

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco
Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud
Sede Trelew



“Selección de bacterias ácido lácticas con potencial
probiótico para la fermentación en matrices
vegetales”

Tesis de Grado

2023

Alumna: María Azul Sánchez Cabrera

Directora: Dra. Marisol Vallejo

Co-Directora: Lic. Romina Belén Parada

Asesora: Mg. Pía Valeria Aloisi

Índice

Agradecimientos.....	3
Resumen	4
Introducción.....	6
Géneros estudiados	7
Alimentos funcionales	7
Probióticos	8
Efectos beneficiosos del consumo de probióticos.....	9
Alimentos fermentados	11
Relevancia del estudio	11
Objetivos.....	12
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos	13
Metodología.....	13
Material biológico	13
Caracterización del potencial probiótico.....	14
Resistencia a pH y bilis	14
Actividad antimicrobiana.....	14
Incompatibilidad	16
Extracción de ADN	16
Determinación molecular de bacteriocinas.....	16
Hidrofobicidad de la superficie celular	17
Capacidad de autoagregación.....	17
Capacidad de co-agregación.....	18
Actividad β -galactosidasa.....	18
Evaluación de seguridad de las cepas.....	18
Actividad gelatinasa y hemólisis	19
Producción de aminas biógenas	19
Resistencia a antimicrobianos.....	19
Propiedades tecnológicas	19
Producción de exopolisacáridos	19
Actividad antioxidante.....	20
Análisis estadístico.....	21

Resultados y Discusión	21
Caracterización del potencial probiótico.....	21
Resistencia a pH y bilis	21
Actividad antimicrobiana.....	22
Incompatibilidad	24
Determinación molecular de bacteriocinas.....	24
Hidrofobicidad de la superficie celular	25
Capacidad de autoagregación.....	26
Capacidad de co-agregación.....	27
Actividad β -galactosidasa.....	29
Evaluación de seguridad de las cepas	30
Actividad gelatinasa y hemólisis	30
Producción de aminas biógenas	31
Resistencia a antimicrobianos.....	31
Propiedades tecnológicas	32
Producción de exopolisacáridos.....	32
Actividad antioxidante.....	35
Conclusiones	38
Divulgación de Resultados	39
Bibliografía.....	39

Agradecimientos

Quiero agradecer primero que nada a mi mamá, Vanina, sin su constante apoyo llegar hasta esta instancia habría sido imposible.

Quiero agradecer a mis directoras, Marisol y Romina, por darme la oportunidad de trabajar con ellas, por ayudarme más allá de lo académico, acompañarme y hacer más ameno el último tramo de mi carrera.

También a Pía mi asesora, por estar conmigo desde el inicio de esta etapa, por ser como una segunda madre para mí y responder mensajes a la 10 de la noche porque ya no soportaba una materia del ciclo superior.

Gracias a todo el Laboratorio de Biotecnología Bacteriana por hacer que los días trabajando en la tesis se pasaran entre risas, que hicieron que cuando tuviera un mal día la idea de ir al laboratorio fuera un alivio.

A la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (FONCyT) y a la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNPSJB, por el financiamiento de los proyectos de investigación. A la Secretaría de Ciencia, Tecnología Innovación Productiva y Cultura de la provincia de Chubut por el apoyo mediante el “Programa de Apoyo Económico para Tesis y Proyectos Finales” y a la Delegación Zonal (Lic. Marcos Kupczewski) por la ayuda económica para la asistencia al Congreso.

A la cátedra de Biología General por ser un lugar seguro en la universidad y parte de todo mi trayecto. Gracias por apoyarme y siempre darme ánimos.

A mis compañeras y amigas, Aylén y Evelyn, por todos los parciales, finales y clases compartidas. Por estar ahí para mí en momentos donde todo me superaba, por el aliento mutuo, por creer más en mí que yo misma y todas las risas, lágrimas y quejas compartidas.

Muchas gracias a mis amigos, Ángeles y Matías, por escucharme hablar emocionada y quejarme de cosas de las que no tenían ni la más remota idea. Por ser un soporte en momentos de crisis, por salir al rescate y dejarme usarles el internet para mis trabajos en momentos donde yo por diversas razones me quedaba sin luz o internet.

Y, por último, muchísimas gracias a Lucas, mi novio, por acompañarme durante cinco años en todo momento, ya sea juntos o a la distancia. Gracias por esas llamadas a las tres de la mañana para ayudarme a calmarme, por creer en mí, por alentarme siempre, por distraerme o recordarme de trabajar. Gracias por ser mi cable a tierra, gracias por absolutamente todo.

Resumen

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos considerados GRAS (Reconocidas Generalmente como Seguras) según la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). Se clasifican dentro del phylum Firmicutes, clase Bacilli, orden Lactobacillales y se encuentran habitualmente en vegetales, productos lácteos, alimentos fermentados y en el tracto gastrointestinal humano y de animales. Dentro de este grupo existen varios géneros utilizados en la industria alimentaria como “starters” y/o probióticos, entre ellos *Lactobacillus*, recientemente reclasificado en 25 nuevos géneros, y *Leuconostoc*. Según la Food and Agriculture Organization/World's Health Organization (FAO-OMS) los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del consumidor. Entre los efectos beneficiosos que se atribuyen a los probióticos se incluyen la regulación del equilibrio microbiano en el tracto gastrointestinal, reducción del colesterol, alivio de los síntomas de intolerancia a la lactosa, reducción de cáncer de colon, mejora de la biodisponibilidad de los nutrientes, incremento de la respuesta inmunológica y aumento de la absorción de calcio. Tradicionalmente estos microorganismos fueron utilizados por la industria alimentaria en la elaboración de alimentos lácteos y cárnicos, dejando excluidos de sus beneficios, por consiguiente, a los consumidores veganos, vegetarianos, intolerantes a la lactosa, o con dietas exentas de colesterol. No obstante, actualmente se comenzó a utilizar cultivos iniciadores en la fermentación de matrices vegetales y rápidamente convirtieron en una alternativa prometedora, ya que pueden proveer compuestos nutricionales y una microbiota beneficiosa al consumidor. En los últimos años se ha observado creciente interés de los consumidores por alimentos funcionales con probióticos, debido a sus beneficios para la salud. En Argentina, el consumo de estos sólo está asociado a productos lácteos, principalmente el yogurt. Por lo cual, la oferta de alimentos funcionales de matrices vegetales brindaría nuevas opciones a los consumidores.

El objetivo principal del trabajo fue la selección de BAL con potencial capacidad probiótica para producir alimentos vegetales fermentados en procesos controlados, que den origen a productos de calidad estable y con propiedades beneficiosas para la salud. Se evaluó el potencial probiótico, la seguridad y las propiedades tecnológicas de 11 cepas de *Lactiplantibacillus* y cuatro de *Leuconostoc* aisladas de fermentaciones espontáneas de brasicáceas, pertenecientes al Cepario del Laboratorio de Biotecnología Bacteriana (LBB) (FCNyCS – UNPSJB, Sede Trelew).

Las cepas de *Lactiplantibacillus argentoratensis* (RCTw111 y PCTw261) y *L. plantarum* (AKTw180 y AKTw335) demostraron resistencia a las condiciones imperantes en el tracto gastrointestinal mediante la simulación *in vitro*. Tres cepas de *L. argentoratensis* (RBTw102, RBTw249 y PCTw270) y dos de *L. plantarum* (RCTw106 y RBTw256) no exhibieron resistencia a pH 2,5; sin embargo, fueron capaces de resistir una concentración de bilis de 1%. Diez cepas de *Lactiplantibacillus* spp. presentaron actividad inhibitoria contra *Listeria* sp. y *Lactococcus lactis* mediante la técnica de difusión en placa. Sin embargo, no presentaron actividad inhibitoria contra los microorganismos Gram positivos y

negativos evaluados mediante la técnica de la doble capa. Esto puede deberse a que en un medio de cultivo líquido la producción de metabolitos como las bacteriocinas es mayor que en un medio sólido y, además su difusión es menor. Posteriormente se evaluó mediante PCR la presencia de seis plantaricinas en las cepas con actividad inhibitoria. Las plantaricinas EF, K, A, C y N se detectaron en nueve cepas, mientras que el gen *plnJ* solo en seis de ellas; *L. plantarum* RCTw106 exhibió resultados negativos. Luego, se determinó que las cepas de BAL resultaron compatibles entre sí debido a que ninguna inhibió el crecimiento de la otra mediante el ensayo de difusión en placa

Se observó una capacidad de autoagregación mayor en cuatro cepas estudiadas: *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum* RBTw100, *L. pentosus* AKTw332, *L. plantarum* AKTw180 y AKTw335 ($p < 0,01$), superando el 60%. Respecto a la capacidad de co-agregación, ocho cepas de *Lactiplantibacillus* spp. y dos de *Leuconostoc* spp. exhibieron una capacidad mayor al 60% con *Escherichia coli* ATCC 25922 ($p < 0,01$). Mientras que, frente a *Staphylococcus aureus* ssp. *aureus* ATCC 25923 la cepa *L. plantarum* AKTw335 presentó una capacidad de co-agregación mayor al 90% ($p < 0,01$). Mediante el método de adhesión a solventes no polares se evaluó la hidrofobicidad de las superficies celulares. En general, se observó que las cepas de *Lactiplantibacillus* spp. exhibieron un mayor carácter hidrofóbico al compararlas con las de *Leuconostoc* spp. En particular, las cepas *L. pentosus* AKTw332 y *L. plantarum* AKTw335 resultaron fuertemente hidrofóbicas, mientras que *L. argentoratensis* PCTw270, *L. plantarum* RCTw106 y AKTw180 exhibieron una hidrofobicidad moderada ($\geq 41,86\%$) ($p < 0,01$). Se observó la misma tendencia respecto a la actividad β -galactosidasa, las cepas de *Lactiplantibacillus* spp. exhibieron mayor actividad que las de *Leuconostoc* spp. ($p < 0,01$). No obstante, se obtuvieron diferencias significativas entre las cepas de *Lactiplantibacillus* spp. estudiadas, de las cuales siete presentaron una actividad más elevada ($p < 0,01$). Por otro lado, se evaluó la seguridad de las BAL, ninguna de las cepas analizadas presentó actividad gelatinasa o hemólisis, condición *sine qua non* para su utilización como starter en la industria alimentaria. Luego, se determinó de forma cualitativa la producción de aminas biógenas por parte de las BAL seleccionadas. Se determinó que las cepas no exhibieron producción de tiramina ni cadaverina, sin embargo, todas resultaron positivas para histamina.

Por otra parte, se evaluó la sensibilidad a los antimicrobianos siguiendo las recomendaciones del Clinical Laboratory Standards Institute y respetando los puntos de corte establecidos por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Todas las BAL mostraron sensibilidad a gentamicina, kanamicina, estreptomycin, eritromicina y clindamicina, mientras que, las cuatro cepas de *Leuconostoc* sp. y *L. plantarum* RCTw106 exhibieron sensibilidad a tetraciclina. No obstante, frente al cloranfenicol y a la ampicilina todas las cepas de BAL resultaron resistentes. A futuro se deberá evaluar el tipo de resistencia mediante pruebas genéticas para determinar si representan un riesgo para la salud del consumidor.

Posteriormente, se evaluaron las propiedades tecnológicas de las BAL; 14 cepas exhibieron producción de exopolisacáridos mediante el método en placa, solo la

cepa *L. pentosus* AKTw332 mostró resultados negativos. En el ensayo de solidificación de leche a 37 °C con diferentes porcentajes de sacarosa del 20%, 10%, 5% y 0%, se obtuvo que 14, 13, 12 y 11 cepas lograron solidificar completamente el medio, respectivamente; en el último caso solo fueron representantes del género *Lactiplantibacillus*. Mientras que, a 18 °C, solo cuatro cepas exhibieron una solidificación completa de la leche, AKTw112 y AKTw180 con 10% y RBTw249 y PCTw261 con 20% de sacarosa, todas pertenecientes al género *Lactiplantibacillus*. Sin embargo, ninguna cepa exhibió una solidificación completa de la leche suplementada con 5% y 0%. Los resultados de capacidad antioxidante evaluada mediante reducción del radical libre 2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) mostraron que las cepas de *Leuconostoc* presentaron una actividad menor que las de *Lactiplantibacillus* ($p < 0,01$). Sin embargo, con el ensayo de capacidad antioxidante sobre el cobre (CUPRAC) no se observó diferencia entre los géneros ($p > 0,01$); las cepas de *Lactiplantibacillus* RBTW102, RCTw106, RCTw111 y AKTw180 exhibieron una capacidad significativamente mayor ($p < 0,01$). Los métodos utilizados exhibieron resultados diferentes entre los géneros evaluados, esto podría ser consecuencia de los distintos sistemas de barrido de radicales que presentan los microorganismos y el mecanismo de detección de las técnicas.

Es importante destacar que, en comparación con las fermentaciones de base láctea, las que usan vegetales como materia prima se encuentran aún sub-exploradas y representan nichos ecológicos muy valiosos para el aislamiento de microorganismos con potencial tecnológico y/o probiótico. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el aislamiento de cepas y su posterior estudio de propiedades fisiológicas y/o metabólicas podrían constituir una herramienta válida para la selección de BAL utilizables en la fermentación controlada de vegetales.

Introducción

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son Gram-positivas, no formadoras de esporas, anaerobias estrictas o facultativas, con morfología de coco o bacilo que producen ácido láctico como producto principal de la fermentación (Quinto *et al.* 2014). Taxonómicamente se ubican dentro del phylum Firmicutes, clase Bacilli, orden Lactobacillales y algunos géneros pertenecientes a este grupo son *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Weisella*, *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus*, entre otros (Quinto *et al.* 2014, König & Fröhlich 2017, Zheng *et al.* 2020). Habitan principalmente en plantas en descomposición, productos lácteos, alimentos fermentados de todo tipo y en el tracto gastrointestinal de animales, incluido el humano. La mayoría de los representantes de este grupo bacteriano no son patógenos, tienen estatus GRAS (Reconocidas Generalmente como Seguras) según la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). Múltiples especies de BAL son utilizadas en la industria alimentaria formando parte de cultivos iniciadores o “starters” y probióticos (König & Fröhlich 2017).

Géneros estudiados

Los microorganismos antiguamente clasificados como *Lactobacillus* son los más utilizados en la industria alimentaria, este género estaba compuesto por 262 especies y presentaba una gran diversidad fenotípica y genotípica, así como también ecológica. Se caracterizan por ser bacilos Gram-positivos inmóviles, no formadores de esporas, anaerobios o anaerobios facultativos y fermentadores (homo o heterofermentadores) (Slover & Danziger 2008). Otro género de importancia para la industria alimentaria es *Leuconostoc* (Shin & Han 2015), conformado actualmente por 17 especies. Los microorganismos pertenecientes a este género presentan morfología de bacilos o cocobacilos, son heterofermentadores estrictos, no móviles y anaerobios facultativos. Se los encuentra en la vegetación, fermentos, ensilados y en productos lácteos por contaminación (Hemme & Foucaud-Scheunemann 2004, Shin & Han 2015).

