



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN JUAN
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Tesis Doctoral:

**Levaduras multifuncionales de origen enológico:
evaluación de su potencial probiótico y características
tecnológicas para ser empleadas como *starters* en
procesos fermentativos**

Autora:

Vergara Alvarez, Silvia Cristina

Directora:

Dra. Maturano, Yolanda Paola
Universidad Nacional de San Juan
CONICET

Co-Directora:

Dra. Nally, Maria Cristina
Universidad Nacional de San Juan
CONICET

San Juan - 2024

Este trabajo es presentado a la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de San Juan, para optar por el título de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lic. Silvia Cristina Vergara Alvarez

Tema: **“Levaduras multifuncionales de origen enológico: evaluación de su potencial probiótico y características tecnológicas para ser empleadas como *starters* en procesos fermentativos.”**

El presente trabajo de tesis doctoral fue llevado a cabo en cooperación y colaboración de las siguientes Instituciones:



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN JUAN

fcefn

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales



FACULTAD DE INGENIERÍA



Universidad Nacional de San Juan, Facultad de ciencias Exactas Físicas y Naturales, Facultad de Ingeniería e Instituto de Biotecnología.

Tribunal Examinador

NOTA:.....

.....
Dra. Lima Beatriz
UNSJ- CONICET

.....
Dra. Mendoza Lucia
CERELA-CONICET

.....
Dra. Bengoa Agustina
UNLP-CIDCA

Lunes, 29 de julio de 2024

A Silvia y José

"A partir de los átomos, desintegrados y vueltos a formar en el curso de varios miles de millones de años, se formaron todas las estrellas y planetas de nuestro Universo, incluyendo nuestra estrella y nuestro planeta. Y es a partir de los átomos presentes en este planeta que se plasmaron y evolucionaron los sistemas vivos. Cada átomo de nuestro propio cuerpo tiene su origen en esta enorme explosión. Usted y yo somos carne y hueso, pero también somos polvo de estrellas."
Helena Curtis.

Agradecimientos

Recordando que la investigación es una tarea en equipo, este trabajo debe mucho la colaboración a instituciones como CONICET, Universidad Nacional de San Juan, Facultad de Ingeniería, Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales y CIDCA, La Plata.

Por asistencia académica, suministro de ideas, análisis, lectura crítica y retroalimentación, etc. al grupo de trabajo al cual pertenezco -Microbiología enológica-; específicamente a Paola Maturano por guiarme en este camino de investigación, a Victoria Mestre, Fabio Vazquez y Cristina Nally, por sus aportes y ayuda en el proceso. Por apoyo moral, a mis compañeras de oficina, José, Pauli, Dani, Belu y Celi, a las cuales les agradezco las charlas, las risas, las lágrimas, ánimo, amistad y paciencia.

Por iniciarme en la formación científica a Edu y Lore y a su grupo ECRA, guardo experiencias lindas, gracias.

A las chichis de la facu, Leti, Anabel y Mari; mujeres fuertes e increíbles muy importantes en una etapa, las quiero y sigo aprendiendo de ustedes.

Por las oportunidades que me brindaron, por dejarme decidir, por darme el espacio que necesitaba cuando fue necesario, por dejarme ser quien soy y apoyarme, les estoy profundamente agradecida a mi Mamá y Papá, ellos no son perfectos, pero son lo que necesitaba. También les agradezco infinitamente a mis hermanos, Cintia y Leo que cerca o lejos siempre están y también van conmigo en el camino que tome. A mis abuelas Matilde y Rosa, que parte de ellas está en mí, siempre las tender presentes, besos al cielo. A mi tiguella Mirta, no hay recuerdo donde no esté presente. También quería agradecer a Estela y Lucy, poco o mucho tiempo me apoyaron y generaron buenos recuerdos.

Y por último a mi compañero de vida, quien camina conmigo hace muchos años, Mati, quien me insistió para que me presentara a la beca, quien confió más en mí que yo misma, el que se ha quedado despierto hasta la madrugada hasta que cerrara la compu. El que me hizo de comer y trajo helado. Esto es por los dos, y lo hicimos. Gracias.

INDICE

Agradecimientos	7
Abreviaturas.....	12
RESUMEN	13
ABSTRACT	14
Resumen grafico general	15
CAPÍTULO 1	16
Microbioma y Microbiota humana	17
Microbiota del tracto gastrointestinal	18
Hongos Levaduriformes del tracto Gastrointestinal.....	20
El Mundo de los microorganismos beneficiosos: los probióticos.....	22
Situación en Argentina.....	25
Levaduras probióticas	26
Alimentos fermentados y levaduras multifuncionales	30
Levaduras multifuncionales	32
Aptitudes fermentativas de levaduras de origen enológico.....	35
OBJETIVOS.....	38
OBJETIVO GENERAL.....	38
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
CAPÍTULO 2	39
INTRODUCCIÓN.....	40
MATERIALES Y MÉTODOS	44
Microorganismos	44
Evaluación de la bioseguridad	46
RESULTADOS	49
Actividad hemolítica, ureasa y susceptibilidad a antibióticos.	49
Evaluación de patogenicidad mediante el modelo <i>in vivo</i> de larvas de <i>Galleria mellonella</i>	52
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIÓN.....	55
CAPÍTULO 3	56

INTRODUCCIÓN.....	57
El ambiente gástrico.....	60
El ambiente intestinal	62
Probióticos en alimentos	63
MATERIALES Y MÉTODOS	64
Microorganismos	64
Resistencia al tracto gastrointestinal (TGI)	64
Paso por el tracto gastrointestinal simulado	66
Análisis de datos	67
RESULTADOS	67
Tolerancia a condiciones gastrointestinales simuladas	73
DISCUSIÓN	74
CONCLUSIONES	80
CAPÍTULO 4	81
INTRODUCCIÓN.....	82
MATERIALES Y MÉTODOS	86
Microorganismos	86
Evaluación de propiedades relacionadas con la adhesión	86
Análisis de datos	88
RESULTADOS	88
Propiedades relacionadas con la adhesión.....	88
DISCUSIÓN	91
CONCLUSIONES	94
CAPITULO 5	95
INTRODUCCIÓN.....	96
MATERIALES Y MÉTODOS	103
Microorganismos	103
Actividades enzimáticas.....	103
Asimilación de colesterol	105
Actividad antimicrobiana	106
Actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células.....	106
Adhesión de levaduras a células Caco-2 /TC-7	107
Efecto de las levaduras en la asociación e invasión de <i>Salmonella enteritidis</i> CIDCA 101 a células Caco-2/TC-7.....	107

Immunomodulación en células Caco-2-CCL20: luc	109
Análisis de datos	110
RESULTADOS	110
Actividad de β -glucosidasa.....	110
- Actividad lipasa, proteasa y catalasa	111
Asimilación de colesterol	112
Actividad antimicrobiana	113
Actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células.....	114
Adhesión de levaduras a células Caco-2 /TC-7	115
Efecto de las levaduras en la asociación e invasión de <i>Salmonella</i> Enteritidis CIDCA 101 a células Caco-2/TC-7.....	116
Immunomodulación de la respuesta innata epitelial mediada por las levaduras	117
DISCUSIÓN	118
CONCLUSIONES	125
CAPÍTULO 6	126
INTRODUCCIÓN.....	127
MATERIALES Y MÉTODOS	132
Microorganismos	132
Actividad de descarboxilación	133
Selección de cultivos <i>starter</i> para proceso fermentativo de cerveza tipo <i>Ale</i> sin filtrar: .	134
Determinación de compuestos <i>Off-flavors</i>	135
Proceso fermentativo de cerveza tipo <i>Ale</i> a escala de laboratorio	135
Simulación del tracto gastrointestinal posterior a la fermentación de mosto cervecero.	136
Evaluación sensorial.....	137
Selección de cultivos <i>starter</i> para proceso fermentativo de aceitunas de mesa:	137
Conducción de procesos fermentativos	138
Evaluación sensorial.....	138
Análisis de datos	139
RESULTADOS	139
Actividad de descarboxilación	139
Metabolización de carbohidratos:	139
Metabolización de azúcares por vía fermentativa:.....	140
Metabolización de azúcares por vía fermentativa en mosto cervecero:	141
Determinación de compuestos <i>Off-flavors</i>	142

Fermentación de cerveza tipo <i>Ale</i> con la levadura con aptitudes probióticas seleccionada	143
Simulación del tracto gastrointestinal	145
Evaluación sensorial	145
Selección de cultivos <i>starter</i> para proceso fermentativo de aceitunas de mesa:	147
Fermentación de aceitunas de mesa con levaduras autóctonas con aptitudes probióticas	148
Evaluación sensorial	148
DISCUSIÓN	154
CONCLUSIONES	162
CONCLUSIONES GENERALES	163
PROYECCIONES	164
Profundización en Estudios de Propiedades Benéficas:	164
Coinoculación con Cepas Comerciales y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con aptitudes probióticas PB101:	164
Incorporación de Levaduras Probióticas Encapsuladas en Matrices Alimentarias:	164
Bioprospección con Aplicaciones Postbióticas, Prebióticas y Simbióticas:	165
BIBLIOGRAFIA	166
ANEXO	190
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	197

Abreviaturas

Tracto gastro intestinal	TGI
Bacterias ácido lácticas	BAL
Unidades taxonómicas operativas	OTU
Organización para la Agricultura y la Alimentación	FAO
Organización Mundial de la Salud	OMS
Código alimentario Argentino	CAA
Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica	ANMAT
Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria	EFSA
Presunción calificada de seguridad	QPS
Levadura candidata a probiótico	PB
American type culture collection	ATCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ps
Logaritmo natural	ln
Índice de resistencia a la bilis	IR _{bilis}
Digestión en condiciones gástricas	DG
Digestión en condiciones pancreáticas	DP
Porcentaje de hidrofobicidad	H%
Porcentaje de autoagregación	Au%
Absorbancia	Abs
Sistema de secreción tipo III	T3SS
<i>p</i> -nitrophenil- β -D-glucosido	pNPG
Reducción de colesterol	COL %
<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis	S. Enteritidis
Densidad óptica	DO
Efecto levadura	EL
Porcentaje de adhesión de levaduras	ADH%
Porcentaje de asociación de S. Enteritidis	ASC%
Porcentaje de S. Enteritidis internalizado	INV%
Co-incubación de <i>Salmonella</i> con la levadura	CC
Sobrenadante libre de células	SLC
Luminiscencia media normalizada	NAL
Lactato deshidrogenasa	LDH
Uniones estechas	TJ
Alimentos para Usos Sanitarios Específicos	FOSHU
Aminas biogénicas	AB
Comisión Nacional de Alimentos	CONAL
Coordinadora de las Industrias de Productos Alimenticios	COPAL
Atenuación aparente	AA
Densidad	D
Poder fermentativo	PF
Índice de crecimiento	IC
Fermentación espontánea	FE
<i>Wickerhamomyces</i>	W
Polifenol positivo	POF+
Polifenol negativo	POF-
Descarboxilasa del ácido fenilacético	PAD1
Sustancias poliméricas extracelulares	SPE
Enfermedad inflamatoria intestinal	EII

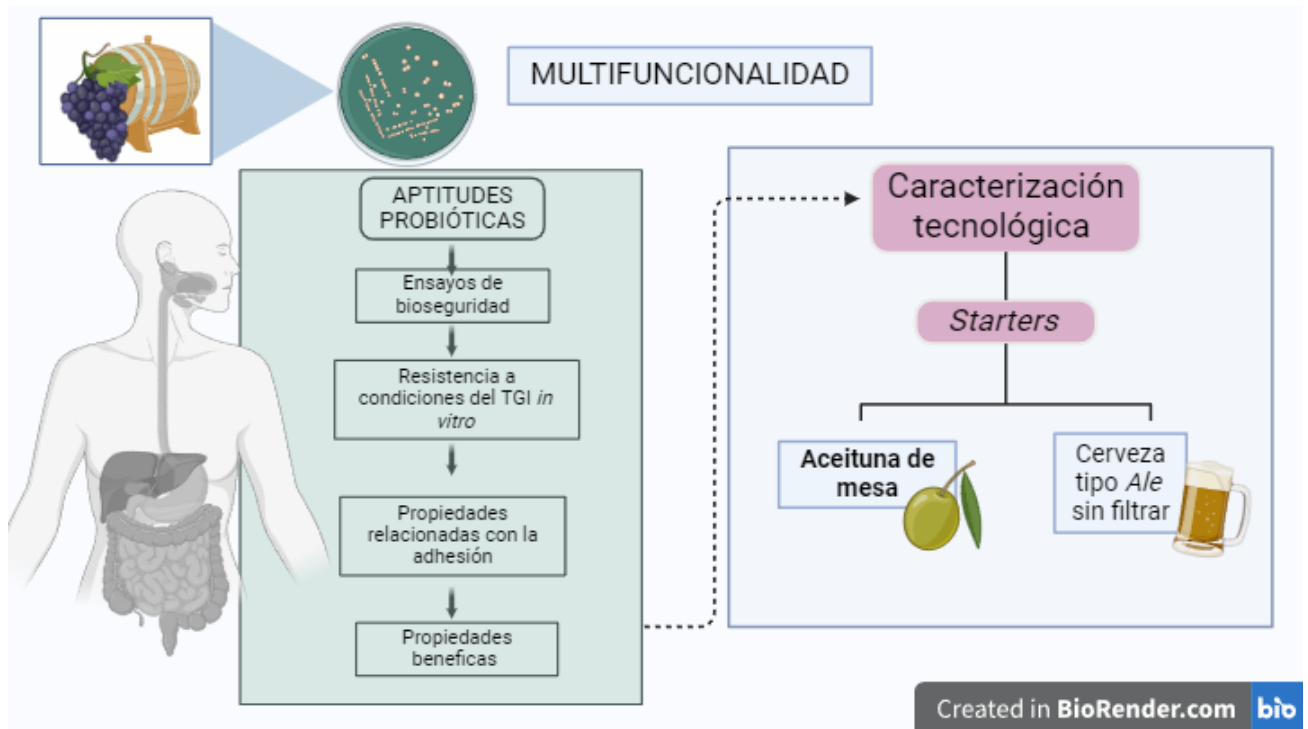
RESUMEN

Una tendencia actual en la microbiología de los alimentos es el empleo de microorganismos multifuncionales. Un cultivo iniciador o *starter* también puede ser capaz de desempeñar otra/s funciones tales como probiótico, reducir la presencia de compuestos tóxicos, producir vitaminas, entre otras. Las levaduras asociadas al proceso de vinificación, están plenamente adaptadas a las condiciones hostiles presentes durante el proceso tales como bajo pH, osmotolerancia, baja disponibilidad de oxígeno y concentraciones crecientes de etanol. Además, diversas especies presentan propiedades de hidrofobicidad, producción de exopolisacáridos y/o formación de biofilm, características especiales que les permiten una adhesión más óptima a la superficie de la uva, así como crear una barrera protectora contra otros microorganismos y/o factores físico-químicos adversos. Por lo tanto, la resistencia o tolerancia a las condiciones de vinificación (con algunas semejanzas a las del sistema gastrointestinal) sumado a sus similitudes estructurales y funcionales convierte a las levaduras enológicas en potenciales candidatas probióticas para ejercer efectos beneficiosos sobre la salud humana. Por otro lado, diversas especies que participan de la fermentación alcohólica del vino también pueden conducir otros procesos fermentativos en los cuales pueden permanecer viables y activas una vez finalizada la fermentación, tales como la aceituna de mesa y la cerveza artesanal tipo *Ale* sin filtrar. Es importante destacar que varias de las propiedades tecnológicas deseables para obtener estos productos tienen relación con las aptitudes que se buscan en los microorganismos probióticos. Por lo tanto, el empleo de cultivos *starter* autóctonas con propiedades probióticas permitiría lograr un producto regional con características distintivas y además brindaría un valor agregado al producto por sus beneficios a la salud del consumidor, lo que significa una mejora competitiva sustancial para el sector alimentario. La Hipótesis del presente estudio fue: “las levaduras autóctonas aisladas de ambientes vitivinícolas se consideran multifuncionales dado que poseen aptitudes para ser empleadas como probióticos para humanos en co-inóculo de aceitunas de mesa y *starters* en cerveza tipo *Ale*”. El Objetivo principal fue: estudiar las propiedades probióticas y aptitudes fermentativas de levaduras de origen enológico con el fin de ser emplearlas como cultivos multifuncionales en alimentos fermentados.

ABSTRACT

A current trend in food microbiology is the use of multifunctional microorganisms. A starter culture may also be capable of performing other functions such as probiotic, reducing the presence of toxic compounds, producing vitamins, among others. Yeasts associated with the winemaking process are fully adapted to the hostile conditions present during the process such as low pH, osmotolerance, low oxygen availability and increasing ethanol concentrations. In addition, several species exhibit properties of hydrophobicity, exopolysaccharide production and/or biofilm formation, special characteristics that allow them to adhere more optimally to the grape surface, as well as to create a protective barrier against other microorganisms and/or adverse physicochemical factors. Therefore, resistance or tolerance to winemaking conditions (with some similarities to those of the gastrointestinal system) added to their structural and functional similarities make enological yeasts potential probiotic candidates to exert beneficial effects on human health. On the other hand, several species that participate in the alcoholic fermentation of wine can also conduct other fermentative processes in which they can remain viable and active once fermentation is complete, such as table olives and unfiltered craft ale beer. It is important to highlight that several of the desirable technological properties to obtain these products are related to the aptitudes sought in probiotic microorganisms. Therefore, the use of native starter cultures with probiotic properties would allow achieving a regional product with distinctive characteristics and would also provide an added value to the product for its benefits to the consumer's health, which means a substantial competitive improvement for the food sector. The Hypothesis of the present study was: "native yeasts isolated from viticultural environments are considered multifunctional since they possess aptitudes to be used as probiotics for humans in co-inoculation of table olives and starters in Ale type beer". The main objective was: to study the probiotic properties and fermentative aptitudes of yeasts of oenological origin in order to be used as multifunctional cultures in fermented foods.

Resumen grafico general



CAPÍTULO 1

Microbioma y Microbiota humana

El término “flora intestinal” evolucionó en las últimas décadas hasta bifurcarse en conceptos más precisos como “microbioma” y “microbiota” (Prieto, 2023).

Etimológicamente la palabra microbioma significan micro: pequeño, y biome: vida. El término microbioma fue introducido en el 2001 por el biólogo molecular Joshua Ledenberg, quien declaró que los microorganismos simbióticos y los humanos forman una unidad metabólica (Sebastián et al., 2021). En la actualidad, el término “microbioma” incluye los microorganismos, sus genomas, las condiciones ambientales presentes en un hábitat y metabolitos (Requena y Velasco, 2019, Morales et al., 2022). El cuerpo humano es considerado un ecosistema complejo, donde la pérdida del equilibrio en sus distintos nichos biológicos genera enfermedades y susceptibilidades inmunológicas (Bennett et al., 2021).

Incrementar conocimiento sobre los microbiomas se ha convertido en un tema popular en las últimas dos décadas no sólo en la comunidad científica, sino también entre la sociedad en general. Incluso se considera que el microbioma humano es nuestro “último órgano” (Baquero y Nombela, 2012). La investigación sobre el microbioma humano ha pasado de ser un campo incipiente a convertirse en un área floreciente de la investigación médica (Proctor, 2019)

Según Requena y Velasco (2019) y Berg et al. (2020), en términos generales, la microbiota se refiere a la comunidad de microorganismos que residen en un hábitat específico, con poblaciones de especies estables (autóctonas) y otras variables (alóctonas).

