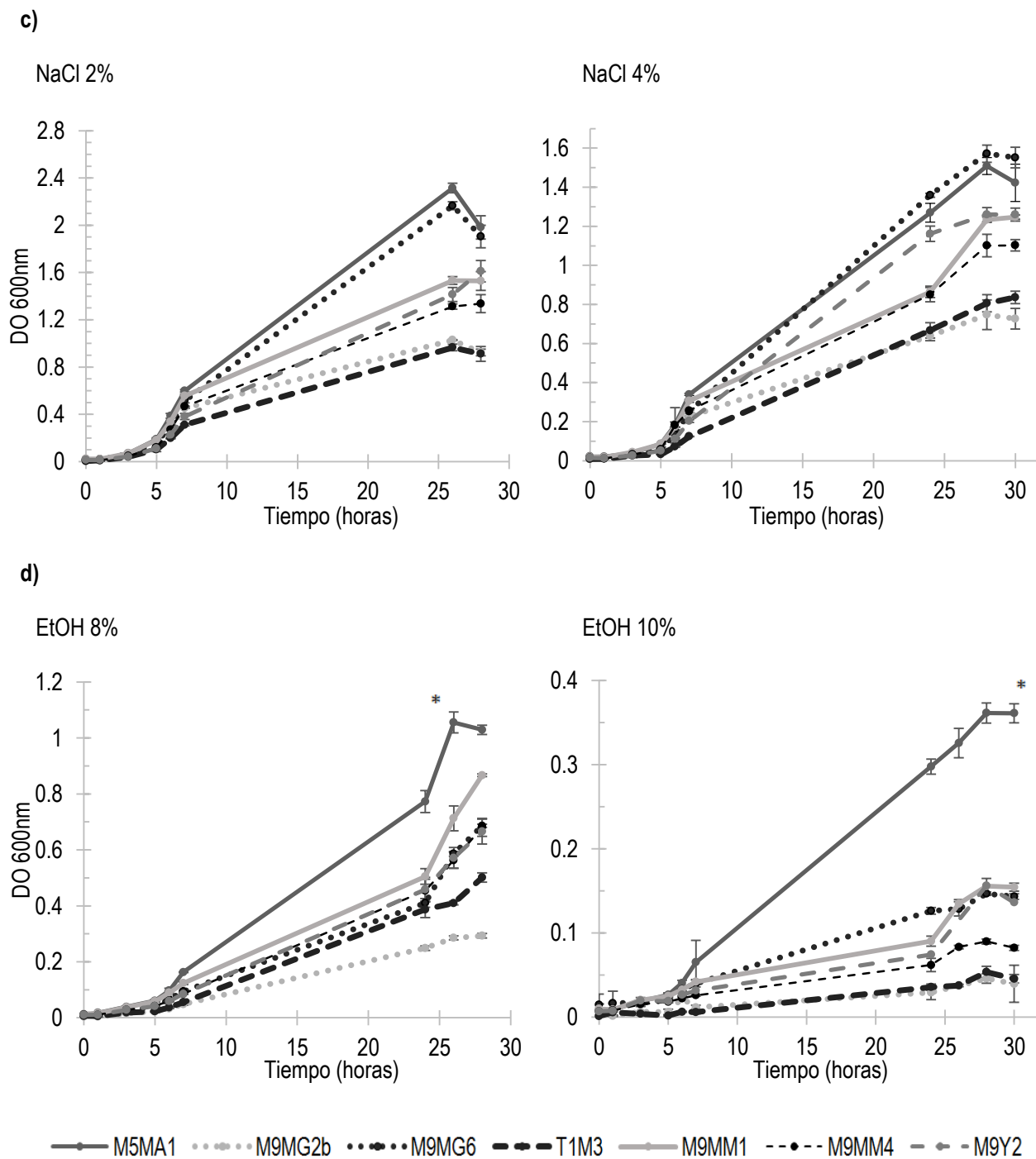


Fig. 1-C4. Cont.

Capítulo 4. Resultados

En cuanto a las condiciones de pH, el análisis estadístico confirmó que las cepas *Lb. plantarum* mostraron las máximas DO_{600nm} estimadas a ambas condiciones de pH. No obstante, las cepas de *Leuconostoc* M9MG2b y T1M3 no mostraron crecimiento o éste fue muy bajo a los pHs estudiados (Figura 1-C4 a). Todas las cepas fueron capaces de crecer a las diferentes temperaturas estudiadas y, en general, las mejores tasas de crecimiento se observaron a 20 °C, seguidas por 37 °C. Cabe destacar los resultados obtenidos de la cepa *Lb. plantarum* M5MA1 ya que alcanzó la máxima DO_{600nm} estimada a todas las temperaturas estudiadas, mostrando una diferencia estadísticamente significativa a 20 y a 37 °C. Las cepas *Lc. mesenteroides* T1M3 y *Lc. suionicum* M9MG2b no mostraron diferencias significativas con *Lb. plantarum* M9Y2 a 37 °C, ni con *Lb. plantarum* M9MM4 a 20 °C. Por tanto, el crecimiento a una temperatura determinada dentro de este rango, 20-37 °C, es una característica dependiente de cepa y no de especie. Como se esperaba, la incubación a 10 °C disminuyó mucho el crecimiento de todas las cepas además de retardar su fase estacionaria (Figura 1-C4 b). En cuanto al estrés frente a la presión osmótica, todas las cepas estudiadas fueron capaces de crecer al 2%, y también al 4% aunque presentaron menor DO_{600nm} . *Lb. plantarum* M5MA1 y M9MG6 alcanzaron la máxima DO_{600nm} estimada al 2% de NaCl mientras que las cepas del género *Leuconostoc* mostraron la mínima DO_{600nm} a ambas concentraciones de sal (Figura 1-C4 c). El crecimiento en presencia del 8% de etanol fue entre 2 y 4 veces más alto que en presencia del 10% de etanol para las cepas de *Lb. plantarum*, siendo M5MA1 y M9MM1 las que alcanzaron la máxima DO_{600nm} estimada para ambas condiciones. Sin embargo, las cepas del género *Leuconostoc* a penas crecieron al 10% de etanol (Figura 1-C4 d).

Considerando los resultados globales para las condiciones de estrés, *Lb. plantarum* M5MA1 mostró la mejor tolerancia a pH ácido, y el mejor crecimiento a un amplio rango de temperaturas, así como a distintas concentraciones de sal y de etanol. Además, también presentó la mayor μ_{max} (máxima velocidad de crecimiento) a ambos pHs y a 20, 37 y 42 °C (datos no representados).

Además, se determinó el crecimiento en presencia de diferentes fuentes de carbono, glucosa, lactosa y sacarosa, de las cepas *Lb. plantarum* M5MA1, M9MG6 y M9MM1, por ser las más prometedoras en cuanto a su tolerancia a los distintos estreses estudiados. Los resultados se muestran en la Figura 2-C4. Cabe destacar que ninguna de las tres cepas fué capaz de crecer cuando la única fuente de carbono era la lactosa.

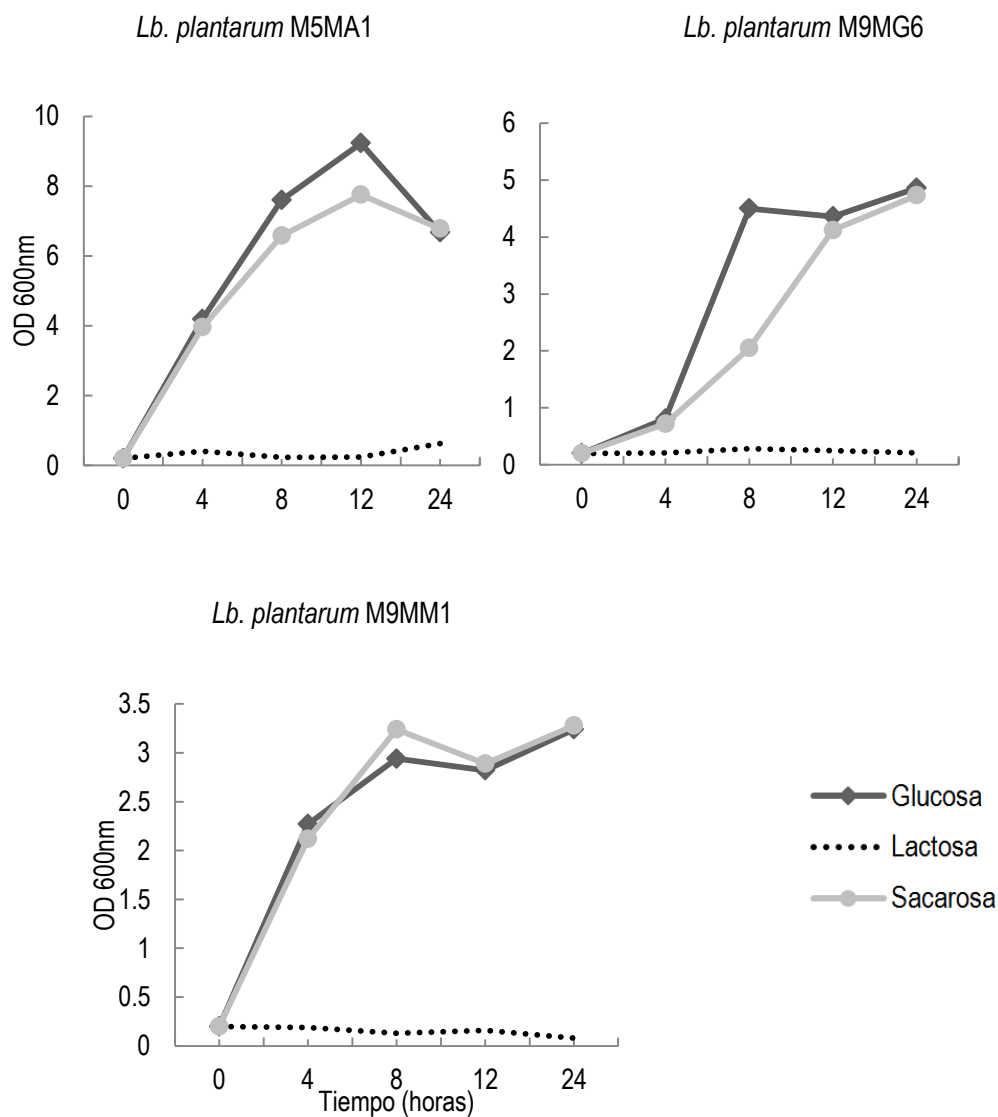


Fig. 2-C4. Crecimiento de las cepas *Lb. plantarum* M5MA1, M9MG6 y M9MM1, seleccionadas por su buena tolerancia a las condiciones de estrés, en medio químicamente definido con diferentes fuentes de carbono. El incremento en la OD_{600nm} se muestra en función del tiempo (horas) y se monitorizó durante 24 h a 30 °C.

2. Selección de cepas superproductoras de riboflavina y análisis de la región reguladora RFN

En paralelo a los estudios de evaluación de la resistencia a los estreses industriales, las 7 cepas seleccionadas por producir, de forma natural, las mayores concentraciones de riboflavina, fueron tratadas con el agente químico roseoflavina para recuperar mutantes espontáneos superproductores de riboflavina y conseguir niveles de producción adecuados para el enriquecimiento de una matriz alimentaria. Las cepas salvajes de BAL fueron expuestas a la presión selectiva de la roseoflavina. Tras la exposición, los cultivos se inocularon en medio sólido y las colonias se subcultivaron en medio libre de riboflavina, como presuntas superproductoras. El cambio de color del medio de cultivo de blanco a amarillo permitió detectar, de forma cualitativa, el fenotipo de superproducción de la vitamina, seleccionándose las que presentaron el color amarillo más intenso y se designaron añadiendo "B2" al nombre de la cepas (M5MA1-B2, M9MG6-B2, M9MM1-B2, M9MM4-B2, M9Y2-B2, M9MG2b-B2 y T1M3-B2). Posteriormente, se determinó la producción de vitamina B2, correspondiente a todo el extracto celular, mediante la cuantificación analítica por HPLC acoplada a un detector de fluorescencia. Los resultados se muestran en la Figura 3-C4.

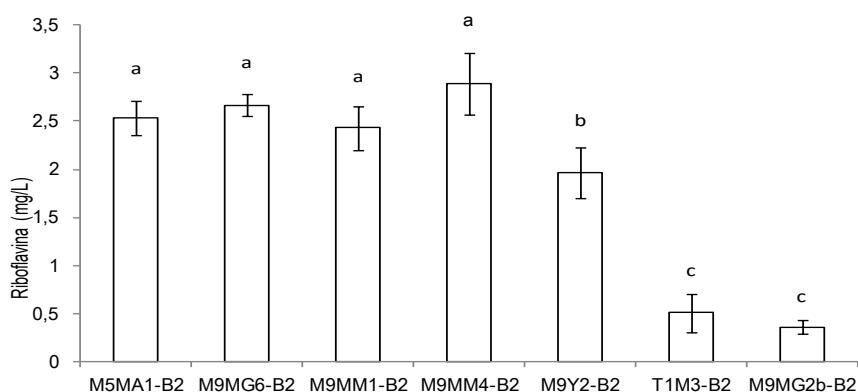


Fig. 3-C4. Cuantificación analítica por HPLC de la riboflavina del extracto celular total de los derivados resistentes a la roseoflavina de las cepas de BAL estudiadas y expresada en mg/L, tras la incubación a 30 °C durante 48 h. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía. La comparación por pares de las medias se realizó mediante el test de Tukey con un nivel de significancia de valores de $P < 0.05$, usando el software estadístico Past 3.0.

El contenido en riboflavina se encontraba en el rango entre 2,5 y 2,8 mg/L para todos los derivados de las cepas de *Lb. plantarum*. Sin embargo, se observó una menor capacidad para la síntesis de vitamina B2 en los derivados de cepas de *Leuconostoc*, siendo aproximadamente de 0,5 mg/L para ambas cepas.

A continuación, se analizaron las secuencias de la región reguladora conocida como elemento RFN con el objetivo de identificar posibles mutaciones asociadas a la superproducción de riboflavina. Este estudio se centró en las cepas de *Lb. plantarum* por ser mayores productoras, incluyéndose tanto las salvajes como las derivadas resistentes a la roseoflavina con fines comparativos. En todos los casos, se observó el cambio de un nucleótido (Anexo I). Los mutantes espontáneos de *Lb. plantarum* M5MA1-B2 y M9MM1-B2 mostraron la misma mutación en la posición 19, que consistía en una adenina (A) en vez de una guanosina (G). Mientras que el mutante espontáneo de la cepa *Lb. plantarum* M9MG6-B2 presentaba una citosina (C) en vez de una A en la misma posición que las anteriores. Por su parte, se observó la mutación simple (A en vez de G) en la posición 114 del mutante espontáneo de la cepa *Lb. plantarum* M9Y2-B2 y en la posición 125 de *Lb. plantarum* M9MM4-B2.