Recientemente se realizó una revisión taxonómica de ambos géneros, ubicando al género *Leuconostoc* dentro de la familia Lactobacillaceae y dividiendo el género *Lactobacillus* en 25 géneros (Zheng *et al.* 2020). De acuerdo a esta nueva clasificación, en este trabajo se estudiaron especies pertenecientes al nuevo género *Lactiplantibacillus*, el cual está compuesto por 17 especies (Liu & Gu 2020, Zheng *et al.* 2020).

Las especies reclasificadas en el género *Lactiplantibacillus* son bacilos homofermentadores, capaces de fermentar una amplia variedad de carbohidratos, entre ellos glucosa, lactosa, ribosa, arabinosa, sucrosa, xilosa, rafinosa, celobiosa, etc. (König & Fröhlich 2017). La mayoría de las cepas de este género son capaces de metabolizar ácidos fenólicos mediante actividad esterasa, descarboxilasa y reductasa. La esterasa facilita la extracción de flavonoides al degradar la matriz de la pared celular vegetal. En cambio, la descarboxilasa actúa sobre ácidos hidroxibenzoicos, mediante su actividad de descarboxilación (Muñoz *et al.* 2017), mientras que la reductasa permite la metabolización de estos mismos compuestos, pero por reducción (Rodríguez *et al.* 2008). Al ser capaces de metabolizar diversos azúcares y compuestos presentes en alimentos, se los encuentra principalmente en este tipo de ambientes. También pueden estar presentes en otros hábitats y son parte de la microbiota intestinal de mamíferos, debido a esto se caracterizan por presentar un comportamiento ubicuo (Zheng *et al.* 2020).

Alimentos funcionales

El concepto de alimento funcional surgió por primera vez en Japón en la década del '80, cuando se iniciaron una serie de investigaciones enmarcadas en un gran proyecto de gobierno, cuyo propósito fue conocer otras funciones de los alimentos, además de la principal función nutritiva (Saito 2007). Este proyecto definió por primera vez el concepto de alimento funcional. En general se define que los alimentos deben tener tres funciones: la primera es "nutricional", esencial para la

supervivencia del individuo. La segunda es una función "sensorial", esto es que su consumo produzca una sensación placentera a partir de su sabor, olor, textura, entre otras. La tercera es una función "fisiológica" con lo cual el alimento debe producir un efecto favorable en la nutrición, el biorritmo, el sistema nervioso, en la capacidad de defensa corporal, entre otras, de quien lo consume.

Los alimentos funcionales son y deben ser alimentos, no medicamentos, los beneficios se pueden comprender gracias a sus efectos profilácticos, no terapéuticos (Doyon & Labrecque 2008). Para que un alimento pueda ser considerado funcional, debe demostrar que posee un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas del organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales. Esto significa que estos alimentos deben contener, necesariamente, alguno de los llamados componentes o ingredientes funcionales, entre los cuales pueden mencionarse como ejemplos: vitaminas, minerales, antioxidantes, fibra dietaria, etc. Por lo expuesto, son alimentos que pueden ser fácilmente incorporados en la dieta normal de una persona y su consumo habitual es suficiente para obtener beneficios. Actualmente la demanda de estos alimentos que promueven la salud ha ido en aumento (Tokatlı *et al.* 2015); en particular los probióticos han recibido una atención considerable en los últimos años (Argyri *et al.* 2013).

Probióticos

Si bien los probióticos se han utilizado por décadas, el concepto ha ido evolucionando con el paso del tiempo y la investigación (Soccol *et al.* 2010). El término se utilizó por primera vez en 1965, haciendo referencia a "sustancias secretadas por un microorganismo para estimular el crecimiento de otro" (Lilly & Stillwell 1965). En 1974, se propuso que los probióticos eran "organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal" (Parker 1974). Definiciones más modernas hablan de "alimentos que contienen bacterias vivas beneficiosas para la salud" (Salminen *et al.* 1998) o "preparados microbianos o componentes de células microbianas que tienen un efecto beneficioso para la salud" (Marteau *et al.* 2001). Una definición más precisa fue la propuesta por Charteris *et al.* (1997), que estableció que los probióticos eran "microorganismos que, cuando se los ingiere, podrían tener un efecto preventivo o tratar una condición patológica específica". Sin embargo, la definición más aceptada ha sido la propuesta por la FAO-OMS (Food and Agriculture Organization/World's Health Organization Working Group 2002), según la cual los probióticos son "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del consumidor". La mayor parte de los microorganismos considerados probióticos son BAL, principalmente especies pertenecientes al género *Lactobacillus* (antigua clasificación) y *Pediococcus* (Beganović *et al.* 2011, Zheng *et al.* 2020). Otros ejemplos de organismos probióticos son las bifidobacterias y levaduras (Soccol *et al.* 2010).

Las dos fuentes principales de microorganismos probióticos son el tracto gastrointestinal humano y productos lácteos fermentados. Sin embargo, otras fuentes, como los alimentos de origen vegetal, representan alternativas importantes, ya que las cepas aisladas de éstos pueden ser más viables y útiles para su aplicación en productos probióticos no lácteos (Peres *et al.* 2012, Fontana *et al.* 2013).

Efectos beneficiosos del consumo de probióticos

Entre los efectos beneficiosos que se atribuyen a los probióticos se encuentra la regulación del equilibrio microbiano en el tracto gastrointestinal, reducción del colesterol, alivio de los síntomas de intolerancia a la lactosa, reducción de cáncer de colon, mejora de la biodisponibilidad de los nutrientes, incremento de la respuesta inmunológica y aumento de la absorción de calcio (Argyri *et al.* 2013, Touret *et al.* 2018). Estos beneficios se deben principalmente a la capacidad de adhesión a las paredes del intestino, la actividad antioxidante y la producción de distintas sustancias como bacteriocinas, exopolisacáridos (EPS) y β -galactosidasa (β -gal) (James & Wang 2019).

La producción de bacteriocinas es considerada una de las principales características de los probióticos, ya que se trata de compuestos capaces de inhibir varios grupos indeseables de microorganismos. Las bacteriocinas son producidas por algunos grupos de bacterias Gram-negativas y positivas, entre ellas las BAL. Estas últimas tienen la capacidad de inhibir un diverso grupo de patógenos gastro-intestinales y/o microorganismos contaminantes de alimentos. Según Mokoena (2017) las bacteriocinas se clasifican en cuatro clases diferentes:

- Clase I: son lantibióticos, moléculas altamente modificadas, termoestables, con 20 a 30 residuos de aminoácidos llamados lantibióticos y de un tamaño menor a 5 kDa.
- Clase II: son péptidos no modificados, termoestables, con 30 a 70 residuos de aminoácidos no lantibióticos y de un tamaño menor a 5 kDa. La clase II ha sido dividida en cinco subclases (IIa, IIb, IIc, IId, IIe), donde las bacteriocinas de la subclase IIa son las más estudiadas y son producidas por una amplia variedad de géneros de BAL. Estas moléculas presentan actividad inhibitoria contra patógenos transmitidos por alimentos, especialmente *Listeria monocytogenes*.
- Clase III: proteínas de gran tamaño (mayor a 30 kDa) y no termoestables.
- Clase IV: péptidos cíclicos que no poseen modificaciones post-traduccionales y son termoestables.

Por otro lado, la actividad antioxidante reduce la reacción inflamatoria del intestino, disminuyendo así el riesgo de varias enfermedades gastrointestinales. Los probióticos pueden realizar esta actividad mediante regulación enzimática, eliminación de radicales libres y/o reducción de iones metálicos. Estos mecanismos

involucran enzimas antioxidantes, EPS y diferentes metabolitos bacterianos. Además, los organismos probióticos presentan directamente una función antioxidante, ya que su colonización intestinal produce una modulación de la microbiota, evitando la proliferación de patógenos que estimulan la producción de radicales libres en el epitelio del mismo (Feng & Wang 2020).

Algunos microorganismos pueden sintetizar extracelularmente polímeros de monosacáridos, conocidos como polisacáridos exocelulares o EPS. Según su composición química y su modo de síntesis, los EPS de las BAL se dividen en homopolisacáridos, los cuales están compuestos por un único tipo de monosacárido como el dextrano, y los heteropolisacáridos que están constituidos por dos o más tipos de monosacáridos y ácido glucónico (Ross *et al.* 2002). Los EPS además de presentar actividad antioxidante, permiten la adhesión a la pared intestinal, la auto y co-agregación (Wang *et al.* 2019). Las BAL pueden secretar estas sustancias al medio extracelular o presentar estas moléculas en sus paredes celulares en forma de cápsula, lo que les permite interactuar con otras superficies celulares y adherirse a ellas. En la industria alimentaria la producción de EPS es una característica aplicable de las BAL, debido a la influencia que ejercen sobre las propiedades reológicas. En particular estas sustancias se utilizan como agentes gelificantes, biosurfactantes, bioestabilizadores y bioemulsificantes, confiriéndoles características deseables a los alimentos (Wang *et al.* 2019).

La intolerancia a la lactosa es una afección producida por la mala absorción de este azúcar debido a bajos niveles de β -gal (E.C. 3.2.1.23). Este problema fisiológico afecta a millones de personas alrededor del mundo, aproximadamente el 75% de la población mundial tiene mala absorción, influenciada principalmente por factores étnicos (Gomes *et al.* 2018). La presencia de lactosa en la luz del colon provoca su fermentación por los microorganismos intestinales, produciendo hidrógeno, dióxido de carbono y gas metano. Además de eliminar o reducir la lactosa de los productos lácteos para personas intolerantes, esta enzima presenta ventajas nutricionales y tecnológicas como la producción de galactooligosacáridos (Wichienchot *et al.* 2016) y el aumento de cremosidad y dulzura en productos alimenticios. Esto se debe a que la glucosa y la galactosa presentan mayor poder endulzante en comparación con la lactosa y además se absorben más fácilmente.

La FAO y la OMS han establecido que las principales pruebas *in-vitro* utilizadas actualmente para el estudio de cepas con potencial probiótico son la resistencia a la acidez gástrica y a los ácidos biliares, adherencia a la mucosa y/o células epiteliales humanas, producción de metabolitos con actividad antimicrobiana, capacidad para reducir la adhesión de patógenos a las superficies, entre otras (FAO/WHO Working Group 2002).

Alimentos fermentados

La fermentación de alimentos se ha realizado desde la prehistoria, con el objetivo de preservar alimentos perecederos o por motivos religiosos, como es el caso de varias bebidas alcohólicas. A lo largo de la historia y alrededor del mundo se han consumido diferentes fermentos, desde bebidas alcohólicas, como ya se mencionó, hasta panes, leches fermentadas, cereales, jugos frutales, cacao, condimentos, fermentos vegetales, como el kimchi y el chucrut, entre otros. En la actualidad también se utiliza la fermentación para reducir el tiempo de cocción, mejorar las características organolépticas y/o mejoramiento de la nutrición (Paramithiotis *et al.* 2017, Schneier 2020).

En Argentina, y gran parte de occidente, se consumen principalmente alimentos lácteos fermentados, aplicándose tradicionalmente en la elaboración de estos productos especies probióticas, siendo el yogurt el principal vehículo de las mismas (Beganović *et al.* 2011, Vinderola & Weill 2020). Sin embargo, actualmente se está introduciendo su uso cada vez más en bebidas y vegetales fermentados como cultivos iniciadores funcionales (Beganović *et al.* 2011), siendo este tipo de alimentos fermentados novedosos en nuestro país. A diferencia de los países asiáticos donde el consumo de legumbres y vegetales fermentados es histórico, siendo ejemplo de ello el miso y el kimchi, respectivamente. En estos países, el consumo de productos lácteos es lo novedoso, ya que llegaron a oriente en la modernidad (Schneier 2020, Vinderola & Weill 2020).

Relevancia del estudio

Durante los últimos años, ha tomado una especial dinámica el estudio de los procesos fermentativos sobre matrices vegetales dentro de las cuales, las brasicáceas (repollo blanco, repollo rojo, col china, etc.) se han transformado en el modelo a investigar (Seong *et al.* 2016, Wiczowski *et al.* 2016). Todas sus variedades son ricas en compuestos antioxidantes (polifenoles, flavonoides, taninos, antocianinas, etc.) que tienen la propiedad de reducir o eliminar a especies reactivas de oxígeno, las cuales se vinculan directamente con el envejecimiento celular, enfermedades inflamatorias crónicas y degenerativas, cáncer, etc. (de Pascual-Teresa & Sanchez-Ballesta 2008).

Actualmente, existen estudios que demuestran que los vegetales fermentados podrían actuar como posibles fuentes de cepas de BAL con potencial probiótico (Beganović *et al.* 2011, Tokatli *et al.* 2015, Sáez *et al.* 2018); en particular el chucrut, un producto vegetal que resulta de la fermentación espontánea de repollo en condiciones anaeróbicas después de la adición de sal (Touret *et al.* 2018). La fermentación se produce en el transcurso de varias semanas, a temperaturas comprendidas entre 15-20 °C, y se realiza mediante una sucesión microbiana, caracterizada por dos fases: una heterofermentativa dominada por la especie *Leuconostoc mesenteroides*, seguida de una homofermentativa donde destaca la

presencia *Lactiplantibacillus plantarum* (Zabat *et al.* 2018). Si bien estas bacterias son las especies predominantes involucradas en la fermentación de chucrut, existen otros microorganismos presentes que pueden ser importantes, principalmente otras especies de *Leuconostoc* y *Lactiplantibacillus*, como así también *Pediococcus* y *Weissella* (Zabat *et al.* 2018).

La inclusión de este tipo de alimentos al mercado ofrece una alternativa a los consumidores veganos, vegetarianos, intolerantes a la lactosa, o con dietas exentas de colesterol; posibilitándoles la incorporación de productos ricos en compuestos nutricionales y una microbiota beneficiosa. Además, pueden resultar atractivos para el resto de la población en general, como una nueva forma rápida de incorporar frutas y vegetales, cuyo consumo ha disminuido en el país. En cambio, el consumo de carnes rojas, alimentos ultra procesados, con alto contenido de azúcar, sal, grasas y alimentos listos para consumir ha aumentado (Zabat *et al.* 2018). Por ello, la dieta de la población argentina se ha vuelto baja en fibras, lo que típicamente se asocia con enfermedades no transmisibles como algunos tipos de tumores sólidos, en particular el cáncer colorrectal, enfermedades hormono-dependientes, como la diabetes tipo II, y enfermedades cardiovasculares (Castañola *et al.* 2004).

En los últimos años, se ha observado una creciente demanda de alimentos capaces de proporcionar bienestar y promover la salud. Esto ha impulsado a la industria alimentaria a buscar y desarrollar productos con propiedades funcionales que cumplan con tales exigencias. Las BAL son los microorganismos más comúnmente usados como probióticos; su capacidad metabólica les permite la utilización de distintos sustratos con la consecuente producción de metabolitos bioactivos. Su presencia es común en los alimentos fermentados y su vinculación con su uso histórico a lo largo de la civilización ha contribuido a su aceptación para el consumo humano.

En nuestro país el consumo de probióticos sólo está asociado a productos lácteos, por lo que se podría inferir que la oferta de alimentos funcionales bajo la presentación de matrices vegetales brindaría nuevas opciones a los consumidores. Por lo expuesto, resulta de interés y relevancia establecer procedimientos estandarizados para la selección de cepas de BAL aisladas de fermentaciones espontáneas de brasicáceas con potencial tecnológico y/o probiótico para que puedan ser empleados como cultivos iniciadores comerciales para la elaboración de vegetales fermentados.