Una ampliación de la definición de microbioma, permite definir el termino microbiota de una manera más compleja que engloba diferentes aspectos de la dinámica microbiana (microbiota central), basándose en análisis de coocurrencia y datos experimentales que capturan la dinámica temporal y espacial de los microbiomas. Esto es útil ya que los microbiomas autóctonas suelen ser muy complejos y comprenden miles de especies de diferentes reinos (Berg et al., 2020).

Definir la microbiota central puede facilitar la distinción de los miembros estables y permanentes de un microbioma de poblaciones que pueden ser

intermitentes, asociadas solo con estados específicos del microbioma o restringidas a condiciones ambientales específicas. Actualmente, la microbiota central se define principalmente sobre la base de secuencias de ADN con información taxonómica (Berg et al., 2020).

La microbiota autóctona humana está constituida sobre todo por bacterias, aunque también están presentes virus, arqueas, mohos, levaduras y protozoos (Berg et al., 2020). Puntualmente, la colonización microbiana en los seres humanos ocurre en la piel y las mucosas de cavidades que están expuestas al exterior, como así también en los tractos digestivo, respiratorio y genitourinario, y glándulas secretoras como las sebáceas, biliar y mamarias (Berg et al., 2020). En todos estos entornos, la microbiota establece una relación simbiótica con el hospedador, aportando la modulación temprana del desarrollo fisiológico del hospedador y funciones de nutrición, inmunitarias y de resistencia a patógenos en todas las etapas de la vida. A su vez, cada hábitat tiene una variación relativamente baja cuando se compara entre individuos sanos de una misma distribución geográfica, raza, origen étnico y fase de la vida (Bennett et al., 2021).

Microbiota del tracto gastrointestinal

De acuerdo a Hillman et al., (2017), el ecosistema del tracto gastrointestinal humano experimenta una amplia variedad de condiciones químicas y físicas a medida que avanza desde la cavidad bucal hasta el ano. Estas variaciones en el entorno, junto con la dieta, tienen un impacto significativo en la composición, densidad y funciones de la microbiota gastrointestinal. Este proceso selectivo favorece el crecimiento de microorganismos que se adaptan fácilmente a las condiciones específicas de cada segmento del tracto gastrointestinal, contribuyendo así a la diversidad y estabilidad del ecosistema gastrointestinal.

Con respecto a la microbiota intestinal, es importante destacar que desempeña roles metabólicos y de protección importantes, que incluye el metabolismo de material indigerible de la dieta, la producción de vitaminas y nutrientes esenciales, y la protección contra infecciones por organismos patógenos. Además, tiene un impacto significativo en la modulación de la respuesta inmune y endocrina del

hospedador, así como en la secreción de neurotransmisores que comunican el intestino con el cerebro (Cusotto et al., 2018).

En los seres humanos, la microbiota intestinal es la que alberga la mayor cantidad y diversidad de microorganismos en comparación con otras partes del cuerpo (Quigley, 2013). Esta comunidad está compuesta por miles de microorganismos, que comienzan a colonizar el tracto digestivo durante la gestación como después del nacimiento (Passos y Moraes-Filho, 2017; Li et al., 2018).

La microbiota intestinal consta aproximadamente de 1500 especies, distribuidas en más de 50 filos diferentes (Robles-Alonso y Guarner, 2013). Los filos más dominantes reportados son Bacteroidetes y Firmicutes, seguidos de Proteobacteria, Fusobacteria, Tenericutes, Actinobacteria y Verrucomicrobia, representando hasta el 90% de la población microbiana total en los seres humanos (Jethwani y Grover, 2019). Existen diversos factores que pueden cambiar la composición y función de la microbiota intestinal, tales como la genética del huésped, la dieta, la edad (Odamaki et al., 2016), el modo de nacimiento (Nagpal et al., 2017) y el consumo de antibióticos (Hasan y Yang, 2019), actividad física, entre otros.

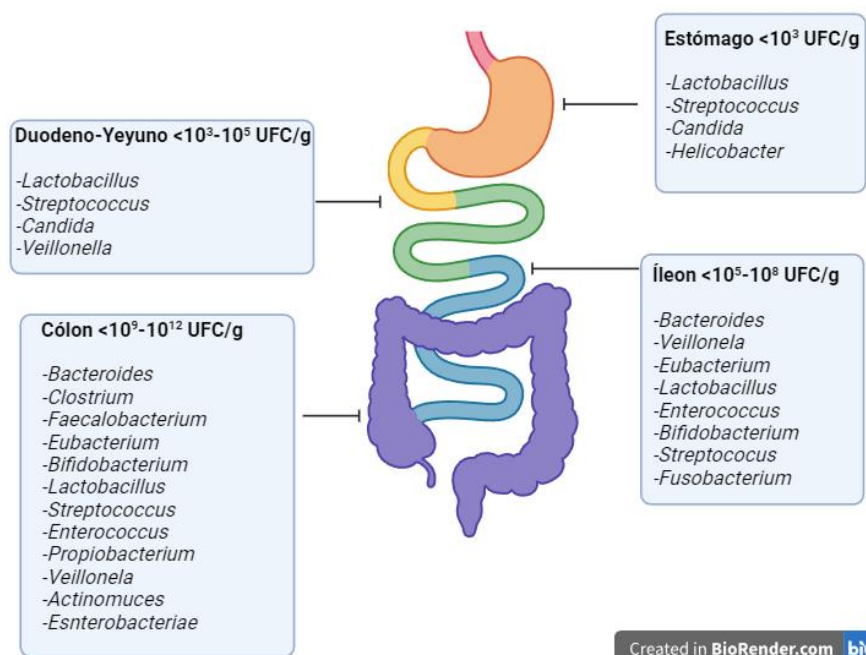


Figura 1.1: Distribución y composición de la microbiota gastrointestinal. (Adaptado de Roccorina et al., 2010).

En resumen, la microbiota intestinal desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la fisiología y la salud del huésped. En la Figura 1.1 se muestra los géneros más comunes de la microbiota de un individuo considerado sano.

Hongos Levaduriformes del tracto Gastrointestinal

En general, los estudios de la microbiota del tracto gastrointestinal se han centrado en las bacterias ya que estas son el grupo más abundante, siendo limitado el número de estudios realizados sobre Archaea, Eukarya y virus a pesar de sus importantes funciones en este ecosistema. Además, debido a los desafíos asociados con la recolección de muestras directamente del interior de los seres humanos, muchos estudios aún son exploratorios, con un enfoque principal en la composición de los microbiomas (Hallen-Adams y Suhr, 2017).

Puntualmente, el microbioma intestinal de un ser humano sano contiene miembros de todos los ámbitos de la vida, siendo Eukarya representado principalmente por hongos y, en algunas poblaciones protistas, en particular *Blastocystis* (Rajilic-Stojanovic *et al.*, 2007; Scanlan y Marchesi, 2008, Matijašić *et al.*, 2020). Durante mucho tiempo, los hongos estuvieron particularmente subrepresentados en los estudios de la microbiota (Perez y Johnson, 2013). El trabajo constante de varios investigadores ha producido una disciplina madura en la última década. Específicamente, Cui *et al.* (2016) proporcionan perspectivas del microbioma humano de todo el cuerpo, mientras que otros autores como Huffnagle y Noverr (2013); Seed y Collado (2014); Underhill y Iliev (2012); Ianiro *et al.* (2014), Kirschner *et al.* (2015) y Suhr y Hallen-Adams (2015) informaron sobre la microbiota intestinal. Por otra parte, Moyes y Naglik (2012) reportan sobre el papel de la microbiota intestinal en las enfermedades, que, aunque no se ha definido una microbiota núcleo común compartida para todos los individuos relacionado con un estado saludable, se ha observado que la disminución de la diversidad microbiana está asociada con ciertas enfermedades (Sommer *et al.*, 2017).

Los hongos constituyen aproximadamente el 0,1% de los microorganismos del tracto gastrointestinal y existe una relación estable de antagonismo, sinergia o simbiosis entre hongos, bacterias y virus en el intestino (Arumugam *et al.*, 2011). Generalmente el número total de hongos aumenta desde el íleon hasta el colon y

alcanza la mayor densidad en el intestino distal (Scupham *et al.*, 2006). Aunque el componente fúngico de la microbiota intestinal es poco estudiado (Limon *et al.*, 2017; Richard y Sokol, 2019) en comparación con su homólogo bacteriano, cada vez hay más pruebas de que los hongos comensales intestinales desencadenan respuestas múltiples y consistentes en el intestino de los mamíferos (Perez, 2021). A pesar de esto, se ha encontrado un grupo diverso de hongos asociados con el tracto digestivo humano. Por ejemplo, se encontraron 101 especies pertenecientes a 85 géneros de hongos en la cavidad bucal de personas sanas (Matijašić *et al.*, 2020). En muestras fecales tomadas de 45 voluntarios humanos sanos, se recuperaron 72 unidades taxonómicas operativas (OTU), que representan dos filos y diez clases de hongos (Hallen-Adams *et al.*, 2015). En otra cohorte que constaba de 96 muestras de heces (Hoffmann *et al.*, 2013), los autores detectaron 66 géneros de hongos y 13 linajes adicionales que no pudieron clasificarse a nivel de género. En un estudio más amplio que analizó muestras de heces de 147 voluntarios sanos, se identificaron 701 OTU de hongos que abarcan 247 géneros (el 17 % de las OTU de hongos no pudieron asignarse a ninguna especie conocida). Sin embargo, el número de OTU dentro de las muestras osciló entre 2 y 92 en el estudio de Nash *et al.* (2017). Estas cifras se traducen en un índice de diversidad de Shannon-Wiener bajo, lo que implica una baja diversidad alfa para la mayoría de las muestras. En comparación con la composición que normalmente se encuentra en las comunidades bacterianas del intestino humano, tanto el número de OTU observadas como los valores del índice de diversidad de Shannon-Wiener son más bajos para los hongos (Nash *et al.*, 2017).

Las levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Malassezia* y *Candida* han sido los hongos dominantes encontrados en muestras de heces en la mayoría de los estudios. *Saccharomyces* spp. y *Malassezia* spp. están asociados con ciertos alimentos o residentes conocidos de la piel, respectivamente, lo que plantea dudas sobre si los miembros de estos dos géneros realmente deberían considerarse residentes naturales del tracto gastrointestinal (Fiers *et al.*, 2019). Evidentemente, todavía no hay consenso sobre que especies de hongos constituyen un "microbioma intestinal central", o incluso si tal concepto puede aplicarse a estos microorganismos. El campo claramente se beneficiaría de estudios adicionales a

gran escala destinados a identificar todo el conjunto de especies de hongos que residen en los humanos (Perez *et al.*, 2021).

El Mundo de los microorganismos beneficiosos: los probióticos

La historia moderna de los probióticos comienza a principios del siglo XX, sin embargo, la tradición de los probióticos es tan antigua como la historia de la humanidad (Ozen *et al.*, 2015), ya que está estrechamente relacionada con el uso de alimentos fermentados. Cabe plantear la hipótesis que cuando la agricultura empezó a sustituir la caza y la recolección hace unos 10.000 años, el hombre empezó a producir alimentos y bebidas fermentados (Gasbarrini *et al.*, 2016).

Específicamente, la conexión entre los alimentos fermentados, los microorganismos y la salud se originó con el inicio de la disciplina de la microbiología. En 1680, van Leeuwenhoek utilizó su recién construido microscopio para observar las células de levadura en la cerveza en fermentación (Lodolo *et al.*, 2008). Como nunca relacionó la presencia de estas células de levadura con el proceso de fermentación, sus observaciones cayeron en el olvido. A finales del siglo XVIII, Lavoisier, uno de los fundadores de la química moderna, describió el proceso de fermentación como el proceso de transformación de los azúcares en alcohol y dióxido de carbono. Describió este fenómeno de fermentación alcohólica como "uno de los más extraordinarios de la química" (Barnett y Barnett, 2011).

En la figura 1.3 se muestran algunos de los hechos relevantes que marcaron el camino hacia el descubrimiento de la relación entre los microorganismos los alimentos y los beneficios para la salud.

El término probiótico deriva del latín (pro) y del griego (bios), que significa literalmente "para la vida". Fue utilizado por primera vez por Kollath en 1953 para describir genéricamente varios suplementos orgánicos e inorgánicos a los que se atribuía la capacidad de restablecer la salud de pacientes desnutridos. La definición actual de probiótico fue formulada en 2001 por la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) como "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped". Posteriormente, en 2002, la

FAO/OMS redactó unas directrices relativas a la evaluación de los probióticos en diversos productos alimentarios. En el 2014, según la definición estándar de la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP) bajo el marco establecido por la FAO y OMS, los probióticos incluyen 'todos los microorganismos vivos que, cuando se administran en una cantidad adecuada confiere un efecto beneficioso al huésped' (Hill *et al.*, 2014).

Debido a la gama de funciones, objetivo y aplicaciones tecnológicas de los probióticos, la selección y evaluación de nuevos candidatos a probióticos requiere un enfoque integral que incluya múltiples pasos. La FAO/OMS publicó en el 2002 las “Directrices para la evaluación de probióticos en los alimentos”, que establecieron estándares de seguridad y eficacia para los probióticos las cuales siguen vigentes (Araya *et al.*, 2002) como se indica en la Figura 1.2.

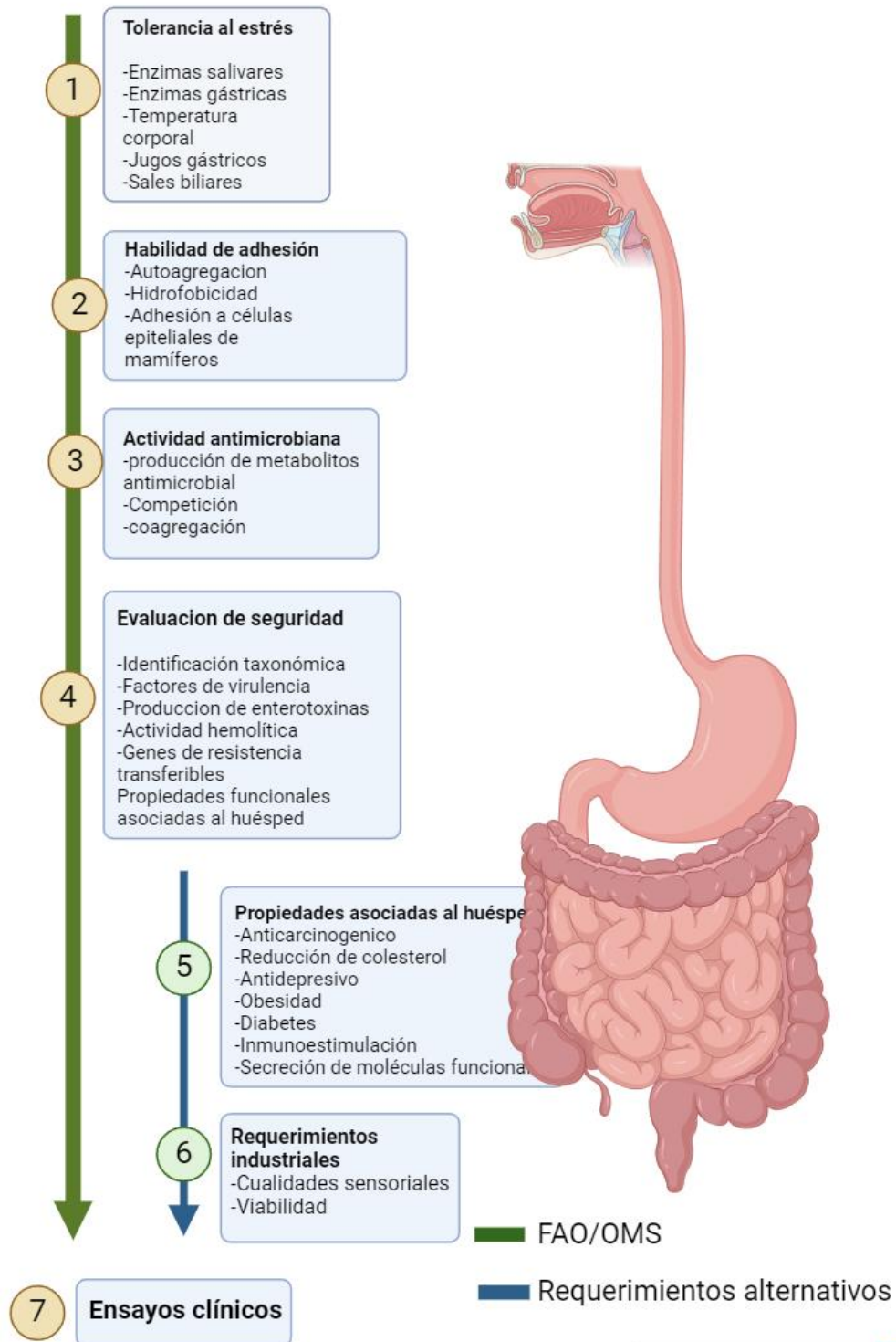


Figura 1.2: Criterio de selección de un microorganismo probiótico según la (FAO/OMS) y requerimientos alternativos

Situación en Argentina

Según el código alimentario argentino (CAA), regulado por el ANMAT, en el CAPÍTULO XVII de alimentos de régimen o dietéticos, Artículo 1389 - (Resolución Conjunta SPReI N° 261/2011 y SAGyP N° 22/2011), para que una cepa pueda ser utilizada como ingrediente probiótico deberá cumplir con el siguiente protocolo de Evaluación:

I. Requisitos Mínimos

1. Identificación de la cepa (Género/especie/subespecie)

2. Caracterización *in Vitro* e *in Vivo*

- Resistencia gástrica
 - Resistencia a bilis
 - Resistencia a lisozima (opcional): ensayo realizado como indicador que la cepa podrá sortear esta barrera biológica presente en la boca (saliva) e intestino delgado.
3. Ensayos “*in Vivo*” e “*in Vitro*” que demuestren el(los) efecto(s) probiótico(s) adjudicado(s) debidamente documentados y respaldados en estudios efectuados por organismos nacionales y/o internacionalmente reconocidos.

4. Seguridad: La cepa probiótica no debe ser riesgosa para la salud.

II. Pruebas Complementarias para Garantizar la Seguridad de la Cepa

- Resistencia a antibióticos
- Actividad hemolítica
- Producción de toxinas

III. Identificación Comercial de la(s) Cepa(s) El producto se presentará comercialmente en un envase bromatológicamente apto cuyo rótulo indique la identificación precisa de la(s) cepa(s) que lo componga(n) y la concentración de células viables de cada una de ellas (UFC/g).

Según el CAA los alimentos elaborados con probióticos serán autorizados, previa evaluación satisfactoria de los ensayos *in Vivo* con el alimento tal cual se va a consumir, que demuestren la funcionalidad que se le atribuye a la(s) cepa(s) probiótica(s) que contiene, de una Comisión Evaluadora integrada por profesionales especializados pertenecientes a la Autoridad Sanitaria o a los que ésta designe a ese efecto para cada caso particular.