3. Potencial de las cepas de BAL seleccionadas para su aplicación en un modelo de alimento funcional vegetal

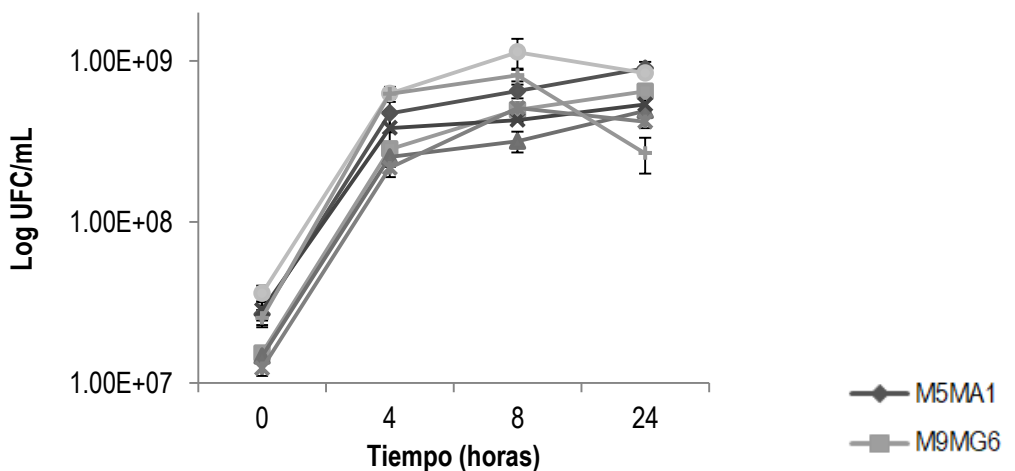
Como una primera aproximación para la elaboración de un alimento vegetal enriquecido en riboflavina, se evaluó el crecimiento de las 7 cepas de BAL *Lb. plantarum* (M5MA1, M9MG6, M9MM1 y M9MM4), *Lc. suionicum* (M9MG2b) y *Lc. mesenteroides* (T1M3), en dos matrices de origen vegetal: leche de soja y leche de avena comerciales.

A continuación, se escogió la elaboración de productos “tipo kéfir” a partir de los cereales avena, malta y maíz, como modelo de alimento fermentado con el objetivo de conseguir la biofortificación en riboflavina del mismo mediante la incorporación de una cepa de BAL seleccionada. Dicha selección se realizó teniendo en cuenta tanto los resultados de tolerancia a los estreses tecnológicos estudiados como las cantidades de riboflavina producidas por cada cepa tras la obtención de sus variantes superproductoras de la vitamina.

3.1 Comportamiento de las cepas de BAL seleccionadas durante la fermentación de bebidas basadas en matrices vegetales

El crecimiento de las cepas de BAL en las bebidas comerciales de soja y de avena se muestra en la Figura 4-C4. Además, se realizó la monitorización del pH del producto durante la fermentación.

a)



b)

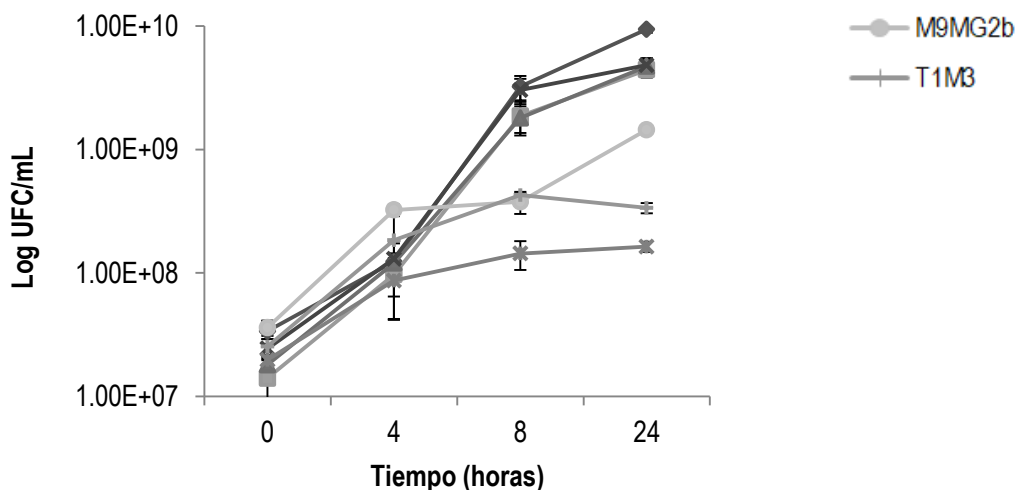


Fig. 4-C4. Monitorización del crecimiento de las cepas de BAL seleccionadas en las dos matrices vegetales estudiadas: a) leche de soja y b) leche de avena, mediante recuento en placas de MRS y representado como unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro (mL), en función del tiempo. Se partió de un inóculo inicial de 10^7 UFC/mL y la fermentación se realizó durante 24 h a 30°C .

Todas las cepas eran capaces de crecer en leche de soja comercial, aumentando de 1 a 2 unidades logarítmicas su densidad en la bebida en las primeras 4 horas de fermentación y manteniendo su viabilidad al menos durante 24 h. Se observó un descenso de pH generándose un producto similar al yogur y para determinar el final del proceso de fermentación se tomó como criterio que se alcanzara un valor de pH 4,6 como en el caso del yogur. En el producto derivado de la leche de soja, las cepas *Lc. mesenteroides* T1M3 7,5 h y *Lc. suionicum* M9MG2b consiguieron la acidificación en 9 h, seguidas por *Lb. plantarum* M9MG6 y M5MA1 que lo hicieron tras 12 horas de fermentación.

La leche de avena también permitió el crecimiento de todas las cepas ensayadas. Todas las *Lb. plantarum*, excepto M9Y2, superaron una densidad de 10^9 UFC/mL durante las 8 primeras horas de fermentación y, en el caso de *Lb. plantarum* M5MA1, llegó a aumentar 3 unidades logarítmicas pasadas las 24 horas. En cambio, las cepas del género *Leuconostoc* en 8 horas habían aumentado una unidad logarítmica y media y, solamente *Lc. suionicum* M9MG2b, llegó a las 10^9 UFC/mL al final de la fermentación. En cuanto a la monitorización del pH en la bebida de avena, con *Lc. mesenteroides* T1M3 y *Lc. suionicum* M9MG2b el descenso de pH a 4,6 se alcanzó en aproximadamente 6 h, mientras que las cepas de *Lb. plantarum* necesitaron al menos 10 h.

3.2 Ensayos de resistencia a condiciones de estrés relacionadas con la producción de kéfir

Con el fin de abordar el diseño de un producto fermentado tipo kefir enriquecido en riboflavina, se seleccionaron las cepas de *Lb. plantarum* M5MA1, M9MG6 y M9MM1 productoras de riboflavina por su buen crecimiento en las matrices vegetales y por presentar la mejor tolerancia a los estreses estudiados. Así mismo, se evaluaron las cepas superproductoras de vitamina B2, derivadas de ellas mediante la monitorización de su crecimiento en condiciones que simulasen las del kéfir, en este caso, 2 % etanol, pH 4 y 25 °C, simultáneamente.

Todas las cepas fueron capaces de crecer en las condiciones estudiadas y, además, no se observaron diferencias significativas entre las cepas salvajes y las derivadas superproductoras de riboflavina. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5-C4.

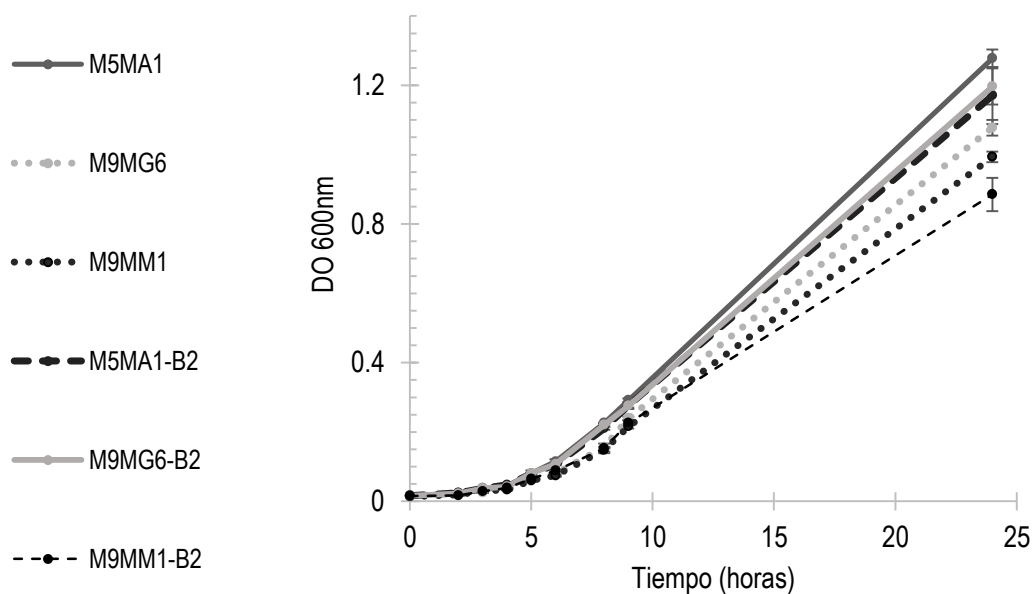


Fig. 5-C4. Crecimiento de las cepas seleccionadas de *Lb. plantarum* (M5MA1, M9MG6 y M9MM1), y sus respectivas variantes resistentes a las roseoflavina, bajo las condiciones de estrés relacionadas con la producción de kéfir (pH 4, 2 % de etanol y 25°C). Se representa el incremento de la DO_{600nm} en función del tiempo (horas) y monitorizado durante 24 h. Los datos mostrados son medias \pm las desviaciones estándar como resultado de tres réplica. El parámetro DO_{600nm} máxima para cada cepa se obtuvo mediante el ajuste de la ecuación de Gompertz (Zwietering et al., 1990). Se llevó a cabo el análisis ANOVA de una vía siguiendo el test de Tukey HSD ($\alpha = 0.1$).

La cepa *Lb. plantarum* M5MA1 y su derivada *Lb. plantarum* M5MA1-B2 fueron las que alcanzaron valores de DO mayores, por ello, se seleccionó esta última para inocularse en combinación con los cultivos iniciadores comerciales en las fermentaciones de los productos tipo kéfir basados en cereales y comprobar si era capaz de enriquecerlos en riboflavina.

3.3 Determinación de los parámetros físico-químicos y microbiológicos del kéfir de leche y los productos tipo kéfir a base de cereales

Los valores registrados para los distintos parámetros físico-químicos se resumen en la Tabla.1-C4.

Tabla 1-C4. Análisis físico-químico del kéfir de leche y de los productos tipo kéfir de cereales elaborados con estárter de kéfir de agua (a), con estárter de kéfir de leche (b), o co-inoculados (β) tanto (a) como (b) con la cepa superproductora de riboflavina *Lb. plantarum* M5MA1-B2.

Matriz	Lote	Pérdida total de CO ₂ (g/25mL) ¹	Ácido láctico (g/L) ¹	Ácido acético (g/L) ¹	Viscosidad (cP) ²
Leche	a	0,40±0,07a*	7,96±0,70a*	0,73±0,07a*	80,0±0,00a*
	b	0,04±0,02b	8,77±0,99a	1,01±0,15b	560±56,57b
	a β	0,10±0,00ab	5,47±0,17b	1,21±0,09b	440±0,00b
	b β	0,10±0,00ab	4,29±0,55b	1,09±0,15b	520±0,00b
	C3	0,02±0,00b	-	-	40,0±0,00a
Avena	a	0,60±0,04c	-0,01±0,01c	-0,72±0,05d	520±25,00c
	b	0,03±0,01d	0,50±0,31c	-0,73±0,06d	1300±44,00d
	a β	0,27±0,00d	1,10±0,13cd	-1,11±0,00e	1180±39,00d
	b β	0,01±0,00d	2,69±0,75e	-0,97±0,00de	1460±26,00d
	C	0,04±0,00d	-	-	680±12,00c
Cebada	a	1,61±0,07e	0,19±0,04f	-1,12±0,28g	480±13,0e
	b	0,28±0,04f	2,20±0,38gh	1,24±0,16h	860±0,00ef
	a β	0,71±0,00f	1,60±0,38fgh	-0,63±0,00gi	1080±0,00f
	b β	0,12±0,00f	3,04±0,86h	1,04±0,00hi	960±0,00ef
	C	0,27±0,00f	1,04±0,07fg	1,30±0,00h	600±0,00ef
Maíz	a	0,23±0,02g	0,48±0,06i	-0,83±0,09j	820±19,0g
	b	0,07±0,01h	2,79±0,26j	-0,19±0,01k	1880±0,00h
	a β	0,15±0,00gh	0,66±0,42i	0,32±0,00l	1400±0,00gh
	b β	0,05±0,00h	3,44±0,26j	0,21±0,00kl	1520±0,00gh
	C	0,08±0,00h	0,93±0,30i	0,56±0,00l	1400±0,00gh

¹La pérdida total de dióxido de carbono (CO₂) y los valores de los ácidos láctico y acético son el resultado de la diferencia entre las determinaciones tras 48 h de fermentación y la medida al inicio de la misma.

²La viscosidad en centipoise (cP) fue determinada tras las 48 h de fermentación.

³C, matriz sin inocular.

*Las letras distintas en la misma columna indica que son valores de ANOVA de una vía significativamente diferentes según el test de Tukey HSD ($\alpha = 0,1$).

La producción de los ácidos láctico y acético, en los tres productos “tipo kéfir” basados en cereales y en el kéfir de leche, se determinaron como la diferencia entre la concentración al final y al inicio de la fermentación, y se calculó la pérdida total de CO₂ a lo largo de toda la fermentación. Además, con el objetivo de estudiar las propiedades reológicas de los productos elaborados, se determinó la viscosidad de los mismos al final del proceso de fermentación.

Respecto a las diferencias entre los dos tipos de cultivos iniciadores de kéfir utilizados, en el caso de la producción de CO₂ la mayor pérdida de peso correspondió a los productos fermentados con el estárter de kéfir de agua y, especialmente, en los productos elaborados con cebada. El mayor contenido en ácido láctico se observó en los productos fermentados con el estárter de leche. Sin embargo, el tipo de cultivo iniciador comercial utilizado no afectó al contenido en ácido acético, siendo la matriz fermentada el factor que parece influir más en este parámetro.

Además, cabe destacar que todos los lotes fermentados con kéfir de leche mostraron un marcado aumento de la viscosidad con respecto a la matriz correspondiente no fermentada. En particular, el empleo del estárter de kéfir de leche en leche dio lugar a una viscosidad 14 veces mayor que el control. Así mismo, los productos de cereales fermentados con el estárter de kéfir de leche mostraron mayor viscosidad, con un incremento de más de 1,5 veces respecto a las matrices correspondientes sin inocular.

La co-inoculación con la cepa *Lb. plantarum* M5MA1-B2 aumentó la concentración en ácido láctico en los productos basados en cereales al compararse con las matrices fermentadas con cualquiera de los dos cultivos iniciadores utilizados, mientras que se observó una reducción del contenido en ácido láctico cuando se utilizó leche como matriz a fermentar. En cuanto al contenido en ácido acético, no se observaron cambios significativos por la adición de la cepa superproductora de riboflavina. Cabe destacar que la actividad de la cepa *Lb. plantarum* M5MA1-B2 mejoró considerablemente la textura de las matrices co-inoculadas con el estárter de kéfir de agua, obteniéndose una viscosidad 5 veces mayor en la leche y aproximadamente 2 veces mayor en los productos tipo kéfir de cereales.

En cuanto a la caracterización sensorial, los productos basados en avena y cebada fermentados con el estárter de kéfir de leche mostraron un aroma agradable y relacionable con productos lácteos, mientras que los productos obtenidos a base de maíz presentaron un aroma menos atrayente.

La caracterización microbiológica de los productos fermentados se realizó mediante recuento de microorganismos viables y los resultados se muestran en la Tabla 2-C4.

Tabla 2-C4. Determinación mediante recuento en placa de las BAL y las levaduras viables en el kéfir de leche y en los productos tipo kéfir basados en cereales, inoculados con estárter de kéfir de agua (a), de kéfir de leche (b) o co-inoculados con la cepa superproductora de riboflavina *Lb. plantarum* M5MA1-B2 (β). Los recuentos se realizaron en muestras tomadas tras 48 h de fermentación a 25°C.