Objetivos

Objetivo general

Debido a la relevancia de los probióticos para la salud humana, es importante identificar candidatos bacterianos con potencial para su uso en productos alimenticios alternativos como los vegetales. En este contexto, el objetivo principal

del trabajo fue la selección de BAL con potencial capacidad probiótica para producir alimentos vegetales fermentados en procesos controlados, que den origen a productos de calidad estable y con propiedades beneficiosas para la salud.

Objetivos específicos

- Seleccionar de la colección de BAL del Laboratorio Biotecnología Bacteriana (FCNyCS, Sede Trelew, UNPSJB) cepas con capacidad funcionales y/o tecnológicas comprobadas en estudios anteriores.
- Evaluar la capacidad de las BAL de resistir al tránsito gastrointestinal mediante simulaciones *in-vitro*.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de las BAL contra microorganismos patógenos y/o contaminantes de alimentos.
- Determinar mediante cebadores específicos los genes de bacteriocinas de las BAL con capacidad inhibitoria.
- Evaluar las características de las superficies celulares de las BAL mediante ensayos de adhesión a solventes orgánicos.
- Evaluar la capacidad de autoagregación y co-agregación contra microorganismos Gram positivos y negativos de colección.
- Evaluar la actividad β -gal *in-vitro* de las cepas de BAL seleccionadas.
- Evaluar la seguridad de las cepas de BAL seleccionadas.
- Evaluar la producción de EPS de las cepas de BAL seleccionadas.
- Evaluar la capacidad antioxidante *in-vitro* de las cepas de BAL seleccionadas.

Metodología

Material biológico

Se utilizaron microorganismos del Cepario del Laboratorio de Biotecnología Bacteriana (LBB), el cual cuenta con BAL que se han obtenido a partir de fermentaciones espontáneas de brasicáceas y otros alimentos. En particular se utilizaron cepas de los géneros *Lactiplantibacillus* y *Leuconostoc* (tabla 1); todos considerados con estatus "GRAS", para uso humano. La selección se realizó sobre la base de las distintas capacidades tecnológicas y/o funcionales que puedan lograr el objetivo del plan de trabajo propuesto. Las cepas se repicaron a agar Man, Rogosa & Sharp (MRS) (Biokar, Francia) para su reactivación y posterior estudio.

Tabla 1: Cepas de BAL seleccionas para el estudio de su potencial probiótico.

	Cepas (según taxonomía 2020*)	Nº GenBank	Origen
RCTw1.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>jonggajibkimchii</i>	MT702992	Repollo colorado
RCTw13	<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i>	MT178433	Repollo colorado
AKTw35	<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>jonggajibkimchii</i>	MT178434	Akusai
RBTw100	<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i>	MT178435	Repollo blanco
RBTw102	<i>Lactiplantibacillus argentoratensis</i>	MT178436	Repollo blanco
RCTw106	<i>L. plantarum</i>	MT178437	Repollo colorado
RCTw111	<i>L. argentoratensis</i>	MT178438	Repollo colorado
AKTw112	<i>L. argentoratensis</i>	MT178439	Akusai
AKTw180	<i>L. plantarum</i>	MT178440	Akusai
RBTw249	<i>L. argentoratensis</i>	MT178441	Repollo blanco
RBTw256	<i>L. plantarum</i>	MT178442	Repollo blanco
PCTw261	<i>L. argentoratensis</i>	MT178443	Pak choi
PCTw270	<i>L. argentoratensis</i>	MT178444	Pak choi
AKTw332	<i>L. pentosus</i>	MT178445	Akusai
AKTw335	<i>L. plantarum</i>	MT178446	Akusai

*Según Zheng *et al.* (2020).

Caracterización del potencial probiótico

Resistencia a pH y bilis

Se utilizó el método propuesto por Chang *et al.* (2010) para la evaluación de la resistencia al pH y bilis, con algunas modificaciones. Se realizó un cultivo *overnight* en caldo MRS de cada cepa, luego se repicó una concentración conocida a caldo MRS acidificado con HCl 1 M a pH 2,5 y 3, y se incubaron durante 72 h a 35 °C. Se midió la densidad óptica a 600 nm y se los comparó con el estándar n°1 de la Escala de McFarland. El crecimiento se determinó como positivo (+) y la ausencia del mismo como negativo (-).

La resistencia a bilis se evaluó de la misma forma, utilizando MRS suplementado con bilis al 0,5% y al 1% m/v. La determinación de la resistencia se evaluó de la misma manera que lo descrito anteriormente.

Actividad antimicrobiana

Las pruebas de inhibición se realizaron sobre las cepas seleccionadas utilizando como cepas indicadoras las que se listan a continuación (tabla 2):

Tabla 2: Cepas indicadoras y condiciones de cultivo.

Organismos	Medio	Temperatura (°C)
<i>Listeria innocua</i> Tw67 ^a	BHI	35
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	BHI	35
<i>L. innocua</i> 6A ^b	BHI	35
<i>L. monocytogenes</i> 1915 ^c	BHI	35
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	BHI	35
<i>L. monocytogenes</i> 1599 ^c	BHI	35
<i>L. monocytogenes</i> 1908 ^c	BHI	35
<i>L. monocytogenes</i> Scott A ^b	BHI	35
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	MRS	35
<i>Lc. lactis</i> Tw11 ^a	MRS	30
<i>Lc. lactis</i> Tw12 ^a	MRS	30
<i>Lc. lactis</i> Tw34 ^a	MRS	30
<i>Lc. lactis</i> Tw35 ^a	MRS	30
<i>L. plantarum</i> TwLb5 ^a	MRS	35
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 15307	BHI	35
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	MRS	35
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	BHI	35
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	BHI	35
<i>Staphylococcus aureus</i> ssp. <i>aureus</i> ATCC 25923	BHI	35

^a Cepas pertenecientes al LBB – Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

^b Cepas donadas por la Dra. Kátia G. de Carvalho (Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos (PROIMI-CONICET, San Miguel de Tucumán).

^c Cepas donadas por el Lic. Pablo Ledesma (Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco).

BHI = cerebro-corazón.

MRS = Man, Rogosa & Sharp.

Técnica de difusión en placa

Los sobrenadantes libres de células (SLC) de las cepas seleccionadas se utilizaron en el ensayo antimicrobiano que se realizó por el método de difusión en placa (Vallejo *et al.* 2013). Se colocaron 50 µl de SLC en pocillos practicados en placas de agar (1,2%) cerebro-corazón (BHI) (Biokar, Francia) sembrados previamente con 50 µl de un cultivo *overnight* (0,5 de la escala Mc Farland) de diferentes microorganismos indicadores. Las placas se incubaron durante 24 h a temperatura óptima y el efecto antimicrobiano se expresó en mm, midiendo el halo de inhibición de crecimiento con un micrómetro.

Técnica en doble capa

Se realizó el ensayo de inhibición de la doble capa, según la metodología propuesta por Touret *et al.* (2018). Todas las cepas seleccionadas se repicaron a agar MRS y se incubaron durante 24 h a 35 °C. posteriormente se adicionó una segunda capa de tripticasa soja (TS) (Britania, Argentina) agarizado (0,8%) el cual contenía el microorganismo indicador. Luego, las placas se incubaron nuevamente durante 24 h y el efecto antimicrobiano se determinó mediante la inhibición del microorganismo indicador.

Incompatibilidad

Se evaluó la incompatibilidad entre las cepas de BAL seleccionadas utilizando los SLC mediante el método de difusión en placa previamente descrito. Las placas se incubaron durante 24 h a 35 °C y el efecto antimicrobiano se expresó en mm.

Extracción de ADN

Las cepas de BAL seleccionadas se cultivaron en caldo MRS a 35 °C durante 24 h. Luego, los cultivos se centrifugaron a 12.000 g durante 5 min y el ADN se extrajo utilizando un equipo comercial de purificación Wizard Genomics Promega DNA purification kit (Madison, Wisconsin, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Determinación molecular de bacteriocinas

Se determinó la presencia de 6 plantaricinas (A, C, N, EF, J y K) mediante PCR sobre las cepas que presentaron actividad antimicrobiana, utilizando los cebadores y condiciones detalladas en la tabla 3. Para las plantaricinas A, C y N, se realizó una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min y 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min y elongación a 72 °C por 30 s. La elongación final se realizó a 72 °C por 5 min (Ben-Omar *et al.* 2008). Para las plantaricinas EF, J y K se realizó una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min y 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s y elongación a 72 °C por 2 min. La elongación final se realizó a 72 °C por 7 min (Chaalet *et al.* 2015).

Tabla 3: Cebadores utilizados para la detección de plantaricinas mediante PCR.

Plantaricinas	Cebadores	Amplicón (pb)	Annealing	Referencia
A	F: GTACAGTACTAATGGGAG	450	53°C	Ben-Omar <i>et al.</i> (2008)
	R: CTTACGCCAATCTATACG		1 min	
C	F: AGCAGATGAAATTCGGCAG	108	49,5°C	
	R: ATAATCCAACGGTGCAATCC		1 min	
N	F: ATTGCCGGGTTAGGTATCG	146	51,9°C	
	R: CCTAAACCATGCCATGCAC		1 min	
EF	F: GGCATAGTTAAAATTCCCCCC	428	53°C	
	R: CAGGTTGCCGCAAAAAAAG		30 s	
J	F: TAACGACGGATTGCTCTG	475	51°C	
	R:AATCAAGGAATTATCACATTAGTC		30 s	
K	F: CTGTAAGCATTGCTAACCAATC	246	53°C	
	R: ACTGCTGACGCTGAAAAG		30 s	

Hidrofobicidad de la superficie celular

Se realizaron los ensayos de adhesión a n-hexadecano sobre las cepas seleccionadas según el método de Pérez *et al.* (1998). El descenso de la absorbancia de la fase acuosa se tomó como una medida de la hidrofobicidad de la superficie celular, calculándose con la siguiente fórmula:

$$H\% = [(A_0 - A)/A_0] \times 100$$

Donde A_0 y A representan la DO anterior y posterior a la extracción con n-hexadecano, respectivamente.

Capacidad de autoagregación

La capacidad de autoagregación se realizó según lo descrito por Kos *et al.* (2003). Se realizó un cultivo *overnight* de las cepas en 2 ml de caldo MRS a 35 °C, luego los cultivos se centrifugación a 3.500 rpm y se realizaron dos lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, los pellets se resuspendieron en el mismo volumen de buffer fosfato salino (PBS pH 7,2). La capacidad de autoagregación se evaluó durante 5 h de incubación a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas (100 µl) de la capa superior al inicio (t=0 h) y al finalizar el ensayo (t=5 h), y se transfirieron a otro tubo conteniendo 1,9 ml de buffer PBS para la determinación de la DO a 600 nm. El porcentaje de autoagregación se expresó como:

$$A\% = [1 - (A_t/A_0)] \times 100$$

Donde A_t representa la DO a tiempo $t = 5$ h y la A_0 representa la DO a $t = 0$.

Capacidad de co-agregación

El método para preparar las suspensiones celulares para determinar la capacidad de co-agregación fue el mismo que para el ensayo anterior. Se mezclaron volúmenes iguales de las cepas seleccionadas de BAL con bacterias indicadoras (*E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ssp. *aureus* ATCC 25923). Luego de 5 h de incubación a temperatura ambiente, se midió la DO a 600 nm. El porcentaje de co-agregación se expresó como:

$$C\% = \{1 - [A_{mix}/(A_x + A_y/2)]\} \times 100$$

Donde A_{mix} representa la DO de la mezcla de la suspensión de BAL y la bacteria indicadora después de 5 h ($t = 5$ h), A_x y A_y representan la DO de las suspensiones individuales de BAL e indicadora luego del periodo de incubación, $t = 5$ h.

Actividad β -galactosidasa

Se evaluó la actividad β -gal de las cepas según el método propuesto por Gobinath & Prapulla (2014) con algunas modificaciones. Las cepas se cultivaron durante 24 h a 35 °C en caldo MRS modificado, reemplazando la glucosa por lactosa al 2% (m/v). Se tomó una alícuota de 1 ml de cultivo, se centrifugó a máxima velocidad y se realizaron dos lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, las células se resuspendieron en 900 μ l de buffer Z (60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl, 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mM β -mercaptoetanol), para luego permeabilizarlas mediante la adición de 50 μ l de SDS al 0,1% (m/v) y 50 μ l de cloroformo. Luego, se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Al lisado celular se le adicionó 200 μ l de Orto-Nitrofenol- β -d-Galactospiranósido (ONPG) (4 mg/ml) como sustrato y se incubó a 37 °C durante 15 min. La reacción se detuvo con 100 μ l de carbonato de sodio al 10% y se midió la DO a 420 nm. La actividad enzimática se calculó según la concentración de Orto-Nitrofenol liberada (ONP) y los resultados se expresaron en unidades enzimáticas (UE). La UE se definió como la cantidad de μ moles de ONP liberados por mililitro de enzima por minuto en las condiciones del ensayo.

Evaluación de seguridad de las cepas

Con el objetivo de determinar potenciales factores de virulencia y/o rasgos negativos para la salud humana, las cepas de BAL se sometieron a los siguientes ensayos:

Actividad gelatinasa y hemólisis

La producción de gelatinasa se evaluó utilizando agar MRS con 3% (m/v) de gelatina, las placas se incubaron a 35 °C durante 48 h. Posteriormente, se dejaron a 4 °C durante 3 h y una zona de turbidez alrededor de las colonias se consideró como resultado positivo (Igbinosa & Beshiru 2019).

La actividad hemolítica se evaluó en agar BHI suplementado con sangre defibrinada humana al 5% luego de una incubación a 35 °C durante 48 h. Los resultados se interpretaron como positivos cuando se observó un halo de hemólisis completa alrededor de las colonias (β -hemólisis). En ambos ensayos se utilizó como control positivo la cepa *E. faecalis* ATCC 29212.

Producción de aminas biógenas

La capacidad de producción de histamina, tiramina y cadaverina se evaluó empleando la metodología propuesta Bover-Cid *et al* (2014). Las BAL seleccionadas se sembraron en agar MRS a pH 5,3; suplementado con 1% (m/v) del aminoácido específico (histidina, tirosina y lisina) y 0,006% de purpura de bromo cresol, como indicador del pH. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h. Los resultados se interpretaron como positivos cuando el medio viró de amarillo a purpura, como consecuencia del incremento del pH producido por la descarboxilación de los aminoácidos.

Resistencia a antimicrobianos

La sensibilidad a los antimicrobianos ampicilina, gentamicina, kanamicina, estreptomycin, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y cloranfenicol se evaluó en todas las cepas seleccionadas mediante diluciones seriadas utilizando el agar Mueller-Hinton (Britania, Argentina), según las recomendaciones del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2022). Los puntos de corte para cada antibiótico fueron los establecidos por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2018) (Aquilina *et al.* 2018) para los géneros *Lactiplantibacillus* y *Leuconostoc*. Se utilizó la cepa de *E. faecalis* ATCC 29212 como microorganismo de control.