Levaduras probióticas

Desde su origen etimológico, “levadura” alude a su papel crucial en la fermentación. Esta palabra proviene del inglés antiguo, -gyst-, y de la raíz indoeuropea -yes-, que significa “hervir”, “espuma” o “burbuja”, que se relaciona directamente con lo que se observa durante una fermentación tumultuosa. (Legras *et al.*, 2007). En la Figura 1.3 se muestra una cronología resumida, desde los primeros registros fósiles de este grupo de microorganismos, hasta los sucesos que dieron su origen como probióticos en la actualidad (Vergara *et al.*, 2023b).

Está claro que la domesticación de las levaduras comenzó antes del descubrimiento de los microorganismos (Gallone *et al.*, 2018). Durante el neolítico el hombre comenzó a formar los primeros asentamientos, como resultado de un suministro de alimentos más seguro, surgió una “cocina” neolítica que implicó el desarrollo de una variedad de técnicas de procesamiento de alimentos, incluida la fermentación (Rasmussen, 2015).

En 1920, el científico francés Henri Boulard observó que ciertas personas en la Indochina francesa no se vieron afectadas por un brote de cólera. Estas personas consumían un tipo específico de té elaborado con extracto de *Litchi chinensis* y *Garcinia mangostana*. Boulard aisló una cepa de *Saccharomyces* de la cáscara de la fruta de *Litchi chinensis* y la llamó *Saccharomyces boulardii*. Actualmente, la cepa está disponible en todo el mundo como suplemento probiótico de venta libre. El hecho de que se hayan fabricado y vendido preparaciones de *S. boulardii* desde la década de 1950 y se hayan utilizado en estudios clínicos desde 1977 es indicativo de la relativa seguridad y la naturaleza no patógena de la cepa (McFarland, 2010). Se han realizado varios estudios que confirman los diversos efectos beneficiosos de esta cepa como la restauración gastrointestinal, la acción antioxidante, la

protección hepática y la actividad hipoglucemiante y ansiolítica (Czerucka *et al.*, 2007, Szajewska *et al.*, 2010, Kelesidis y Pothoulakis, 2012, Szajewska y Kołodziej, 2015). Un estudio de Offei *et al.* (2019) proporcionó la primera explicación molecular de un rasgo relacionado con su acción probiótica, mostrando que su potencia antibacteriana puede deberse a mutaciones específicas de cepa dentro de la misma especie (Figura 1.3). Este estudio sugiere que la acidificación del medio permite esta actividad antibacteriana, proporcionando a *S. boulardii* una ventaja selectiva en su nicho ecológico.

Hasta el momento, *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 es la única cepa patentada perteneciente a géneros de levadura para uso humano, la cual ha sido ampliamente evaluada por su efecto probiótico. Por otro lado, *Kluyveromyces marxianus* B0399 es la única levadura no- *Saccharomyces* disponible actualmente en el mercado en diferentes países del mundo. El campo de los probióticos fúngicos es uno de los de mayor desarrollo hoy en día y las levaduras conforman un enorme y diverso grupo de microorganismos que está atrayendo la atención de investigadores e industrias.

Es importante señalar que las levaduras tienen ciertas ventajas como probióticos sobre las bacterias por ejemplo, no se ven afectadas por los antibacterianos administrados durante los tratamientos con antibióticos más comunes, son aproximadamente 10 veces más grandes que las bacterias y proporcionan una barrera más eficaz en la pared intestinal, tienen una transferencia genética horizontal extremadamente baja y su crecimiento óptimo es a un pH bajo, entre otras (Ogunremi *et al.*, 2015; Banik *et al.*, 2019; Hsiung *et al.*, 2021). Asimismo, la arquitectura única de la pared celular de las levaduras les brinda ventajas adicionales sobre las bacterias, debido a que la envoltura celular está compuesta por dos capas: la capa exterior formada por mananos y la capa interior contiene quitina y 1,3- y 1,6- β -glucano. Esta estructura permite una fácil transición a través del entorno gastrointestinal (Cid *et al.*, 1995). Además, las levaduras también exhiben altos contenidos de minerales, vitamina B, péptidos, proteínas y varios compuestos inmunoestimulantes como mananoligosacáridos, proteasas y glucanos y presentan buena resistencia a condiciones industriales como altas temperaturas y liofilización (Alkalbani *et al.*, 2022).

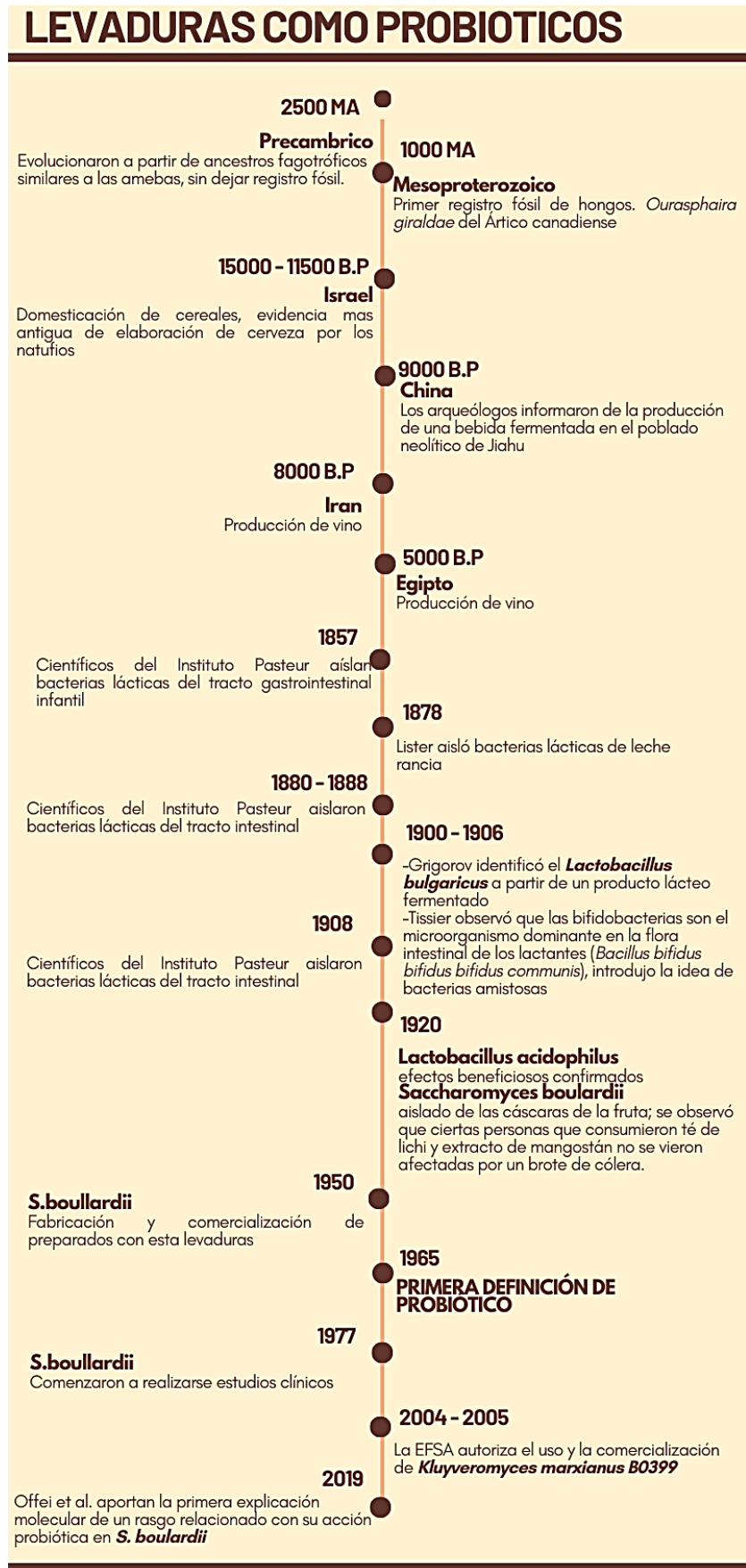


Figura 1.3: Cronología de la historia y antecedentes de las levaduras y su origen como probiótico.

Características/propiedades tecnológicas de las levaduras enológicas

En la elaboración del vino intervienen varias especies de diferentes géneros de levaduras, transformando el mosto de uva en vino. Están presentes tanto en el viñedo (principalmente en la superficie de la uva) como en las instalaciones de la bodega, y se caracterizan especialmente por su adaptación a condiciones hostiles dado el carácter altamente selectivo del proceso de elaboración del vino (Chambers *et al.*, 2015; Marsit y Dequin, 2015). La fermentación del vino es un entorno fluctuante que expone a la levadura a una variedad de factores de estrés, incluida alta osmolaridad, que refleja mayores concentraciones de azúcar, altos niveles de sulfitos, anaerobiosis, estrés ácido, agotamiento de nutrientes (nitrógeno, lípidos y vitaminas) y toxicidad del etanol, entre otros. Una fermentación de vino típica comprende una fase de retraso, que dura varias horas, una fase de crecimiento corta de 24 a 36 h, seguida de una fase estacionaria, durante la cual la mayor parte del azúcar (entre el 50 y el 80%) se fermenta. Durante esta fase, la actividad de la levadura disminuye continuamente, aunque los niveles de viabilidad se mantienen altos, generalmente superiores al 90%, hasta que se agota el azúcar (Marsit y Dequin, 2015). Numerosos subproductos fermentativos como el glicerol, ácidos carboxílicos, aldehídos, alcoholes superiores, ésteres, compuestos carbonílicos, compuestos de azufre, se derivan de la degradación de azúcares, aminoácidos y ácidos grasos, producidas por las levaduras, los cuales podrían tener importancia biológica. Por otra parte, las levaduras del vino también están expuestas a una amplia gama de temperaturas, ya que la fermentación del vino tinto generalmente se realiza a temperaturas medias-altas (18 a 25 °C). Otros autores afirman que durante la fermentación del azúcar en alcohol se eleva la temperatura del mosto de uva a más de 40 °C (Rankine, 2007). En la fermentación del vino blanco, ocurre a temperaturas más frías (10 a 15 °C) (Marsit y Dequin, 2015). Además, durante la maduración de la uva la microbiota que se encuentra en la pruina soportan temperaturas que alcanzan 46- 47 °C, por tal motivo tienen buena termotolerancia (Müller *et al.*, 2023).

Así, durante milenios, las condiciones de elaboración del vino han expuesto a las levaduras a una combinación de estreses (osmótico, ácido, falta de

nutrientes, toxicidad del etanol) que actúan de forma individual o sinérgica, lo que potencialmente conduce a una diferenciación adaptativa (Marsit y Dequin, 2015).

A diferencia de las matrices de fermentación de la cerveza y el pan, que son entornos pobres en especies y que están más controlados biotecnológicamente, el mosto de uva es un hábitat dinámico y especialmente desafiante para las levaduras. El ambiente fermentativo del vino no solo aporta un entorno físico-químico estresante para las levaduras ya que también podría considerarse como un excelente modelo para examinar el efecto de las asociaciones microbianas de un producto fermentado (Zilelidou y Nisiotou, 2021). Debido a la riqueza del mosto de uva en especies microbianas junto con sus particulares propiedades fisicoquímicas sometidas a alteraciones altamente dinámicas impulsadas por microorganismos, el vino es, sin dudas, un producto de interacciones microbianas.

Durante las etapas iniciales de la fermentación alcohólica, varias especies y cepas de levadura están presentes en el mosto (Nisiotou *et al.*, 2007), por lo tanto, podría considerarse que las adaptaciones que presentan las levaduras en ambientes fermentativos también están influenciadas por las interacciones microorganismo-microorganismo (Kurtzman *et al.*, 2011).

Alimentos fermentados y levaduras multifuncionales

Actualmente, existe una tendencia a la selección de microorganismos no sólo con buenas propiedades tecnológicas sino también con características probióticas (Benítez-Cabello *et al.*, 2020). Por ejemplo, los cultivos iniciadores de levadura pueden producir diferentes metabolitos secundarios como acetatos, ésteres, ácidos grasos y alcoholes superiores en la fermentación de alimentos, que contribuyen a los atributos sensoriales del producto final así como también aportan beneficios a la salud del consumidor (Sadeghi *et al.*, 2022). Estos microorganismos con diversas funcionalidades son los denominados *microorganismos multifuncionales*.

Aunque se han aplicado diversos microorganismos funcionales (en su mayoría bacterias lácticas –BAL-) en alimentos fermentados probióticos comerciales en todo el mundo, el mercado de productos biofuncionales necesita continuamente la implementación y diversificación de los productos disponibles. Para ello, un número creciente de estudios científicos ha implicado la selección de nuevas cepas con

propiedades funcionales diferentes y específicas, donde constantemente se identifican nuevos grupos microbianos como las levaduras (Staniszewski *et al.*, 2021).

En los últimos años, las principales categorías de alimentos estudiadas son aquellas con fines dietéticos específicos (por ejemplo, “light”, dietéticos, bajos en grasas) y los categorizados como alimentos funcionales. Estos últimos se definen como alimentos naturales o procesados industrialmente que, cuando se consumen regularmente dentro de una dieta diversa en niveles eficaces, tienen efectos potencialmente positivos en la salud más allá de la nutrición básica (Granato *et al.*, 2017).

En particular, la formulación de estos alimentos puede estar dirigida a eliminar/reemplazar ciertos ingredientes o agregar compuestos bioactivos, obteniendo así diferentes categorías como: alimentos ligeros, mejorados, enriquecidos o fortificados. Dentro de estos últimos se incluyen aquellos alimentos donde se añade un compuesto bioactivo (por ejemplo, prebióticos y probióticos, vitaminas A, D, B₁₂ y calcio en bebidas vegetales) o se ha aumentado su presencia como fibra dietética en productos de panadería, vitaminas en zumos de frutas, los cuales se pueden obtener reforzando la entrega de compuestos bioactivos presentes de forma natural, agregándolos al producto o induciendo su formación durante el procesamiento (McClements, 2009).

Los alimentos funcionales han mostrado un enorme crecimiento en los últimos años con la aplicación de probióticos como “aditivos alimentarios” (Min *et al.*, 2019). Además, la fermentación, se ha convertido en una tendencia en el procesamiento de alimentos, dado que es un proceso natural que convierte químicos complejos en compuestos biológicamente más activos y degrada factores antinutricionales y toxinas (Terefe y Augustin, 2020). Los alimentos fermentados se han relacionado principalmente con microorganismos probióticos (en su mayoría bacterias). Por tanto, estos productos fermentados interesan significativamente a la industria y a la comunidad científica. Esto se debe a que incluyen propiedades deseables específicas, como una prolongación de la vida útil (debido a la acidificación y reducción del pH), una mejora de las propiedades organolépticas (textura y

producción de aromas), un mayor valor nutricional y aportes de beneficios al consumidor (Peng *et al.*, 2020).

Las levaduras probióticas y sus productos fermentados han demostrado poseer varios componentes bioactivos como nutraceuticos, que forman parte integral de los alimentos funcionales y son responsables de mejorar la tecnofuncionalidad de los productos finales (Sadeghi *et al.*, 2022). La producción de alimentos funcionales con atributos sensoriales mejorados o fortificados (con probióticos o metabolito secundario multifuncional), son algunas de las potenciales aplicaciones más interesantes de las levaduras probióticas en este campo (Sadeghi *et al.*, 2022).

Levaduras multifuncionales

Una tendencia actual en la microbiología de los alimentos es el empleo de microorganismos multifuncionales. Un cultivo iniciador o *starter* también puede ser capaz de desempeñar otra/s funciones tales como probiótico, reducción de compuestos tóxicos, producción de vitaminas, entre otras (Bevilacqua *et al.*, 2012). Un cultivo *starter* puede definirse como una preparación de gran número de células de un microorganismo que puede ser agregado a una materia prima y producir un alimento fermentado, conduciendo un bioproceso para asegurar la inocuidad de los alimentos, su vida útil y criterios de factibilidad económica y tecnológica (Champagne y Møllgaard, 2008). En la actualidad, los probióticos han atraído a investigadores de todo el mundo por sus propiedades beneficiosas para la salud en general (Zommiti *et al.*, 2020).

Numerosos autores consideran que estos microorganismos son esenciales para mantener la salud intestinal, ya que proporcionan nutrientes vitales y ayudan a reducir la inflamación (Liu *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2023; Lee *et al.*, 2023). Los probióticos se suelen consumir como complemento dietético, o como parte de la microbiota de alimentos fermentados como el queso o el kéfir.

Si bien la mayoría de las investigaciones sobre probióticos se han centrado en cepas bacterianas (principalmente *Lactobacillus* (según la nomenclatura clásica) y *Bifidobacterium*), la exploración de levaduras probióticas está ganando impulso debido a su potencial en términos de características únicas, posibles aplicaciones

terapéuticas y aplicaciones en los alimentos (Morelli y Capurso, 2012; Staniszewski *et al.*, 2021; Sadeghi *et al.*, 2022; Jarocki *et al.*, 2023). En diferentes trabajos se han informado sobre la selección de cepas de bacterias ácido lácticas como microorganismos probióticos y funcionales (Bevilacqua *et al.*, 2009; Iyer *et al.*, 2010; Russo, 2015), sin embargo, existe poca información disponible acerca de levaduras multifuncionales.

Los alimentos fermentados han sido una fuente de microorganismos probióticos en la dieta humana desde el principio de los tiempos (Sybesma *et al.*, 2015; Ponomarova *et al.*, 2017; Tamang *et al.*, 2022). Algunos ejemplos de productos fermentados que pueden ser fuentes para el aislamiento de cepas probióticas son la masa madre, los productos lácteos (queso, leche ácida, yogurt), las frutas y verduras fermentadas y los alimentos y bebidas tradicionales (Pytko *et al.*, 2022; Kunyeit *et al.*, 2023; de Miranda *et al.*, 2023). Dado que los alimentos con probióticos pueden contribuir a la salud, ha habido un aumento en la demanda de estos productos (Vera-Santander *et al.*, 2023). Como resultado, el mercado mundial de probióticos en 2022 ascendió a 68,56 mil millones de dólares. Aun así, se estima que este valor aumentará a 133,92 mil millones de dólares para 2030, debido al alto consumo de productos probióticos luego de la pandemia (Precedence Research. Probiotics, <https://www.precedenceresearch.com/probiotics-market>). Además, otros factores como las crecientes tendencias en el consumo de alimentos funcionales, las nuevas estrategias de marketing por parte de las redes sociales y los canales de distribución de alimentos innovadores, como las compras online, pueden aumentar la demanda y el consumo de estos productos. Por tanto, las industrias alimentaria y farmacéutica necesitan incrementar la investigación para ofrecer una oferta más diversa y productos mejorados al consumidor (Vera-Santander *et al.*, 2023).

Por otro lado, existe gran cantidad de evidencia científica respecto al consumo de alimentos con probióticos bacterianos y el aporte de beneficios para la salud como la regulación de la microbiota, disminución de síntomas de trastornos gastrointestinales y enfermedades cardíacas, capacidades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, psicobióticas, antiobesidad y antivirales (Vera-Santander *et al.*, 2023). A pesar de que los informes acerca alimentos funcionales

con levaduras probióticas y sus posibles beneficios para la salud aún son pocos, en los últimos años han incrementado significativamente.

Existen diversos grupos de investigación que están explorando nuevas cepas de levaduras con propiedades probióticas, no sólo *Saccharomyces* (Chen *et al.*, 2010; Arévalo-Villena *et al.*, 2018; Rodríguez-Nogales *et al.*, 2018; Staniszewski *et al.*, 2021), sino también especies no-*Saccharomyces* (conocidas también como no convencionales) (Homayouni-Rad *et al.*, 2020; Koshchayev *et al.*, 2022; Angulo *et al.*, 2023). Además, aunque se han informado varias capacidades beneficiosas de las levaduras potencialmente probióticas, se dispone de poca información sobre sus efectos en los sistemas alimentarios (Shruthi *et al.*, 2022).