Matriz	Lote	MRS (Log UFC/mL) ¹	YPD+cloranfenicol (Log UFC/mL) ¹
Leche	a	7,90±0,16	7,66±0,10
	b	7,54±0,07	3,16±0,13
	aβ	8,38±0,25	6,88±0,07
	bβ	8,05±0,08	2,97±0,02
	C2	3,75±0,02	2,23±0,08
Avena	a	7,28±0,25	7,23±0,21
	b	6,91±0,04	3,15±0,22
	aβ	8,48±0,12	6,91±0,04
	bβ	8,25±0,15	3,70±0,15
	C	3,98±0,02	4,06±0,23
Cebada	a	8,37±0,32	8,11±0,22
	b	8,30±0,26	3,16±0,26
	aβ	8,91±0,09	7,64±0,08
	bβ	8,91±0,06	1,26±0,04
	C	4,02±0,02	1,34±0,06
Maíz	a	8,31±0,13	7,87±0,09
	b	7,67±0,13	3,27±0,17
	aβ	8,62±0,10	8,81±0,11
	bβ	8,71±0,05	2,71±0,16
	C	4,13±0,06	2,83±0,08

¹Media del Log de las unidades formadoras de colonia (UFC) por mL ± desviación estándar de los recuentos por triplicado, en el medio MRS para el recuento de BAL y en el medio YPD suplementado con 0,01 g/L de cloranfenicol para el recuento de levaduras.

²C, matriz sin inocular.

Los recuentos de BAL de los productos elaborados mostraron valores similares entre ellos, independientemente de la matriz alimentaria analizada, siendo ligeramente más altos los recuentos de los co-inoculados con la cepa *Lb. plantarum* M5MA1-B2. Respecto a los recuentos de levaduras, comparando con los valores registrados para las matrices sin inocular, en los productos elaborados con el estárter de kéfir de agua se observó un aumento de aproximadamente 3 Log UFC/mL; mientras que no se observaron diferencias en los productos elaborados con el estárter de kéfir de leche, lo que sugiere que la composición microbiana de ambos cultivos iniciadores es distinta, al menos en cuanto a levaduras.

3.4. Producción de riboflavina en los productos tipo kéfir

El contenido de riboflavina, tanto de los productos finales tras la fermentación como de las matrices no fermentadas, se muestra en la Figura 6-C4.

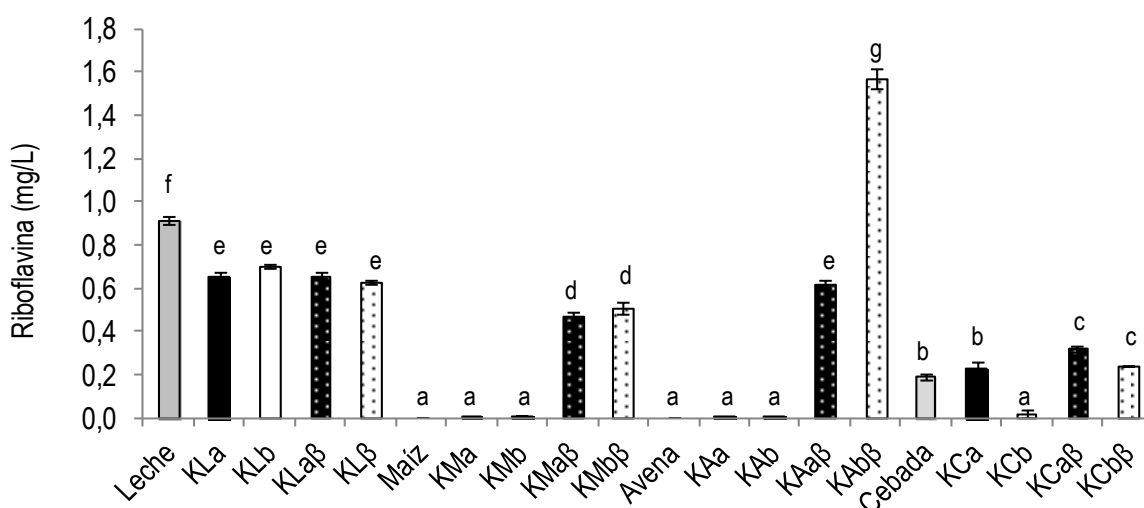


Fig. 6-C4. Cuantificación de la riboflavina en matrices no fermentadas (barras grises); o en el kéfir de leche (KL), kéfir de maíz (KM), kéfir de avena (KA) y kéfir de cebada (KC), fermentados con los cultivos iniciadores comerciales: “a”, kéfir de agua (barras negras), o “b”, kéfir de leche (barras blancas); y co-inoculadas (β) con la cepa superproductora de riboflavina *Lb. plantarum* M5MA1-B2 (barras punteadas). Se realizó un análisis ANOVA y los valores con distintas letras son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$).

Se detectaron diferencias significativas en el contenido de vitamina B2 de las matrices sin fermentar, siendo de casi 1 mg/L en leche; de las matrices cereales, sólo la cebada presentaba una concentración de 0,2 mg/L y fue indetectable en avena y maíz. Curiosamente, en todos los lotes de kéfir de leche, incluso en los co-inoculados con *Lb. plantarum* M5MA1-B2, se detectó una reducción del contenido en riboflavina de aproximadamente 0,25 mg/L tras las 48 h de fermentación.

Los productos a base de cereales, elaborados tanto con el estárter de kéfir de agua como el de leche, presentaron niveles de riboflavina similares a las matrices sin inocular excepto en cebada en que con el estárter de leche disminuyó su contenido. Sin embargo, al co-inocularse con la cepa superproductora de riboflavina *Lb. plantarum* M5MA1-B2, se observó un incremento generalizado de la vitamina. En el kéfir de cebada, el aumento fue de 1,5 veces con respecto al control (0,32 mg/L) con el estárter de agua, mientras que, en el de maíz, aumentó desde niveles indetectables hasta 0,5 mg/L con ambos cultivos iniciadores. El aumento fue incluso mayor en avena, especialmente con el estárter de leche, con el que se alcanzaron valores superiores a 1,6 mg/L lo que supone un incremento de 2,5 veces.

3.5. Perfil de los VOC de los productos de kéfir elaborados

El perfil de los VOC del kéfir de leche y de los productos tipo kéfir de cereales se determinó a lo largo del proceso de fermentación mediante monitorización continua durante 24 horas, utilizando la tecnología PTR-ToF-MS, con el objetivo de elucidar aquellos compuestos que diferenciaban unos productos de otros y si la adición de la cepa superproductora de riboflavina afectaba a dichos perfiles.

Los resultados mostraron que catorce VOC se producían en concentraciones importantes y se identificaron como responsables de contribuir en el aroma y sabor de los productos elaborados. Se identificaron tentativamente como: cinco cetonas (2-butanona, 2-pentanona, acetona, diacetilo y metil vinil cetona), dos aldehídos (acetaldehído y hexanal), dos ésteres (acetoína y butirato de etilo), dos alcoholes (isobutanol y etanol), dos ácidos carboxílicos (ácido acético y acetato de hexilo) y un compuesto azufrado (sulfuro de dimetilo).

El total de los datos obtenidos se sometieron al PCA (Figura 7-C4) para estimar, de forma preliminar, el impacto de la diversidad de los VOC asociados, a las matrices estudiadas, a los cultivos iniciadores utilizados (kéfir de agua y de leche) y a la presencia de la cepa superproductora de riboflavina. Se observó que las dos primeras componentes principales

Discusión

Los alimentos funcionales constituyen un mercado en expansión ya que pueden ofrecer sus beneficios a distintos sectores de la población. Los productos lácteos fermentados, como el kéfir, se encuentran entre los más populares y reconocidos como bebidas saludables. Sin embargo, debido a las cada vez más extendidas intolerancias a la leche, hoy en día el consumidor demanda alimentos funcionales fermentados no lácteos, con propiedades saludables similares. Los cereales son una buena alternativa como matrices fermentables pero, para parecerse nutricionalmente a la leche, requieren muchas veces de un enriquecimiento en vitaminas. En el presente estudio, nuestro objetivo fue i) desarrollar nuevas bebidas a base de cereales que imiten la fabricación de kéfir y ii) mejorar la calidad nutricional de las nuevas bebidas utilizando cepas de BAL superproductoras de riboflavina.

Estos nuevos productos pueden encajar perfectamente en casos como la dieta típica de América Latina, donde, en las últimas décadas, se ha observado una baja ingesta de riboflavina (Bressani, 2000; Berti et al., 2014; Singh et al., 2017). Los principales cultivos de cereales en América del Sur son el arroz, la avena, la cebada, el sorgo, el trigo y el maíz (Ferrero et al., 2018). Entre ellos, en el presente estudio se seleccionaron el maíz, por su relevancia, y la avena y la cebada, como sustratos económicos con potencial para obtener ingredientes funcionales. Para las fermentaciones, se utilizaron dos cultivos iniciadores comerciales diseñados para producir kéfir de leche o kéfir de agua, con y sin la cepa superproductora de riboflavina *Lb. plantarum* M5MA1-B2. Aunque en la literatura existen trabajos que describen la elaboración de bebidas a base de vegetales utilizando cultivos iniciadores de kéfir (Liu y Lin 2000; Cui et al., 2013; Puerari et al., 2012; Corona et al., 2016; Randazzo et al., 2016), todavía es muy escasa la información sobre productos tipo kéfir a base de cereales. Estos nuevos productos se han denominado “productos tipo kéfir”, siguiendo la denominación de las bebidas basadas en vegetales tipo kéfir ya que, al igual que en estas últimas, las fermentaciones se llevaron a cabo con cultivos iniciadores comerciales que contienen un consorcio complejo de levaduras y

bacterias responsables de la producción de kéfir. Los recuentos microbianos obtenidos en el presente trabajo sugieren que, tanto las bebidas comerciales estudiadas como modelo preliminar de alimento funcional vegetal (de soja y de avena), como los cereales finalmente escogidos para la elaboración de los nuevos productos tipo kéfir, presentan propiedades fermentables que son comparables a otras de origen vegetal previamente investigadas (Liu y Lin, 2000; Puerari et al., 2012; Cui et al., 2013; Corona et al., 2016; Randazzo et al., 2016). Los resultados obtenidos corroboran el potencial de los ingredientes tipo cereales para la formulación de bebidas fermentadas similares a los lácteos (Coda et al., 2012; Peyer et al., 2016), un campo de creciente interés en cuanto al desarrollo de soluciones destinados a sectores específicos de la población, como son los veganos y las personas con necesidades dietéticas especiales (Mäkinen et al., 2016).

En general, el estárter de kéfir de leche mostró mejor aptitud para producir ácido láctico y para aumentar la viscosidad en todas las matrices cereales ensayadas. Sin embargo, el tipo de cultivo iniciador comercial utilizado, no afectó al contenido en ácido acético, mientras que sí que se observó una mayor producción de este ácido en el producto a base de cebada, por lo que dicho aumento se atribuye al tipo de matriz fermentada. En cuanto a la medida de la pérdida de CO₂, parece relacionada con el tipo de cultivo iniciador, ya que fue mayor en los productos fermentados con el de kéfir de agua. Este resultado podría explicarse por el mayor recuento de levaduras obtenido en los productos elaborados con estárter de kéfir de agua, y concuerda con la identificación de *Saccharomyces cerevisiae* en este mismo estárter de kéfir comercial realizada en el trabajo de Randazzo et al. (2016). En general, el estárter de kéfir de leche parece ser más apropiado para fabricar bebidas tipo kéfir a base de cereales. Curiosamente, la actividad de la cepa *Lb. plantarum* M5MA1-B2 mejoraba el contenido de ácido acético en la bebida a base de maíz y la concentración de ácido láctico en el producto a base de avena, ocurriendo también ligeramente este último fenómeno en el kéfir de cebada. Además, se observó que *Lb. plantarum* M5MA1-B2 mejoraba la viscosidad al combinarse con el estárter de kéfir de agua. Por tanto, nuestros resultados sugieren que esta cepa podría usarse para mejorar el rendimiento del estárter de kéfir de agua en la elaboración de bebidas tipo kéfir a partir de matrices cereales.

Respecto al enriquecimiento en vitaminas de productos tipo kéfir, existen estudios en los que se han utilizado microorganismos para la producción de otras vitaminas del grupo B (Van Wyk et al., 2011). Sin embargo, esta es la primera vez que el kéfir y productos similares al kéfir son bio-fortificados con riboflavina. Para la selección de la cepa superproductora, se consideró que estas

bacterias deben sobrevivir bajo las condiciones del procesado de alimentos (Serrazanetti et al., 2009; Laureys et al., 2017) y que el kéfir es una leche fermentada ácido-alcohólica (Prado et al., 2015). Entre las siete cepas de BAL analizadas, se observaron diferencias, tanto entre especies como entre cepas, en la respuesta a los estreses ensayados. Por ejemplo, las cepas de *Leuconostoc* sp. fueron menos tolerantes a la sal (estrés osmótico) y al ácido que las cepas de *Lb. plantarum*, en concordancia con otros resultados previamente reportados en la literatura (Hammes y Hertel, 2006). Concretamente, estas variaciones en la tolerancia al ácido entre *Lc. mesenteroides* y *Lb. plantarum* se asocian a su mayor capacidad para reducir el pH intracelular en respuesta a una disminución del pH externo (McDonald et al., 1990). De las cepas de *Lb. plantarum* analizadas, *Lb. plantarum* M5MA1 destacó por su mayor resistencia a todos los factores de estrés estudiados.

Los niveles de producción de forma natural de vitamina B2 de las cepas seleccionadas no son suficientes para el enriquecimiento en la elaboración de un alimento funcional. El uso la técnica de presión selectiva mediante exposición a roseoflavina, previamente utilizada en *Lb. plantarum* y en *Lc. mesenteroides* (Burgess et al. 2006; Capozzi et al. 2011b; Juárez del Valle et al., 2014; Russo et al., 2014), permitió la obtención de mutantes espontáneos que producían de 2 a 3 mg/L de la vitamina; estas cantidades fueron más altas que las obtenidas con esta aproximación y previamente descritas en la bibliografía, alrededor de 0,9 mg/L en *Lactococcus lactis* (Burgess et al., 2004) o 1,2 mg/L en *Lb. fermentum* (Russo et al., 2014).

Para asegurar la estabilidad del fenotipo superproductor, se realizó el análisis de las secuencias de la región reguladora RFN de los mutantes espontáneos resistentes a la roseoflavina *Lb. plantarum* M5MA1, M9MG6, M9MM1, M9MM4 y M9Y2 con respecto a las cepas salvajes. En todas ellas se observó la presencia de mutaciones puntuales que respaldarían la incapacidad de formarse el complejo “riboswitch”, entre el elemento RFN y el FMN, impidiéndose la represión de la expresión génica del operón de síntesis de la riboflavina, como se describió en *Lactococcus lactis* (Burgess et al., 2004), *Lc. mesenteroides* y *Lb. plantarum* (Burgess et al., 2006). Asimismo, estudios más recientes coinciden en la asociación de mutaciones en esta región con el fenotipo de resistencia a roseoflavina (Capozzi et al., 2011b; Russo et al., 2014). Aunque es posible que se dé la pérdida de las propiedades de algunos mutantes (Wegkamp, 2008), en el caso de los mutantes espontáneos resistentes a la roseoflavina se ha descrito que mantienen un fenotipo estable al menos hasta 60 generaciones (Burgess et al. 2006; Capozzi et al. 2011b).