Propiedades tecnológicas

Producción de exopolisacáridos

La producción de EPS de las cepas se evaluó de manera cualitativa en agar BHI adicionado con sacarosa (50 g/l) y 0,8 g/l de rojo Congo. Las placas se incubaron a 35 °C durante 24-48 h, interpretando los resultados como positivos cuando se observaron colonias de color negro (Freeman *et al.* 1989). Como control positivo se utilizó la cepa de *E. mundtii* Tw278 perteneciente al cepario del LBB.

Efecto de la sacarosa en la solidificación de la leche

Se evaluó los efectos de los EPS, producidos por las cepas en la leche, siguiendo el protocolo propuesto por Wang *et al.* (2019) con algunas modificaciones. La leche descremada estéril se suplementó con distintas concentraciones de sacarosa: 0, 5, 10, 20% (m/v). Luego, se sembró 5% de un cultivo *overnight* y se evaluó la producción de EPS a distintas temperaturas. Se realizaron dos ensayos, en el primero la incubación de las cepas se realizó a 35 °C durante 48 h y en el segundo a 18 °C por 7 días.

Actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de las cepas se evaluó según dos métodos diferentes que se detallan a continuación:

Capacidad Antioxidante sobre el Cobre (CUPRAC)

Las cepas se incubaron durante 24 h en caldo MRS a 37 °C. Luego del periodo de incubación, se centrifugaron a 2.000 g durante 15 min y se realizaron dos lavados con 2 ml de buffer PBS. Posteriormente, las células se resuspendieron en 2 ml de reactivo de trabajo (2 ml neocuproina 1mg/ml en etanol, 3 ml de buffer acetato de sodio 0,05 M pH 6,0; 1 ml de solución de CuCl₂ 0,01 M), se incubaron en oscuridad durante 1 h y después se centrifugaron a 12.000 g durante 2 min. Finalmente, se determinó la absorbancia de los sobrenadantes a 450 nm utilizando un espectrofotómetro (Jenway 6405 UV/vis) y los resultados se calcularon con una curva patrón de ácido ascórbico (los resultados se expresaron como milimoles equivalentes a ácido ascórbico por mililitro).

Reducción de DPPH

El método de reducción del radical libre 2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) se evaluó según la metodología propuesta por Kuda *et al.* (2014) con algunas modificaciones. Los cultivos celulares, previamente centrifugados y lavados como lo descrito en el ensayo de CUPRAC, se resuspendieron con 2 ml de la solución de DPPH y se incubaron en oscuridad durante 30 min. Luego se centrifugaron a 6.000 g durante 5 min y se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 517 nm.

El porcentaje de actividad antioxidante se expresó como:

$$[1 - (A/A_0)] \times 100$$

Dónde: A₀ es el control, absorbancia de la solución de DPPH, y A es la muestra de DPPH con suspensión celular.

Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron de manera independiente y por triplicado. Los cálculos del promedio, desvío estándar y el análisis de la varianza (ANOVA) se realizaron con el programa R Studio para Windows, aplicando el test de Tukey con un nivel de $p < 0,01$.

Resultados y Discusión

Caracterización del potencial probiótico

Resistencia a pH y bilis

La palabra “Probiótico” es un término de origen griego que significa “a favor de la vida”. Como se mencionó anteriormente, este término se utiliza para definir a aquellos microorganismos, ya sean bacterias o levaduras, que sobreviven al paso por el tracto gastrointestinal y que producen un efecto beneficioso sobre una o varias funciones del organismo, proporcionando un mejor estado de salud y bienestar y/o reduciendo el riesgo de enfermedad.

La colonización del huésped es un prerrequisito para que los microorganismos considerados como probióticos ejerzan sus beneficios. En consecuencia, la supervivencia de los microorganismos a las condiciones impuestas en el tracto gastrointestinal, es uno de los ensayos *in vitro* que se emplean en cualquier estudio rutinario como proceso de selección. Después de la ingestión, los probióticos se encuentran sometidos a condiciones extremas, se sabe que el pH del estómago fluctúa entre 1-2 hasta 4-5 después del consumo de alimentos (Papadimitriou *et al.* 2015). Luego, las condiciones se modifican drásticamente, en particular en el duodeno el pH aumenta y los microorganismos se exponen a sales biliares.

Las cepas de *Lactiplantibacillus argentoratensis* (RCTw111 y PCTw261) y *L. plantarum* (AKTw180 y AKTw335) demostraron resistencia a pH 2,5 y bilis 1% por lo cual serían capaces de resistir las condiciones impuestas durante el tránsito del tracto gastrointestinal (tabla 4). En aspectos generales, las cepas pertenecientes al género *Lactiplantibacillus* exhiben mayor tolerancia a la simulación de las condiciones gastrointestinales que el género *Leuconostoc*, coincidiendo estos resultados con los ensayos realizados por Szutowska & Gwiazdowska (2020) con cepas de origen vegetal. Sin embargo, las cepas estudiadas parecerían presentar mayor resistencia a la bilis que a la acidez, a diferencia de lo descrito en otros estudios (Junnarkar *et al.* 2019, Szutowska & Gwiazdowska 2020). Tres cepas de *L. argentoratensis* (RBTw102, RBTw249 y PCTw270) y dos de *L. plantarum* (RCTw106 y RBTw256) no exhibieron resistencia a pH 2,5; no obstante, su utilización podría ser considerada con la aplicación de microencapsulación u otros mecanismos protectores al pH (Cook *et al.* 2012). Las cepas que no toleraron la acidez o la bilis

podrían ser consideradas para la utilización como postbióticos, que según Salminen *et al.* (2021) son una preparación de microorganismos inactivados y/o sus componentes que confieren un beneficio para la salud.

Tabla 4: Evaluación de la resistencia a pH y bilis de las cepas de BAL seleccionadas.

Cepas	pH 2,5	pH 3	bilis 0,5%	bilis 1%
RCTw1.1	-	-	-	-
RCTw13	-	-	-	-
AKTw35	+	+	-	-
RBTw100	+	+	+	-
RBTw102	-	+	+	+
RCTw106	-	+	+	+
RCTw111	+	+	+	+
AKTw112	-	-	+	+
AKTw180	+	+	+	+
RBTw249	-	+	+	+
RBTw256	-	+	+	+
PCTw261	+	+	+	+
PCTw270	-	+	+	+
AKTw332	-	-	+	+
AKTw335	+	+	+	+

Considerándose como positivo (+) una densidad óptica mayor o igual al Estándar de Mc Farland N°1 y negativo (-) una densidad óptica menor al mismo.

Actividad antimicrobiana

Una de las características de mayor interés en los microorganismos probióticos es la capacidad de producir compuestos con actividad antimicrobiana, ya que ayudan a la regulación de la microbiota intestinal (Papadimitriou *et al.* 2015). También es una característica buscada en cepas utilizadas como cultivos iniciadores o “starters”, debido a que funcionan como bioestabilizadores durante la fermentación y la conservación de los alimentos (Suskovic *et al.* 2010). Por otra parte, durante las fermentaciones no controladas de alimentos, resulta particularmente necesario debido a la posible contaminación por agentes deteriorantes y/o patogénicos (Sáez *et al.* 2018). Las BAL poseen múltiples moléculas que les proporcionan esta característica, como el ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno, etanol, EPS y bacteriocinas, entre otras (Suskovic *et al.* 2010, Sáez *et al.* 2018).

Técnica de difusión en placa

Los SLC de todas las cepas de *Lactiplantibacillus*, salvo *L. plantarum* AKTw180, mostraron actividad inhibitoria frente a cepas de *L. innocua*, *L. monocytogenes* y *Lc. lactis*, mientras que no se observó actividad contra *Lb. plantarum*, *M. luteus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* o *S. aureus* ssp. *aureus* (datos no mostrados). Ninguna de las cepas perteneciente al género *Leuconostoc* presentó actividad inhibitoria contra los microorganismos evaluados (tabla 5). La actividad anti-listeria exhibida por las nueve cepas coincide con trabajos anteriores para el género *Lactiplantibacillus* (Todorov 2009, da Silva Sabo *et al.* 2014, Voloshyna *et al.* 2021).

Tabla 5: Actividad inhibitoria de los SLC de las cepas de BAL seleccionadas frente a las cepas indicadoras.

Cepas	Li Tw67	Li ATCC 33090	Li 6A	Lm 1915	Lm ATCC 7644	Lm 1599	Lm 1908	Lm Scott A	Lc ATCC 11454	Lc Tw34
RCTw1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RCTw13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AKTw35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RBTw100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RBTw102	10	-	-	-	-	-	10	12	10	10
RCTw106	-	-	-	-	-	-	-	15	-	-
RCTw111	-	-	10	-	-	-	-	-	-	10
AKTw112	-	-	12	-	-	-	-	10	12	10
AKTw180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RBTw249	12	-	11	14	14	14	-	-	-	-
RBTw256	10	-	10	-	-	12	-	-	-	-
PCTw261	10	10	10	-	-	10	-	-	9	-
PCTw270	10	10	10	-	10	-	-	-	9	-
AKTw332	-	-	-	17	13	-	15	15	-	-
AKTw335	11	-	10	-	-	10	-	-	-	10

SCL = sobrenadantes libres de células.

Halos de inhibición medidos en milímetros y considerando como negativo (-) la ausencia de halo.

Li: *Listeria innocua*.

Lm: *Listeria monocytogenes*.

Lc: *Lactococcus lactis*.

Técnica en doble capa

Se utilizó esta técnica para comprobar si la inhibición observada en las BAL era producto de la presencia de bacteriocinas u otro tipo de molécula con actividad antagónica como, por ejemplo: ácidos orgánicos, diacetilo, peróxido de hidrógeno, etc. Ninguna de las cepas de BAL exhibió actividad inhibitoria contra los microorganismos Gram positivos y negativos evaluados. Si bien la técnica de la doble capa es utilizada de manera rutinaria, a diferencia de la difusión en agar, esta es menos sensible. Esto puede deberse a que en un medio de cultivo líquido la producción de metabolitos como las bacteriocinas es mayor que en un medio sólido y, además su difusión es menor.

Incompatibilidad

El uso de “starters” ha posibilitado que la fermentación pase de producción exclusivamente artesanal a procesos industrializados, ya que permite realizar productos de alta calidad estandarizados (Sáez *et al.* 2018). Además, se ha comprobado que funcionalmente, los “starters” multicepa podrían ser más efectivos comparados con los monocepa, ya que presentan una mayor posibilidad de completar efectivamente la fermentación. También se ha observado que algunas cepas en co-cultivo ven sus características aumentadas por un efecto de sinergia entre ellas (Geria & Caridi 2014).

Mediante el ensayo de difusión en placa se evaluó la inhibición entre las cepas seleccionadas con el propósito de determinar si es posible su uso en combinación. Las cepas de BAL exhibieron compatibilidad entre sí, ya que ninguna logró inhibir el crecimiento de la otra. Esta condición se debe cumplir entre los microorganismos que van a conformar los cultivos iniciadores o “starters”, para garantizar su desarrollo durante el proceso de fermentación.

Determinación molecular de bacteriocinas

Las plantaricinas son las bacteriocinas más frecuentes en el género *Lactiplantibacillus*. Estas moléculas pertenecen mayoritariamente a la clase II de la clasificación, en particular a las subclases IIa (plantaricina N) (Abdulhussain Kareem & Razavi 2020) y IIb (plantaricina J, K y EF) (Portilla-Vázquez *et al.* 2016), mientras que la plantaricina C corresponde la clase I (lantibióticos). Otras plantaricinas, como por ejemplo la A es considerada un intermedio evolutivo entre una feromona y bacteriocina, ya que actúa como un péptido inductor y presenta actividad antimicrobiana mediada por la formación de una estructura α -hélice fuertemente anfifílica (Pintos *et al.* 2011). Todas estas bacteriocinas se caracterizan por presentar actividad inhibitoria contra patógenos transmitidos por alimentos, especialmente *L. monocytogenes* (Mokoena 2017).

En todas las cepas de BAL que exhibieron actividad inhibitoria mediante la técnica de difusión en agar se evaluó la presencia de genes de bacteriocinas. En las cepas de *L. argentoratensis* RBTw102, RCTw111, AKTw112, RBTw249, RBTw256 y PCTw270 se detectó la presencia de las seis plantaricinas evaluadas, mientras que la cepa de *L. plantarum* RCTw106 no amplificó ninguna. En las cepas *L. plantarum* PCTw261, *L. pentosus* AKTw332 y *L. argentoratensis* AKTw335 se detectó la presencia de todas las plantaricinas, menos la plnJ (tabla 6). Los resultados obtenidos en este estudio son coincidentes con trabajos previos (Ben-Omar *et al.* 2008, Chaalel *et al.* 2015, Portilla-Vázquez *et al.* 2016, Lauková *et al.* 2022), quienes determinaron la presencia de múltiples plantaricinas en cepas del género *Lactiplantibacillus* aisladas de diversos orígenes.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la presencia de varios genes de plantaricinas en cepas de *Lactiplantibacillus* spp. aisladas de vegetales fermentados. La producción de varias bacteriocinas por la misma cepa juega un papel importante en la competencia de nicho, ya que cada bacteriocina puede diferir en su modo de acción, variando el espectro de inhibición.

La cepa *L. plantarum* RCTw106 podría presentar una plantaricina poco frecuente u otra bacteriocina diferente a las evaluadas en este estudio, por lo cual debería investigarse a futuro. Además, por la presencia de múltiples plantaricinas en la mayoría de las cepas sería conveniente estudiar las condiciones óptimas de producción de las moléculas inhibitorias para maximizar su efecto.

Tabla 6: Detección de genes de plantaricina en cepas de *Lactiplantibacillus* spp. con actividad antimicrobiana.

Cepas	<i>plnEF</i>	<i>plnJ</i>	<i>plnK</i>	<i>plnA</i>	<i>plnC</i>	<i>plnN</i>
RBTw102	+	+	+	+	+	+
RCTw106	-	-	-	-	-	-
RCTw111	+	+	+	+	+	+
AKTw112	+	+	+	+	+	+
RBTw249	+	+	+	+	+	+
RBTw256	+	+	+	+	+	+
PCTw261	+	-	+	+	+	+
PCTw270	+	+	+	+	+	+
AKTw332	+	-	+	+	+	+
AKTw335	+	-	+	+	+	+

Se considera como positivo (+) la presencia de un amplicón del tamaño correspondiente a la plantaricina y negativo (-) la ausencia del mismo.

Hidrofobicidad de la superficie celular

La hidrofobicidad de la superficie celular puede proveer a las bacterias resistencia a la fagocitosis y/o favorecer la adhesión a la mucosa intestinal, permitiendo la colonización del epitelio intestinal (Mattos-Guaraldi *et al.* 1999). Esto se debe a que el proceso involucra la interacción entre células mediante matrices, lo cual se

encuentra relacionado con las habilidades de auto y co-agregación (Yang *et al.* 2020).