Tradicionalmente los productos lácteos fermentados fueron considerados los mejores portadores de probióticos. Sin embargo, los productos basados en leche suelen ocasionar alergias o enfermedades asociadas al colesterol (Perricone *et al.*, 2014). Además, excluyen a un grupo amplio de consumidores que no ingiere estos alimentos. Por lo tanto, se están llevando a cabo investigaciones sobre diversos alimentos y bebidas fermentadas, así como también nuevas materias primas fermentables con el fin de encontrar alimentos no-lácteos funcionales.

En la misma línea, en el estudio de Canonico *et al.*, (2021) se utilizaron levaduras potencialmente probióticas también no convencionales para la producción de cerveza artesanal enriquecida con proteínas. Los principales compuestos aromáticos, incluidos acetato de etilo, acetato de isoamilo y alcoholes superiores, se observaron en cervezas de mosto de pils enriquecidas con lentejas fermentadas con probióticos *Lachancea thermotolerans*, *Kazachstania unispora* y *S. cerevisiae*. En otro estudio, se utilizaron el probiótico *S. boulardii* CNCM I-745, el probiótico *Lactiplantibacillus plantarum* 299V, en cultivo mixto para la fermentación del té verde (Wang *et al.*, 2022). La coinoculación de levaduras probióticas y bacterias lácticas (BAL) mejoró la supervivencia de *L. plantarum*, aumentó los compuestos aromáticos (especialmente los ésteres etílicos con notas afrutadas, como el monocultivo de levadura). En otro estudio, Parafati *et al.*, (2022) informaron que entre las levaduras probióticas aisladas de aceitunas de mesa fermentadas, las cepas de *W. anomalus* mostraron el espectro más amplio de actividades enzimáticas (la mayor actividad fititasa y β -glucosidasa). Las levaduras con actividad β -glucosidasa se pueden utilizar como cultivos iniciadores en el

procesamiento de aceitunas de mesa para eliminar el amargor natural de las aceitunas (oleuropeína) sin tratamiento con lejía. Además, las levaduras probióticas se pueden utilizar como cultivos funcionales solos o en combinación con BAL para producir una variedad de alimentos funcionales que contienen metabolitos multifuncionales.

Aptitudes fermentativas de levaduras de origen enológico

Entre los productos fermentados, los vinos merecen especial atención como fuente de microorganismos probióticos debido a la riqueza de su microbiota y por ser un ecosistema altamente selectivo (Marzano *et al.*, 2016; Sirén *et al.*, 2019; Vilela *et al.*, 2020; Cioch-Skoneczny *et al.*, 2021; Kordowska-Wiater *et al.*, 2022; Vergara *et al.*, 2023a).

Las levaduras asociadas al proceso de vinificación, tanto aquellas pertenecientes al género *Saccharomyces* como las especies incluidas en el grupo no-*Saccharomyces*, son las responsables de llevar a cabo la fermentación alcohólica. Estas levaduras están presentes tanto en el viñedo como en las instalaciones de las bodegas y se caracterizan por estar plenamente adaptadas a las condiciones hostiles presentes durante el proceso. La fermentación expone a las levaduras a múltiples estreses ambientales, incluyendo presión osmótica alta, pH bajo, O₂ bajo, azúcar alto, etanol elevado, falta de nutrientes, adición de sulfitos y fluctuaciones de temperatura (Bauer y Pretorius, 2000; Gasch *et al.*, 2000; Marks *et al.*, 2008; de Nadal *et al.*, 2011; Marsit y Dequin, 2015; Matallana y Aranda, 2017).

Además, diversas especies presentan propiedades de hidrofobicidad, producción de exopolisacáridos y/o formación de biofilm, características especiales que les permiten mejor adhesión a la superficie de la uva, así como crear una barrera protectora contra otros microorganismos y/o factores físico-químicos adversos (Renouf *et al.*, 2005). Por lo tanto, la resistencia o tolerancia a las condiciones de vinificación (con algunas semejanzas a las del tractogastrointestinal) sumado a las características estructurales y funcionales de las levaduras pertenecientes a este nicho ecológico, convierte a las levaduras enológicas en potenciales candidatas probióticas. Ciertas cepas comúnmente aisladas de ambientes vitivinícolas, perteneciente a las especies *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Lachancea*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia* y

Zygosaccharomyces presentaron alta tolerancia a las sales biliares y pH bajos, así como adhesión a células intestinales (Veisseire *et al.*, 2020; Simões *et al.*, 2021; Fernández-Pacheco *et al.*, 2021; Staniszewski y Kordowska-Wiater, 2023).

El impacto de las levaduras en la producción, calidad y seguridad de alimentos y bebidas está íntimamente ligado a su ecología y actividades biológicas. La producción de alimentos funcionales con características sensoriales mejoradas o distintivas tiene gran importancia en el campo de la implementación de levaduras probióticas en la industria alimentaria (Sadeghi *et al.*, 2022). En los últimos años, los investigadores centran su atención en las levaduras, ya que podrían ofrecer una buena alternativa a las bacterias probióticas para la diversificación de productos (Fernández-Pacheco *et al.*, 2021).

Por otra parte, las levaduras juegan un rol significativo en la fermentación de aceitunas para consumo en fresco (o aceituna de mesa) asociado a la formación de compuestos organolépticos deseables (Silva *et al.*, 2011). Ciertas cepas de los géneros *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia* y *Saccharomyces* son beneficiosas y contribuyen significativamente a la calidad sensorial del producto. Entre las características tecnológicas relevantes que se espera encontrar en levaduras para fermentar aceitunas se incluyen: actividades lipasa, esterasa y catalasa, asimilación de oleuropeína y tolerancia y/o producción de ácido láctico, osmotolerancia y tolerancia a un rango amplio de pH (Silva *et al.*, 2011; Sadeghi *et al.*, 2022).

Por último, en la última década, ha habido un aumento mundial en el interés de los consumidores por las cervezas artesanales, que no están pasteurizadas, sin filtrar y sin presión adicional de nitrógeno o dióxido de carbono (Canonico *et al.*, 2014). Aunque existen muchos estudios controvertidos sobre los efectos beneficiosos del consumo de cerveza en la salud humana, estudios epidemiológicos han demostrado que esta bebida, consumida con moderación, tiene efectos positivos en la protección cardiovascular inhibiendo la aterosclerosis, disminuyendo el contenido sérico de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad y triglicéridos, al actuar como un eliminador de radicales libres *in vivo* o antioxidante (Granato *et al.*, 2011; de Gaetano *et al.*, 2016).

De acuerdo a Zendeboodi, *et al.* (2021), las industrias de bebidas han descubierto microorganismos probióticos como herramientas novedosas para el desarrollo de nuevos alimentos con probióticos y funcionales. Las cervezas funcionales se producen mediante la administración de ingredientes no convencionales, que son capaces de producir o transformar insumos de producción en compuestos con beneficios para la salud humana

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es la principal especie que participa de la fermentación alcohólica en la elaboración de la cerveza tipo *Ale*. Las cuales fermentan a temperaturas entre 18-22 °C y tienen la capacidad de flocular al final del proceso fermentativo. Entre los principales criterios de selección de estos microorganismos se puede mencionar: su fase corta de adaptación al mosto cervecero, atenuación aparente moderada a las temperaturas mencionadas, así como la producción de enzimas, tales como β -glucosidasas, que otorgan particularidades organolépticas al producto final (Lengeler *et al.*, 2020).

Actualmente, una particularidad es que los productores cerveceros artesanales de la región de Cuyo (Argentina) comúnmente no filtran ni aplican productos químicos al final de fermentación, por lo tanto, las levaduras siguen presentes pos-fermentación.

Es importante destacar que varias de las propiedades tecnológicas deseables para obtener tanto aceitunas de mesa como cervezas *Ale* sin filtrar tienen relación con las aptitudes que se buscan en los microorganismos probióticos, y, lo más importante, estos microorganismos pueden seguir activos después de finalizado el proceso. Por lo tanto, el empleo de cultivos *starter* autoctonos para obtener aceituna de mesa y cerveza *Ale* sin filtrar artesanal (dos productos de relevancia para la provincia de San Juan, Argentina, tanto por su elaboración como por su consumo) y con propiedades probióticas permite lograr un producto regional con características distintivas y además brindar valor agregado al producto local por sus beneficios a la salud del consumidor, lo que significa una mejora competitiva sustancial para el sector alimentario.

Hipótesis: las levaduras aisladas de ambientes vitivinícolas de la región se consideran multifuncionales dado que poseen aptitudes para ser empleadas como probióticos para humanos en co-inóculo de aceitunas de mesa y *starters* en cerveza tipo *Ale*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar las propiedades probióticas y aptitudes fermentativas de levaduras de origen enológico con el fin de emplearlas como cultivos multifuncionales en alimentos fermentados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar los rasgos de bioseguridad *in vitro* e *in vivo* de los aislamientos de levaduras enológicas.
2. Analizar la supervivencia de los aislamientos de levaduras de origen enológico a las condiciones presentes en el sistema gastrointestinal (SGI) con el fin de ser empleados como probióticos.
3. Evaluar la capacidad de adhesión a las células epiteliales del TGI *in vitro* de las levaduras tolerantes a las condiciones previamente ensayadas.
4. Evaluar propiedades benéficas: producción de enzimas, actividad antimicrobiana, reducción de colesterol, capacidad de adhesión a las células epiteliales del SGI *in vitro* e inmunomodulación.
5. Caracterizar tecnológicamente las levaduras con potencial probiótico para ser empleadas como co-cultivos en el proceso fermentativo de aceituna de mesa y como *starter* en la elaboración de cerveza artesanal tipo *A/e*.
6. Evaluar la viabilidad y vitalidad de las levaduras multifuncionales empleadas en procesos fermentativos.

CAPÍTULO 2

BIOSEGURIDAD

INTRODUCCIÓN

Desde hace unas décadas, los investigadores comenzaron a centrar su atención en las levaduras, dado que ofrecen una buena alternativa a las bacterias probióticas, y uno de los fines es diversificar los productos que ofrecen beneficios para la salud (Fernández-Pacheco *et al.*, 2021). Además, como se informó previamente (capítulo 1, página 24) presentan diversas ventajas frente a las bacterias (More y Swidsinski, 2015).

Numerosos estudios (Ventura *et al.*, 2009; Aragon *et al.*, 2010; Gil-Rodriguez *et al.*, 2015; Ochangco *et al.*, 2016; Agarbati *et al.*, 2021) han evaluado la adaptación y colonización del tracto gastrointestinal por parte de las levaduras, así como de sus posibles mecanismos de acción que ejercen efectos promotores de la salud, sin embargo, existe poca información sobre su bioseguridad.

Los seres humanos, sin saberlo e inadvertidamente, están ingiriendo numerosas poblaciones viables de una gran variedad de especies de levaduras, presentes en alimentos como quesos, carnes curadas y fermentadas, frutas y ensaladas de frutas y bebidas fermentadas como ciertos estilos de cervezas caseras o enriquecidas con levadura (Pérez-Través *et al.*, 2021). En términos de seguridad alimentaria, las levaduras tienen una mejor reputación en comparación con otros microorganismos como bacterias y algunos hongos filamentosos. Sin embargo, bajo determinadas circunstancias, los alimentos fermentados con levaduras pueden provocar enfermedades en humanos (Puig-Asensio *et al.*, 2014).

Saccharomyces cerevisiae es la principal cepa responsable de diversos procesos fermentativos tales como cerveza, sidra, sake, vino y pan, entre otros. Hasta hace dos décadas se consideraba un microorganismo seguro (Sundh y Melin, 2011). Sin embargo, debido al creciente número de informes acerca de levaduras que provocan enfermedades sistémicas leves y potencialmente mortales, el estado de *Saccharomyces cerevisiae* ha pasado de un grupo generalmente reconocido como seguro (GRAS) a un grupo de patógenos oportunistas de baja virulencia (Klingberg *et al.*, 2008); aunque algunos autores lo atribuyen a su amplia distribución y uso (Sundh y Melin, 2011). Los principales informes corresponden a fungemias, aunque también es importante destacar que el número de casos es muy

bajo, comparado con otras enfermedades infecciosas y, en su mayoría están asociados a personas inmunodeprimidas (Klingberg *et al.*, 2008).

Por otra parte, algunas especies de levaduras no relacionadas con los alimentos, clasificadas dentro del grupo no- *Saccharomyces*, como *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, son responsables de infecciones sistémicas en humanos (Perez-Nadales *et al.*, 2014). Asimismo, especies como *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *K. fragilis* y *Wickerhamomyces anomalus* entre otras, fueron aprobadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) e incluidas en la lista de "Presunción calificada de seguridad" (QPS), es decir, son considerados microorganismos que se suponen seguros (EFSA, 2010 y 1017, Koutsoumanis *et al.*, 2020).

Cada vez es más frecuente los reportes de casos de infecciones causadas por especies de levaduras del grupo no-*Saccharomyces* relacionadas con los alimentos (Pérez-Través *et al.*, 2021) sin embargo, estos casos ocurrieron en personas de riesgo, con sus sistemas inmunológicos debilitados (enfermos de cáncer, SIDA y pacientes hospitalizados o con tratamiento de medicamentos inmunosupresores, antibióticos de amplio espectro y radioquimioterapias).

Es importante destacar que, a pesar de que algunas especies de levadura fueron incluidas en QPS por EFSA, ciertas cepas de las especies *D. hansenii* (*C. famata*), *K. marxianus* (*C. kefir*), *Pichia membranifaciens* (*C. valida*), *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), *S. cerevisiae*, *W. anomalus* (*C. pelliculosa*) y *Yarrowia lipolytica* (*C. lipolytica*) se han agregado a la lista de patógenos oportunistas (Fleet y Balia, 2006; Muñoz *et al.*, 2005). En cualquier caso, cuando los problemas infecciosos han sido atribuidos a levaduras no patógenas, los casos han sido considerados como nivel de bioseguridad I, siendo el nivel IV el más elevado (Sundh y Melin, 2011).

Sólo un número limitado de estudios ha analizado la virulencia potencial de las especies de levaduras que están presentes en alimentos y bebidas y que también están relacionadas con infecciones humanas (Pérez-Través *et al.*, 2021).

Por lo anteriormente expuesto, cuando se propone la búsqueda de levaduras con potencialidad probiótica, es primordial considerar aspectos de seguridad que

incluyan especificaciones como origen, identidad y ausencia de actividades/propiedades nocivas para la salud (FAO/OMS), entre otras.

Para que una cepa probiótica pueda integrarse a un producto alimenticio debe esencialmente tener el estatus GRAS, lo que implica que la cepa no debe presentar ningún efecto tóxico, alergénico ni patógeno. Los ingredientes GRAS se utilizan ampliamente como aditivos alimentarios y se mezclan en comestibles convencionales a gran escala en todo el mundo. La FDA destaca la consideración y el cumplimiento de diversas características de seguridad para garantizar a los consumidores que no hay toxicidad (Parker *et al.*, 2018).

En las levaduras, se sabe que la actividad hemolítica es un factor de virulencia que contribuye a la patogenicidad por ejemplo en las especies de *Candida* (Favero *et al.*, 2014). La actividad hemolítica podría ser responsable de la aparición de anemia y/o edema en el huésped (Fernandez-Pacheco *et al.*, 2021). Además, se ha informado que solo ciertas cepas de este género, aisladas de pacientes con patologías, producen esta actividad (Tsang *et al.*, 2007; Wibawa *et al.*, 2015).

Por otro lado, la enzima ureasa cataliza la degradación de la urea, lo que da como resultado la formación de amoníaco y ácido carbámico, este último sufre una hidrólisis espontánea a ácido carbónico y una segunda molécula de amoníaco (Rutherford, 2014). La presencia de esta actividad enzimática se considera un rasgo patogénico ya que, durante la infección, se cree que la producción de amoníaco da como resultado la alcalinización del tejido circundante y, en consecuencia, daño al tejido del huésped (Toplis *et al.*, 2020).

Según el CAA en el artículo 1389 - (Resolución Conjunta SPReI N° 261/2011 y SAGyP N° 22/2011) la cepa probiótica no debe ser riesgosa para la salud. La bacteria no deberá presentar o promover la translocación bacteriana, es decir no debe haber pasaje de bacterias del intestino más allá de los nódulos mesentéricos, en las concentraciones en que se encuentra en el alimento.

Otro aspecto relevante a evaluar es la resistencia a antibióticos, dado que la diseminación de microorganismos antibiótico-resistentes puede reducir las posibilidades terapéuticas en enfermedades infecciosas. El CAA considera necesario determinar la presencia de resistencia transferible genéticamente en

cepas que serán usadas para consumo humano. Cabe destacar que lo propuesto en el CAA es para bacterias probióticas, dado que varias cepas bacterianas presentan alta tasa de transferencia horizontal de genes, no así las levaduras. Además, bajo este contexto, resulta importante evaluar la susceptibilidad frente a diferentes agentes antibacterianos, así como antifúngicos.

Con respecto a la virulencia, su estudio suele requerir el uso de un organismo modelo animal, ya que juega un papel esencial en el campo de la investigación médica y biomédica. Desafortunadamente, la investigación realizada en ratones, ratas y otros mamíferos tiene serias limitaciones, incluidos costos medianos a altos, la necesidad de instalaciones, personal técnico especializado y preocupaciones sobre el uso de animales vertebrados en investigación relacionado con problemas de bioética. Además, los estudios con mamíferos pueden tardar varios meses dependiendo de la virulencia del microorganismo y la progresión de la enfermedad (Stempinski *et al.*, 2022). Para evitar esos problemas, muchos investigadores realizaron estudios, incluidos ensayos de virulencia, en modelos de invertebrados como la mosca de los frutos *Drosophila melanogaster*, el nemátodo *Caenorhabditis elegans* o las larvas de la polilla de la cera *Galleria mellonella*. Se ha demostrado que *G. mellonella* es un organismo modelo útil para probar la patogenicidad de múltiples especies de hongos (Pereira *et al.*, 2018; Maurer *et al.*, 2019). La ventaja de *G. mellonella* como huésped modelo es su flexibilidad para cambios en el protocolo de infección que permiten el estudio de variables no posibles en modelos de invertebrados, como la temperatura del huésped (Stempinski *et al.*, 2022).

Las larvas infectadas de *G. mellonella* se pueden incubar a temperatura ambiente, 30 °C y 37 °C. Este rango de temperatura es importante porque permite experimentos a la temperatura corporal de mamíferos. La larva de *G. mellonella* mide entre 2 y 3 cm de largo, un tamaño fácil de manipular. Además, dado que *G. mellonella* es relativamente fácil de infectar y almacenar en grandes cantidades, este modelo permite a los investigadores realizar exámenes de virulencia o supervivencia bajo varias condiciones, cepas o mutantes diferentes, antes de limitarlos para su uso en un modelo de ratón que requiere mucho tiempo y recursos (Mylonakis *et al.*, 2005; Firacative *et al.*, 2020). Es importante destacar que, a pesar de la divergencia evolutiva, el sistema inmunológico innato de *G. mellonella*

comparte similitudes con el de los mamíferos, lo que lo hace útil para estudiar las interacciones entre hongos y huéspedes humanos (Smith *et al.*, 2021).