La selección de cepas realizada en el presente trabajo, como *Lb. plantarum* M5MA1, corrobora la relevancia y versatilidad de las BAL que poseen propiedades tecnológicas, por ejemplo, para su uso como agentes espesantes (Zannini et al., 2016) y funcionales, como lo es aumentar el contenido de riboflavina en matrices de cereales (Capozzi et al., 2011b; Russo et al., 2016). No obstante, nuestros resultados indican que la capacidad de *Lb. plantarum* M5MA1-B2 para aumentar el contenido de vitamina B2 en las bebidas está relacionada con la matriz y el cultivo iniciador utilizados. Por ejemplo, la fermentación de leche con cualquiera de los dos cultivos iniciadores comerciales, kéfir de leche o de agua, y en combinación con la cepa superproductora de vitamina B2, producía una reducción del contenido de riboflavina. En cambio, en cebada, se detectó un aumento estadísticamente significativo en el contenido de riboflavina entre los productos obtenidos con los estárter de kefir de leche / agua y los productos correspondientes obtenidos por co-fermentación con la cepa superproductora. En maíz y avena, se detectó una clara superproducción de la vitamina cuando se utilizó *Lb. plantarum* M5MA1-B2 en combinación con estárter de kéfir de leche o agua. Sin embargo, en el caso de la avena, el fenotipo superproductor de *Lb. plantarum* M5MA1-B2 fue extraordinariamente alto cuando se utilizó con el estárter de kéfir de leche. Por tanto, cabe destacar la importancia de combinar la matriz y el cultivo iniciador apropiados para optimizar la fortificación *in situ* utilizando bacterias superproductoras de riboflavina. Mediante bio-fortificación con *Lb. plantarum* M5MA1-B2, una porción de kéfir a base de avena de 100 gramos proporcionaría, aproximadamente, el 11,4% de la CDR para la vitamina B2.

Finalmente, los resultados del análisis de espectrometría de masas de inyección directa PTR-MS-ToF, realizado por primera vez para caracterizar el contenido de los VOC asociados con el kéfir clásico y las bebidas tipo kéfir basadas en cereales, mostró diferencias entre ellos tras utilizar diferentes combinaciones de matriz / estárter / BAL productora de vitamina B2. Aunque ha sido un estudio preliminar, los resultados obtenidos demuestran el potencial de PTR-MS-ToF en el monitoreo de bioprocesos aplicado al sector alimentario, ya descrito por algunos autores (Benozzi et al., 2015; Capozzi et al., 2017). No obstante, la variabilidad detectada entre los modos experimentales analizados requiere de un estudio complementario sobre sus propiedades sensoriales, así como las pruebas de aceptación por el consumidor que permitirán valorar su potencial para entrar en el mercado de los alimentos funcionales.

CONCLUSIONES

1. Las 779 cepas de BAL, aisladas de los alimentos tradicionales fermentados de Latinoamérica e identificadas en el presente estudio, pertenecen a los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella* y *Enterococcus*, principalmente, dominando las especies *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus sakei*.
2. La caracterización biotecnológica de 311 cepas seleccionadas, representando las especies identificadas, ha revelado que, en su mayoría, presentan actividad degradadora de fitatos y capacidad de producir vitaminas del grupo B, mientras que la capacidad de producir EPS se limita a cepas de la especie *Lc. mesenteroides* y del género *Weissella*, y, del total de cepas caracterizadas, sólo cinco presentan actividad amilasa.
3. El análisis genómico de 14 cepas con características destacables ha confirmado su adscripción taxonómica en 5 *Lb. plantarum*, 3 *Lc. mesenteroides*, 2 *Lb. sakei* y un *Lb. fermentum*, y la reclasificación de 3 *Lc. mesenteroides* como *Lc. suionicum*. En cuanto a las rutas biosintéticas de vitaminas del grupo B, los cuatro genes necesarios para la biosíntesis de la riboflavina están presentes en todas, excepto en las 2 cepas de *Lb. sakei*, y los seis genes necesarios para la síntesis *de novo* del tetrahidrofolato están presentes en todas las cepas excepto en *Lc. mesenteroides*.
4. Las cepas estudiadas presentan actividad antimicrobiana de forma generalizada frente a patógenos bacterianos transmisibles por alimentos, como *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria* y *Salmonella*, y frente a hongos alterantes de alimentos, como *Aspergillus oryzae* y *Meyerozyma guilliermondii*; cabe destacar que muchas de las cepas provenientes de atole presentan, además, una fuerte actividad antifúngica frente a *Penicillium roqueforti*, así como una cepa de chicha (*Lb. plantarum* M5MA1) y dos de tocosh (*Lb. sakei* T3M7 y *Lc. mesenteroides* T2MM3).
5. La utilización de extractos libres de células neutralizados ha confirmado la actividad antibacteriana observada y ha demostrado que 5 cepas poseen, además, una fuerte actividad antifúngica frente a los hongos micotoxigénicos *A. parasiticus*, *P. expansum* y *Fusarium verticilloides*. Los compuestos responsables de la inhibición producida por *Lb. plantarum* M5MA1, M9MG6 y *Lb. fermentum* T3M3b, han sido identificados como ácidos fenólicos. En el caso de la actividad frente a los patógenos bacterianos, en las cepas *Lb. plantarum* M9MG6 y M9MM1 y de *Lc. mesenteroides* T1M3, se ha evidenciado la producción de compuestos de naturaleza proteica.

Conclusiones

6. La mayoría de las cepas de chicha y tocosh son sensibles a antibióticos mientras que, por el contrario, prácticamente la totalidad de cepas de atole resisten a uno, dos o más antibióticos, clasificándose como multirresistentes, y siendo la resistencia frente a ampicilina la más frecuente en cepas de los tres alimentos. La búsqueda de genes de resistencias a antibióticos, en los genomas de las cepas secuenciadas, ha revelado que el gen *aadA* de resistencia a los aminoglucósidos se encuentra en todas las cepas, sin embargo, dicha resistencia no se ha confirmado en los ensayos “in vitro” y no se puede confirmar que se localice en una zona potencialmente transferible del genoma.

7. Las cepas *Lc. mesenteroides* T1M3 de tocosh, y *Lb. plantarum* M5MA1, M9MG6, M9MM1, M9MM4 y M9Y2 y *Lc. suionicum* M9MG2b de chicha, son las siete seleccionadas por sus características de interés biotecnológico, i.e. producción de riboflavina, actividad degradadora de fitatos, sensibilidad a antibióticos y actividad antimicrobiana. De ellas, la cepa *Lb. plantarum* M5MA1 presenta la mejor tolerancia a pH ácido, y el mejor crecimiento en un amplio rango de temperaturas, así como a distintas concentraciones de sal y de etanol.

8. Se han obtenido siete mutantes superproductores de riboflavina, mediante tratamiento con el agente químico roseoflavina, destacando las cepas de *Lb. plantarum* que producen entre 2,5 y 2,8 mg/L, llegando a niveles de producción adecuados para la bio-fortificación de alimentos. Además, el análisis de las secuencias de la región reguladora, conocida como elemento RFN, ha permitido identificar posibles mutaciones asociadas a la superproducción de riboflavina.

9. Se ha diseñado un alimento modelo “tipo kéfir”, a base de cereales, demostrándose que su fermentación mediante la cepa superproductora de riboflavina, *Lb. plantarum* M5MA1-B2, en combinación con el estárter de kéfir de agua, mejora el proceso de elaboración, cuando la matriz es avena o maíz, por su aumento en la producción de ácido láctico. Cabe destacar que 100 g del producto tipo kéfir, obtenido a partir de avena y fermentado con el estárter de kéfir de leche más la cepa superproductora, contienen el 11,4% de la CDR de riboflavina.

10. El producto tipo kéfir, obtenido a partir de avena y bio-fortificado en riboflavina, presenta perfiles de VOC y características sensoriales que apoyan su potencial para entrar en el mercado de los alimentos funcionales.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, C.A., Sibirny, A.A., 2011. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 321–60. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00030-10>
- Abeijón Mukdsi, M.C., Medina, R.B., Katz, M.B., Pivotto, R., Gatti, P., González, S.N., 2009. Contribution of Lactic Acid Bacteria Esterases to the Release of Fatty Acids in Miniature Ewe's Milk Cheese Models. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1036–1044. <https://doi.org/10.1021/jf8026606>
- Abid, Y., Casillo, A., Gharsallah, H., Joulak, I., Lanzetta, R., Corsaro, M.M., Attia, H., Azabou, S., 2018. Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Biol. Macromol.* 108, 719–728. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.10.155>
- Abriouel, H., Omar, N. Ben, López, R.L., Martínez-Cañamero, M., Keleke, S., Gálvez, A., 2006. Culture-independent analysis of the microbial composition of the African traditional fermented foods poto poto and dégué by using three different DNA extraction methods. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 228–233. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.006>
- Adams, M. R., 2010. Fermented meat products, en: Tamang, J.P., Kailasapathy, K. (Eds.), *Fermented Foods and Beverages of the World*. CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, N.Y., pp. 309–322.
- Aidara-Kane, A., Angulo, F.J., Conly, J.M., Minato, Y., Silbergeld, E.K., McEwen, S.A., Collignon, P.J., 2018. World Health Organization (WHO) guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 7, 7. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0294-9>
- Albuquerque, M.A.C., Bedani, R., LeBlanc, J.G., Saad, S.M.I., 2017. Passion fruit by-product and fructooligosaccharides stimulate the growth and folate production by starter and probiotic cultures in fermented soymilk. *Int. J. Food Microbiol.* 261, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.001>
- Ammor, M.S., Flórez, A.B., van Hoek, A.H.A.M., de los Reyes-Gavilán, C.G., Aarts, H.J.M., Margolles, A., Mayo, B., 2008. Molecular Characterization of Intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 14, 6–15. <https://doi.org/10.1159/000106077>
- Amoa-Awua, W.K., Owusu, M., Feglo, P., 2005. Utilization of Unfermented Cassava Flour for the Production of an Indigenous African Fermented Food, Agbelima. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 1201–1207. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-1441-7>
- Anastasio, M., Pepe, O., Cirillo, T., Palomba, S., Blaiotta, G., Villani, F., 2010. Selection and Use of Phytate-Degrading LAB to Improve Cereal-Based Products by Mineral Solubilization During Dough Fermentation. *J. Food Sci.* 75, M28–M35. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01402.x>
- Angiuoli, S. V., Gussman, A., Klimke, W., Cochrane, G., Field, D., Garrity, G., Kodira, C.D., Kyrpides, N., Madupu, R., Markowitz, V., Tatusova, T., Thomson, N., White, O., 2008. Toward an online repository of Standard Operating Procedures (SOPs) for (meta) genomic annotation. *OMICS* 12, 137–141. <https://doi.org/10.1089/omi.2008.0017>

- Archibald, F., 1986. Manganese: Its Acquisition by and Function in the Lactic Acid Bacteria. CRC Crit. Rev. Microbiol. 13, 63–109. <https://doi.org/10.3109/10408418609108735>
- Arena, M.P., Silvain, A., Normanno, G., Grieco, F., Drider, D., Spano, G., Fiocco, D., 2016. Use of *Lactobacillus plantarum* Strains as a Bio-Control Strategy against Food-Borne Pathogenic Microorganisms. Front. Microbiol. 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00464>
- Arendt, E.K., Ryan, L.A.M., Bello, F.D., 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. Food Microbiol. 24, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.011>
- Atrih, A., Rekhif, N., Moir, A.J.G., Lebrihi, A., Lefebvre, G., 2001. Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. Int. J. Food Microbiol. 68, 93–104. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00482-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00482-2)
- Axel, C., Röcker, B., Brosnan, B., Zannini, E., Furey, A., Coffey, A., Arendt, E.K., 2015. Application of *Lactobacillus amylovorus* DSM19280 in gluten-free sourdough bread to improve the microbial shelf life. Food Microbiol. 47, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.10.005>
- Axelsson, L., 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology, en S. Salminen, y A. von Wright (Eds.), Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects. Marcel Dekker, Inc., pp. 1-72.
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O., 2008. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. BMC Genomics 9, 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Aznar, R., Chenoll, E., 2006. Intraspecific Diversity of *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, and *Leuconostoc mesenteroides* Associated with Vacuum-Packed Meat Product Spoilage Analyzed by Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR. J. Food Prot. 69, 2403–2410. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.10.2403>
- Bacher, A., Eberhardt, S., Fischer, M., Kis, K., Richter, G., 2000. Biosynthesis of Vitamin B2 (Riboflavin). Annu. Rev. Nutr. 20, 153–167. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.20.1.153>
- Basu, T. K., Dickerson, J. W., 1996. Vitamins in human health and disease. Wallingford: CAB International; 1996. p. 345.
- Baruzzi, F., Matarante, A., Caputo, L., Morea, M., 2006. Molecular and physiological characterization of natural microbial communities isolated from a traditional Southern Italian processed sausage. Meat Sci. 72, 261–269. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.07.013>
- Benozzi, E., Romano, A., Capozzi, V., Makhoul, S., Cappellin, L., Khomenko, I., Aprea, E., Scampicchio, M., Spano, G., Märk, T.D., Gasperi, F., Biasioli, F., 2015. Monitoring of lactic fermentation driven by different starter cultures via direct injection mass spectrometric analysis of flavour-related volatile compounds. Food Res. Int. 76, 682–688. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.043>

- Berti, P.R., Fallu, C., Cruz Agudo, Y., 2014. Revista Panamericana de Salud Pública. Organizacion Panamericana de la Salud.
- Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E.D., Johnston, M.D., Barton, H.A., Wright, G.D., 2012. Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome. PLoS One 7, e34953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034953>
- Björkroth, J., Holzapfel, W., 2006. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*, en: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. Springer US, New York, NY, pp. 267-319. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_9
- Black, R.E., Cousens, S., Johnson, H.L., Lawn, J.E., Rudan, I., Bassani, D.G., Jha, P., Campbell, H., Walker, C.F., Cibulskis, R., Eisele, T., Liu, L., Mathers, C., 2010. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. Lancet 375, 1969–1987. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60549-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60549-1)
- Blanck, H.M., Bowman, B.A., Serdula, M.K., Khan, L.K., Kohn, W., Woodruff, B.A., Bhutanese Refugee Investigation Group, the B.R.I., 2002. Angular stomatitis and riboflavin status among adolescent Bhutanese refugees living in southeastern Nepal. Am. J. Clin. Nutr. 76, 430–5.
- Bohn, L., S. Meyer, A., K. Rasmussen, S., 2008. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. J. Zhejiang Univ. Sci. B 9, 165–191. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0710640>
- Botes, A., Todorov, S.D., von Mollendorff, J.W., Botha, A., Dicks, L.M.T., 2007. Identification of lactic acid bacteria and yeast from boza. Process Biochem. 42, 267–270. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.07.015>
- Bounaix, M.-S., Gabriel, V., Robert, H., Morel, S., Remaud-Siméon, M., Gabriel, B., Fontagné-Faucher, C., 2010. Characterization of glucan-producing *Leuconostoc* strains isolated from sourdough. Int. J. Food Microbiol. 144, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.05.026>
- Bourrie, B.C.T., Willing, B.P., Cotter, P.D., 2016. The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. Front. Microbiol. 7, 647. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00647>
- Bove, P., Gallone, A., Russo, P., Capozzi, V., Albenzio, M., Spano, G., Fiocco, D., 2012. Probiotic features of *Lactobacillus plantarum* mutant strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. 96, 431–441. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4031-2>
- Bressani, R., 2000. Micronutrient Policies for Agriculture in Latin America. Food Nutr. Bull. 21, 538–541. <https://doi.org/10.1177/156482650002100438>
- Briggiler-Marcó, M., Capra, M.L., Quiberoni, A., Vinderola, G., Reinheimer, J.A., Hynes, E., 2007. Nonstarter *Lactobacillus* Strains as Adjunct Cultures for Cheese Making: In Vitro Characterization and Performance in Two Model Cheeses. J. Dairy Sci. 90, 4532–4542. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2007-0180>