La adhesión a solventes no polares, como el hexadecano, es una técnica rápida y sencilla para determinar la hidrofobicidad de las superficies celulares. Mediante este método, algunas cepas de *Lactiplantibacillus* exhibieron un mayor carácter hidrofóbico si las comparamos con las de *Leuconostoc* ($p < 0,01$). En particular, las cepas *L. pentosus* AKTw332 y *L. plantarum* AKTw335 resultaron fuertemente hidrofóbicas, mientras que *L. argentoratensis* PCTw270, *L. plantarum* RCTw106 y AKTw180 exhibieron una hidrofobicidad moderada, según la clasificación propuesta por Mattos-Guaraldi *et al.* (1999) (tabla 7). Los valores de hidrofobicidad obtenidos para el género *Lactiplantibacillus* son similares a los reportados en trabajos anteriores para cepas de origen animal (Krausova *et al.* 2019, Guan *et al.* 2020). En cambio, los resultados obtenidos en este estudio para las cepas de *Leuconostoc* son superiores a los descritos por Marín *et al.* (1997). Algunas investigaciones afirman que existe una correlación positiva entre el carácter hidrofóbico de una cepa y la capacidad de adhesión y colonización del intestino (Papadimitriou *et al.* 2015). Sin embargo, sería prematuro aseverar esto, a futuro debería evaluarse la capacidad de adhesión de los microorganismos a líneas celulares.

Tabla 7: Porcentaje y grado de hidrofobicidad de las cepas de BAL seleccionadas.

Cepas	Hidrofobicidad (%)	Grado de Hidrofobicidad
RCTw1.1	13,16 \pm 3,79 ^{ABC}	No hidrofóbica
RCTw13	5,80 \pm 3,52 ^{AB}	No hidrofóbica
AKTw35	2,14 \pm 0,93 ^A	No hidrofóbica
RBTw100	6,17 \pm 0,64 ^{ABC}	No hidrofóbica
RBTw102	15,80 \pm 3,79 ^{BC}	No hidrofóbica
RCTw106	41,86 \pm 2,93 ^D	Moderada
RCTw111	7,70 \pm 3,48 ^{ABC}	No hidrofóbica
AKTw112	17,66 \pm 3,13 ^C	No hidrofóbica
AKTw180	45,71 \pm 4,90 ^D	Moderada
RBTw249	11,08 \pm 3,74 ^{ABC}	No hidrofóbica
RBTw256	4,24 \pm 0,98 ^{AB}	No hidrofóbica
PCTw261	12,09 \pm 0,72 ^{ABC}	No hidrofóbica
PCTw270	44,94 \pm 3,49 ^D	Moderada
AKTw332	50,42 \pm 5,24 ^D	Fuerte
AKTw335	52,94 \pm 3,04 ^D	Fuerte

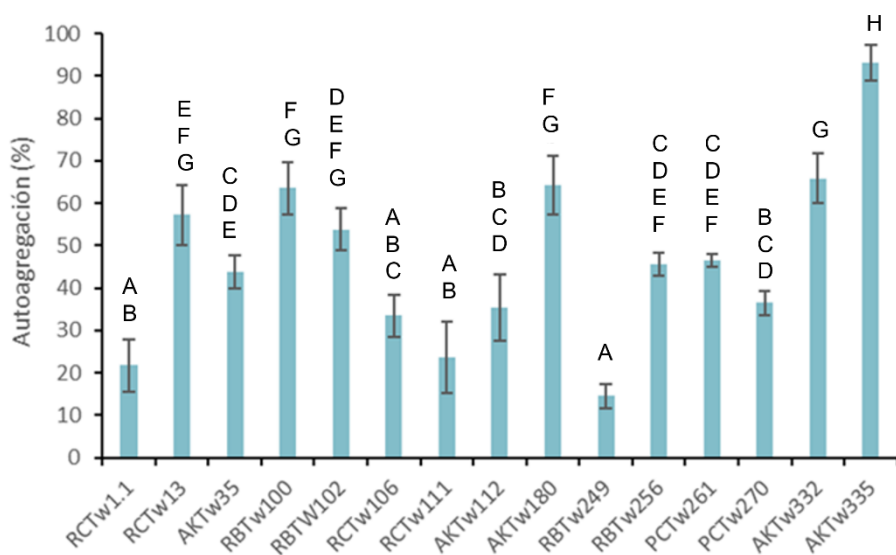
Los resultados expresados son el promedio \pm desviación estándar de tres réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas ($p < 0,01$) según test de Tukey. Se considera no hidrofóbico $< 20\%$, hidrofobicidad moderada $> 20\%$ y $< 50\%$, fuertemente hidrofóbica $> 50\%$, según Mattos-Guaraldi *et al.* (1999).

Capacidad de autoagregación

La capacidad de agregación bacteriana entre microorganismos de la misma especie (autoagregación) facilita la adhesión de las células al epitelio del intestino delgado, permitiendo la colonización del mismo, al igual que la hidrofobicidad (Kos *et al.* 2003).

La capacidad de autoagregación resultó mayor en cuatro cepas estudiadas: *L. mesenteroides* ssp. *dextranicum* RBTw100, *L. pentosus* AKTw332, *L. plantarum* AKTw180 y AKTw335 ($p < 0,01$), superando el 60% en todos los casos (figura 1).

Figura 1: Porcentaje de autoagregación en cepas de BAL seleccionadas



Los resultados son el promedio \pm desviación estándar de tres réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas ($p < 0,01$) según test de Tukey.

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con los reportados en trabajos previos para cepas de *Lactobacillus* (antigua clasificación) aisladas de alimentos fermentados de origen vegetal, vagina de mujeres sanas y jabalíes (Li *et al.* 2020, Li *et al.* 2015, Ocaña & Nader-Macías 2016), mientras que resultaron superiores a lo obtenido por Tuo *et al.* (2013) para cepas de *L. plantarum* de origen lácteo. Por otra parte, no existe en la actualidad estudios similares llevados a cabo en cepas del género *Leuconostoc*, por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio resultan novedosos y podrían ser un criterio a evaluar en futuros estudios.

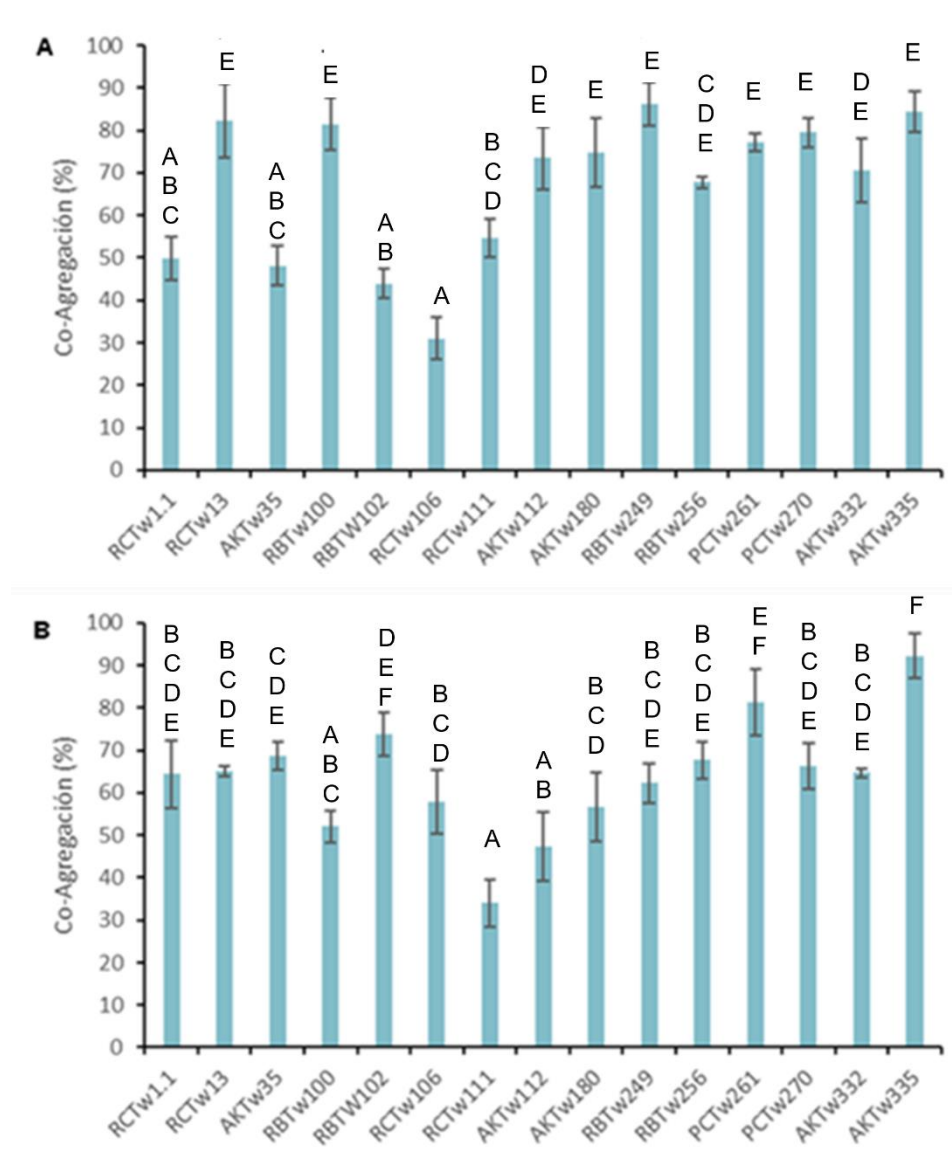
Capacidad de co-agregación

La capacidad de co-agregación permite que las bacterias actúen como barrera frente a microorganismos patógenos, evitando la colonización del intestino y regulando de esta manera la microbiota (Kos *et al.* 2003).

La mayoría de las cepas exhibieron una buena capacidad de co-agregación contra los microorganismos evaluados. Siete cepas de *Lactiplantibacillus* y dos de *Leuconostoc* exhibieron una capacidad de co-agregación significativamente mayor ($> 60\%$) con *E. coli* ATCC 25922 ($p < 0,01$) (figura 2A). Mientras que, frente a *S. aureus* ssp. *aureus* ATCC 25923 la cepa *L. plantarum* AKTw335 exhibió una

capacidad de co-agregación mayor al 90% ($p < 0,01$) (figura 2B). En general, los resultados obtenidos son mayores a los reportados anteriormente para cepas pertenecientes al género *Lactiplantibacillus* de origen vegetal co-agregando con *E. coli* (Tuo *et al.* 2013). Sin embargo, son coincidentes con lo reportado por Li *et al.* (2020) para cepas de lactobacilos de origen animal utilizando *E. coli* y *S. aureus*. Los resultados obtenidos con *Leuconostoc* resultan novedosos, debido a que no se los había evaluado en este aspecto con anterioridad.

Figura 2: Porcentaje de co-agregación con *E. coli* ATCC 25922 (A) y con *S. aureus* ssp. *aureus* ATCC 25923 (B) de las cepas de BAL seleccionadas.



Los resultados son el promedio \pm desviación estándar de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las cepas ($p < 0,01$) según test de Tukey.

Actividad β -galactosidasa

La intolerancia a la lactosa es un problema fisiológico que se produce por deficiencia de lactasa (β -gal) y se puede clasificar en tres tipos en función de su origen: congénita, primaria y secundaria. La deficiencia primaria de lactasa es la más común y aparece a los pocos años del nacimiento. La deficiencia secundaria es una condición que aparece en diferentes situaciones que afectan a la mucosa intestinal en individuos cuya actividad enzimática está presente (Castro *et al.* 2016). En individuos con intolerancia a la lactosa, el uso de probióticos reduce los síntomas de inflamación o distensión, posiblemente como consecuencia de la presencia de la enzima de las BAL, mejorando así la digestión de la lactosa (Gomes *et al.* 2018).

La β -gal es una enzima inducible y, por lo tanto, el medio debe contener componentes, como lactosa y diferentes aminoácidos que aportan las fuentes de nitrógeno para su producción (Gomes *et al.* 2018). La determinación de la actividad se llevó a cabo utilizando el medio MRS, reemplazando la glucosa por lactosa. Las cepas de *L. argenteratensis* (RBTw102, RCTw111, RBTw249, PCTw261 y PCTw270), *L. plantarum* (RBTw256 y AKTw335) y *L. pentosus* (AKTw332) exhibieron una actividad β -gal mayor ($p < 0,01$), comparadas con el resto (tabla 8). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Gomes *et al.* (2018), quienes evaluaron la actividad lactasa en especies de lactobacilos de origen vegetal empleando medios de cultivos de bajo costo con diferentes fuentes de nitrógeno.

En los últimos años, el desarrollo de alimentos funcionales, en particular aquellos conteniendo microorganismos probióticos y/o compuestos prebióticos ha recibido particular atención de la industria alimentaria debido a la alta demanda de alimentos saludables por parte de los consumidores. Al respecto, la enzima β -gal reviste interés biotecnológico por cuanto confiere a los microorganismos que la poseen potencial probiótico para aliviar los síntomas de intolerancia a la lactosa o prebiótico como generadores de galactooligosacáridos capaces de modular positivamente la microbiota intestinal. En este sentido, la selección de microorganismos para estos fines implica no solo la presencia excluyente de la enzima, sino también la cuantificación de la actividad específica.

Tabla 8: Actividad β -galactosidasa de las cepas BAL seleccionadas.

Cepas	UE
RCTw1.1	7,16 \pm 3,38 ^A
RCTw13	10,40 \pm 1,76 ^A
AKTw35	6,48 \pm 2,75 ^A
RBTw100	4,25 \pm 1,70 ^A
RBTw102	350,18 \pm 3,67 ^F
RCTw106	3,76 \pm 0,67 ^A
RCTw111	542,66 \pm 8,81 ^H
AKTw112	4,48 \pm 1,43 ^A
AKTw180	65,88 \pm 7,91 ^B
RBTw249	586,94 \pm 2,45 ^I
RBTw256	236,85 \pm 8,41 ^C
PCTw261	301,51 \pm 1,10 ^E
PCTw270	278,19 \pm 8,53 ^D
AKTw332	286,03 \pm 1,71 ^{DE}
AKTw335	373,79 \pm 13,21 ^G

Los resultados son el promedio \pm desviación estándar de tres réplicas. UE (unidad enzimática): se definió como la cantidad de μ moles de ONP liberados por mililitro de enzima por minuto en las condiciones del ensayo. Letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas ($p < 0,01$) según test de Tukey.

Evaluación de seguridad de las cepas

Actividad gelatinasa y hemólisis

Cada cepa que quiera utilizarse como probiótico en alimentos, debe cumplir con una serie de requisitos de seguridad (inocuidad), fisiológicos, funcionales y tecnológicos. Actualmente, las nuevas cepas destinadas a la biotecnología de alimentos, tanto para consumo humano como para el uso en animales, deben superar las pruebas de seguridad propuestas por la FDA. La caracterización de la seguridad incluye primero ensayos *in vitro* que prueban la ausencia de patogenicidad (resistencia antibiótica, hemólisis, actividad gelatinasa, producción de aminas biogénicas, etc), luego ensayos preclínicos con modelos animales y finalmente los ensayos clínicos con humanos.

La gelatinasa es una metaloendopeptidasa extracelular capaz de hidrolizar insulina, caseína, hemoglobina, fibrinógeno, colágeno y gelatina. Además, este tipo de enzima pueden generar procesos inflamatorios en el huésped (Kanemitsu *et al.* 2001). Los microorganismos que sintetizan gelatinasa son considerados no seguros, ya que no solo producen daños tisulares, sino que en ciertos casos logran migrar y difundir a través de los tejidos lesionados del hospedador provocándoles distintos tipos de enfermedades, como la endocarditis infecciosa, lesiones renales agudas, entre otras.