El estudio de bioseguridad en cepas probióticas es esencial para garantizar la seguridad y la eficacia de estos bioproductos para el consumo humano, cumplir con las regulaciones pertinentes y mantener la confianza del consumidor en el mercado de probióticos. Es por ello que el **objetivo** de este capítulo fue examinar en primera instancia varios aspectos de bioseguridad *in vitro* en el *pool* inicial de levaduras de origen enológico como actividad hemolítica, ureasa y susceptibilidad a antibióticos, incluyendo levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, como parte del primer proceso de selección. En una segunda etapa de análisis de la bioseguridad *in vivo* se evaluó la virulencia a levaduras seleccionadas en modelo de *Galleria mellonella*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

El presente estudio evaluó 96 levaduras nativas aisladas de ambientes asociados a la elaboración del vino como: suelo, racimos y mostos de uva en diferentes etapas de fermentaciones espontáneas de cosechas de 1992, 1994, 2004 y 2011 (región de Cuyo, Argentina).

Las levaduras de las divisiones Ascomycetos y Basidiomycetos pertenecen a 25 especies diferentes, incluidas en los géneros *Candida* (6 aislamientos), *Cryptococcus* (3), *Debaryomyces* (3), *Hanseniaspora* (12), *Issatchenkia* (1), *Kluyveromyces* (5), *Metschnikowia* (12), *Pichia* (14), *Rodhotorula* (3), *Saccharomyces* (30), *Torulaspora* (1) y *Wickerhamomyces* (7) (Tabla 2.1).

En todos los ensayos de bioseguridad se empleó como control a la cepa de levadura probiótica comercial *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745.

Todas las cepas empleadas se identificaron previamente mediante ensayos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos convencionales según Kurtzman *et al.* (2011), y técnica molecular descrito por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999). Todos los aislamientos pertenecen a la Colección de Cultivos de Microorganismos Autóctonos del Instituto de Biotecnología, Facultad de Ingeniería – UNSJ, San Juan, Argentina.

Tabla 2.1: Especies, cantidad y nomenclatura de aislamientos de levaduras autóctonas empleados en el presente estudio

Espece	Aislamientos autóctonos	Nomenclatura
<i>Candida famata</i>	2	PB1, PB2
<i>Candida membranaefaciens</i>	2	PB4, PB5
<i>Candida sake</i>	1	PB6
<i>Cryptococcus albidus</i>	1	PB8
<i>Cryptococcus magnus</i>	2	PB9, PB10
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1	PB11
<i>Debaryomyces vanriijae</i>	2	PB12, PB13
<i>Hanseniaspora sp</i>	1	PB14
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	3	PB15, PB16, PB17
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	5	PB19, PB 20, PB21, PB22, PB23
<i>Hanseniaspora vineae</i>	3	PB24, PB25, PB26
<i>Issatchenkia orientalis</i>	1	PB27
<i>Kluyveromyces sp</i>	2	PB28, PB29
<i>Kluyveromyces lactis</i>	2	PB30, PB31
<i>Kluyveromyces maxianus</i>	1	PB32
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	12	PB33, PB34, PB35, PB36, PB37, PB38, PB39, PB40, PB41, PB42, PB43, PB44
<i>Pichia fabiani</i>	1	PB45
<i>Pichia kluyveri</i>	2	PB46, PB47
<i>Pichia kudriavzevii</i>	7	PB48, PB49, PB50, PB51, PB52, PB53, PB100
<i>Pichia manshurika</i>	1	PB54
<i>Pichia occidentalis</i>	3	PB56, PB57, PB58
<i>Rhodotorula glutinis</i>	2	PB59, PB60
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	PB61
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	PB62, PB63, PB64, PB65, PB66, PB67, PB68, PB69, PB70, PB71, PB72, PB73, PB74, PB75, PB76, PB77, PB78 PB79, PB80, PB81, PB82, PB83, PB84, PB85, PB86, PB87, PB88, PB89, PB90, PB101
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	1	PB92
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	7	PB93, PB94, PB95, PB96, PB97, PB98, PB99
Total	96	

*PB: levadura candidata a probiótico

Los microorganismos patógenos *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 y *Shigella sonnei* ATCC® 9290 se utilizaron como controles positivos para la evaluación de la actividad hemolítica y ureasa, respectivamente. Estas cepas

fueron proporcionadas por la American Type Culture Collection ATCC (Rockville, MD, EE. UU.).

Todos los microorganismos se conservaron criogénicamente a -80 °C. Las levaduras se propagaron en caldo YEPD (g/L: extracto de levadura 10, peptona 20, glucosa 20) y las bacterias en caldo nutritivo, CN (g/L: pluripeptona 5, extracto de carne, 3) durante 24 h, previo a cada ensayo experimental.

Evaluación de la bioseguridad

Actividad hemolítica

Se inoculó 5 µL de suspensión de levadura de forma puntual en medio de agar sangre, suplementado con un 5 % de sangre de oveja desfibrinada e incubaron durante 48 h a 37 °C (Lara-Hidalgo *et al.*, 2019). La actividad hemolítica se evidenció por el desarrollo de zonas claras o verdoso alrededor de las colonias. Se examinaron las placas en busca de signos de α -hemólisis (zonas de tonos verdes alrededor de las colonias) y β -hemólisis (zonas claras alrededor de las colonias) (Bonatsou *et al.*, 2018).

Actividad ureasa

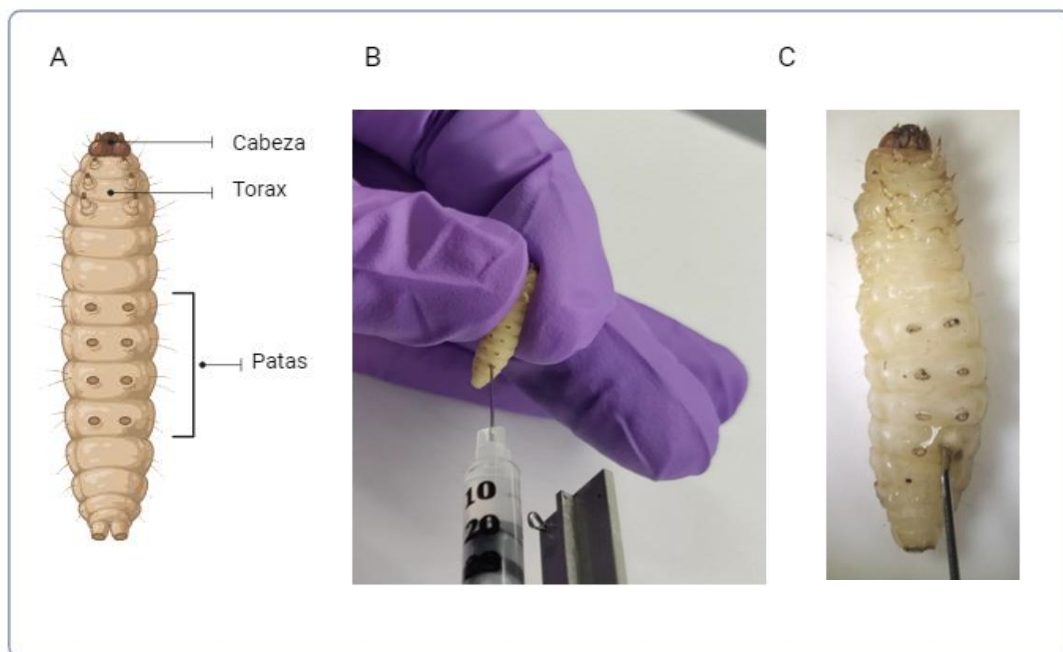
Se evaluó utilizando el medio Christensen según el método de Seeliger (1956) con modificaciones. El medio agar base urea consta de los siguientes componentes (g/L): peptona 10, glucosa 10, cloruro de sodio 5, dihidrogenofosfato de potasio 2, rojo fenol 0,012, agar 15; El pH final fue de $6,8 \pm 0,2$. El medio (2,85 ml) se dispensó en tubos de ensayo y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Cada tubo del medio tratado en autoclave se complementó con 0,15 ml de una solución de urea filtrada al 40 %. Se dejó que el contenido solidificara con los tubos mantenidos en posición inclinada. Se estrió un inóculo de levaduras previamente activadas en YEPD- Agar (24 a 48 h, 28 ± 1 °C) con un ansa en la superficie del medio en cultivo inclinado. Luego los tubos se incubaron a 37 ± 1 °C durante 18 a 24 h. La hidrólisis de la urea se demostró mediante un cambio de color distintivo del indicador de amarillo-anaranjado a rojo-rosado intenso.

Susceptibilidad a los antibióticos

Para determinar la sensibilidad a los antibióticos se utilizó el método de difusión en agar. Los agentes antibacterianos utilizados fueron (a concentraciones de $\mu\text{g/mL}$): ampicilina 25, gentamicina 10, levofloxacina 10, rifampicina 20, tetraciclina 80, cloranfenicol 60; y los antimicóticos ($\mu\text{g/mL}$) evaluados fueron: ketoconazol 50, clotrimazol 10, fluconazol 10, itraconazol 10, miconazol 50, nistatina 100. Cada levadura, previamente activada, se inoculó (1×10^7 UFC/mL) en YEPD- agar para formar un césped. Se perforaron pocillos ($\approx 5,5$ mm) en el agar y se añadieron a los pocillos 50 μL de cada antibiótico. Posteriormente, las placas se incubaron durante 48 h a 37 ± 1 °C, según Amorim *et al.* (2018) con modificaciones. La sensibilidad se detectó mediante la formación de halos de inhibición uniformes alrededor del pozo y se cuantificó con un calibre digital. Los halos se compararon contra puntos de corte para definir susceptibilidad o resistencia. Se seleccionaron los aislamientos que fueron susceptibles al menos a 3 antifúngicos.

Evaluación de patogenicidad *in vivo* utilizando *Galleria mellonella*.

Las larvas de *G. mellonella* en estadio larval 6 (obtenidas del Laboratorio de Centro de Multiplicación de Agentes de Biocontrol Nativos, INTA, Alto Valle) se incubaron a 20 ± 1 °C en condiciones de oscuridad (Pérez-Través *et al.*, 2021). Las larvas utilizadas en el ensayo registraron un peso promedio de $0,22 \pm 0,03$ g y se utilizaron dentro de los 3 días posteriores a la recepción. Para cada levadura se seleccionaron aleatoriamente 10 larvas por placa, 2 repeticiones por levadura con viruta de madera.



Created in BioRender.com 

Figura 2.1: Infección de larvas. (A) Ilustración del modelo de larva de *G. mellonella* con indicación de las partes anatómicas principales. (B) Foto que ilustra el lugar de inyección de la suspensión de células de levaduras en la base de la pata de la larva. (C) Foto de primer plano del lugar de la inyección. Gráfico creado con BioRender.com

Cada larva se inoculó intradérmicamente (1×10^6 UFC/mL) en la última pata izquierda utilizando una jeringa de subdérmica de 1 mL y se administraron 20 μ L de la suspensión de levaduras (Figura 2.1). Las larvas se aclimataron a 30 ± 1 °C durante 1 h antes de realizar todos los experimentos y luego se incubaron a 30 ± 1 °C en oscuridad durante 72 h. La supervivencia se registró a las 24, 48 y 72 h y se confirmó visualmente y mediante estimulación física utilizando la punta de una pipeta estéril (Pérez-Través *et al.*, 2021).

Para el control positivo, las larvas fueron inoculadas con 20 μ L de la cepa patógena *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, en la misma concentración que las levaduras de prueba. Para el control negativo, las larvas fueron inoculadas con 20 μ L de PBS estéril.

El porcentaje de supervivencia se calculó como:

$$\% \text{ supervivencia} = (\text{N}^\circ \text{ larvas iniciales} - \text{N}^\circ \text{ larvas muertas} / \text{N}^\circ \text{ larvas iniciales}) * 100$$

Análisis de los datos

Cada ensayo se realizó independientemente por triplicado y los resultados representan la media de las tres determinaciones con la correspondiente desviación estándar ($\pm$ SD). Para analizar y graficar los datos cualitativos experimentales se utilizó el programa Graphpad Prism 9.4.1.

RESULTADOS

Actividad hemolítica, ureasa y susceptibilidad a antibióticos.

Ninguna de las cepas de levadura evaluadas en el presente estudio fueron susceptibles a los antibacterianos ni mostraron actividad hemolítica α o β (Figura 2.2). En cuanto a la actividad ureasa, el 9,3 % (PB1, 4, 24, 25, 61, 70, 71, 73, 81) del total de aislamientos fueron positivos y, por lo tanto, fueron retirados del estudio (Figura 2.2). En cuanto a la susceptibilidad antifúngica, el 61,45 % de los aislamientos fueron sensibles al menos a 3 agentes. El antifúngico más eficaz fue la nistatina, con el 97,89 % de los aislamientos sensibles, seguido del miconazol, con el 93,68 % de las cepas sensibles. El fluconazol fue el antifúngico menos eficaz, con sólo el 26,31 % de los aislamientos mostraron sensibilidad. Los aislamientos con sensibilidad a todos los azoles analizados fueron PB6, 9, 21, 31, 51, 58, mientras que los aislamientos PB 13 y 77 fueron los más resistentes (a >4 azoles).

En general, los aislamientos de *M. pulcherrima* fueron los más susceptibles (a 5 o más de los antifúngicos ensayados). Por otro lado, la mayoría de los aislamientos de *Saccharomyces* fueron resistentes al menos a 4 agentes antifúngicos. Los resultados indican que las levaduras analizadas mostraron una amplia variabilidad con respecto a la susceptibilidad y resistencia a los antifúngicos, lo que indica una característica dependiente de la cepa (Figuras 2.2 y 2.3).

Sobre la base de los resultados de los ensayos *in vitro*, se seleccionaron 66 aislamientos que mostraron actividad hemolítica y ureasa negativa y que además fueron susceptibles al menos a 3 antifúngicos para realizar los ensayos *in vivo* con larvas de *Galleria mellonella*.



Figura 2.2: (A) Placa de agar sangre, (Ps) representa el control positivo. (B) Tubos con medio Cristensen, levaduras 61 y 4 con actividad ureasa positiva. Levaduras 57 y 18 con actividad ureasa negativa. (C) Ensayo de susceptibilidad a antifúngicos.

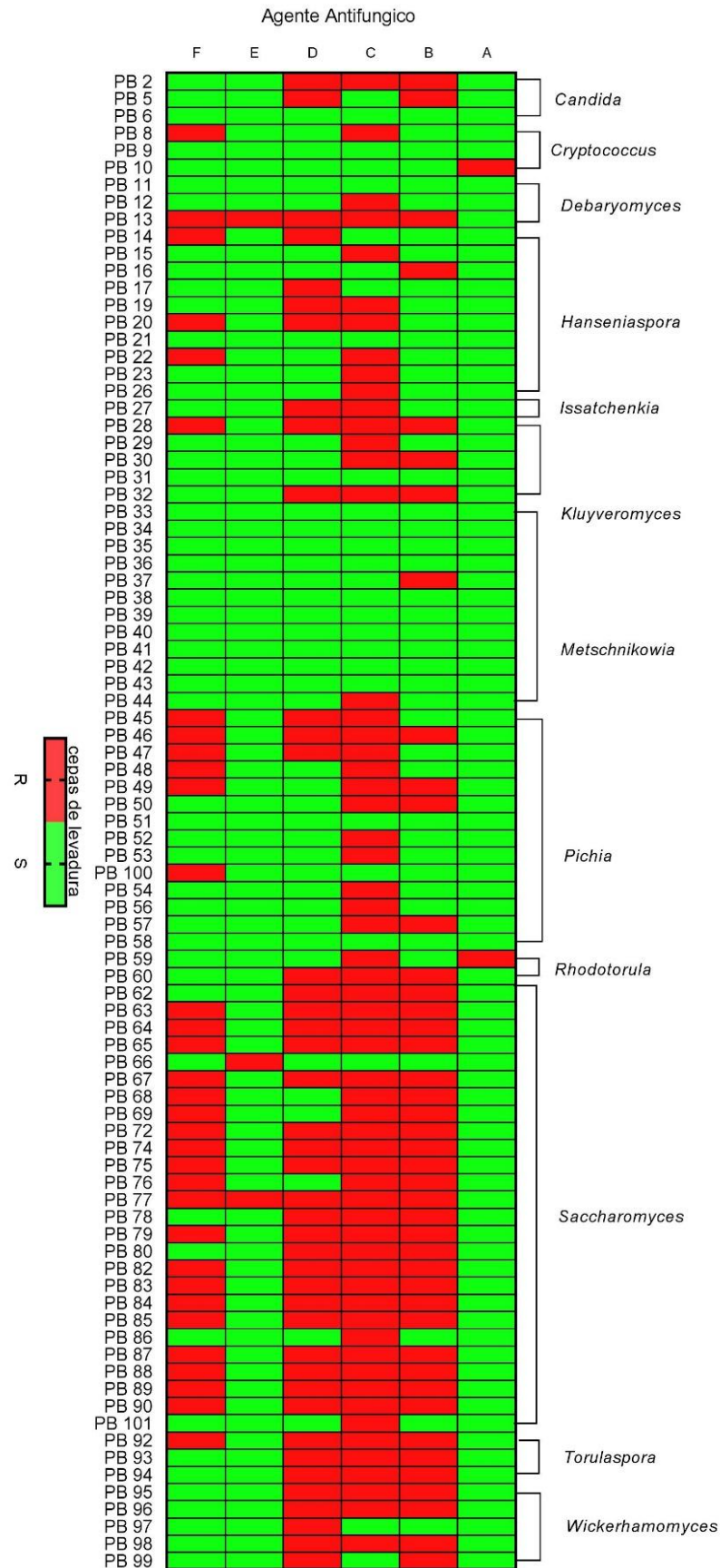


Figura 2.3: Resistencia (R) y sensibilidad (S) de los aislamientos de levadura ensayados frente a diferentes antifúngicos, nistatina (A), intraconazol (B), fluconazol (C), clotrimazol (D), miconazol (E), ketoconazol (F).

Evaluación de patogenicidad mediante el modelo *in vivo* de larvas de *Galleria mellonella*

La evaluación de patogenicidad en los 66 aislamientos seleccionados en larvas de *Galleria mellonella*, mostraron porcentajes de supervivencia del 100% en las todas las levaduras ensayadas, a excepción de *Pichia kudriadzevii* (PB100), que registró una tasa de supervivencia del 94,4%, dado que sobrevivieron 19 de las 20 larvas inoculadas con la levadura.

La Figura 2.4 muestra el estado de las larvas, control negativo, control positivo y larva inoculada con *W. anomalous* PB97. Además, en las placas de Petri también se puede visualizar el contenedor de las larvas del grupo PB97.



Figura 2.4: Ensayo de patogenicidad utilizando larvas de *Galleria mellonella*. De izquierda a derecha: en el primer cuadro se pueden observar larvas de diferentes grupos con un aumento de estereoscopio de 40X. En el segundo recuadro se puede observar un grupo de larvas pertenecientes a un mismo grupo. Referencias: A) Larva perteneciente al control positivo, en fase de muerte inoculada con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, B) Larva perteneciente al control negativo, inoculada con solución salina estéril (NaCl al 0,9%), C) Larva perteneciente al estudio PB97 D) Placa con 10 larvas pertenecientes al grupo de estudio PB97.