- Brosnan, B., Coffey, A., Arendt, E.K., Furey, A., 2014. The QuEChERS approach in a novel application for the identification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria cultures. *Talanta* 129, 364–373. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2014.05.006>
- Burgess, C., O'Connell-Motherway, M., Sybesma, W., Hugenholtz, J., van Sinderen, D., 2004. Riboflavin production in *Lactococcus lactis*: potential for in situ production of vitamin-enriched foods? *Appl. Environ. Microbiol.* 70. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5769-5777.2004>
- Burgess, C.M., Smid, E.J., Rutten, G., Van Sinderen, D., 2006. A general method for selection of riboflavin-overproducing food grade micro-organisms. *Microb. Cell Fact.* 5, 24. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-24>
- Burgess, C.M., Smid, E.J., van Sinderen, D., 2009. Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: An overview. *Int. J. Food Microbiol.* 133, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.012>
- Caggianiello, G., Kleerebezem, M., Spano, G., 2016. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 3877–3886. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7471-2>
- Cálix-Lara, T.F., Rajendran, M., Talcott, S.T., Smith, S.B., Miller, R.K., Castillo, A., Sturino, J.M., Taylor, T.M., 2014. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on spinach and identification of antimicrobial substances produced by a commercial Lactic Acid Bacteria food safety intervention. *Food Microbiol.* 38, 192–200. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.006>
- Caplice, E., Fitzgerald, G.F., 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 131–149. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00082-3)
- Capozzi, V., Ladero, V., Beneduce, L., Fernández, M., Alvarez, M.A., Benoit, B., Laurent, B., Grieco, F., Spano, G., 2011a. Isolation and characterization of tyramine-producing *Enterococcus faecium* strains from red wine. *Food Microbiol.* 28, 434–439. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.005>
- Capozzi, V., Menga, V., Digesù, A.M., De Vita, P., van Sinderen, D., Cattivelli, L., Fares, C., Spano, G., 2011b. Biotechnological Production of Vitamin B2-Enriched Bread and Pasta. *J. Agric. Food Chem.* 59, 8013–8020. <https://doi.org/10.1021/jf201519h>
- Capozzi, V., Russo, P., Dueñas, M.T., López, P., Spano, G., 2012. Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 1383–1394. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4440-2>
- Capozzi, V., Arena, M.P., Russo, P., Spano, G., Fiocco, D., Spano, G., Fiocco, D., 2016. Stressors and Food Environment, en: “Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics”. Elsevier, pp. 245–256. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802189-7.00016-2>
- Carrizo, S.L., Montes de Oca, C.E., Laiño, J.E., Suarez, N.E., Vignolo, G., LeBlanc, J.G., Rollán, G., 2016. Ancestral Andean grain quinoa as source of lactic acid bacteria capable to degrade phytate and produce B-group vitamins. *Food Res. Int.* 89, 488–494. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.013>

- Chaillou, S., Daty, M., Baraige, F., Dudez, A.-M., Anglade, P., Jones, R., Alpert, C.-A., Champomier-Vergès, M.-C., Zagorec, M., 2009. Intraspecies Genomic Diversity and Natural Population Structure of the Meat-Borne Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus sakei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 970–980. <https://doi.org/10.1128/AEM.01721-08>
- Chao, S.-H., Tomii, Y., Watanabe, K., Tsai, Y.-C., 2008. Diversity of lactic acid bacteria in fermented brines used to make stinky tofu. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.010>
- Chen, Y.-S., Yanagida, F., Hsu, J.-S., 2006. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from dochi (fermented black beans), a traditional fermented food in Taiwan. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 229–235. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01922.x>
- Chenoll, E., Macián, M.C., Aznar, R., 2003. Identification of *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* by rDNA-based techniques. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 546–556. <https://doi.org/10.1078/072320203770865855>
- Chenoll, E., Macián, M.C., Elizaquível, P., Aznar, R., 2007. Lactic acid bacteria associated with vacuum-packed cooked meat product spoilage: population analysis by rDNA-based methods. *J. Appl. Microbiol.* 102, 498–508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03081.x>
- Chokesajjawatee, N., Pornaem, S., Zo, Y.-G., Kamdee, S., Luxananil, P., Wanasen, S., Valyasevi, R., 2009. Incidence of *Staphylococcus aureus* and associated risk factors in Nham, a Thai fermented pork product. *Food Microbiol.* 26, 547–551. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.02.009>
- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D.R., da Costa, M.S., Rooney, A.P., Yi, H., Xu, X.-W., De Meyer, S., Trujillo, M.E., 2018. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 461–466. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516>
- Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A., Bartkiene, E., 2013. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control* 31, 539–545. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.004>
- Cocolin, L., Dolci, P., Rantsiou, K., 2011. Biodiversity and dynamics of meat fermentations: The contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. *Meat Sci.* 89, 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.011>
- Coda, R., Lanera, A., Trani, A., Gobbetti, M., Di Cagno, R., 2012. Yogurt-like beverages made of a mixture of cereals, soy and grape must: Microbiology, texture, nutritional and sensory properties. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.016>
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37, D141–D145. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn879>

- Collar, C., Mascarós, A. F., Barber, C. B., 1992. Amino Acid Metabolism by Yeasts and Lactic Acid Bacteria during Bread Dough Fermentation. *J. Food Sci.* 57, 1423–1427. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb06874.x>
- Consensus Document, 1999. Scientific Concepts of Functional Foods in Europe. *Bri J Nutr*, 81:S1. <https://doi.org/10.1079/BJN19990002>
- Coppola, S., Fusco, V., Andolfi, R., Aponte, M., Blaiotta, G., Ercolini, D., Moschetti, G., 2006. Evaluation of microbial diversity during the manufacture of Fior di Latte di Agerola, a traditional raw milk pasta-filata cheese of the Naples area. *J. Dairy Res.* 73, 264–272. <https://doi.org/10.1017/S0022029906001804>
- Corona, O., Randazzo, W., Miceli, A., Guarcello, R., Francesca, N., Erten, H., Moschetti, G., Settanni, L., 2016. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. *LWT - Food Sci. Technol.* 66, 572–581. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.014>
- Crittenden, R.G., Martinez, N.R., Playne, M.J., 2003. Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 217–222. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00170-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00170-8)
- Crowley, S., Mahony, J., Van Sinderen, D., 2013. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 33, 93–109. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.07.004>
- Cui, X.H., Chen, S.J., Wang, Y., Han, J.R., 2013. Fermentation conditions of walnut milk beverage inoculated with kefir grains. *LWT - Food Sci. Technol.* 50, 349–352. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.043>
- Da Silva Felício, M.T., Hald, T., Liebana, E., Allende, A., Hugas, M., Nguyen-The, C., Johannessen, G.S., Niskanen, T., Uyttendaele, M., McLauchlin, J., 2015. Risk ranking of pathogens in ready-to-eat unprocessed foods of non-animal origin (FoNAO) in the EU: Initial evaluation using outbreak data (2007–2011). *Int. J. Food Microbiol.* 195, 9–19. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.005>
- Danielsen, M., Wind, A., 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00254-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00254-4)
- Dashper, S.G., Liu, S.W., Reynolds, E.C., 2007. Antimicrobial peptides and their potential as oral therapeutic agents. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 13, 505–516. <https://doi.org/10.1007/s10989-007-9094-z>
- Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417–33. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- De Angelis, M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M.R., Gobbetti, M., 2001. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2011–20. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2011-2020.2001>
- De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M.R., McSweeney, P.L.H., Faccia, M., Giovine, M., Gobbetti, M., 2003. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 259–270. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00072-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00072-2)

- De Man, J.C., Rogosa, M., Sharp, M.E., 1960. A medium for the cultivation of Lactobacilli. J Appl Bacteriol 23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
- De Oliveira Leite, A.M., Miguel, M.A.L., Peixoto, R.S., Rosado, A.S., Silva, J.T., Paschoalin, V.M.F., 2013. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: A natural probiotic beverage. Brazilian J. Microbiol. 44, 341–349. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200001>
- De Vos, W.M., 2005. Frontiers in food biotechnology – fermentations and functionality. Curr. Opin. Biotechnol. 16, 187–189. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2005.03.006>
- De Vuyst, L., Neysens, P., 2005. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. Trends Food Sci. Technol. 16, 43–56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.012>
- De Vuyst, L., Vrancken, G., Ravyts, F., Rimaux, T., Weckx, S., 2009. Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. Food Microbiol. 26, 666–675. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.012>
- De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H.-M., Weckx, S., 2014. Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? Food Microbiol. 37, 11–29. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.002>
- Delibes Mateos, R., Barragan Villena, A., 2008. El consumo ritual de chicha en San José de moro. Arqueología Mochica: Nuevos Enfoques.
- Devirgiliis, C., Zinno, P., Perozzi, G., 2013. Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. Front. Microbiol. 4, 301. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00301>
- Devriese, L., Baele, M., Butaye, P., 2006. The Genus *Enterococcus*, en: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. Springer US, New York, NY, pp. 163–174. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_5
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Limitone, A., Minervini, F., Carnevali, P., Corsetti, A., Gaenzle, M., Ciati, R., Gobbetti, M., 2006. Glucan and Fructan Production by Sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. J. Agric. Food Chem. 54, 9873–9881. <https://doi.org/10.1021/jf061393>
- Díaz-Ruiz, G., Guyot, J.-P., Ruiz-Teran, F., Morlon-Guyot, J., Wachter, C., 2003. Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. Appl. Environ. Microbiol. 69, 4367–4374. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4367-4374.2003>
- Dicks, L.M.T., Dellaglio, F., Collins, M.D., 1995. Proposal To Reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 395–397. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-2-395>

Bibliografía

- Dolci, P., Alessandria, V., Rantsiou, K., Cocolin, L., 2015. 7 - Advanced methods for the identification, enumeration, and characterization of microorganisms in fermented foods, en: Holzapfel, W. (Ed.), *Advances in Fermented Foods and Beverages*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, pp. 157–176. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-015-6.00007-4>
- Dueñas, M., Irastorza, A., Fernández, K., Bilbao, A., 1995. Heterofermentative Lactobacilli Causing Ropiness in Basque Country Ciders. *J. Food Prot.* 58, 76–80. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.1.76>
- Dutka-Malen, S., Evers, S., Courvalin, P., 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33.
- EFSA, 2007. Opinion of the scientific committee on introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J.* 587, 1-16. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.587>
- EFSA, 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.* 10, 2740. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2740>
- EFSA, 2018. Guidance on the characterization of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA J.* 16, e05206. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5206>
- Elizaguível, P., Chenoll, E., Aznar, R., 2008. A TaqMan-based real-time PCR assay for the specific detection and quantification of *Leuconostoc mesenteroides* in meat products. *FEMS Microbiol. Lett.* 278, 62–71. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00974.x>
- Elizaguível, P., Sánchez, G., Salvador, A., Fiszman, S., Dueñas, M.T., López, P., de Palencia, P.F., Aznar, R., 2011. Evaluation of yogurt and various beverages as carriers of lactic acid bacteria producing 2-branched (1,3)- β -d-glucan. *J. Dairy Sci.* 94, 3271–3278. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4026>
- Elizaguível, P., Pérez-Cataluña, A., Yépez, A., Aristimuño, C., Jiménez, E., Cocconcelli, P.S., Vignolo, G., Aznar, R., 2015. Pyrosequencing vs. culture-dependent approaches to analyze lactic acid bacteria associated to chicha, a traditional maize-based fermented beverage from Northwestern Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 198, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.027>
- Endo, A., Dicks, L.M., 2014. Physiology of the LAB, en: *Lactic Acid Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 13–30. <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch2>
- Enujiugha, V.N., Badejo, A.A., 2017. Probiotic potentials of cereal-based beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 790–804. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.930018>
- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M.S., López-Munguía, A., Gosset, G., Bolívar, F., 2008. Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *Int. J. Food Microbiol.* 124, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003>
- Escamilla-Hurtado, M.L., Olguin-Lora, P., Prado-Barragan, L.A., 1993. Lactic acid fermentation of sour corn porridge of the Tzotzil ethnic group. *Rev. Española Cienc. y Tecnol. Aliment.* 555–565.

- European Food Information Council, 2006. Mini Guid. 06/2006. URL <http://www.eufic.org/article/en/expid/miniguide-vitamins/#3>
- Fabian, E., Bogner, M., Kickinger, A., Wagner, K.-H., Elmadfa, I., 2012. Vitamin status in elderly people in relation to the use of nutritional supplements. *J. Nutr. Health Aging* 16, 206–212. <https://doi.org/10.1007/s12603-011-0159-5>
- FAO, 2013. El Estado mundial de la agricultura y la alimentación. <http://www.fao.org/3/a-i3300s.pdf>
- Farhad, M., Kailasapathy, K., Tamang, J., 2010. Health aspects of fermented foods, en: Tamang, J.P., Kailasapathy, K. (Eds.), *Fermented Foods and Beverages of the World*. CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, N.Y., pp. 391–414.
- Ferrando, V., Quiberoni, A., Reinhemer, J., Suárez, V., 2015. Resistance of functional *Lactobacillus plantarum* strains against food stress conditions. *Food Microbiol.* 48, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.12.005>
- Ferrero, R., Lima, M., Gonzalez-Andujar, J.L., 2018. Crop production structure and stability under climate change in South America. *Ann. Appl. Biol.* 172, 65–73. <https://doi.org/10.1111/aab.12402>
- Fleet, G.H., 2007. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.010>
- Fraqueza, M.J., 2015. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 212, 76–88. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2015.04.035>
- Galle, S., Schwab, C., Dal Bello, F., Coffey, A., Gänzle, M.G., Arendt, E.K., 2012. Influence of in-situ synthesized exopolysaccharides on the quality of gluten-free sorghum sourdough bread. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 105–112. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2012.01.009>
- Gänzle, M.G., Vermeulen, N., Vogel, R.F., 2007. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiol.* 24, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.006>
- García-Mantrana, I., Monedero, V., Haros, M., 2014. Application of phytases from bifidobacteria in the development of cereal-based products with amaranth. *Eur. Food Res. Technol.* 238, 853–862. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2167-2>
- Gareau, M.G., Sherman, P.M., Walker, W.A., 2010. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. & Hepatol.* 7, 503. <https://doi.org/10.0.4.14/nrgastro.2010.117>
- Garrity, G.M., Holt, J.G., 2001. The Road Map to the Manual, en: Boone, D.R., Castenholz, R.W., Garrity, G.M. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume One: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. Springer New York, New York, NY, pp. 119–166. https://doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6_15

Bibliografía

- Garrote, G.L., Abraham, a G., De Antoni, G.L., 2001. Chemical and microbiological characterization of kefir grains. *J. Dairy Res.* 68, 639–652. <https://doi.org/10.1017/S0022029901005210>
- Gaudana, S.B., Dhanani, A.S., Bagchi, T., 2010. Probiotic attributes of *Lactobacillus* strains isolated from food and of human origin. *Br. J. Nutr.* 103, 1620–1628. <https://doi.org/10.1017/S0007114509993643>
- Gerez, C.L., Torino, M.I., Rollán, G., Font de Valdez, G., 2009. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control* 20, 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.03.005>
- Gevers, D., Huys, G., Swings, J., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 205, 31–36. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10921.x>
- Gevers, D., Masco, L., Baert, L., Huys, G., Debevere, J., Swings, J., 2003. Prevalence and Diversity of Tetracycline Resistant Lactic Acid Bacteria and their *tet* Genes Along the Process Line of Fermented Dry Sausages. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 277–283. <https://doi.org/10.1078/072320203322346137>
- Giraffa, G., Carminati, D., 2008. Molecular Techniques in Food Fermentation: Principles and Applications, en: Cocolin, L., Ercolini, D. (Eds.), *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. Springer New York, New York, NY, pp. 1–30. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74520-6_1
- Giraffa, G., 2014. Overview of the ecology and biodiversity of the LAB, en: *Lactic Acid Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 45-53. <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch4>
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R., 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 57–69.
- Guarneri, T., Rossetti, L., Giraffa, G., 2001. Rapid identification of *Lactobacillus brevis* using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 377–381. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.01014.x>
- Guerrant, R.L., Oriá, R.B., Moore, S.R., Oriá, M.O.B., Lima, A.A.M., 2008. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. *Nutr. Rev.* 66, 487–505. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2008.00082.x>
- Guido, R., Gabriele, A., Giovanna, A., Vasileios, B., de Lourdes, B.M., Georges, B., Andrew, C., Sandro, C.P., Gerhard, F., Jürgen, G., Boris, K., Maryline, K., Marta, L.-A., Secundino, L.P., Alberto, M., Baltasar, M., Fernando, R., Maria, S., Edoardo, V.R., John, W.R., Pieter, W., Boet, G., Lieve, H., Sirpa, K., Jaime, A., Montserrat, A., Rosella, B., Jaume, G., 2018. Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA J.* 16, 05206. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5206>
- Gupta, R.K., Gangoliya, S.S., Singh, N.K., 2013. Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. *J. Food Sci. Technol.* 52, 676–684. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0978-y>