La citolisina o hemolisina β es una toxina extracelular y tiene un rol importante en la primera fase de la infección, debido a que interviene en la penetración bacteriana en los tejidos intestinales humanos, provocando un daño tisular y posterior lisis de la

célula (Semedo *et al.* 2003). De esta forma, contribuye a la severidad del proceso inflamatorio y cuando los enterococos invaden el tracto gastrointestinal logran desarrollar bacteriemias y endocarditis con la presencia de esta enzima.

Ninguna de las cepas de BAL evaluadas presentó actividad gelatinasa o hemólisis; condición *sine qua non* para su utilización como starter en la industria alimentaria.

Producción de aminas biógenas

Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que se encuentran presentes en animales, plantas y microorganismos, se producen por la descarboxilación de los aminoácidos (Ladero *et al.* 2020). Sin embargo, su presencia en alimentos no es deseada, ya que consumos elevados de las mismas pueden producir síntomas como malestar, náuseas, alteraciones respiratorias, sofocos, sudoración, palpitaciones, migrañas, fuertes dolores de cabeza, picor de ojos, hiper e hipotensión, problemas estomacales e intestinales y reacciones pseudoalérgicas, siendo las principales causantes de estos síntomas la histamina y la tiramina (Bover-Cid *et al.* 2014).

En este estudio, se evaluó de forma cualitativa la producción de histamina, cadaverina y tiramina por parte de las BAL seleccionadas. Se determinó que las cepas no exhibieron producción de tiramina ni cadaverina. Sin embargo, todas resultaron positivas para histamina.

Las BAL producen aminas biógenas para sobrevivir durante la fermentación de alimentos como queso, salchichas y vegetales fermentados (Barbieri *et al.* 2019). No obstante, los resultados positivos para histamina no necesariamente implican que las cepas exhiban este comportamiento en la matriz a fermentar, ya que existen diferentes factores (NaCl, glucosa, temperatura, etc.) que condicionan su producción. A futuro se debería cuantificar la producción de histamina en los productos fermentados para determinar su nivel de toxicidad.

Resistencia a antimicrobianos

La resistencia a antibióticos de las BAL resulta de gran interés, debido a que podrían actuar como reservorios de genes de resistencia (Bernardeau *et al.* 2008) y ser capaces de transferirlos a otros microorganismos comensales o patógenos presentes en el tracto gastrointestinal. Los lactobacilos comúnmente presentan resistencia a bacitracina, cefoxitina, ciprofloxacina, kanamicina, gentamicina, metronidazol, nitrofurantoína, estreptomina, sulfadiazina, teicoplanina, sulfametaxazol y vancomicina; y por el contrario son sensibles a cloranfenicol, eritromicina, clindamicina y tetraciclina (Ammor *et al.* 2007, Bernardeau *et al.* 2008). El género *Leuconostoc*, por su parte, es resistente a glucopéptidos (teicoplanina, vancomicina, etc), cefoxitina y metronidazol, y parcialmente a gentamicina,

kanamicina, estreptomycin, nitrofurantoina, sulfadiazina, trimetoprima y ácido nalidixico (Ammor *et al.* 2007).

Todas las BAL estudiadas resultaron sensibles a gentamicina, kanamicina, estreptomycin, eritromicina y clindamicina, mientras que solo las cuatro cepas de *Leuconostoc* sp. (RCTw1.1, RCTw13, AKTw35 y RBTw100) y *L. plantarum* RCTw106 exhibieron sensibilidad a tetraciclina. Por otra parte, todas las cepas resultaron resistentes a ampicilina y cloranfenicol (tabla 9). Stefańska *et al.* (2021) evaluaron la resistencia a los mismos antibióticos en múltiples cepas de BAL de diversas especies incluida *L. plantarum*, observando resistencia a tetraciclina y ampicilina, resultados coincidentes con los obtenidos en este estudio. Por otra parte, en la revisión de Colautti *et al.* (2022) se analizó la resistencia a antibióticos en cepas de *L. plantarum* de diversos orígenes encontrando uno o más genes relacionados con la resistencia tetraciclina. A futuro, se deberá evaluar el tipo de resistencia a ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol mediante pruebas genéticas para determinar si representan un riesgo para la salud del consumidor, ya que de tratarse de una resistencia adquirida implicaría la posible transmisión de la misma a diversos microorganismos, incluidos los patógenos.

Tabla 9: Resistencia a antibióticos en las cepas de BAL seleccionadas.

Cepas	AMP	GTM	KNM	ETP	ERI	CDM	TET	CRF
RCTw1.1	R	S	S	S	S	S	S	R
RCTw13	R	S	S	S	S	S	S	R
AKTw35	R	S	S	S	S	S	S	R
RBTw100	R	S	S	S	S	S	S	R
RBTw102	R	S	S	N.R.	S	S	R	R
RCTw106	R	S	S	N.R.	S	S	S	R
RCTw111	R	S	S	N.R.	S	S	R	R
AKTw112	R	S	S	N.R.	S	S	R	R
AKTw180	R	S	S	N.R.	S	S	R	R
RBTw249	R	S	S	N.R.	S	S	R	R
RBTw256	R	S	S	N.R.	S	S	R	R
PCTw261	R	S	S	N.R.	S	S	R	R
PCTw270	R	S	S	N.R.	S	S	R	R
AKTw332	R	S	S	N.R.	S	S	R	R
AKTw335	R	S	S	N.R.	S	S	R	R

Puntos de corte sugeridos por EFSA (2018) para cada antibiótico; para *Lactiplantibacillus* son kanamicina (KNM) 64 mg/L, clindamicina (CDM) 2 mg/L, tetraciclina (TET) 32 mg/L, cloranfenicol (CRF) 8 mg/L y estreptomycin (ETP) no es requerida (N.R.) para este género; para *Leuconostoc* son KNM 16 mg/L, ETP 64 mg/L, CDM 1 mg/L, TET 8 mg/L y CRF 4 mg/L. Para ampicilina (AMP), gentamicina (GTM) y eritromicina (ERI) se utiliza el mismo punto de corte para ambos géneros y son 2 mg/L, 16 mg/L y 1 mg/L, respectivamente. R = resistente y S = sensible.

Propiedades tecnológicas

Producción de exopolisacáridos

Los EPS son moléculas producidas por BAL y otros microorganismos, que pueden encontrarse unidas covalentemente a la superficie celular o ser secretadas al medio. Se las puede dividir en homopolisacáridos, formados por azúcares como la fructosa

o glucosa, y heteropolisacáridos, conformados por dos o más monosacáridos diferentes (Wang *et al.* 2019). Estos compuestos permiten la adhesión a la pared intestinal, capacidad de auto y co-agregación, y pueden presentar actividad antioxidante, actuar como agentes gelificantes, biosurfactantes, bioestabilizadores y/o bioemulsificantes (Wang *et al.* 2019). Además, se ha comprobado que los EPS producidos por *Lactiplantibacillus* y *Leuconostoc* poseen hidrocoloides, los cuales son capaces de reunir polisacáridos mejorando la estabilidad textural de suspensiones, las propiedades reológicas de los alimentos y el tiempo de conservación (Guérin *et al.* 2020).

Todas las cepas de BAL, salvo *L. pentosus* AKTw332 exhibieron producción de EPS a las 24 y 48 h (tabla 10). Actualmente, existe un mayor interés en la producción de EPS por medio de las BAL involucradas en la fermentación de frutas y vegetales, ya que generan efectos positivos sobre las características sensoriales del alimento y la salud del consumidor. Además, al utilizarse en una matriz rica en fenoles como lo es un fermento de brasicáceas, la presencia de EPS podría presentar un efecto prebiótico, ya que los compuestos fenólicos juntos con los EPS tienen la capacidad de influir en la estructura y funcionamiento de la microbiota (Guérin *et al.* 2020).

Tabla 10: Producción de EPS de las cepas de BAL seleccionadas durante 24 h y 48 h de incubación.

Cepas	Tiempo de incubación	
	24 h	48 h
RCTw1.1	+	+
RCTw13	+	+
AKTw35	+	+
RBTw100	+	+
RBTw102	+	+
RCTw106	+	+
RCTw111	+	+
AKTw112	+	+
AKTw180	+	+
RBTw249	+	+
RBTw256	+	+
PCTw261	+	+
PCTw270	+	+
AKTw332	-	-
AKTw335	+	+

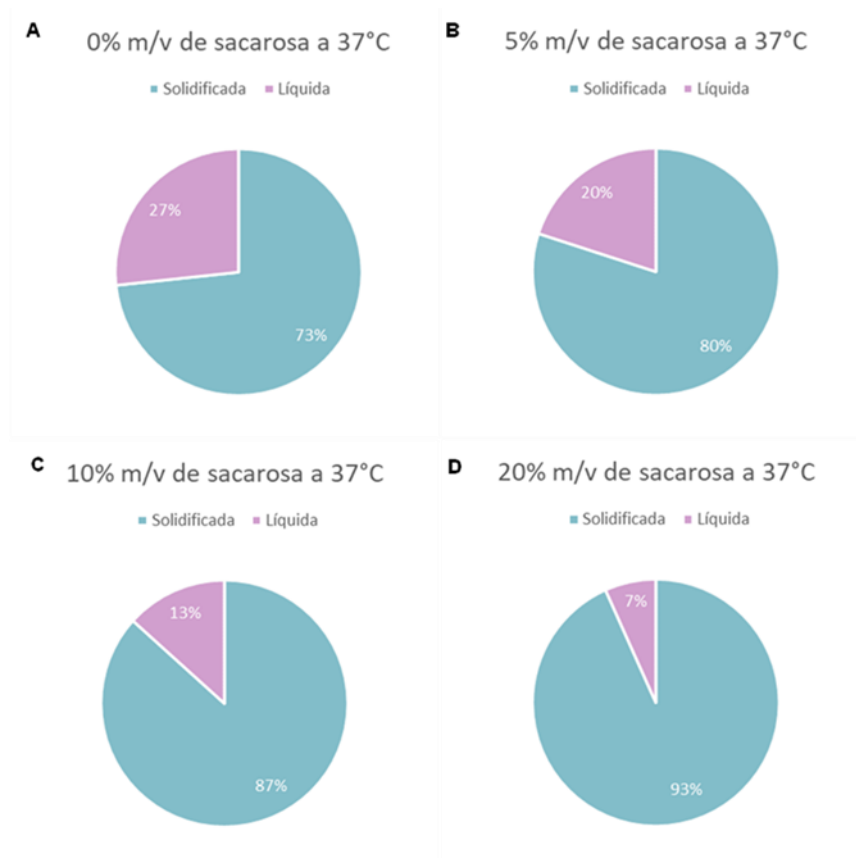
+ presencia de coloración negra en la colonia; – ausencia de coloración en la colonia.

Efecto de la sacarosa en la solidificación de la leche

En el ensayo de solidificación de leche a 37 °C se obtuvo que con 0% de sacarosa solo las cepas de *Lactiplantibacillus* lograron solidificar el medio (figura 3A). Al 5% de sacarosa la cepa *Ln. mesenteroides* ssp. *dextranicum* RBTw100, fue capaz de solidificar la leche, al igual que los *Lactiplantibacillus* (figura 3B). Cuando se suplementó con 10%, la cepa de *Ln. mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* AKTw35 solidificó la leche (figura 3C), mientras que al 20% solo la cepa *Ln. mesenteroides* ssp. *dextranicum* RCTw13 fue incapaz de solidificar la leche (figura 3D).

Estos resultados indicarían que las BAL estudiadas producen EPS capaces de conferirle cambios de textura deseables a los alimentos fermentados y que una mayor concentración de azúcares incrementaría la producción de los mismos. Nuestros resultados coinciden con lo reportado en trabajos previos para cepas probióticas de los géneros *Weisella* y *Leuconostoc* de origen vegetal (Kim *et al.* 2008, Wang *et al.* 2019).

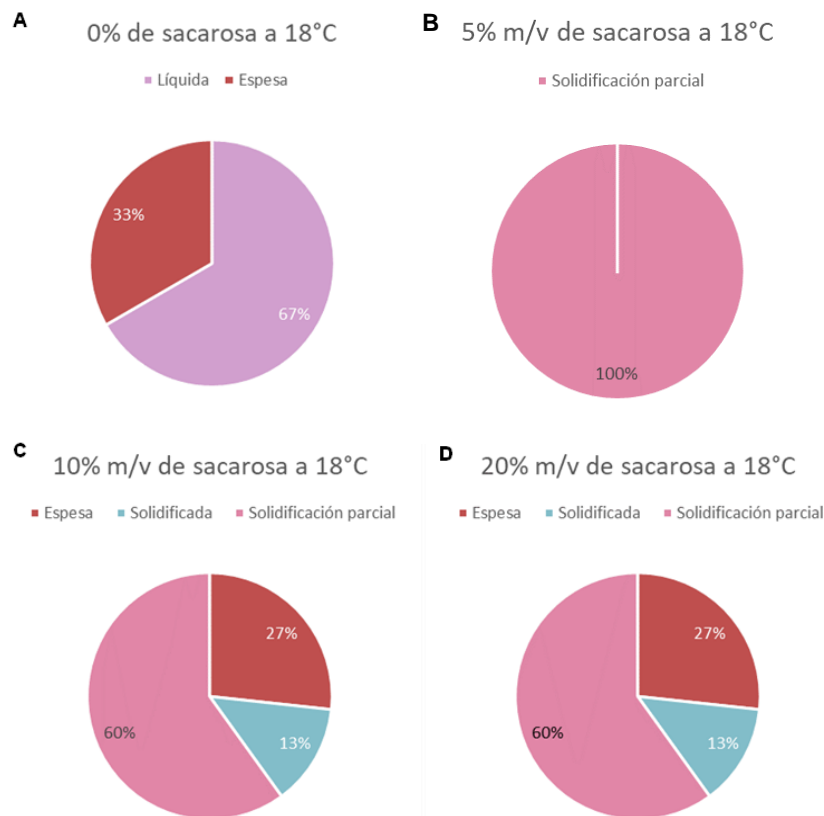
Figura 3: Porcentaje de cepas de BAL seleccionadas capaces de solidificar la leche con 0% m/v (A), 5% m/v (B), 10% m/v (C) 20% m/v (D) de sacarosa luego de 48 h de incubación a 37 °C.



Por otra parte, en el ensayo realizado a 18 °C, no se observó solidificación en la leche suplementada con 0% y 5% de sacarosa. Con 0% cuatro cepas, tres *L. argentoratensis* (RBTw102, AKTw112 y RBTw249) y un *L. plantarum* (AKTw180), consiguieron espesar el medio (figura 4A). Al 5% se observó una solidificación parcial de la leche por parte de todas las cepas de ambos géneros (figura 4B). En el medio suplementado con 10% de sacarosa suplementada las cepas *L. argentoratensis* AKTw112 y *L. plantarum* AKTw180 fueron capaces de solidificar completamente el medio, las demás cepas del género lograron una solidificación parcial (figura 4C). En cambio, con 20% de sacarosa dos cepas de *L. argentoratensis* (RBTw249 y PCTw261) mostraron una solidificación completa (Figura 4D). Las cepas del género *Leuconostoc* solo fueron capaces de solidificar

parcialmente el medio al 5% de sacarosa. No se observó solidificación parcial o completa en ninguna otra concentración por parte de este género.