DISCUSIÓN

Las pruebas de bioseguridad son cruciales porque cualquier aislamiento de levadura puede ser un patógeno potencial, especialmente contra personas inmunodeprimidas (Fleet y Balia, 2006; Fernandez – Pacheco *et al.*, 2021).

Como se mencionó anteriormente los antibacterianos ensayados para evaluar susceptibilidad no presentaron resultados positivos en las levaduras analizadas debido a la capacidad intrínseca de resistir la mayoría de los antibióticos comunes, lo que las convierte en grandes candidatos para combinarse en terapias antibacterianas (Dubreuil *et al.*, 2017)

Dado que la mayoría de los microorganismos probióticos comerciales son bacterias, las levaduras probióticas presentan una ventaja para ser empleadas en pacientes que llevan tratamientos con antibacterianos, ya que su viabilidad y propiedades probióticas permanecerían intactas. Además, la transferencia de material genético entre bacterias patógenas del tracto gastrointestinal y levaduras es un evento bastante raro, lo que hace que el uso de levaduras sea más seguro durante el tratamiento con antibióticos (Czerucka *et al.*, 2007; Daniali *et al.*, 2020, Lara-Hidalgo *et al.*, 2017).

Numerosos estudios se han centrado en el potencial probiótico de aislamientos de los géneros *Candida*, *Pichia*, *Wickerhamomyces* y *Saccharomyces* (Chelliah *et al.*, 2016, Di Cagno *et al.*, 2020). Sin embargo, algunos autores han planteado dudas sobre la seguridad de determinadas especies de estos géneros dado que podrían ser patógenos oportunistas responsables de la morbilidad y mortalidad en individuos inmunocomprometidos (De Llanos *et al.*, 2006, Fleet y Balia, 2006). Por lo que examinar la susceptibilidad de las levaduras a antifúngicos de amplio espectro para controlar una posible fungemia, es necesario.

El género *Saccharomyces* es uno de los géneros más estudiados y que presentan más aptitudes para la búsqueda de posibles candidatos probióticos en muchos estudios. Sin embargo, nuestros resultados muestran que es el género dentro del *pool* inicial con mayor número de cepas con alta resistencia antifúngica a los agentes azólicos ensayados. Lim *et al.* (2019) informaron que la

susceptibilidad reducida a la mayoría de los agentes azoles, especialmente al fluconazol, puede ser inherente al género *Saccharomyces*.

Para evaluar la patogenicidad de posibles levaduras probióticas, se llevó a cabo un estudio *in vivo* utilizando el modelo invertebrado *G. mellonella*. En los últimos años, ha habido un aumento en el número de estudios que evalúan la toxicidad de posibles cepas probióticas en larvas como modelo de invertebrado, tanto en bacterias (Wang *et al.*, 2020) como en levaduras (Perez-Traves *et al.*, 2021), aunque con menor frecuencia. *G. mellonella* es un modelo de infección invertebrado que resulta atractivo como sistema experimental para estudiar la patogénesis fúngica debido a su facilidad de uso, bajo costo, experimentos de alto rendimiento en comparación con las investigaciones en vertebrados de orden superior (por ejemplo, ratones, conejos, primates no humanos, etc.) (Smith y Casadevall, 2021). Asimismo, el uso de *G. mellonella* está en línea con iniciativas para minimizar y optimizar las investigaciones en animales vertebrados, al tiempo que se maximiza el bienestar de los mismos (Clark, 2018). Aunque existen inconvenientes en el uso de *G. mellonella*, como su falta de inmunidad adaptativa, existen estudios que sostienen que los sistemas inmunes innatos antifúngicos de los ratones y *G. mellonella* son comparables (Smith y Casadevall, 2021). De acuerdo a Smith y Casadevall, (2021), la literatura indica en gran medida que los factores de virulencia fúngica tienen roles comparables y superpuestos en los huéspedes mamíferos y *G. mellonella*, lo que sugiere que los estudios con *G. mellonella* pueden ser trasladables a mamíferos.

En este estudio, se evaluó inicialmente la concentración de 1×10^6 UFC/mL ya que algunos informes indican que esta es la concentración mínima a la que las levaduras probióticas deben llegar al sitio de acción (Staniszewski y Kordowska-Wiater, 2021; Lai *et al.*, 2024). En condiciones similares, Tran *et al.* (2023) ensayaron la patogenicidad de levaduras probióticas a diferentes concentraciones (10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8) e informaron una disminución en la viabilidad larval (o sea incremento de toxicidad y, por tanto, patogenicidad) a medida que aumentaba la concentración de levaduras. Cuando la concentración evaluada fue de 10^6 UFC/mL de *Pichia kudriadzevii*, el 100% de las larvas sobrevivieron, lo cual concuerda con los resultados alcanzados en el presente estudio. En otro trabajo realizado por

Maione *et al.* (2014), evaluaron un aislamiento de *P. kudriavzevii*, a diferentes concentraciones y sus resultados también coincidieron con los del presente estudio, indicando que dosis inferiores a 10^6 UFC/larva, eran seguras y al aumentar las concentraciones había reducción de la supervivencia. Por otro lado, Pérez-Travis *et al.* (2021) evaluaron *W. anomalous* a tres concentraciones (10^6 , 10^7 y 10^8 UFC/mL) y a cuatro temperaturas (28, 37, 39 y 42°C). En línea con los resultados obtenidos en este trabajo, con una concentración de 1×10^6 UFC/mL a 30°C, informaron una supervivencia del 100%, pero no se observó el mismo resultado a concentraciones más altas. En la bibliografía, no se han encontrado informes que estudien la patogenicidad *in vivo* en modelo de invertebrado de *G. mellonella* de posibles probióticos en levaduras de *S. cerevisiae* y *H. guilliermondii*. Aunque se han realizado estudios sobre este análisis en *P. kudriavzevii*, no se ha reportado sobre aislamientos de *P. manshuriana* y *P. occidentalis*. Por tanto, este estudio adquiere relevancia ya que forma parte de los primeros reportes para las cepas de estas especies en este modelo de invertebrado.

CONCLUSIÓN

Con respecto a las características para determinar si una cepa presenta propiedades probióticas, se determinaron las siguientes propiedades de bioseguridad:

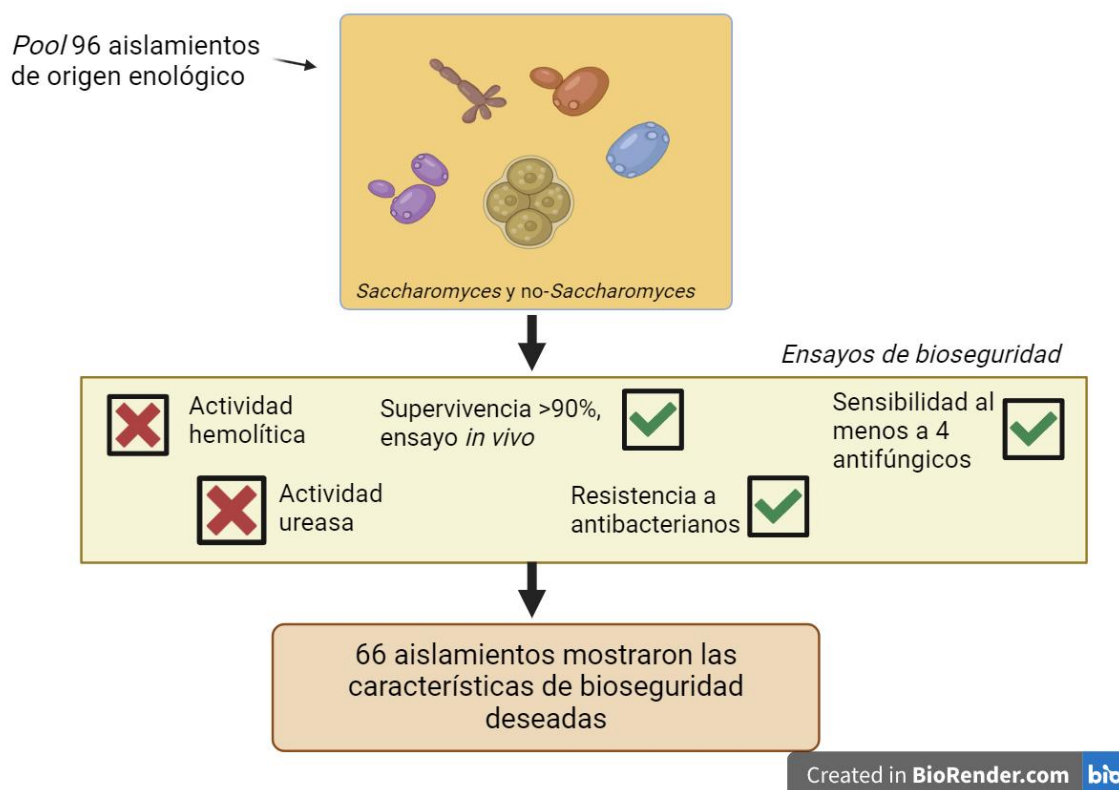
Sesenta y seis aislamientos de levaduras registraron las características de bioseguridad deseadas: actividad hemolítica negativa, actividad ureasa negativa, resistencia a antibacterianos y susceptibilidad a 3 o más antifúngicos. Con respecto al ensayo *in vivo*, se observó más del 90% de supervivencia de las larvas de *G. mellonella* evaluadas frente a las levaduras seleccionadas.

Por lo tanto, estos aislamientos se seleccionaron para continuar con otra etapa de ensayos cruciales para evaluar la potencialidad probiótica.

CAPÍTULO 3

TOLERANCIA A CONDICIONES DEL TRACTO GASTROINTESTINAL

Teniendo en cuenta los resultados del capítulo 2, en el siguiente esquema se resumen las características de bioseguridad que presentaron las cepas seleccionadas.



INTRODUCCIÓN

El potencial probiótico de las levaduras merece ser explorado por diversas razones. En primer lugar, aunque la levadura sólo representa <0,1% de la microbiota en el tracto gastrointestinal, el tamaño de las células de la mayoría de las levaduras es al menos 10 veces mayor que el de las bacterias (Pflughoeft y Versalovic, 2012; Huffnagle y Noverr, 2013). Por tanto, representar un importante obstáculo físico para las bacterias, ya que podría conformar una barrera entre las bacterias patógenas y las células epiteliales del intestino. En segundo lugar, la composición de la pared celular de levaduras y bacterias son diferentes y son reconocidas por diferentes receptores de reconocimiento de patrones, por lo que puede explicar las diferentes respuestas de estos microorganismos como "inmunomoduladores" (Janeway y Medzhitov, 2002). Las diferencias en las condiciones óptimas de crecimiento con respecto al pH y la temperatura de la

levadura (4,5 a 6,5; 20 a 30 °C) y las bacterias (6,5 a 7,5; 10 a 80 °C) también las hacen activas en diferentes sitios del tracto gastrointestinal (Czerucka *et al.*, 2007). Algunas especies de levadura incluso pueden tolerar condiciones altamente ácidas con un pH tan bajo como 1,5 y, por lo tanto, son candidatos prometedores como probióticos. Como se mencionó anteriormente, un punto importante es que la levadura no es afectada por los antibióticos antibacterianos y, una característica significativamente destacable es que la transmisión horizontal de material genético ocurre muy escasamente en levaduras (Czerucka *et al.*, 2007; Serero *et al.*, 2018). Por tanto, teniendo esto en cuenta la levadura con potencialidad probiótica serían seguras en combinación con tratamientos con agentes antibacterianos en aquellos casos particulares de gastroenterocolitis agudas o alteraciones gastrointestinales (Czerucka *et al.*, 2007; Daniali *et al.*, 2020).

Una nueva tendencia en la microbiología de alimentos es el uso de microorganismos multifuncionales como, por ejemplo, implementar el uso de cultivos iniciadores en procesos fermentativos con alguna actividad que le aporte beneficios al consumidor (propiedades probióticas) (Perricone *et al.*, 2014). En cuanto a las levaduras probióticas, *S. cerevisiae* var. *boulardii* (*Saccharomyces boulardii*) una de las cepas más populares respaldada por un marco normativo, aceptada comercialmente y disponible en varias fórmulas probióticas para humanos en todo el mundo (Czerucka *et al.*, 2007; Di Cagno *et al.*, 2020). Dentro del grupo no-*Saccharomyces*, Quarella *et al.* (2016) reportaron *Kluyveromyces marxianus fragilis* B0399 como la primera levadura aprobada como probiótico para alimentación animal y consumo humano según EFSA (2004), Ministerio de Ila Salute (2016). Por lo tanto, es de creciente interés evaluar propiedades funcionales adicionales en levaduras previamente evaluadas y seleccionadas con rasgos probióticos (Gil-Rodríguez *et al.*, 2015).

Las levaduras se utilizan en biotecnología para diferentes propósitos como producción de alimentos y bebidas fermentadas, síntesis de proteínas y vitaminas recombinantes y control biológico (García-Hernández *et al.*, 2012; Hatoum *et al.*, 2012). Particularmente en la industria alimentaria, se está explorando cada vez más las cepas de especies distintas de *Saccharomyces* para implementarse como

iniciadores en la producción de diversos alimentos y bebidas como pan, vino, cerveza, kéfir, koumiss, entre otros (Arroyo-López *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2011) o implementándolas para la maduración de quesos o para aportar propiedades organolépticas distintivas a aceitunas de mesa (Binetti *et al.*, 2013). Las levaduras no-*Saccharomyces* (no convencionales), representan una interesante alternativa industrial para el desarrollo de nuevos productos (Holt *et al.*, 2018; Steensels y Verstrepen, 2014) ya que estas podrían brindar propiedades distintivas para la industria.

Tal como se mencionó previamente, en el caso particular de la fermentación del mosto de uva en vino, las levaduras están expuestas a una combinación de estreses (osmótico, ácido, falta de nutrientes, toxicidad del etanol) que actúan de forma individual o sinérgica, lo que potencialmente conduce a una diferenciación adaptativa (Marsit y Dequin, 2015). La tolerancia a condiciones hostiles de elaboración del vino (con algunas similitudes con las del tracto gastrointestinal) junto con similitudes estructurales y funcionales con otros probióticos convencionales, hacen de las levaduras enológicas potenciales candidatos probióticos para ejercer efectos beneficiosos sobre la salud humana.

Uno de los principales factores a los que están expuestas las levaduras del ambiente vitivinícola es la temperatura. Durante la maduración de la uva la microbiota presente en la pruina está expuesta a temperaturas que pueden alcanzar los 46-47 °C. Posteriormente, cuando las uvas se someten a fermentación los rangos de temperatura son generalmente controlados, siendo los óptimos para el caso de las vinificaciones en tinto entre 18 y 25 °C y para las vinificaciones en blanco entre 10 y 18 °C. Sin embargo, se conoce que durante la fermentación natural de los azúcares en alcohol puede elevarse la temperatura del mosto de uva a más de 40 °C (Rankine, 2007).

Para evaluar las aptitudes de ciertas cepas para ser consideradas probióticas debe realizarse una evaluación preliminar *in vitro* (Araya *et al.*, 2002). Los criterios adoptados por la mayoría de los estudios para la selección de levaduras son esencialmente los establecidos para las bacterias (de Melo Pereira *et al.*, 2018). Esta evaluación tradicionalmente ha prestado especial atención al origen ecológico

de las cepas, su tolerancia a las condiciones hostiles del tránsito gastrointestinal y su capacidad para adherirse a las superficies intestinales (Salminen *et al.*, 1998; de Melo Pereira *et al.*, 2018) (tópicos a desarrollarse en el siguiente capítulo). En el momento de la administración, el probiótico debe ser resistente a las enzimas presentes en la cavidad bucal, como la amilasa y la lisozima. Después de la ingestión, las células probióticas se enfrentan a factores antimicrobianos en el estómago (pH bajo, jugo gástrico y pepsina) y en los intestinos (pancreatina y sales biliares), así como a un leve choque térmico provocado por la temperatura interna del cuerpo (de Melo Pereira *et al.*, 2018).

Para comprender adecuadamente las condiciones a las que se someterán los candidatos probióticos, es esencial entender el mecanismo de la digestión de los alimentos. Aunque la forma de administrar los probióticos puede variar, es inevitable que superen las condiciones del tracto gastrointestinal para llegar a su sitio de acción en cantidades adecuadas y ejercer así el efecto beneficioso que puedan aportar.

El ambiente gástrico

La digestión es el proceso que degrada las sustancias alimentarias en nutrientes (por ejemplo, fitoquímicos, micronutrientes y macronutrientes) para liberarlos en el torrente sanguíneo (Li *et al.*, 2020). Este proceso comprende digestión mecánica y química. La digestión mecánica descompone las sustancias alimentarias en pequeñas partículas, como prelude de una digestión química eficaz (Camilleri, 2006), mientras que la digestión química es responsable de catabolizar otras moléculas de alimentos a través de diversas enzimas digestivas, para absorberlas en el torrente sanguíneo (Bienvenido, 2018). El bolo alimenticio resultante de la digestión oral es transportado por la peristalsis esofágica al estómago, que tiene cuatro funciones motoras principales: almacenamiento, mezcla, trituración y vaciado (Figura 3.1). El estómago proximal (fondo y cuerpo), actúa principalmente como depósito de material no digerido, mientras que el estómago distal (antro) es el triturador, mezclador y tamizador de alimentos sólidos. El antro también realiza el vaciado gástrico de sólidos mediante acciones propulsoras, permitiendo el pasaje del quimo al duodeno (Kong y Singh, 2008).

La mucosa gástrica contiene dos glándulas, las llamadas glándulas oxínticas y pilóricas, asociadas con la digestión química (Carlson, 2019). Sus células parietales producen ácido clorhídrico (HCl; 160 mmol/L, pH 0,8) (Herdt, 2020). El HCl es importante para eliminar los microorganismos patógenos ingeridos junto con alimentos sólidos y líquidos (Schubert, 2003) y para activar la pepsina del zimógeno pepsinógeno, que es secretado por las células principales de las glándulas oxínticas (Carlson, 2019). Otra función intrínseca del HCl es la desnaturalización de proteínas, para facilitar la digestión enzimática por la pepsina.

La pepsina descompone los enlaces peptídicos de las proteínas al pH óptimo de 2 a 3 en aminoácidos individuales, que se liberan en el torrente sanguíneo (Camilleri, 2006; Carlson, 2019). Las glándulas pilóricas se encuentran en el antro del estómago (Schubert, 2017). Secretan la hormona gastrina secretada por sus células G enteroendocrinas, que actúan para inducir la producción de HCl (Herdt, 2020; Schubert, 2017). Además, el moco secretado por las células mucosas de las glándulas pilóricas juega un papel importante en la protección de la superficie gástrica del medio ácido del estómago (Berín *et al.*, 2014).