- Guyot, J. P., 2010. Fermented cereal products, en: *Fermented Foods and Beverages of the World*. Tamang JP, Kailasapathy, K. (Eds.) CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, pp. 247-261. <https://doi.org/10.1201/ebk1420094954-c8>
- Guyot, J., 2012. Cereal-based fermented foods in developing countries: ancient foods for modern research. *Int. J. Food Sci. Technol.* 47, 1109–1114. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.02969.x>
- Hammes, W. P., Hertel, C., 2006. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*, en: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. Springer US, New York, NY, pp. 320-403. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_10
- Hansen, E.B., 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int. J. Food Microbiol.* 78, 119–131. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00238-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00238-6)
- Haros, M., Bielecka, M., Honke, J., Sanz, Y., 2008. Phytate-degrading activity in lactic acid bacteria. *Polish J. Food Nutr. Sci.* 58, 33–40.
- Henry, C.J., 2010. Functional foods. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64, 657. <https://doi.org/10.0.4.14/ejcn.2010.101>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E., 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. & Hepatol.* 11, 506.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 365s–373s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.365s>
- Holzapfel, W.H., Wood, B.J.B., 2014. Introduction to the LAB, en: *Lactic Acid Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–12. <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch1>
- Hongpattarakere, T., Chertong, N., Wichienchot, S., Kolida, S., Rastall, R.A., 2012. *In vitro* prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydr. Polym.* 87, 846–852. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2011.08.085>
- Horkheimer, H., 1973. *Alimentación y obtención de alimentos en el Perú prehispánico*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Hughenoltz, J., 2013. Traditional biotechnology for new foods and beverages. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 155–159.
- Hugenschmidt, S., Schwenninger, S.M., Gnehm, N., Lacroix, C., 2010. Screening of a natural biodiversity of lactic and propionic acid bacteria for folate and vitamin B12 production in supplemented whey permeate. *Int. Dairy J.* 20, 852–857. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.05.005>
- Hutkins, R. W., 2006. Fermented vegetables, en: *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 233-259

Bibliografía

- Ibarburu, I., Puertas, A.I., Berregi, I., Rodríguez-Carvajal, M.A., Prieto, A., Dueñas, M.T., 2015. Production and partial characterization of exopolysaccharides produced by two *Lactobacillus suebicus* strains isolated from cider. *Int. J. Food Microbiol.* 214, 54–62. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.012>
- Iino, T., Manome, A., Okada, S., Uchimura, T., Komagata, K., 2001. Effects of sodium acetate on the production of stereoisomers of lactic acid by *Lactobacillus sakei* and other lactic acid bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 47, 223–239. <https://doi.org/10.2323/jgam.47.223>
- Imbert, M., Blondeau, R., 1998. On the Iron Requirement of Lactobacilli Grown in Chemically Defined Medium. *Curr. Microbiol.* 37, 64–66. <https://doi.org/10.1007/s002849900339>
- Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington (DC): National Academies Press (US), 1998. 5, Riboflavin. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114322/>
- International Standard ISO 10932/IDF 223, 2010. Milk and milk products - Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria (LAB).
- Irlinger, F., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 302–310. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.016>
- Ishikawa, M., Tanasupawat, S., Nakajima, K., Kanamori, H., Ishizaki, S., Kodama, K., Okamoto-Kainuma, A., Koizumi, Y., Yamamoto, Y., Yamasato, K., 2009. *Alkalibacterium thalassium* sp. nov., *Alkalibacterium pelagium* sp. nov., *Alkalibacterium putridalgicola* sp. nov. and *Alkalibacterium kapii* sp. nov., slightly halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria isolated from marine organisms and salted foods collected in Japan and Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1215–1226. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65602-0>
- Iyer, R., Tomar, S.K., 2009. Folate: A Functional Food Constituent. *J. Food Sci.* 74, R114–R122. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01359.x>
- Iyer, R., Tomar, S.K., Uma Maheswari, T., Singh, R., 2010. *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.10.005>
- Jakobsen, J., 2008. Optimisation of the determination of thiamin, 2-(1-hydroxyethyl)thiamin, and riboflavin in food samples by use of HPLC. *Food Chem.* 106, 1209–1217. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.008>
- Jeong, D.-W., Lee, J.-H., 2015. Antibiotic resistance, hemolysis and biogenic amine production assessments of *Leuconostoc* and *Weissella* isolates for kimchi starter development. *LWT - Food Sci. Technol.* 64, 1078–1084. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2015.07.031>

- Jeon, H.H., Kim, K.H., Chun, B.H., Ryu, B.H., Han, N.S., Jeon, C.O., 2017. A proposal of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *jonggajibkimchii* subsp. nov. and reclassification of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *suionicum* (Gu et al., 2012) as *Leuconostoc suionicum* sp. nov. based on complete genome sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 2225–2230. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001930>
- Jiménez, E., Yépez, A., Pérez-Cataluña, A., Ramos Vásquez, E., Zúñiga Dávila, D., Vignolo, G., Aznar, R., 2018. Exploring diversity and biotechnological potential of lactic acid bacteria from tocosh - traditional Peruvian fermented potatoes - by high throughput sequencing (HTS) and culturing. *LWT - Food Sci. Technol.* 87, 567–574. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.033>
- Juárez del Valle, M., Laiño, J.E., Savoy de Giori, G., LeBlanc, J.G., 2014. Riboflavin producing lactic acid bacteria as a biotechnological strategy to obtain bio-enriched soymilk. *Food Res. Int.* 62, 1015–1019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.029>
- Jung, J.Y., Lee, S.H., Kim, J.M., Park, M.S., Bae, J.-W., Hahn, Y., Madsen, E.L., Jeon, C.O., 2011. Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2264–74. <https://doi.org/10.1128/AEM.02157-10>
- Justé, A., Malfliet, S., Waud, M., Crauwels, S., De Cooman, L., Aerts, G., Marsh, T.L., Ruyters, S., Willems, K., Busschaert, P., Lievens, B., 2014. Bacterial community dynamics during industrial malting, with an emphasis on lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 39, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.10.010>
- Kajala, I., Mäkelä, J., Coda, R., Shukla, S., Shi, Q., Maina, N.H., Juvonen, R., Ekholm, P., Goyal, A., Tenkanen, M., Katina, K., 2016. Rye bran as fermentation matrix boosts in situ dextran production by *Weissella confusa* compared to wheat bran. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 3499–3510. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7189-6>
- Kandler, O., Schillinger, U., Weiss, N., 1983. *Lactobacillus bifermentans* sp. nov., nom. rev., an Organism Forming CO₂ and H₂ from Lactic Acid. *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 408–412. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(83\)80025-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0723-2020(83)80025-3)
- Kandler, O., Weiss, N., 1986. Genus *Lactobacillus*, Beijerinck 1901, 212AL, en: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 1209–34.
- Kandylis, P., Pissaridi, K., Bekatorou, A., Kanellaki, M., Koutinas, A.A., 2016. Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Curr. Opin. Food Sci.* 7, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.012>
- Kayodé, A.P.P., Hounhouigan, D.J., Nout, M.J.R., Niehof, A., 2007. Household production of sorghum beer in Benin: technological and socio-economic aspects. *Int. J. Consum. Stud.* 31, 258–264. <https://doi.org/10.1111/j.1470-6431.2006.00546.x>
- Klaenhammer, T.R., Barrangou, R., Buck, B.L., Azcarate-Peril, M.A., Altermann, E., 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 393–409. <https://doi.org/10.1016/j.fmrre.2005.04.007>

- Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Müller-Bertling, S., Witte, W., Goossens, H., 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 900–912. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm035>
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Tarchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W., Stiekema, W., Lankhorst, R.M., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W.M., Siezen, R.J., 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337704100>
- Koort, J., Coenye, T., Santos, E.M., Molinero, C., Jaime, I., Rovira, J., Vandamme, P., Björkroth, J., 2006. Diversity of *Weissella viridescens* strains associated with “Morcilla de Burgos.” *Int. J. Food Microbiol.* 109, 164–168. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.021>
- Kralj, S., Geel-Schutten, G.H. van, Dondorff, M.M.G., Kirsanovs, S., Maarel, M.J.E.C. van der, Dijkhuizen, L., 2004. Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains. *Microbiology* 150, 3681–3690. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27321-0>
- Kumar, A., Schweizer, H.P., 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1486–1513. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2005.04.004>
- Lacerda Ramos, C., de Almeida, E.G., Pereira, G.V. de M., Cardoso, P.G., Dias, E.S., Schwan, R.F., 2010. Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.029>
- Laiño, J.E., Juárez del Valle, M., Savoy de Giori, G., LeBlanc, J.G.J., 2013. Development of a high folate concentration yogurt naturally bio-enriched using selected lactic acid bacteria. *LWT - Food Sci. Technol.* 54, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.035>
- Laiño, J.E., Zelaya, H., Juárez del Valle, M., Savoy de Giori, G., LeBlanc, J.G., 2015. Milk fermented with selected strains of lactic acid bacteria is able to improve folate status of deficient rodents and also prevent folate deficiency. *J. Funct. Foods* 17, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.055>
- Laulund, S., Wind, A., Derkx, P.M.F., Zuliani, V., 2017. Regulatory and Safety Requirements for Food Cultures. *Microorganisms* 5, 1-14.
- Laureys, D., Van Jean, A., Dumont, J., De Vuyst, L., 2017. Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 2811-2819. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8084-5>
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., Gobbetti, M., 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4084–90. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4084-4090.2000>

- Layton, B.A., Walters, S.P., Lam, L.H., Boehm, A.B., 2010. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.* 109, 539–547. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04675.x>
- LeBlanc, J.G., Sybesma, W., Starrenburg, M., Sesma, F., de Vos, W.M., de Giori, G.S., Hugenholtz, J., 2010. Supplementation with engineered *Lactococcus lactis* improves the folate status in deficient rats. *Nutrition* 26, 835–841. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.06.023>
- LeBlanc, J.G., Laiño, J.E., del Valle, M.J., Vannini, V., van Sinderen, D., Taranto, M.P., de Valdez, G.F., de Giori, G.S., Sesma, F., 2011. B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. *J. Appl. Microbiol.* 111, 1297–1309. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05157.x>
- Ledesma, O.V., De Ruiz Holgado, A.P., Oliver, G., De Giori, G.S., Raibaud P., Galpin, J.V., 1977. A Synthetic Medium for Comparative Nutritional Studies of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 42, 123–133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1977.tb00676.x>
- Leroy, F., De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 67–78
- Leroy, F., Verluysten, J., Vuyst, L. De, 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 270–285. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.027>
- Leuschner, R.G.K., Robinson, T.P., Hugas, M., Cocconcelli, P.S., Richard-Forget, F., Klein, G., Licht, T.R., Nguyen-The, C., Querol, A., Richardson, M., 2010. Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). *Trends Food Sci. Technol.* 21, 425–435.
- Liu, J.R., Lin, W.C., 2000. Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose, or sucrose. *JFS Food Microbiol. Saf. Prod.* 65, 716–719. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb16078.x>
- London, J., 1990. Uncommon pathways of metabolism among lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 87, 103–111. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90700-Z](https://doi.org/10.1016/0378-1097(90)90700-Z)
- Lonvaud-Funel, A., 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 76, 317–331. <https://doi.org/10.1023/A:1002088931106>
- López, H.W., Leenhardt, F., Coudray, C., Remesy, C., 2000. Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition? *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, 727–739. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00618.x>
- Lorence-Quiñones, A., Wachter-Rodarte, C., Quintero-Ramírez, R., 1999. Cereal fermentations in latin american countries. *FAO Agric. Serv. Bull.* 138, 99–114.
- Lücke, F.K., 2015. Quality improvement and fermentation control in meat products, en: *Advances in Fermented Foods and Beverages*. Holzapfel, W. (Ed.), Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, pp. 357–376. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-015-6.00015-3>

- Ludwig, W., Klenk, H.-P., 2009. Overview: A Phylogenetic Backbone and Taxonomic Framework for Prokaryotic Systematics, in: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. American Cancer Society, pp. 1–27. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.bm00020>
- Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Williams, B. W., 2015. Revised Road Map to the Phylum *Firmicutes*, in: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. American Cancer Society, pp. 1–16. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.bm00025>
- Lyhs, U., Korkeala, H., Björkroth, J., 2002. Identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged 'gravad' rainbow trout using ribotyping. *Int. J. Food Microbiol.* 72, 147–153. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00634-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00634-1)
- Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J., Schnürer, J., 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 219, 129–135. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01207-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01207-7)
- Maicas, S., Ferrer, S., Pardo, I., 2002. NAD(P)H regeneration is the key for heterolactic fermentation of hexoses in *Oenococcus oeni*. *Microbiology* 148, 325–332. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-325>
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.-H., Díaz-Muñiz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'textquoterightSullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D., 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 15611–15616. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607117103>
- Mäkinen, O.E., Wanhalinna, V., Zannini, E., Arendt, E.K., 2016. Foods for Special Dietary Needs: Non-dairy Plant-based Milk Substitutes and Fermented Dairy-type Products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 339–349. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.761950>
- Manini, F., Casiraghi, M.C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D., Plumed-Ferrer, C., 2016. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. *LWT-Food Sci. Technol.* 66, 275–283. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.045>
- Marsh, A.J., Hill, C., Ross, R.P., Cotter, P.D., 2014. Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends Food Sci. Technol.* 38, 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.05.002>
- Marshall, B. M., Ochieng, D. J., Levy, S. B., 2009. Commensals: underappreciated reservoir of antibiotic resistance. *Microbe.* 4, 231-238.
- Martinez, J.L., 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* 157, 2893–2902. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2009.05.051>
- Martirosyan, D.M., Singh, J., 2015. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? *Funct. Foods Heal. Dis.* 5, 209–223.