Figura 4: Porcentaje de cepas de BAL seleccionadas capaces de solidificar la leche con 0% m/v (A), 5 % m/v (B), 10% m/v (C) 20% m/v (D) de sacarosa luego de 5 días de incubación a 18 °C.



Esto indicaría que las cepas de *Leuconostoc* no son capaces de producir EPS a la temperatura en la que se realiza la fermentación de brasicáceas y que los *Lactiplantibacillus* continúan produciéndolos, pero en menor medida. A diferencia de lo informado en trabajos anteriores para la producción de EPS en cepas probióticas, que se ha observado un aumento del mismo a bajas temperaturas. Sin embargo, estos trabajos se han realizado a 20 °C y no a 18 °C (Kim *et al.* 2008, Wang *et al.* 2019). Otro factor que podría modificar la producción de EPS es la acidez del medio, ya que en trabajos realizados con *Weisella* mostraron un óptimo de producción a 20 °C y pH 5 (Kim *et al.* 2008).

Actividad antioxidante

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés) se producen normalmente

como consecuencia de los procesos metabólicos. Juega un importante rol en la reacción inmunológica contra microorganismos y regulan la comunicación entre células (Kim *et al.* 2022). Sin embargo, el exceso de ROS/RNS produce estrés oxidativo, que puede ocasionar oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos, daño al ADN y apoptosis (Lin *et al.* 2018, Kim *et al.* 2022). Está comprobado que la actividad antioxidante de BAL puede reducir el estrés oxidativo mediante diferentes mecanismos (Kim *et al.* 2022).

Capacidad Antioxidante sobre el Cobre (CUPRAC)

Este ensayo se basa en la transferencia simple de electrones, midiendo el poder reductor de los compuestos antioxidantes para convertir iones cúpricos (Cu^{2+}) a cuproso (Cu^+). Es utilizado como variante del ensayo FRAP, presentando reacciones más selectivas, debido al menor poder redox en comparación con el hierro (Shahidi & Zhong 2015). Comúnmente la técnica CUPRAC se utiliza para evaluar matrices alimentarias y extractos, emplearla para el análisis de actividad antioxidante sobre células vivas es una novedad.

Las cepas *L. argentoratensis* RBTW102 y RCTw111 y *L. plantarum* RCTw106 y AKTw180 exhibieron una capacidad antioxidante mayor ($p < 0,01$) comparadas con el resto. Sin embargo, al evaluar los géneros como conjuntos no se observaron diferencias significativas ($p > 0,01$) (tabla 11).

Tabla 11: Actividad antioxidante según CUPRAC de las cepas de BAL seleccionadas.

Cepas	Actividad antioxidante (en equivalentes a milimoles de ácido ascórbico)
RCTw1.1	0,68 ± 0,03 ^{ABCD}
RCTw13	0,66 ± 0,07 ^{ABCD}
AKTw35	0,67 ± 0,12 ^{ABCD}
RBTw100	0,49 ± 0,07 ^{AB}
RBTw102	0,75 ± 0,07 ^{BCD}
RCTw106	0,77 ± 0,14 ^{CD}
RCTw111	0,79 ± 0,09 ^{CD}
AKTw112	0,60 ± 0,08 ^{ABCD}
AKTw180	0,81 ± 0,12 ^D
RBTw249	0,69 ± 0,02 ^{ABCD}
RBTw256	0,46 ± 0,04 ^A
PCTw261	0,56 ± 0,09 ^{ABDC}
PCTw270	0,44 ± 0,05 ^A
AKTw332	0,48 ± 0,04 ^{AB}
AKTw335	0,52 ± 0,06 ^{ABC}

Los resultados son el promedio ± desviación estándar de tres réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas ($p < 0,01$) según test de Tukey.

Reducción de DPPH

El método de reducción de DPPH se basa en la interacción de estos radicales con compuestos de carácter antioxidante donantes de protones, lo que produce un descenso en la absorbancia respecto al control, evidenciando la actividad antioxidante (Bhagwat & Annapure 2019).

De acuerdo al análisis estadístico, las cepas de *L. mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* RCTw1.1, *L. argentoratensis* RCTw111 y dos *L. mesenteroides* ssp. *dextranicum* (RCTw13 y RBTw100) presentaron una capacidad antioxidante menor al resto (tabla 12). En conjunto, el género *Leuconostoc* presentó un porcentaje de actividad menor si lo comparamos con *Lactiplantibacillus* ($p < 0,01$). Los resultados obtenidos en este estudio son similares con los observados en el trabajo de Lin *et al.* (2018) para cepas de *L. plantarum* provenientes de alimentos fermentados. Por otra parte, los resultados obtenidos para *Leuconostoc* resultan novedosos ya que no se ha encontrado bibliografía donde se evalúe esta capacidad.

Tabla 12: Porcentaje de actividad antioxidante según DPPH de las cepas de BAL seleccionadas.

Cepas	Actividad antioxidante (%)
RCTw1.1	16,75 \pm 0,89 ^A
RCTw13	13,82 \pm 2,55 ^A
AKTw35	24,18 \pm 1,98 ^{BC}
RBTw100	14,98 \pm 1,21 ^A
RBTw102	24,66 \pm 1,43 ^C
RCTw106	25,33 \pm 0,77 ^C
RCTw111	13,81 \pm 2,46 ^A
AKTw112	26,41 \pm 1,45 ^C
AKTw180	29,56 \pm 1,20 ^C
RBTw249	24,13 \pm 0,59 ^{BC}
RBTw256	18,54 \pm 2,11 ^{AB}
PCTw261	27,09 \pm 2,48 ^C
PCTw270	26,33 \pm 1,49 ^C
AKTw332	25,26 \pm 0,86 ^C
AKTw335	23,92 \pm 1,21 ^{BC}

Los resultados son el promedio \pm desviación estándar de tres réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas ($p < 0,01$) según test de Tukey.

La utilización de microorganismos probióticos con capacidad antioxidante retarda el deterioro de matrices alimentarias y reemplaza la utilización de compuestos sintéticos, que pueden presentar efectos negativos para la salud de los consumidores (Rezaei *et al.* 2020). Además, en matrices vegetales ricas en compuestos antioxidantes como las brasicáceas, pueden producir un aumento de capacidad antioxidante previniendo el envejecimiento celular, enfermedades inflamatorias crónicas y degenerativas, cáncer, etc. (de Pascual-Teresa & Sanchez-Ballesta 2008).

Los métodos utilizados exhibieron resultados diferentes entre los géneros evaluados, esto podría ser consecuencia de los distintos sistemas de barrido de radicales que

presentan los microorganismos y el mecanismo de detección de las técnicas. Por lo cual se debe tener en consideración analizar la actividad antioxidante mediante dos o más métodos. Además, las diferencias observadas entre métodos y entre cepas de una misma especie indicarían que la actividad antioxidante es dependiente de la cepa, no del género o la especie.

Conclusiones

- ✓ Según los resultados obtenidos en este estudio, las cepas de *Lactiplantibacillus* presentan un mayor potencial tecnológico y/o probiótico si se las compara con las especies de *Leuconostoc*. Sin embargo, el género *Leuconostoc* es esencial al comienzo de las fermentaciones controladas de vegetales y no debería descartarse su uso como starters.
- ✓ Los resultados obtenidos son novedosos y sientan un precedente, ya que los microorganismos pertenecientes al género *Leuconostoc* han sido poco estudiados como potenciales probióticos, por lo cual la bibliografía es escasa.
- ✓ Las cepas de *L. plantarum* AKTw180 y AKTw335 exhibieron una mayor tolerancia a la simulación *in vitro* de las condiciones imperantes durante el tránsito gastrointestinal (pH 2,5 y 1% de bilis). Además, presentaron un carácter moderado a fuerte de hidrofobicidad y una elevada capacidad de auto y co-agregación. Todas estas propiedades resultan de importancia para la supervivencia de los microorganismos y la posibilidad de adherirse al epitelio intestinal compitiendo con potenciales patógenos.
- ✓ Por otra parte, las cepas *L. plantarum* RCTw106, *L. argentoratensis* PCTw270 y *L. pentosus* AKTW332, podrían ser utilizadas como probióticos si se las emplea en microencapsulación u otros mecanismos de protección.
- ✓ La detección de genes de plantaricinas se determinó en nueve de las 10 cepas de *Lactiplantibacillus* que exhibieron actividad contra microorganismos Gram positivos. A futuro se debería optimizar la síntesis de bacteriocinas y evaluar su producción durante la fermentación de matrices vegetales.
- ✓ Las cepas de BAL evaluadas para conformar cultivos iniciadores o starters no presentaron factores de virulencia y/o rasgos negativos. Sin embargo, se deberá evaluar el tipo de resistencia a ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol antes de su uso en la elaboración de alimentos.
- ✓ Las cepas de *L. argentoratensis* RBTw102, RCTw111, RBTw249, PCTw261 y PCTw270, *L. pentosus* AKTw332 y *L. plantarum* AKTw335 exhibieron una elevada actividad de β -gal, comparable con cepas de origen lácteo. En consecuencia, los resultados obtenidos nos permiten considerar su uso para

fermentar o formar parte de la flora acompañante de productos lácteos destinados a personas con intolerancia a la lactosa.

- ✓ Tanto la producción de EPS y actividad antioxidante son propiedades tecnológicas de interés durante la elaboración de alimentos fermentados. Salvo la cepa *L. pentosus* AKTw332, todas produjeron exopolisacáridos en las condiciones evaluadas. La actividad antioxidante resultó variable entre los géneros y especies, sin embargo, podría componer una característica de selección, con el propósito de evaluar el potencial biotecnológico para su utilización en procesos fermentativos.
- ✓ Es importante destacar que, en comparación con las fermentaciones de base láctea, las que usan vegetales como materia prima se encuentran aún sub-exploradas y representan nichos ecológicos muy valiosos para el aislamiento de microorganismos con potencial tecnológico y/o probiótico. El conocimiento del proceso con fundamento científico puede contribuir a mejorar la calidad de los productos ya existentes y a innovar en el desarrollo de alimentos funcionales de base vegetal, diversificando la oferta y abriendo nuevos mercados.

Divulgación de Resultados

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación fueron expuestos a la comunidad científica en el VIII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2022), mediante los trabajos: “Potencial probiótico de cepas lácticas proveniente de fermentaciones espontáneas de brasicáceas” y “Propiedades tecnológicas de cepas de *Lactiplantibacillus* y *Leuconostoc* de origen vegetal”.

Bibliografía

- Abdulhussain Kareem, R., & S. H. Razavi. 2020. Plantaricin bacteriocins: As safe alternative antimicrobial peptides in food preservation—A review. *J Food Saf* 40.
- Ammor, M. S., A. Belén Flórez, & B. Mayo. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol* 24: 559–570.
- Aquilina, G., G. Bories, A. Chesson, P. S. Cocconcelli, J. de Knecht, A. Dierick, A. Gralak, J. Gropp, I. Halle, C. Hogstrand, R. Kroker, L. Leng, S. L. Puente, A.-K. L. Haldorsen, A. Mantovani, G. Martelli, M. Mézes, D. Renshaw, M. Saarela, K. Sejrnsen, & J. Westendorf. 2018. EFSA panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP); Scientific opinion on title of the opinion. *EFSA Journal*.

- Argyri, A. A., G. Zoumpopoulou, K. A. G. Karatzas, E. Tsakalidou, G. J. E. Nychas, E. Z. Panagou, & C. C. Tassou. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiol* 33: 282–291.
- Barbieri, F., C. Montanari, F. Gardini, & G. Tabanelli. 2019. Biogenic amine production by lactic acid bacteria: A review. *Foods* 8.
- Beganović, J., A. L. Pavunc, K. Gjuračić, M. Špoljarec, J. Šušković, & B. Kos. 2011. Improved sauerkraut production with probiotic strain *Lactobacillus plantarum* L4 and *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954. *J Food Sci* 76: 124–129.
- Ben-Omar, N., H. Abriouel, S. Keleke, A. Sánchez Valenzuela, M. Martínez-Cañamero, R. Lucas López, E. Ortega, & A. Gálvez. 2008. Bacteriocin-producing *Lactobacillus* strains isolated from poto poto, a congolese fermented maize product, and genetic fingerprinting of their plantaricin operons. *Int J Food Microbiol* 127: 18–25.
- Bernardeau, M., J. P. Vernoux, S. Henri-Dubernet, & M. Guéguen. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *Int J Food Microbiol* 126: 278–285.
- Bhagwat, A., & U. S. Annapure. 2019. In vitro assessment of metabolic profile of *Enterococcus* strains of human origin. *J Genet Eng Biotechnol* 17.
- Bover-Cid, S., M. L. Latorre-Moratalla, M. T. Vecina-Nogués, & M. C. Vidal-Carou. 2014. Biogenic amines. Pp. 381–391 in Motarjemi, Y., G. Moy, & E. Todd (eds). *Encyclopedia of food safety*. Academic Press.
- Castañola, J., M. Magariños, & S. Ortiz. 2004. Patrón de ingesta de vegetales y frutas en adolescentes del área metropolitana de Buenos Aires. *Arch Argent Pediatr* 102: 265–270.
- Castro, M., I. Arias, F. Barboza, L. Duque Darfel, & D. Villalobos. 2016. Usos clínicos de los probióticos: Malabsorción de lactosa, cólico de lactante, enfermedad inflamatoria intestinal, enterocolitis, *Helicobacter pylori*. *Arch Venez Pueric Pediatr* 79: 22–28.
- Chaalel, A., A. Riazi, R. Dubois-Dauphin, & P. Thonart. 2015. Screening of plantaricin EF and JK in an Algerian *Lactobacillus plantarum* isolate. *Asian Pac J Trop Dis* 5: 474–482.
- Chang, J. -H., Y. Y. Shim, S. -K. Cha, & K. M. Chee. 2010. Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *J Appl Microbiol* 109: 220–230. Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2009.04648.x>.
- Charteris, W. P., P. M. Kelly, L. Morelli, & J. K. Collins. 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *Int J Food Microbiol* 35: 1–27. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160596012226>.