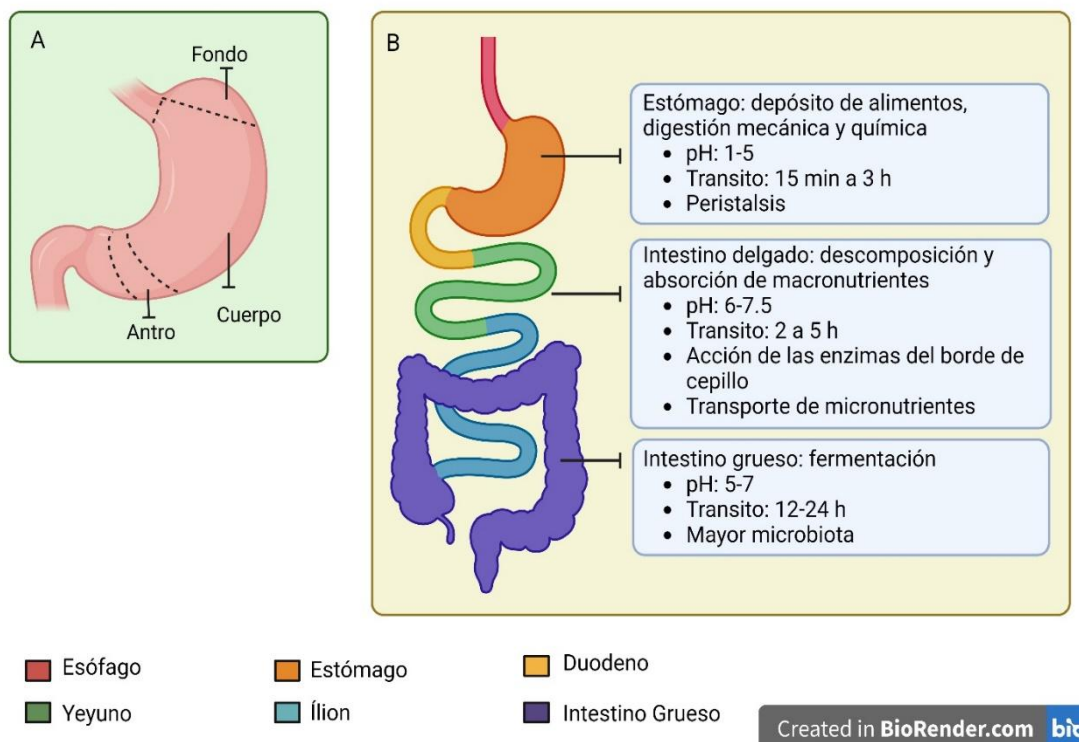


Figura 3.1: (A) Anatomía del estómago. (B) Partes del tracto gastro intestinal, principales características y funciones. Anatomía del intestino. Creado con BioRender.com

El ambiente intestinal

La digestión de los alimentos continúa en el intestino delgado después de la digestión gástrica. El intestino delgado tiene dos funciones principales en la digestión y la absorción, es decir, la descomposición de macromoléculas y la absorción de agua y nutrientes. Anatómicamente incluye duodeno, yeyuno e íleon (Li *et al.*, 2020). La mayor parte de la digestión ocurre en el duodeno, mientras que los nutrientes digeridos se absorben en el yeyuno y el íleon. Las enzimas pancreáticas (una mezcla compleja de proteasas, amilasas y lipasas) y otras enzimas digestivas producidas por la pared interna del intestino delgado actúan juntas en la descomposición de los componentes de los alimentos. Además, el páncreas secreta bicarbonato al duodeno para mantener el pH del intestino delgado entre 6 y 7, lo que es adecuado para que estas enzimas digieran grasas, carbohidratos y proteínas (Li *et al.*, 2020) (Figura 3.1).

Específicamente, los glúcidos o carbohidratos se digieren en monosacáridos (glucosa, fructosa y galactosa), las proteínas en dipéptidos, tripéptidos y aminoácidos, y los lípidos en ácidos grasos libres, colesterol y 2-monoglicéridos antes de la absorción (CampPBell *et al.*, 2019). La bilis producida por la vesícula biliar también ingresa al duodeno y desempeña un papel específico en la digestión de los lípidos al emulsionar las grasas de la dieta en pequeñas gotas, promoviendo así la actividad de la lipasa pancreática. La mayoría de las sales biliares se reabsorben activamente en el íleon y se reutilizan en la bilis mediante el ciclo enterohepático.

Mientras que, el agua y los nutrientes son absorbidos por los enterocitos de las vellosidades mediante difusión simple, difusión facilitada (agua) o transporte activo (nutrientes). Esto evita la acumulación de productos de la digestión en la luz del intestino delgado, lo que podría inhibir las actividades enzimáticas. De esta manera, el quimo se transporta a través de los intestinos mediante segmentación y contracciones de los músculos peristálticos, que se regulan mediante una combinación de factores miógenos, neurales y hormonales (CampPBell *et al.*, 2019).

Probióticos en alimentos

En Argentina, según el CAA Artículo 1389 - (Resolución Conjunta SPReI N° 261/2011 y SAGyP N° 22/2011), para que una cepa pueda ser empleada como probiótico en alimentos, debe cumplir con los requisitos mínimos del protocolo de evaluación que incluye: • Resistencia gástrica a 37°C; • Resistencia a bilis y • Resistencia a lisozima. Este último requerimiento mínimo es opcional, y, como las lisozimas no afectan a las levaduras (Fakruddin *et al.*, 2017) puede ser desestimado.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de este capítulo es evaluar la tolerancia a las condiciones del tracto gastrointestinal (por separado) in vitro de las 66 levaduras pre-seleccionadas por cumplir con el requisito de ser bioseguras (capítulo 2), de acuerdo con los ensayos in vitro e in vivo para el consumo. Aquellas levaduras que presentaron las mejores aptitudes de tolerancia se seleccionaron para ser sometidas a estudios de supervivencia a las condiciones del tracto gastrointestinal simulado y conocer su comportamiento bajo factores de estrés sucesivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

De acuerdo a lo expuesto en el capítulo 2, los aislamientos de levaduras fueron seleccionados por los siguientes parámetros de bioseguridad:

Actividad hemolítica y ureasa negativa, resistencia a antibacterianos (ampicilina 25, gentamicina 10, levofloxacina 10, rifampicina 20, tetraciclina 80, cloranfenicol 60µg/mL) y sensibilidad al menos a 4 antifúngicos ensayados (ketoconazol 50, clotrimazol 10, fluconazol 10, itraconazol 10, miconazol 50, nistatina 100 µg/mL). Supervivencia mayor a 90% de larvas de *G. mellonella*.

Como resultado se obtuvo un total de 66 aislamientos con las características de bioseguridad deseadas.

Todos los microorganismos se conservaron criogénicamente a -80 °C. Las levaduras se propagaron en caldo YEPD (g/L: extracto de levadura 10, peptona 20, glucosa 20) previo a cada ensayo experimental.

Resistencia al tracto gastrointestinal (TGI)

Tolerancia a la temperatura

Las levaduras fueron inoculadas en solución fisiológica (NaCl 0,9 g/L) y agitadas a 100 rpm durante 48 h a 28 °C para agotar las reservas nutricionales. Para este ensayo se utilizó la metodología propuesta por Gut *et al.* (2018) con modificaciones. Las levaduras se inocularon puntualmente en YEPD- agar y se incubaron a 37 ±1 °C (temperatura corporal interna), 39±1 y 42±1 °C (estados febriles) durante 48 h. El crecimiento de la levadura se determinó en comparación con un control a 25 ±1°C (Ragavan y Das, 2017), sin crecimiento (-); con crecimiento (+); con buen crecimiento (++); con muy buen crecimiento similar a el control (+++).

Tolerancia a valores de pH bajos (acidez)

Las levaduras previamente activadas (1x10⁶ UFC/mL) se inocularon en caldo YEPD a pH 2, 3 y 4,6 (control), y se incubaron a 100 rpm durante 4 h a 37 ±1 °C. Luego se inocularon las levaduras en YEPD agar después de 0 y 4 h. Los

recuentos de células viables (UFC/mL) se realizaron después de incubar a 48 h a 30 ± 1 °C.

La supervivencia se determinó de la siguiente manera:

$$\% \text{ supervivencia: } (\ln N^{\circ} \text{ UFC/ mL}_{\text{final}} / \ln N^{\circ} \text{ UFC/ mL}_{\text{inicial}}) * 100$$

Dónde:

- $\ln N^{\circ}$ inicial UFC/mL es el logaritmo natural del número inicial de Unidades Formadoras de Colonias
- $\ln N^{\circ}$ final UFC/mL es el logaritmo natural del número final de unidades formadoras de colonias

Tolerancia a la bilis

La tolerancia a la bilis se determinó según el método ecométrico modificado propuesto por Kociubinski *et al.* (1999). El ensayo se realizó en 5 estrías consecutivas en YGC- agar (g/L: extracto de levadura 5, D (+) glucosa 20, cloranfenicol 0,1, agar 20) (control positivo) YGC + 1 % de bilis- agar, utilizando un ansa de alambre de platino calibrado de 5 μ L, sin recarga ni esterilización por llama entre cada una de las 5 estrías. Las placas se incubaron durante 48 h a 37 ± 1 °C en condiciones anaeróbicas. Se comparó el crecimiento para cada estría realizada en el medio de cultivo YGC + 1 % de bilis- agar en comparación con el control YGC- agar (Figura 3.2). El grado de resistencia se cuantificó asignando un valor numérico al crecimiento positivo en cada estría realizada en bilis YGC- agar (1 para el crecimiento microbiano en la primera estría, 2 en la segunda estría, 3 en la tercera estría, 4 en la cuarta estría, y 5 en la quinta estría). La ausencia de crecimiento en YGC-bilis se registró como IR = cero. El índice de resistencia a la bilis, IR bilis, se calculó como la suma de los valores asignados a las 5 estrías. El IR_{bilis} oscila entre 0 y 15, donde el valor máximo indica un alto grado de resistencia de la bilis.

Se calculo con la siguiente formula:

$$IR_{\text{bilis}} = \sum N^{\circ} \text{ estría}$$

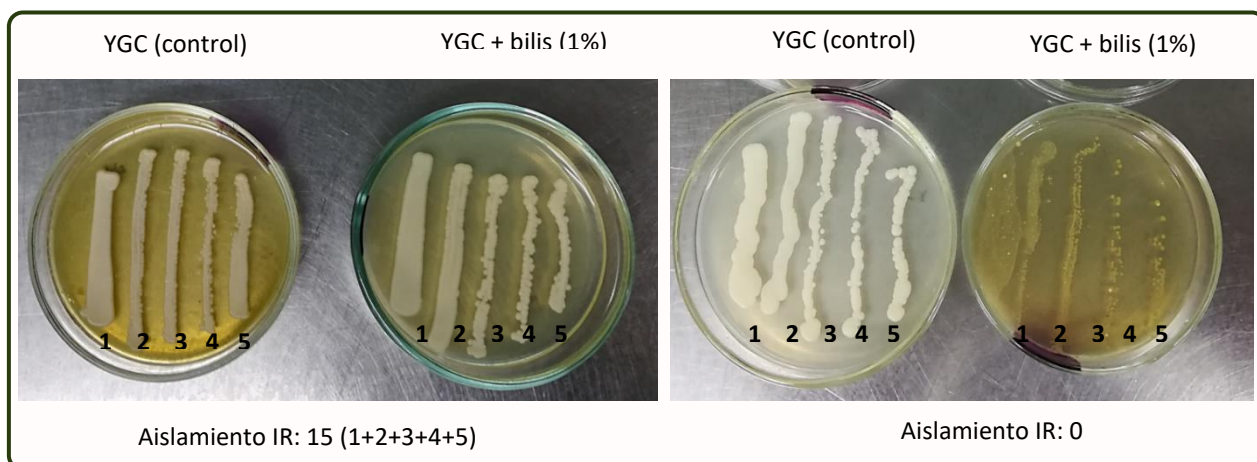


Figura 3.2: Ejemplos de índice de resistencia a la bilis (IR_{bilis}) igual a 15 (valor máximo) y 0

Paso por el tracto gastrointestinal simulado

Se realizaron simulaciones de digestión en condiciones gástricas (DG) y pancreáticas (DP) in vitro utilizando el método descrito por Zullo *et al.* (2019) con modificaciones. Para DG, se preparó un jugo gástrico sintético en una solución tampón a pH 2 que contenía (g/L): NaCl 2,05; KH_2PO_4 0,60; $CaCl_2$ 0,11 y KCl 0,37. Después de la esterilización del medio, se agregaron 0,0133 g/L de pepsina esterilizada por filtración (0,22 μm) para completar la solución gástrica. Los cultivos de levadura se activaron en caldo YEPD durante 48h a 30 °C. El sobrenadante se separó mediante centrifugación a 4600 rpm durante 10 min y el sedimento se lavó dos veces con una solución estéril de Buffer PBS. Posteriormente, las células de levadura se resuspendieron en 7 mL de solución gástrica y la concentración celular se ajustó a aproximadamente 1×10^8 UFC /mL. La solución gástrica se incubó durante 2,5 h a 37 °C con agitación constante a 100 rpm para simular movimientos peristálticos. Se tomaron muestras después de 0, 75 y 150 min, se diluyeron y luego se sembraron en una placa para el posterior recuento de células viables mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

La simulación de DP se realizó utilizando una solución tampón con pH 7,0 (ajustado con HCl 1 M) con la siguiente fórmula (g/L): sales biliares 3,0, pancreatina esterilizada por filtración 0,1, Na_2HPO_4 26,9 y NaCl 8,5. Las células recolectadas durante el paso de GD anterior se centrifugaron a 4600 rpm durante 5 min y luego se resuspendieron en 7 mL de la misma solución. La suspensión se incubó durante

3 h a 37 °C con agitación (100 rpm). De manera similar, se tomaron muestras después de 0, 90 y 180 min, se diluyeron y se sembraron en una placa con medio YEPD agar, para el posterior recuento de células viables (UFC). La supervivencia durante la DP y la DG para cada punto de muestra se determinó de la siguiente manera:

$$\% \text{ supervivencia: } (\ln N^{\circ} \text{ UFC/ mL}_{\text{final}} / \ln N^{\circ} \text{ UFC/ mL}_{\text{inicial}}) * 100$$

Dónde:

- $\ln N^{\circ}$ inicial UFC/mL es el logaritmo natural del número inicial de unidades formadoras de colonias
- $\ln N^{\circ}$ final UFC/mL es el logaritmo natural del número final de unidades formadoras de aislamientos

Análisis de datos

Cada ensayo se realizó de forma independiente por triplicado y los resultados representan el promedio de las 3 determinaciones con la desviación estándar correspondiente ($\pm$ DE). Los datos experimentales se procesaron con análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para analizar el supuesto de normalidad y la prueba de Levene para homogeneidad de varianza. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba de Tukey y los resultados se consideraron significativos si el valor de p asociado era $< 0,05$. Para analizar los datos no paramétricos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis o la prueba de Friedman equivalente a la prueba ANOVA para medidas repetidas. Para todas las pruebas se utilizó SPSS versión 19.0, Statistics R 3.6.2. y *Graphpad Prism* 9.4.1.

RESULTADOS

Para el *screening* inicial se consideró la tolerancia de las levaduras a la temperatura corporal humana y a estados febriles, los valores bajos de pH y la presencia de sales biliares.

De las 66 levaduras autóctonas analizadas, 49 aislamientos (74,24 %) mostraron un crecimiento favorable a 37 °C, 51 aislamientos (77,27 %) a 39 °C y 47 aislamientos (71,21 %), a 42 °C. Las levaduras pertenecientes a los géneros *Cryptococcus* y *Rhodotorula* no crecieron a ninguna de las temperaturas analizadas, mientras que las levaduras del género *Hanseniaspora* mostraron alta sensibilidad (%) a las diferentes temperaturas. Los aislamientos del género *Metschnikowia* mostraron una sensibilidad creciente al aumentar la temperatura al igual que los aislamientos de los géneros *Saccharomyces*, *Torulaspora* y *Wickerhamomyces* (Figura 3.3). Todas las cepas del género *Pichia* (de diferentes especies) mostraron buen crecimiento (++) a todas las temperaturas ensayadas respecto al control. A partir de estos resultados, se seleccionaron 47 levaduras autóctonas que crecieron favorablemente a las 3 temperaturas seleccionadas.

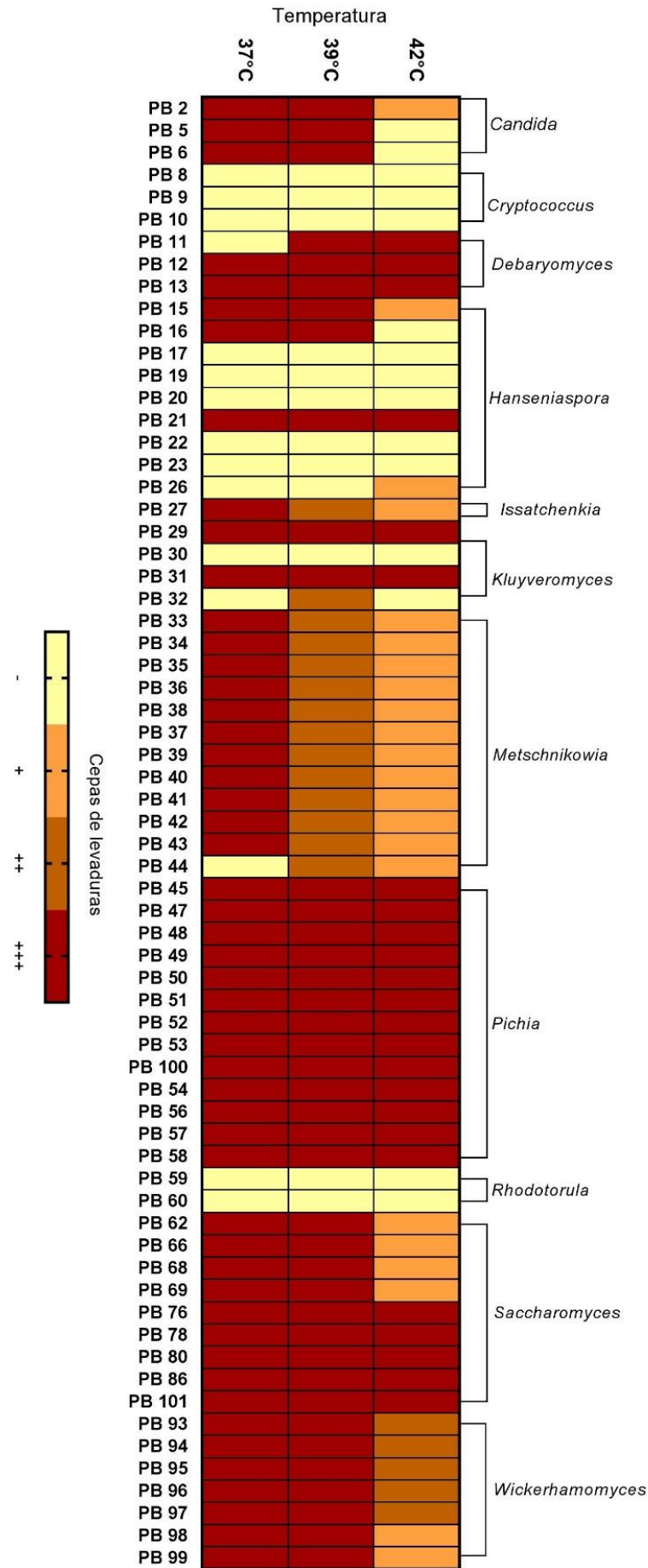


Figura 3.3: Aislamientos de levaduras tolerantes a diferentes temperaturas de crecimiento (37, 39 y 42 °C). Sin crecimiento (-); con crecimiento (+); con buen crecimiento (++); con muy buen crecimiento como control (+++).