- Mayo, B., Ammor, M. S., Delgado, S., Alegría, A., 2010. Fermented milk products, en: J. P. Tamang (Eds.), K. Kailasapathy Fermented Foods and Beverages of the World. CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, NY, pp. 263–288. <https://doi.org/10.1201/ebk1420094954>
- McDonald, L.C., Fleming, H.P., Hassan, H.M., 1990. Acid Tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol. 56, 2120–4.
- Mensink, G.B.M., Fletcher, R., Gurinovic, M., Huybrechts, I., Lafay, L., Serra-Majem, L., Szponar, L., Tetens, I., Verkaik-Kloosterman, J., Baka, A., Stephen, A.M., 2013. Mapping low intake of micronutrients across Europe. Br. J. Nutr. 110, 755–773. <https://doi.org/10.1017/S000711451200565X>
- Meucci, A., Rossetti, L., Zago, M., Monti, L., Giraffa, G., Carminati, D., Tidona, F., 2018. Folate biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* during growth in milk. Food Microbiol. 69, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.001>
- Mills, S., Serrano, Lm., Griffin, C., O'Connor, P.M., Schaad, G., Bruining, C., Hill, C., Ross, R., Meijer, W.C., 2011. Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* LMG P-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese. Microb. Cell Fact. 10, S7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S7>
- Moat, S.J., Ashfield-Watt, P.A.L., Powers, H.J., Newcombe, R.G., McDowell, I.F.W., 2003. Effect of Riboflavin Status on the Homocysteine-lowering Effect of Folate in Relation to the MTHFR (C677T) Genotype. Clin. Chem. 49, 295–302. <https://doi.org/10.1373/49.2.295>
- Molenaar, D., Bringel, F., Schuren, F.H., de Vos, W.M., Siezen, R.J., Kleerebezem, M., 2005. Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays. J. Bacteriol. 187, 6119–27. <https://doi.org/10.1128/JB.187.17.6119-6127.2005>
- Molina, V., Médici, M., Font de Valdez, G., Taranto, M.P., 2012. Soybean-based functional food with vitamin B12-producing lactic acid bacteria. J. Funct. Foods 4, 831–836. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.05.011>
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R.-M., Remaud-Siméon, M., 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 11, 675–685. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00113-3)
- Moroni, A. V, Arendt, E.K., Bello, F.D., 2011. Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs. Food Microbiol. 28, 497–502. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.016>
- Muhalidin, B.J., Hassan, Z., 2011. Screening of lactic acid bacteria for antifungal activity against *Aspergillus oryzae*. Am. J. Appl. Sci. 8, 447–451. <http://dx.doi.org/10.3844/ajassp.2011.447.451>
- Ndagano, D., Lamoureux, T., Dortu, C., Vandermoten, S., Thonart, P., 2011. Antifungal Activity of 2 Lactic Acid Bacteria of the *Weissella* Genus Isolated from Food. J. Food Sci. 76, M305–M311. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02257.x>

- Nguyen, D.T.L., Van Hoorde, K., Cnockaert, M., De Brandt, E., Aerts, M., Binh Thanh, L., Vandamme, P., 2013. A description of the lactic acid bacteria microbiota associated with the production of traditional fermented vegetables in Vietnam. *Int. J. Food Microbiol.* 163, 19–27. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.024>
- Notararigo, S., Nácher-Vázquez, M., Ibarburu, I., Werning, M.L., de Palencia, P.F., Dueñas, M.T., Aznar, R., López, P., Prieto, A., 2013. Comparative analysis of production and purification of homo- and hetero-polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Carbohydr. Polym.* 93, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.016>
- Oguntoyinbo, F.A., Narbad, A., 2012. Molecular characterization of lactic acid bacteria and *in situ* amylase expression during traditional fermentation of cereal foods. *Food Microbiol.* 31, 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.004>
- Olympia, M., Fukuda, H., Ono, H., Kaneko, Y., Takano, M., 1995. Characterization of starch-hydrolyzing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food, “burong isda”, and its amyolytic enzyme. *J. Ferment. Bioeng.* 80, 124–130. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)93206-Y](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)93206-Y)
- Oneca, M., Irigoyen, A., Ortigosa, M., Torre, P., 2003. PCR and RAPD identification of *L. plantarum* strains isolated from ovine milk and cheese. Geographical distribution of strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 227, 271–277.
- Ott, E., Stolz, J., Mack, M., 2009. The RFN riboswitch of *Bacillus subtilis* is a target for the antibiotic roseoflavin produced by *Streptomyces davawensis*. *RNA Biol.* 6, 276–280. <https://doi.org/10.4161/rna.6.3.8342>
- Oude Elferink, S.J., Krooneman, J., Gottschal, J.C., Spoelstra, S.F., Faber, F., Driehuis, F., 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 125–32. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.125-132.2001>
- Oyewole, O. B., Olatunji, O.O., Odunfa, S.A., 2004. A process technology for conversion of dried cassava chips into ‘gari’. *Nigerian Food J.* 22, 65–76. <http://doi.org/10.4314/nifoj.v22i1.33570>
- Pacheco Da Silva, F.F., Biscola, V., LeBlanc, J.G., Gombossy de Melo Franco, B.D., 2016. Effect of indigenous lactic acid bacteria isolated from goat milk and cheeses on folate and riboflavin content of fermented goat milk. *LWT - Food Sci. Technol.* 71, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.033>
- Parente, E., Cogan, T.M., 2004. Starter Cultures: General Aspects, en: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *General Aspects, Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Academic Press, pp. 123–147. [https://doi.org/10.1016/S1874-558X\(04\)80065-4](https://doi.org/10.1016/S1874-558X(04)80065-4)
- Park, E.-J., Chang, H.-W., Kim, K.-H., Nam, Y.-D., Roh, S.W., Bae, J.-W., 2009. Application of quantitative real-time PCR for enumeration of total bacterial, archaeal, and yeast populations in kimchi. *J. Microbiol.* 47, 682–685. <https://doi.org/10.1007/s12275-009-0297-1>

- Pastink, M.I., Sieuwerts, S., de Bok, F.A.M., Janssen, P.W.M., Teusink, B., van Hylckama Vlieg, J.E.T., Hugenholtz, J., 2008. Genomics and high-throughput screening approaches for optimal flavour production in dairy fermentation. *Int. Dairy J.* 18, 781–789. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.07.006>
- Patel, S., Majumder, A., Goyal, A., 2012. Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Indian J. Microbiol.* 52, 3–12. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0148-8>
- Pawlowska, A.M., Zannini, E., Coffey, A., Arendt, E.K., 2012. “Green Preservatives”: Combating Fungi in the Food and Feed Industry by Applying Antifungal Lactic Acid Bacteria. *Adv. Food Nutr. Res.* 66, 217–238. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394597-6.00005-7>
- Pérez, G., Cardell, E., Zárate, V., 2002. Random amplified polymorphic DNA analysis for differentiation of *Leuconostoc mesenteroides* subspecies isolated from Tenerife cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 82–85. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01050.x>
- Pérez-Cataluña, A., Elizaquível, P., Carrasco, P., Espinosa, J., Reyes, D., Wachter, C., Aznar, R., 2017. Diversity and dynamics of lactic acid bacteria in Atole agrio, a traditional maize-based fermented beverage from South-Eastern Mexico, analysed by high throughput sequencing and culturing. *Antonie Van Leeuwenhoek.* <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0960-1>
- Pérez-Ramos, A., Mohedano, M.L., López, P., Spano, G., Fiocco, D., Russo, P., Capozzi, V., 2017. In Situ β -Glucan Fortification of Cereal-Based Matrices by *Pediococcus parvulus* 2.6: Technological Aspects and Prebiotic Potential. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1588. <https://doi.org/10.3390/ijms18071588>
- Peyer, L.C., Zannini, E., Arendt, E.K., 2016. Lactic acid bacteria as sensory biomodulators for fermented cereal-based beverages. *Trends Food Sci. Technol.* 54, 17–25. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2016.05.009>
- Pitcher, D.G., Saunders, N.A., Owen, R.J., 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 8, 151–156. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>
- Plengvidhya, V., Breidt, F., Fleming, H.P., 2004. Use of RAPD-PCR as a method to follow the progress of starter cultures in sauerkraut fermentation. *Int J Food Microbiol* 93. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2003.11.010>
- Powers, H.J., 2003. Riboflavin (vitamin B-2) and health. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 1352–1360. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.6.1352>
- Prado, F.C., Parada, J.L., Pandey, A., Socol, C.R., 2008. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Res. Int.* 41, 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.10.010>
- Prado, M.R., Blandón, L.M., Vandenberghe, L.P.S., Rodrigues, C., Castro, G.R., Thomaz-Socol, V., Socol, C.R., 2015. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Front. Microbiol.* 6, 1177. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01177>
- Puerari, C., Magalhães, K.T., Schwan, R.F., 2012. New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. *Food Res. Int.* 48, 634–640. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.005>

Bibliografía

- Qin, G.Z., Tian, S.P., 2004. Biocontrol of postharvest diseases of jujube fruit by *Cryptococcus laurentii* combined with a low dosage of fungicides under different storage conditions. *Plant Dis.* 88, 497–501. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.5.497>
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D., 2011. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 150, 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001>
- Quillama, E., Liendo, N., 1995. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas asociadas a Chicha de Jora. *Boletín Lima No 100* 17, 171–180.
- Ramirez, M.S., Tolmasky, M.E., 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist. Updat.* 13, 151–171. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2010.08.003>
- Randazzo, W., Corona, O., Guarcello, R., Francesca, N., Germanà, M.A., Erten, H., Moschetti, G., Settanni, L., 2016. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. *Food Microbiol.* 54, 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.018>
- Raspor, P., Goranovič, D., 2008. Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28, 101–124. <https://doi.org/10.1080/07388550802046749>
- Ravyts, F., Vuyst, L. De, Leroy, F., 2012. Bacterial diversity and functionalities in food fermentations. *Eng. Life Sci.* 12, 356–367. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100119>
- Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., Kumar, E.V., 2008. Amyolytic bacterial lactic acid fermentation — A review. *Biotechnol. Adv.* 26, 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.07.004>
- Reid, G., Younes, J.A., Van der Mei, H.C., Gloor, G.B., Knight, R., Busscher, H.J., 2010. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 27. <https://doi.org/10.0.4.14/nrmicro2473>
- Reid, G., 2015. The growth potential for dairy probiotics. *Int. Dairy J.* 49, 16–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.04.004>
- Reyes-Velázquez, W.P., Figueroa-Gómez, R.M., Barberis, M., Reynoso, M.M., Rojo, F.G.A., Chulze, S.N., Torres, A.M., 2011. *Fusarium* species (section Liseola) occurrence and natural incidence of beauvericin, fusaproliferin and fumonisins in maize hybrids harvested in Mexico. *Mycotoxin Res.* 27, 187–194. <https://doi.org/10.1007/s12550-011-0095-6>
- Robert, H., Gabriel, V., Fontagné-Faucher, C., 2009. Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 135, 53–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.006>
- Robredo, B., Singh, K. V., Baquero, F., Murray, B.E., Torres, C., 2000. Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. *Int. J. Food Microbiol.* 54, 197–204. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00195-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00195-6)

- Rodas, A.M., Chenoll, E., Macián, M.C., Ferrer, S., Pardo, I., Aznar, R., 2006. *Lactobacillus vini* sp. nov., a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 513–517. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63877-0>
- Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., Blázquez, J., 2013. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 293–297. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2013.02.004>
- Rogosa, M., Franklin, J.G., Perry, K.D., 1961. Correlation of the Vitamin Requirements with Cultural and Biochemical Characters of *Lactobacillus* spp. *J. Gen. Microbiol.* 25, 473–482. <https://doi.org/10.1099/00221287-25-3-473>
- Rossi, M., Amaretti, A., Raimondi, S., 2011. Folate Production by Probiotic Bacteria. *Nutrients* 3, 118–134. <https://doi.org/10.3390/nu3010118>
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C.G., Salminen, S., 2006. Exopolysaccharides Produced by Probiotic Strains Modify the Adhesion of Probiotics and Enteropathogens to Human Intestinal Mucus. *J. Food Prot.* 69, 2011–2015. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.8.2011>
- Ruiz-Rodríguez, L., Vera Pingitore, E., Rollan, G., Cocconcelli, P.S., Fontana, C., Saavedra, L., Vignolo, G., Hebert, E.M., 2016a. Biodiversity and technological-functional potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented quinoa sourdoughs. *J. Appl. Microbiol.* 120, 1289–1301. <https://doi.org/10.1111/jam.13104>
- Ruiz-Rodríguez, L., Vera Pingitore, E., Rollan, G., Martos, G., Saavedra, L., Fontana, C., Hebert, E.M., Vignolo, G., 2016b. Biodiversity and technological potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented amaranth sourdough. *Lett. Appl. Microbiol.* 63, 147–154. <https://doi.org/10.1111/lam.12604>
- Russo, P., Capozzi, V., Arena, M.P., Spadaccino, G., Dueñas, M.T., López, P., Fiocco, D., Spano, G., 2014. Riboflavin-overproducing strains of *Lactobacillus fermentum* for riboflavin-enriched bread. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 3691–3700. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5484-7>
- Russo, P., de Chiara, M.L.V., Capozzi, V., Arena, M.P., Amodio, M.L., Rascón, A., Dueñas, M.T., López, P., Spano, G., 2016. *Lactobacillus plantarum* strains for multifunctional oat-based foods. *LWT - Food Sci. Technol.* 68, 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.040>
- Russo, P., Arena, M.P., Fiocco, D., Capozzi, V., Spano, G., 2017. *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *Int. J. Food Microbiol.* 247, 48–54. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2016.04.027>
- Saladino, F., Luz, C., Manyes, L., Fernández-Franzón, M., Meca, G., 2016. *In vitro* antifungal activity of lactic acid bacteria against mycotoxigenic fungi and their application in loaf bread shelf life improvement. *Food Control* 67, 273–277. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.012>
- Samaržija, D., Sikora, S., Redzepović, S., Antunac, N., Havranek, J., 2002. Application of RAPD analysis for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains isolated from artisanal cultures. *Microbiol. Res.* 157, 13–17. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00126>

Bibliografía

- Sandberg, A.-S., Andlid, T., 2002. Phytogetic and microbial phytases in human nutrition. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, 823–833. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00641.x>
- Sanders, M.E., Guarner, F., Guerrant, R., Holt, P.R., Quigley, E.M.M., Sartor, R.B., Sherman, P.M., Mayer, E.A., 2013. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut* 62, 787–796. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302504>
- Sanni, A., Franz, C., Schillinger, U., Huch, M., Guigas, C., Holzapfel, W., 2013. Characterization and Technological Properties of Lactic Acid Bacteria in the Production of “Sorghurt,” a Cereal-Based Product. *Food Biotechnol.* 27, 178–198. <https://doi.org/10.1080/08905436.2013.781949>
- Santos, F., Wegkamp, A., de Vos, W.M., Smid, E.J., Hugenholtz, J., 2008. High-Level folate production in fermented foods by the B12 producer *Lactobacillus reuteri* JCM1112. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3291–4. <https://doi.org/10.1128/AEM.02719-07>
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P., 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 394–406. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0427-1>
- Schoustra, S.E., Kasase, C., Toarta, C., Kassen, R., Poulain, A.J., 2013. Microbial Community Structure of Three Traditional Zambian Fermented Products: Mabisi, Chibwantu and Munkoyo. *PLoS One* 8, e63948. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063948>
- Serrazanetti, D.I., Guerzoni, M.E., Corsetti, A., Vogel, R., 2009. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. *Food Microbiol.* 26, 700–711. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.007>
- Shi, Z., Zhen, S., Wittert, G.A., Yuan, B., Zuo, H., Taylor, A.W., 2014. Inadequate Riboflavin Intake and Anemia Risk in a Chinese Population: Five-Year Follow Up of the Jiangsu Nutrition Study. *PLoS One* 9, e88862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088862>
- Shiby, V.K., Mishra, H.N., 2013. Fermented milks and milk products as functional foods-A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53, 482–496. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.547398>
- Sieuwerths, S., de Bok, F.A.M., Hugenholtz, J., van Hylckama Vlieg, J.E.T., 2008. Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4997–5007. <https://doi.org/10.1128/AEM.00113-08>
- Singh, A., Trumpff, C., Genkinger, J., Davis, A., Spann, M., Werner, E., Monk, C., 2017. Micronutrient Dietary Intake in Latina Pregnant Adolescents and Its Association with Level of Depression, Stress, and Social Support. *Nutrients* 9. <https://doi.org/10.3390/nu9111212>
- Sonar, N.R., Halami, P.M., 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, 4143–4148. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1456-x>
- Songré-Ouattara, L.T., Mouquet-Rivier, C., Icard-Vernière, C., Rochette, I., Diawara, B., Guyot, J.P., 2009. Potential of amylolytic lactic acid bacteria to replace the use of malt for partial starch hydrolysis to produce African fermented pearl millet gruel fortified with groundnut. *Int. J. Food Microbiol.* 130, 258–264. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2009.02.002>