- Colautti, A., M. Arnoldi, G. Comi, & L. Iacumin. 2022. Antibiotic resistance and virulence factors in lactobacilli: something to carefully consider. *Food Microbiol* 103.
- Cook, M. T., G. Tzortzis, D. Charalampopoulos, & V. v. Khutoryanskiy. 2012. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J Controlled Release* 162: 56–67.
- Doyon, M., & J. A. Labrecque. 2008. Functional foods: A conceptual definition. *Br Food J* 110: 1133–1149.
- FAO/WHO Working Group. 2002. Report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Pp. 1–11 in *In Vitro*. Geneva, Switzerland.
- Feng, T., & J. Wang. 2020. Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: A systematic review. *Gut Microbes* 12.
- Fontana, L., M. Bermudez-Brito, J. Plaza-Diaz, S. Muñoz-Quezada, & A. Gil. 2013. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition* 109: S35–S50. Available at https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114512004011/type/journal_article.
- Freeman, D. J., F. R. Falkiner, & C. T. Keane. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 42: 872–874.
- Geria, M., & A. Caridi. 2014. Methods to assess lactic acid bacteria diversity and compatibility in food. *Acta Aliment* 43: 96–104.
- Gobinath, D., & S. G. Prapulla. 2014. Permeabilized probiotic *Lactobacillus plantarum* as a source of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides. *Biotechnol Lett* 36: 153–157.
- Gomes, T. A., L. B. Santos, A. Nogueira, & M. R. Spier. 2018. Increase in an intracellular β -galactosidase biosynthesis using *L. reuteri* NRRL B-14171, inducers and alternative low-cost nitrogen sources under submerged cultivation. *Int J Food Eng* 14.
- Guan, C., X. Chen, X. Jiang, R. Zhao, Y. Yuan, D. Chen, C. Zhang, M. Lu, Z. Lu, & R. Gu. 2020. *In vitro* studies of adhesion properties of six lactic acid bacteria isolated from the longevous population of China. *RSC Adv* 10: 24234–24240.
- Guérin, M., C. Robert-Da Silva, C. Garcia, & F. Remize. 2020. Lactic acid bacterial production of exopolysaccharides from fruit and vegetables and associated benefits. *Fermentation* 6.
- Hemme, D., & C. Foucaud-Scheunemann. 2004. Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int Dairy J* 14: 467–494.

- Igbinosa, E. O., & A. Beshiru. 2019. Antimicrobial resistance, virulence determinants, and biofilm formation of *Enterococcus* species from ready-to-eat seafood. *Front Microbiol* 10.
- James, A., & Y. Wang. 2019. Characterization, health benefits and applications of fruits and vegetable probiotics. *CYTA - J Food* 17: 770–780.
- Junnarkar, M., S. Pawar, S. Gaikwad, A. Mandal, J. Jass, & N. Nawani. 2019. Probiotic potential of lactic acid bacteria from fresh vegetables: Application in food preservation. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.
- Kanemitsu, K., T. Nishino, H. Kunishima, N. Okamura, H. Takemura, H. Yamamoto, & M. Kaku. 2001. Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. Available at www.elsevier.com/locate/jmicmeth.
- Kim, M. J., H. N. Seo, T. S. Hwang, S. H. Lee, & D. H. Park. 2008. Characterization of exopolysaccharide (EPS) produced by *Weissella hellenica* SKkimchi3 isolated from kimchi. *J Microbiol* 46: 535–541.
- Kim, S., J. Y. Lee, Y. Jeong, & C. H. Kang. 2022. Antioxidant activity and probiotic properties of lactic acid bacteria. *Fermentation* 8.
- König, H., & J. Fröhlich. 2017. Lactic acid bacteria. Pp. 3–41 in *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer International Publishing.
- Kos, B., J. Šušković, S. Vuković, M. Šimpraga, J. Frece, & S. Matošić. 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* 94: 981–987.
- Krausova, G., I. Hyrslova, & I. Hynstova. 2019. In vitro evaluation of adhesion capacity, hydrophobicity, and auto-aggregation of newly isolated potential probiotic strains. *Fermentation* 5.
- Kuda, T., M. Kawahara, M. Nemoto, H. Takahashi, & B. Kimura. 2014. *In vitro* antioxidant and anti-inflammation properties of lactic acid bacteria isolated from fish intestines and fermented fish from the Sanriku Satoumi region in Japan. *Food Res Int* 64: 248–255.
- Ladero, V., M. A. Álvarez, & M. Fernandez. 2020. Aminas biógenas en productos lácteos. *Bol. Ciencias y Tecnología R.I.D.E.A.* 55.
- Lauková, A., M. Tomáška, M. J. Fraqueza, R. Szabóová, E. Bino, J. Ščerbová, M. P. Simonová, & E. Dvorožňáková. 2022. Bacteriocin-producing strain *Lactiplantibacillus plantarum* LP17L/1 isolated from traditional stored ewe's milk cheese and its beneficial potential. *Foods* 11.

- Li, M., Y. Wang, H. Cui, Y. Li, Y. Sun, & H. J. Qiu. 2020. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the gastrointestinal tract of a wild boar as potential probiotics. *Front Vet Sci* 7.
- Li, Q., X. Liu, M. Dong, J. Zhou, & Y. Wang. 2015. Aggregation and adhesion abilities of 18 lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented food. *Int J Agric Policy Res* 3: 84–92.
- Lilly, D. M., & R. H. Stillwell. 1965. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* (1979) 147: 747–748.
- Lin, X., Y. Xia, G. Wang, Y. Yang, Z. Xiong, F. Lv, W. Zhou, & L. Ai. 2018. Lactic acid bacteria with antioxidant activities alleviating oxidized oil induced hepatic injury in mice. *Front Microbiol* 9.
- Liu, D. D., & C. T. Gu. 2020. Proposal to reclassify *Lactobacillus zhaodongensis*, *Lactobacillus zae*, *Lactobacillus argentoratensis* and *Lactobacillus buchneri* subsp. *silagei* as *Lacticaseibacillus zhaodongensis* comb. nov., *Lacticaseibacillus zae* comb. nov., *Lactiplantibacillus argentoratensis* comb. nov. and *Lentilactobacillus buchneri* subsp. *silagei* comb. nov., respectively and *Apilactobacillus koso* as a later heterotypic synonym of *Apilactobacillus micheneri*. *Int J Syst Evol Microbiol* 70: 6414–6417.
- Marín, M. L., Y. Benito, C. Pin, M. F. Fernández, M. L. García, & C. Casas. 1997. Lactic acid bacteria: Hydrophobicity and strength of attachment to meat surfaces. *Lett Appl Microbiol* 24: 14–18.
- Marteau, P. R., M. de Vrese, C. J. Cellier, & J. Schrezenmeir. 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* 73: 430s–436s. Available at <https://academic.oup.com/ajcn/article/73/2/430s/4737574>.
- Mattos-Guaraldi, A. L., L. Carlos, D. Formiga, A. Feitosa, & B. Andrade. 1999. Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods. *Curr Microbiol* 38: 37–42.
- Mokoena, M. P. 2017. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules* 22.
- Muñoz, R., B. de las Rivas, F. López de Felipe, I. Reverón, L. Santamaría, M. Esteban-Torres, J. A. Curiel, H. Rodríguez, & J. M. Landete. 2017. Biotransformation of phenolics by *Lactobacillus plantarum* in fermented foods. Pp. 63–83 in *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc.
- Ocaña, V. S., & M. E. Nader-Macías. 2016. Vaginal lactobacilli: self- and co-aggregating ability. *Br J Biomed Sci* 59: 183–190. Available at <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09674845.2002.11783657>.

- Papadimitriou, K., G. Zoumpopoulou, B. Foligné, V. Alexandraki, M. Kazou, B. Pot, & E. Tsakalidou. 2015. Discovering probiotic microorganisms: *In vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. *Front Microbiol* 6.
- Paramithiotis, S., G. Papoutsis, & E. H. Drosinos. 2017. Lactic acid fermentation of fruits and vegetables: An overview. Pp. 1–17 *in* Paramithiotis, S. (ed). *Lactic Acid Fermentation of Fruits and Vegetables*. CRC Press, Boca Raton.
- Parker, R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health* 29: 4–8.
- de Pascual-Teresa, S., & M. T. Sanchez-Ballesta. 2008. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry Reviews* 7: 281–299. Available at <http://link.springer.com/10.1007/s11101-007-9074-0>.
- Peres, C. M., C. Peres, A. Hernández-Mendoza, & F. X. Malcata. 2012. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria - With an emphasis on table olives. *Trends Food Sci Technol* 26: 31–42.
- Pérez, P. F., Y. Minnaard, E. A. Disalvo, & G. L. de Antoni. 1998. Surface properties of Bifidobacterial strains of human origin. *Appl Environ Microbiol* 64: 21–26. Available at <https://aem.asm.org/content/64/1/21>.
- Pintos, D., B. Marzani, & F. Minervini. 2011. La plantaricina A sintetizada *por Lactobacillus plantarum* induce la proliferación y migración in vitro de queratinocitos humanos y aumenta la expresión de los genes TGF-beta1, VEGF-A e IL-8. *Peptides (N.Y.)* 32: 1815–1824.
- Portilla-Vázquez, S., A. Rodríguez, M. Ramírez-Lepe, P. G. Mendoza-García, & B. Martínez. 2016. Biodiversity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from Mexican regional cheeses and their contribution to milk fermentation. *Food Biotechnol* 30: 155–172.
- Quinto, E. J., P. Jiménez, I. Caro, J. Tejero, J. Mateo, & T. Girbés. 2014. Probiotic lactic acid bacteria: A review. *Food Nutr Sci* 05: 1765–1775.
- Rezaei, M., N. Noori, N. Shariatifar, H. Gandomi, A. Akhondzadeh Basti, & A. Mousavi Khaneghah. 2020. Isolation of lactic acid probiotic strains from Iranian camel milk: Technological and antioxidant properties. *LWT* 132.
- Rodríguez, H., J. M. Landete, B. de las Rivas, & R. Muñoz. 2008. Metabolism of food phenolic acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. *Food Chem* 107: 1393–1398.
- Ross, R. P., S. Morgan, & C. Hill. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int J Food Microbiol*: 3–16. Available at www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro.

- Sáez, G. D., L. Flomenbaum, & G. Zárate. 2018. Lactic acid bacteria from argentinean fermented foods: Isolation and characterization for their potential use as starters for fermentation of vegetables. *Food Technol Biotechnol* 56: 398–410.
- Saito, M. 2007. Role of FOSHU (Food for Specied Health Uses) for Healthier Life.
- Salminen, S., M. C. Collado, A. Endo, C. Hill, S. Lebeer, E. M. M. Quigley, M. E. Sanders, R. Shamir, J. R. Swann, H. Szajewska, & G. Vinderola. 2021. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18: 649–667.
- Salminen, S., A. von Wright, L. Morelli, P. Marteau, D. Brassart, W. M. de Vos, R. Fonden, M. Saxelin, K. Collins, G. Mogensen, S.-E. Birkeland, & T. Mattila-Sandholm. 1998. Demonstration of safety of probiotics-a review. *Int J Food Microbiol* 44: 93–106.
- Schneier, P. 2020. La fermentación: una mirada antropológica. Pp. 21–41 in Ferrari, A., G. Vinderola, & R. Weill (eds). *Alimentos Fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura*. Instituto Danone del Cono Sur, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Semedo, T., M. A. Santos, P. Martins, M. F. Silva Lopes, J. J. Figueiredo Marques, R. Tenreiro, & M. T. Barreto Crespo. 2003. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *J Clin Microbiol* 41: 2569–2576.
- Seong, G.-U., I.-W. Hwang, & S.-K. Chung. 2016. Antioxidant capacities and polyphenolics of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) leaves. *Food Chem* 199: 612–618. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615303447>.
- Shahidi, F., & Y. Zhong. 2015. Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods* 18: 757–781.
- Shin, S.-Y., & N. S. Han. 2015. *Leuconostoc* spp. as starters and their beneficial roles in fermented foods. Pp. 111–132.
- da Silva Sabo, S., M. Vitolo, J. M. D. González, & R. P. de S. Oliveira. 2014. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Res Int* 64: 527–536.
- Slover, C. M., & L. Danziger. 2008. *Lactobacillus*: A review. *Clin Microbiol Newsl* 30: 23–27. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S019643990800007X>.
- Socol, C. R., L. Porto De Souza Vandenberghe, M. R. Spier, A. Bianchi, P. Medeiros, C. T. Yamaguishi, J. De, D. Lindner, A. Pandey, & V. Thomaz-Socol. 2010. The potential of probiotics: A review. *Food Technol Biotechnol* 48: 413–434.

- Stefańska, I., E. Kwiecień, K. Józwiak-Piasecka, M. Garbowska, M. Binek, & M. Rzewuska. 2021. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria strains of potential use as feed additives - The basic safety and usefulness criterion. *Front Vet Sci* 8.
- Suskovic, J., B. Kos, J. Beganovi, A. Lebo Pavunc, K. Habjani, & S. Matoi. 2010. Antimicrobial activity-The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technol Biotechnol* 48: 296–307.
- Szutowska, J., & D. Gwiazdowska. 2020. Probiotic potential of lactic acid bacteria obtained from fermented curly kale juice. *Arch Microbiol*.
- Todorov, S. D. 2009. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* - Production, genetic organization and mode of action. *Braz J Microbiol* 40: 209–221.
- Tokatlı, M., G. Gülgör, S. Bağder Elmacı, N. Arslankoz İşleyen, & F. Özçelik. 2015. *In vitro* properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. *Biomed Res Int* 2015: 1–8. Available at <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/315819/>.
- Touret, T., M. Oliveira, & T. Semedo-Lemsaddek. 2018. Putative probiotic lactic acid bacteria isolated from sauerkraut fermentations. *PLoS One* 13: 1–16.
- Tuo, Y., H. Yu, L. Ai, Z. Wu, B. Guo, & W. Chen. 2013. Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *J Dairy Sci* 96: 4252–4257.
- Vallejo, M., P. Ledesma, & E. R. Marguet. 2013. Caracterización parcial de enterocinas producidas por una cepa de *Enterococcus faecium* aislada de leche ovina. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 33: 28–34.
- Vinderola, G., & R. Weill. 2020. Leches fermentadas, yogures y probióticos. Pp. 117–133 *in* Ferrari, A., G. Vinderola, & R. Weill (eds). *Alimentos Fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura*. Instituto Danone del Cono Sur, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Voloshyna, I. M., K. I. Soloshenko, V. O. Krasinko, I. v. Lych, & L. v. Shkotova. 2021. Bacteriocins lactobacillus — An alternative to antimicrobial drugs. *Biopolym Cell* 37: 85–97.
- Wang, B., Q. Song, F. Zhao, H. Xiao, Z. Zhou, & Y. Han. 2019. Purification and characterization of dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* PC as a potential exopolysaccharide suitable for food applications. *Process Biochem* 87: 187–195.
- Wichienchot, S., J. Hemmaratchirakul, P. Jaturapiree, & S. Pruksasri. 2016. Evaluating prebiotic property of galactooligosaccharide produced by *Lactobacillus pentosus* var. *platarum* BFP32 in fecal culture. *Int. Food Res J* 23: 2241–2248.

- Wiczowski, W., D. Szawara-Nowak, & J. Romaszko. 2016. The impact of red cabbage fermentation on bioavailability of anthocyanins and antioxidant capacity of human plasma. *Food Chem* 190: 730–740.
- Yang, S. J., K. T. Kim, T. Y. Kim, & H. D. Paik. 2020. Probiotic properties and antioxidant activities of *Pediococcus pentosaceus* SC28 and *Levilactobacillus brevis* KU15151 in fermented black gamju. *Foods* 9.
- Zabat, M. A., W. H. Sano, J. I. Wurster, D. J. Cabral, & P. Belenky. 2018. Microbial community analysis of sauerkraut fermentation reveals a stable and rapidly established community. *Foods* 7.
- Zheng, J., S. Wittouck, E. Salvetti, C. M. A. P. Franz, H. M. B. Harris, P. Mattarelli, P. W. O'toole, B. Pot, P. Vandamme, J. Walter, K. Watanabe, S. Wuyts, G. E. Felis, M. G. Gänzle, & S. Lebeer. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 70: 2782–2858.