- Sperber, W.H., 2007. Role of microbiological guidelines in the production and commercial use of milled cereal grains: a practical approach for the 21st century. *J. Food Prot.* 70, 1041–1053. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.4.1041>
- Sreeramulu, G., Srinivasa, D.S., Nand, K., Joseph, R., 1996. *Lactobacillus amylovorus* as a phytase producer in submerged culture. *Lett. Appl. Microbiol.* 23, 385–388. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb01342.x>
- Sridhar, V.R., Hughes, J.E., Welker, D.L., Broadbent, J.R., Steele, J.L., 2005. Identification of endopeptidase genes from the genomic sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the role of these genes in hydrolysis of model bitter peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3025–32. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3025-3032.2005>
- Steinkraus, K.H., 1997. Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control* 8, 311–317. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(97\)00050-9](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(97)00050-9)
- Steinkraus, H.K., 2002. Fermentations in world food processing. *Compr. Rev. food Sci. food Saf.* 1, 23–32. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2002.tb00004.x>
- Stiles, M.E., Holzapfel, W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01233-0)
- Stoyanova, L.G., Ustyugova, E.A., Netrusov, A.I., 2012. Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. *Appl. Biochem. Microbiol.* 48, 229–243.
- Sümengen, M., Dincer, S., & Kaya, A., 2012. Phytase production from *Lactobacillus brevis*. *Turk. J. Biol.* 36, 533-541.
- Sybesma, W., Burgess, C., Starrenburg, M., Van Sinderen, D., Hugenholtz, J., 2004. Multivitamin production in *Lactococcus lactis* using metabolic engineering. *Metab. Eng.* 6, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2003.11.002>
- Tamang, J.P., Tamang, B., Schillinger, U., Franz, C.M.A.P., Gores, M., Holzapfel, W.H., 2005. Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 347–356. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.024>
- Tamang, J. P., 2010. Diversity of fermented foods, en: *Fermented Foods and Beverages of the World*. Tamang JP, Kailasapathy, K. (Eds.) CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, pp. 41–84. <https://doi.org/10.1201/ebk1420094954-c2>
- Tamang, J.P., Watanabe, K., Holzapfel, W.H., 2016. Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>
- Tamime, A.Y., 2003. Fermented milks: a historical food with modern applications—a review. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56, S2.
- Tamime, A.Y., Saarela, M., Skriver, A., Mistry, V., Shah, N.P., 2005. Production and maintaining viability of probiotic bacteria in dairy products. *Probiotic Dairy Prod.* 39–72.

Bibliografía

- Taranto, M.P., Vera, J.L., Hugenholtz, J., De Valdez, G.F., Sesma, F., 2003. *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produces cobalamin. *J. Bacteriol.* 185, 5643–7. <https://doi.org/10.1128/JB.185.18.5643-5647.2003>
- Teale, C.J., 2002. Antimicrobial resistance and the food chain. *J. Appl. Microbiol.* 92, 85S–89S. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.20.x>
- Terrade, N., Noël, R., Couillaud, R., de Orduña, R.M., 2009. A new chemically defined medium for wine lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* 42, 363–367. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.011>
- Tojo, R., Suárez, A., Clemente, M.G., de los Reyes-Gavilán, C.G., Margolles, A., Gueimonde, M., Ruas-Madiedo, P., 2014. Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J. Gastroenterol.* 20, 15163–15176. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i41.15163>
- Toldra, F., 2007. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Oxford: Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9780470376430>
- Torino, M., de Valdez, G., Mozzi, F., 2015. Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Front. Microbiol.* 6, 834. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00834>
- Torriani, S., Felis, G.E., Dellaglio, F., 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3450–4. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3450-3454.2001>
- Tou, E.H., Guyot, J.P., Mouquet-Rivier, C., Rochette, I., Counil, E., Traoré, A.S., Trèche, S., 2006. Study through surveys and fermentation kinetics of the traditional processing of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) into ben-saalga, a fermented gruel from Burkina Faso. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.010>
- Valerio, F., Favilla, M., De Bellis, P., Sisto, A., de Candia, S., Lavermicocca, P., 2009. Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. *Syst. Appl. Microbiol.* 32, 438–448. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.01.004>
- Van der Meulen, R., Scheirlinck, I., Van Schoor, A., Huys, G., Vancanneyt, M., Vandamme, P., De Vuyst, L., 2007. Population dynamics and metabolite target analysis of lactic acid bacteria during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4741–50. <https://doi.org/10.1128/AEM.00315-07>
- Van Boeckel, T.P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Laxminarayan, R., 2014. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect. Dis.* 14, 742–750. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70780-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70780-7)
- Van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., van Hylckama Vlieg, J., Ursing, B.M., Boekhorst, J., Smit, B.A., Ayad, E.H., Smit, G., Siezen, R.J., 2002. Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *Int. Dairy J.* 12, 111–121. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00132-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00132-7)

- Van Wyk, J., Witthuhn, R.C., Britz, T.J., 2011. Optimisation of vitamin B12 and folate production by *Propionibacterium freudenreichii* strains in kefir. *Int. Dairy J.* 21, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.09.004>
- Vandamme, P., De Bruyne, K., Pot, B., 2014. Phylogenetics and systematic, en: *Lactic Acid Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 31–44. <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch2>
- Väkeväinen, K., Valderrama, A., Espinosa, J., Centurión, D., Rizo, J., Reyes-Duarte, D., Díaz-Ruiz, G., von Wright, A., Elizaquível, P., Esquivel, K., Simontaival, A.-I., Aznar, R., Wacher, C., Plumed-Ferrer, C., 2018. Characterization of lactic acid bacteria recovered from atole agrio, a traditional Mexican fermented beverage. *LWT - Food Sci. Technol.* 88, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.004>
- Velásquez-Milla, D., Casas, A., Torres-Guevara, J., Cruz-Soriano, A., 2011. Ecological and socio-cultural factors influencing in situ conservation of crop diversity by traditional Andean households in Peru. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 7, 40. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-7-40>
- Vera-Pingitore, E., Jimenez, M.E., Dallagnol, A., Belfiore, C., Fontana, C., Fontana, P., von Wright, A., Vignolo, G., Plumed-Ferrer, C., 2016. Screening and characterization of potential probiotic and starter bacteria for plant fermentations. *LWT - Food Sci. Technol.* 71, 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.046>
- Vignolo, G., Saavedra, L., Sesma, F., Raya, R., 2012. Food Bioprotection: Lactic acid bacteria as natural preservatives, en R. Bhat, A. K. Alias, G. Paliyath (Eds.), *Progress in food preservation*. Willey-Blackwel, Oxford, UK, pp. 454-483.
- Waldherr, F. W., Vogel, R. F., 2009. Commercial exploitation of homo-exopolysaccharides in non-dairy food, en Matthias Ullrich (Eds.), *Bacterial polysaccharides: Current innovations and future trends*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 314-329.
- Wang, K., Li, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., Dong, M., 2014. Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *Int. J. Biol. Macromol.* 63, 133–139. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2013.10.036>
- Waters, D.M., Mauch, A., Coffey, A., Arendt, E.K., Zannini, E., 2015. Lactic Acid Bacteria as a Cell Factory for the Delivery of Functional Biomolecules and Ingredients in Cereal-Based Beverages: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55, 503–520. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.660251>
- Wegkamp, A., 2008. Modulation of folate production in lactic acid bacteria. PhD thesis. Wageningen, The Netherlands:Wageningen University. ISBN 978 90 8504 859 6.
- Welman, A.D., Maddox, I.S., 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol.* 21, 269–274. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00107-0)
- Winkler, W.C., Cohen-Chalamish, S., Breaker, R.R., 2002. An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15908–13. <https://doi.org/10.1073/pnas.212628899>

Bibliografía

- Yang, E.J., Chang, H.C., 2010. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *Int. J. Food Microbiol.* 139, 56–63. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.02.012>
- Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K.-H., Ludwig, W., Glöckner, F.O., Rosselló-Móra, R., 2008. The All-Species Living Tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 241–250. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2008.07.001>
- Yousif, N.M.K., Huch, M., Schuster, T., Cho, G.S., Dirar, H.A., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P., 2010. Diversity of lactic acid bacteria from Hussuwa, a traditional African fermented sorghum food. *Food Microbiol.* 27, 757–768. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.012>
- Zannini, E., Pontonio, E., Waters, D.M., Arendt, E.K., 2012. Applications of microbial fermentations for production of gluten-free products and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 473–485. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3707-3>
- Zannini, E., Waters, D.M., Coffey, A., Arendt, E.K., 2016. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 1121–1135. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7172-2>
- Zaunmüller, T., Eichert, M., Richter, H., Unden, G., 2006. Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 421–429. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0514-3>
- Zeidan, A.A., Poulsen, V.K., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P.M.F., Øregaard, G., Neves, A.R., 2017. Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, S168–S200. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux017>
- Zvitov-Ya'ari, R., Nussinovitch, A., 2014. Browning prevention in rehydrated freeze-dried non-blanched potato slices by electrical treatment. *LWT - Food Sci. Technol.* 56, 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.017>
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van 't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–81.

ANEXO I

Secuencias región RFN

M5MA1_preF

CGATTTCTTCGGGGCAGGGTGCAATTCCTCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAGAA
AATT

M9MG2_preF

GATTTCTTCGGGGCAGGGTGCAATTCCTCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGACC
CGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAGAAA
ATT

M9MG6_preF

CGATTTCTTCGGGGCAGGGTGCAATTCCTCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAGAA
AATT

M9MM1_preF

CGATTTCTTCGGGGCAGGGTGCAATTCCTCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAGAA
AATT

M9MM4_preF

CGATTTCTTCGGGGCAGGGTGCAATTCCTCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAGAA
AATT

LpNCDO

CGATTTCTTCGGGGCAGGGTGCAATTCCTCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAGAA
AATT

M5MA1_preR

CGATTTCTTCGGGGCAGGGTGCAATTCCTCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAGAA
AATT

M9MG2_preR

CGATTTCTTCGGGGCAGGGTGAATTCCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAGAA
AATT

M9MG6_preR

CGATTTCTTCGGGGCAGGGTGAATTCCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAGAA
AATT

M9MM1_preR

CGATTTCTTCGGGGCAGGGTGAATTCCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAGAA
AATT

M9MM4_preR

CGATTTCTTCGGGGCAGGGTGAATTCCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAGAA
AATT

M9Y2_preR

CGATTTCTTCGGGGCAGGGTGAATTCCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAGAA
AATT

M5MA1_roseoR

CGATTTCTTCGGGGCAGGATGCAATTCCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAGAA
AATT

M5MA1_roseoF

CGATTTCTTCGGGGCAGGATGCAATTCCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAGAA
AATT

M9MG2_roseoR

CGATTTCTTCGGGGCAGGGTGAATTCCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAGAA
AATT

M9MG6_roseoR

CGATTTCTTCGGGGCAGGCTGCAATTCCTCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAGAA
AATT

M9MG6_roseoF

CGATTTCTTCGGGGCAGGCTGCAATTCCTCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAGAA
AATT

M9MM1_roseoR

CGATTTCTTCGGGGCAGGATGCAATTCCTCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAGAA
AATT

M9MM1_roseoF

CGATTTCTTCGGGGCAGGATGCAATTCCTCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAGAA
AATT

M9MM4_roseoR

CGATTTCTTCGGGGCAGGGTGAATTCCTCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAA
AATT

M9MM4_roseoF

CGATTTCTTCGGGGCAGGGTGAATTCCTCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTGGATGGGAGAAA
AATT

M9Y2_roseoR

CGATTTCTTCGGGGCAGGGTGAATTCCTCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTAGATGGGAGAAGAA
AATT

M9Y2_roseoF

CGATTTCTTCGGGGCAGGGTGAATTCCTCCGACCGACGGTAACAACGTAAGTTGAAGTCCGTGAC
CCGCGTGAGCGGTGGACCCAGTGCAAGTCTGGGACCGACAGTATAGTCTAGATGGGAGAAGAA
AATT

*Cambios respecto a la cepa salvaje

ANEXO II



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Pyrosequencing vs. culture-dependent approaches to analyze lactic acid bacteria associated to *chicha*, a traditional maize-based fermented beverage from Northwestern Argentina



Patricia Elizaquível^a, Alba Pérez-Cataluña^a, Alba Yépez^a, Cecilia Aristimuño^b, Eugenia Jiménez^b, Pier Sandro Cocconcelli^d, Graciela Vignolo^b, Rosa Aznar^{a,c,*}

^a Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València (UVEG), Av. Dr. Moliner 50, 46100, Burjassot, Valencia, Spain

^b Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), Chacabuco 145, 4000 Tucumán, Argentina

^c Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Calle Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia, Spain

^d Istituto di Microbiologia-Centro Ricerche Biotecnologiche, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza-Cremona, Italy



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont

Biopreservation potential of lactic acid bacteria from Andean fermented food of vegetal origin



Alba Yépez^a, Carlos Luz^b, Giuseppe Meca^b, Graciela Vignolo^c, Jordi Mañes^b, Rosa Aznar^{a,d,e,*}

^a Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València (UVEG), Av. Dr. Moliner 50, 46100, Burjassot, Valencia, Spain

^b Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universitat de València, (UVEG), Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Burjassot, Spain

^c Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), Chacabuco 145, 4000, Tucumán, Argentina

^d Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Calle Agustín Escardino 7, 46980, Paterna, Valencia, Spain

^e Colección Española de Cultivos Tipo, Universitat de València, Calle Agustín Escardino 9, 46980, Paterna, Valencia, Spain



Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

Exploring diversity and biotechnological potential of lactic acid bacteria from *tocosh* - traditional Peruvian fermented potatoes - by high throughput sequencing (HTS) and culturing



Eugenia Jiménez ^{c,1}, Alba Yépez ^{a,1}, Alba Pérez-Cataluña ^a, Elena Ramos Vázquez ^d, Doris Zúñiga Dávila ^d, Graciela Vignolo ^c, Rosa Aznar ^{a,b,*}

^a Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València (UVEG), Av. Dr. Moliner 50, 46100, Burjassot, Valencia, Spain

^b Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Calle Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia, Spain

^c Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), Chacabuco 145, 4000 Tucumán, Argentina

^d Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología "Marino Tabusso", Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Peru



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm

In situ riboflavin fortification of different kefir-like cereal-based beverages using selected Andean LAB strains



Alba Yépez^a, Pasquale Russo^{b,1}, Giuseppe Spano^b, Iuliia Khomenko^c, Franco Biasioli^c, Vittorio Capozzi^{b,1}, Rosa Aznar^{a,d,e,*}

^a Department of Microbiology and Ecology, University of Valencia, Av. Dr. Moliner 50, 46100, Burjassot, Valencia, Spain

^b Department of Science of Agriculture, Food and Environment, University of Foggia, Via Napoli 25, Foggia, 71122, Italy

^c Department of Food Quality and Nutrition, Research and Innovation Centre, Fondazione Edmund Mach (FEM), Via E. Mach 1, 38010, San Michele All'Adige (TN), Italy

^d Department of Preservation and Food Safety Technologies, Institut of Agrochemistry and Food Technology (IATA-CSIC), Calle Agustín Escardino 7, 46980, Paterna, Valencia, Spain

^e Spanish Type Culture Collection (CECT), University of Valencia, Calle Agustín Escardino 9, 46980, Paterna, Valencia, Spain