Después de la incubación a 37 °C durante 4 h, en general, los recuentos de levaduras viables indicaron que los aislamientos tenían mayor tolerancia a pH 3 y mayor sensibilidad a pH 2. Las cepas que superaron el 100 % de supervivencia a pH 2 fueron PB 52, 56 y 68. Mientras que a pH 3 alcanzaron un porcentaje de tolerancia superior al 100 % PB 29, 45, 47-53, 56-58, 66, 69, 86, 97, 100 y 101. Las cepas PB 11-16, 52 y 56 en ambos pH tuvieron un porcentaje de tolerancia superior al 100 % (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Tolerancia de los aislamientos de levaduras autóctonas a pH 2 y pH 3.

Especie	Nomenclatura	% tolerancia	
		pH 2	pH3
<i>Candida famata</i>	PB 2	0.00%	39.13%
<i>Candida sake</i>	PB 5	0.00%	55.24%
<i>Candida sake</i>	PB 6	1.12%	11.24%
<i>Cryptococcus albidus</i>	PB 8	0.00%	0.00%
<i>Cryptococcus magnus</i>	PB 9	0.00%	0.00%
<i>Cryptococcus magnus</i>	PB 10	0.00%	0.00%
<i>Debaryomyces hansenii</i>	PB 11	314.06%	410.94%
<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	PB 12	116.48%	169.23%
<i>Hanseniaspora sp.</i>	PB 13	218.18%	262.12%
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	PB 15	195.70%	219.35%
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	PB 16	501.30%	192.21%
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	PB 17	0.00%	0.00%
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	PB 19	1.79%	0.00%
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	PB 20	0.00%	0.00%
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	PB 21	0.00%	5.00%
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	PB 22	0.00%	0.00%
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	PB 23	0.00%	0.00%
<i>Hanseniaspora vineae</i>	PB 26	0.00%	0.00%
<i>Issatchenkia orientalis</i>	PB 27	13.16%	10.53%
<i>Kluyveromyces sp.</i>	PB 29	5.41%	186.49%
<i>Kluyveromyces lactis</i>	PB 30	0.00%	0.00%
<i>Kluyveromyces lactis</i>	PB 31	15.91%	52.27%
<i>Kluyveromyces maxianus</i>	PB 32	0.00%	4.00%
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 33	0.00%	0.00%
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 34	4.84%	3.23%
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 35	3.17%	3.17%
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 36	4.44%	0.00%
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 37	1.33%	5.33%
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 38	20.27%	60.81%
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 39	2.25%	8.99%
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 40	14.52%	25.81%
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 41	1.43%	13.57%
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 42	1.75%	43.86%

<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 43	1.30%	71.43%
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 44	0.00%	0.00%
<i>Pichia fabiani</i>	PB 45	11.29%	117.74%
<i>Pichia kluyveri</i>	PB 47	79.22%	188.31%
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB 48	53.74%	284.62%
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB 49	10.39%	462.34%
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB 50	49.38%	642.22%
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB 51	47.99%	259.02%
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB 52	363.49%	323.08%
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB 53	63.01%	550.00%
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB 100	22.76%	197.03%
<i>Pichia masmurika</i>	PB 54	47.99%	50.62%
<i>Pichia occidentalis</i>	PB 56	178.00%	110.89%
<i>Pichia occidentalis</i>	PB 57	69.70%	246.46%
<i>Pichia occidentalis</i>	PB 58	96.10%	320.00%
<i>Rhodotorula glutinis</i>	PB 59	0.00%	0.00%
<i>Rhodotorula glutinis</i>	PB 60	0.00%	20.69%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PB 62	10.98%	71.34%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PB 66	16.92%	221.54%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PB 68	184.43%	43.44%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PB 69	5.26%	185.26%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PB 76	5.48%	57.53%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PB 78	4.71%	76.47%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PB 80	0.00%	26.63%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PB 86	31.15%	104.92%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PB 101	29.19%	153.33%
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB 93	0.00%	38.46%
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB 94	0.00%	22.12%
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB 95	0.00%	65.88%
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB 96	0.00%	56.57%
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB 97	65.12%	80.58%
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB 98	27.77%	95.41%
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB 99	44.54%	73.11%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> CNCM I-745	Sb	21.36%	50.49%

Referencia: Sb: cepa de referencia.

Se resaltan en negrita los aislamientos con un crecimiento notable.

De acuerdo a los resultados, los ensayos de tolerancia a la bilis revelaron que el 39,39 % (26/66) de las cepas crecieron en presencia del 1 % de sales biliares con un índice de tolerancia IRbilis= 15 (correspondiente a un crecimiento igual a 5 estrías en el tratamiento respecto al control). Mientras que, el 19,64 % (13/66) presentó una IRbilis = 10 (crecimiento en 4 de las 5 estriaciones en el tratamiento). Específicamente, las especies con mayor número de aislamientos resistentes (IRbilis $\geq$ 10) fueron: *W. anomalus* (7/7: 100 %), *P. kluyveri* (2/2: 100 %), *P. occidentalis* (3/3: 100 %), *P. kudriavzevii* (7/7: 100 %), *M. pulcherrima* (9/12: 75 %),

C. magnus (1/2: 50 %), *C. albidus* (1/1: 100 %), *S. cerevisiae* (6/9: 66,6 %), *Candida* (2/3: 66,6). Por el contrario, los aislamientos de *Hanseniaspora* (5/11: 41,66 %) y *Kluyveromyces* sp (1/4: 25 %) mostraron poca o ninguna resistencia. ($IR_{bilis} < 10$; Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Aislamiento de levaduras que muestran resistencia a la bilis ($RI_{bilis} = 10$ o 15) en presencia de sales biliares y el correspondiente Índice de Resistencia a la Bilis (RI_{bilis}).

Especie	Cepa	RI_{bilis}	Especie	Cepa	RI_{bilis}
<i>Candida famata</i>	PB 1	IR 15	<i>Candida membranefaciens</i>	PB 4	IR 10
<i>Hanseniaspora</i> sp	PB 14	IR 15	<i>Cryptococcus albidus</i>	PB 8	IR 10
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	PB 22	IR 15	<i>Cryptococcus magnus</i>	PB 10	IR 10
<i>Hanseniaspora vineae</i>	PB 26	IR 15	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	PB 15	IR 10
<i>Issatchenkia orientalis</i>	PB 27	IR 15	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	PB 19	IR 10
<i>Kluyveromyces</i> sp	PB 28	IR 15	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 37	IR 10
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 33	IR 15	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 38	IR 10
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 35	IR 15	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 40	IR 10
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 36	IR 15	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 41	IR 10
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 44	IR 15	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	PB 42	IR 10
<i>Pichia kluyveri</i>	PB 46	IR 15	<i>Pichia masmurika</i>	PB 54	IR 10
<i>Pichia kluyveri</i>	PB 47	IR 15	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PB 65	IR 10
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB 48	IR 15	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PB 72	IR 10
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB 49	IR 15	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PB 87	IR 10
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB 50	IR 15	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PB 88	IR 10
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB 51	IR 15	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB 97	IR 10
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB 52	IR 15	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB 98	IR 10
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB 53	IR 15	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB 99	IR 10
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB 100	IR 15			
<i>Pichia occidentalis</i>	PB 56	IR 15			
<i>Pichia occidentalis</i>	PB 57	IR 15			
<i>Pichia occidentalis</i>	PB 58	IR 15			
<i>Rhodotorula glutinis</i>	PB 60	IR 15			
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	PB 61	IR 15			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PB 80	IR 15			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PB 101	IR 15			
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB 93	IR 15			
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB 94	IR 15			
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB 95	IR 15			
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB 96	IR 15			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> CNCM I-745	Sb	IR 15			

Sobre la base de los resultados, se realizó la selección de aquellas levaduras que presentaron buen crecimiento a pH 2 y 3, que fueron tolerantes a temperaturas de 37, 39 y 42 °C y que registraron un índice de resistencia a sales biliares de 10 y/o 15. De las 66 cepas evaluadas **15 levaduras cumplieron con dichas características, las cuales se detallan en la Tabla 3.3.**

Tabla 3.3: Levaduras seleccionadas según resistencia a la bilis (RI_{bilis}), tolerancia a la acidez (%) y crecimiento a la temperatura 37, 39 y 42 °C.

Aislamiento	Nomenclatura	IR_{bilis}	% tolerancia		Crecimiento a tres temperaturas.
			pH 2	pH 3	
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	PB15	10	195,70%	219,35%	+
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB48	15	53,74%	284,62%	+
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB50	15	49,38%	642,22%	+
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB51	15	47,99%	259,02 %	+
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB52	15	363,49%	323,08%	+
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB53	15	63,01%	550,00 %	+
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB100	15	22,76%	197,03%	+
<i>Pichia masmurika</i>	PB54	10	47,99%	50,62 %	+
<i>Pichia occidentalis</i>	PB56	15	178%	110,89%	+
<i>Pichia occidentalis</i>	PB57	15	69,70%	246,46%	+
<i>Pichia occidentalis</i>	PB58	15	96,10%	320,00 %	+
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB97	10	65,12%	80,58%	+
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB98	10	27,77%	95,41%	+
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB99	10	44,54%	73,11%	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PB101	15	29,19%	153,33%	+

Tolerancia a condiciones gastrointestinales simuladas

Como se muestra en la figura 3.4, en general la reducción de la población inicial no superó el 30 % luego de la fase duodenal en ninguno de los aislamientos ensayados. En el presente estudio, los aislamientos mostraron mayor sensibilidad a las condiciones pancreáticas que a las gástricas, con una disminución de células viables entre 1 log₁₀ – 2 log₁₀ (Figura 3.4). Los aislamientos con mayores tasas de supervivencia al final de la fase duodenal fueron *S. cerevisiae* PB101 (94,76 %); *P. kudriadzevii* PB48, PB51, PB53 y 100 con porcentajes de 85,64; 89,63; 83,01 y

80,77 %, respectivamente. *P. occidentalis* PB56 y PB58, 89,66; 81,75 %, respectivamente y *W. anomalous* B97 (80,30 %). En particular, la cepa probiótica de referencia *S. cerevisiae* var. *Boulardii* CNCM I-745 mostró una tasa de supervivencia del 76,78 %, inferior a la mayoría de los asilamientos de levadura autóctonos analizados.

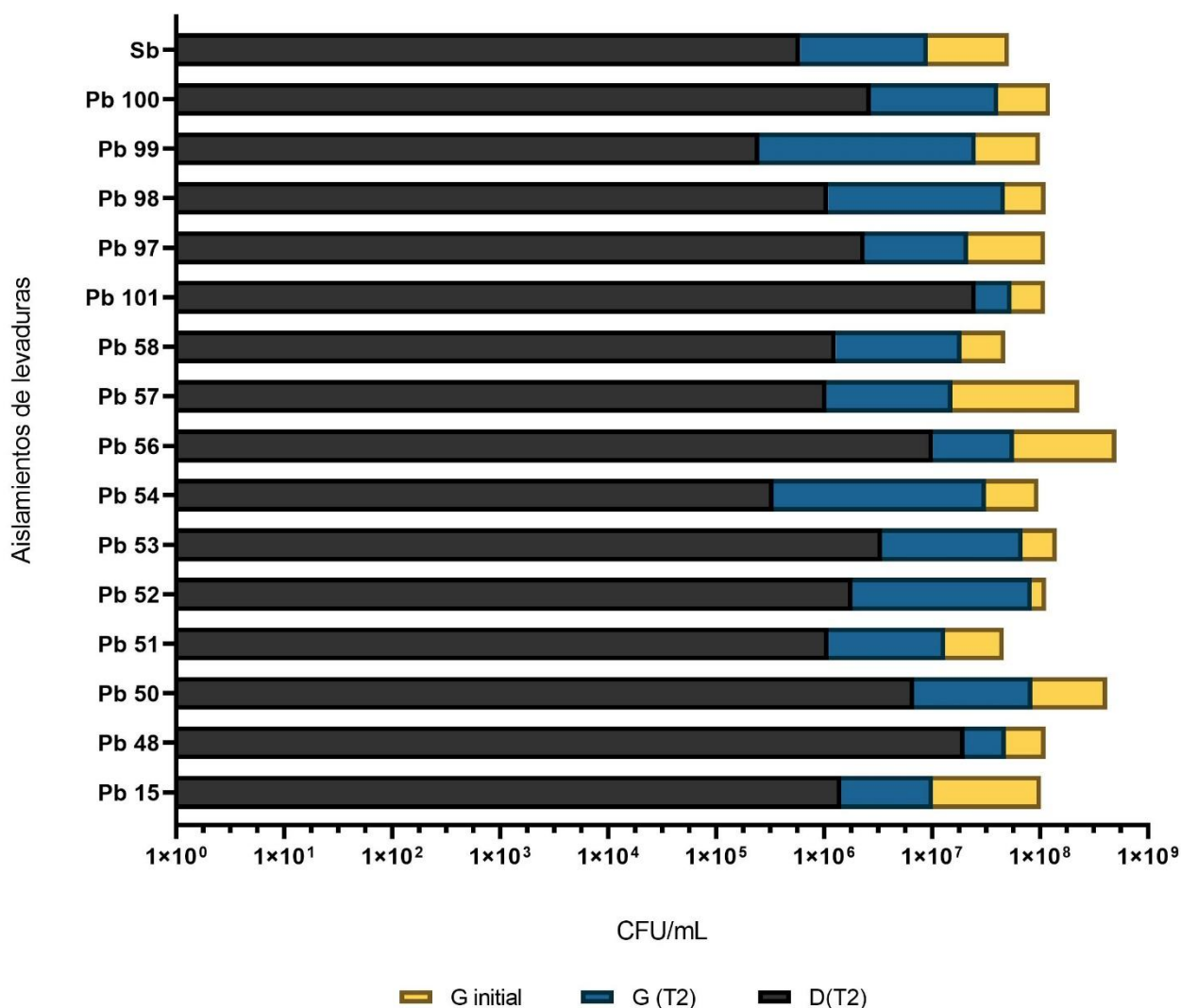


Figura 3.4: Supervivencia (UFC/mL) de final de la fase gástrica (G(T2)) y fase duodenal (D(T2)) respecto al número de células inoculadas inicialmente (G inicial).

DISCUSIÓN

Para que un microorganismo sea considerado probiótico debe llegar al intestino grueso de forma viable y funcional. Por lo tanto, las cepas deben sobrevivir

a las barreras naturales presentes en el sistema gastrointestinal. Asimismo, los registros existentes indican que la capacidad de las levaduras probióticas para sobrevivir en el tracto gastrointestinal es variable y depende de la cepa (Binetti *et al.*, 2013; Fadda *et al.*, 2017). Además, la tolerancia de la levadura al estrés causado por el aumento de la temperatura de crecimiento está bien descrita para numerosas cepas de *S. cerevisiae* (Munna *et al.*, 2015), pero datos similares para levaduras que no -*Saccharomyces* se limitan a unos pocos estudios (Piraine *et al.*, 2023). Dentro de estos estudios muchos autores solo evaluaron el crecimiento a 37 °C (Syal y Vohra, 2012; Agarbati *et al.*, 2020) y, teniendo en cuenta que las temperaturas elevadas pueden representar un factor limitante para la proliferación de levaduras (Gil-Rodríguez *et al.*, 2015; Romero-Gil *et al.*, 2013), consideramos importante seleccionar candidatos probióticos que sean eficientes y toleren temperaturas entre 39 (estado de fiebre alta en humanos) y 42 °C (temperatura considerada hiperpirexia, asociada con un mayor riesgo de infección bacteriana grave, especialmente en bebés pequeños) (Rosenfeld- Yehoshua, 2018). Es interesante saber que, evaluando estas temperaturas, estas cepas se podrían implementar como estrategia alternativa al suministrarse bajo un estado febril (sin que se vea comprometida la viabilidad de las mismas), síntoma común de enfermedades asociadas al tracto gastrointestinal.

Por otra parte, algunas levaduras no- *Saccharomyces* relacionadas con el vino, crecen mejor a bajas temperaturas, posiblemente debido a la composición lipídica de la membrana y a la actividad de las proteínas transmembrana (Torija *et al.*, 2003; Maturano *et al.*, 2019). Afortunadamente, géneros diversos como *Saccharomyces*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Wickerhamomyces* tiene un espectro de temperatura más amplio (Figura 3.3). Durante la fase tumultuosa de fermentación del vino tinto, las temperaturas pueden alcanzar valores de alrededor de 37-40 °C (García-Ríos *et al.*, 2019). A estas temperaturas, las células de levadura activan la respuesta de choque térmico y alteran algunos otros componentes de su fisiología, incluida la composición de la membrana y el flujo de carbohidratos (Lindquist, 1986; Richter *et al.*, 2010; Morano *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2018). Estos cambios, propios de las levaduras enológicas, sumado a que los aislamientos provienen de zonas cálidas donde las temperaturas durante la maduración de la uva alcanzan los 46-47 °C, podrían responder a la buena termotolerancia de estos hongos. Otros estudios han reportado levaduras con potencial termotolerantes como lo expuesto

por Psomas *et al.* (2001), donde se evaluó el crecimiento de las levaduras *Saccharomyces*, *Candida*, *Issatchenkia*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* y *Torulaspora* aisladas de heces infantiles y queso feta a diferentes temperaturas. De acuerdo al estudio, todos los aislamientos de heces infantiles crecieron a 25, 37 y 42 °C y 44 de las 50 levaduras aisladas del queso feta crecieron a 25 y 37 °C, y 43 de ellas incluso a 42 °C. Ogunremi *et al.* (2015) realizaron estudios de termotolerancia en cepas de *Pichia kluyveri*, *P. kudriavzevii*, *Issatchenkia orientalis* y *Candida tropicalis* aisladas de algunos alimentos tradicionales nigerianos, que mostraron un crecimiento favorable a 37 °C. Por otro lado, Menezes *et al.*, (2020) aislaron levaduras de una fermentación de granos de cacao y kéfir brasileño pertenecientes a los géneros *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Candida* y *Hanseniaspora*, que mostraron buen crecimiento a 37 °C, con coincidencias en los resultados de crecimientos de los mismos géneros, con este estudio.

Tal como se mencionó previamente, las condiciones del jugo gástrico resultan una barrera importante o, donde el efecto inhibitor está estrictamente relacionado con el pH y la concentración de ácido clorhídrico (Psomas *et al.*, 2001). El pH del HCl excretado en el estómago es 0,9, pero con la presencia de alimentos el pH aumenta a aproximadamente a un valor de 3, siendo el tiempo promedio de tránsito de los alimentos en el estómago de 2 a 4 h (Erkkila y Petaja, 2000). La presencia de alimentos u otros componentes alimentarios podría amortiguar las condiciones a las que se someten los probióticos ingeridos, lo que confiere un cierto efecto protector sobre las células microbianas del estómago (Conway *et al.*, 1987; Prasad *et al.*, 1998). La resistencia de los microorganismos a la acidez del jugo gástrico es fundamental para la selección de probióticos. Por lo tanto, los valores de pH de 2 y 3 se consideraron ideales para la selección de cepas de levadura resistentes a los ácidos del tracto GI.

De acuerdo a Kapteyn *et al.* (2001) y Lucena *et al.* (2020) el mecanismo subyacente para la supervivencia de la levadura en condiciones de pH bajo es la modificación de la pared celular de la levadura. Las células de levaduras sometidas a pH bajos o a ácidos inorgánicos fuertes como el HCl en el estómago, disparan un mecanismo que activa la vía de integridad de la pared celular (Chen *et al.*, 2009, de Lucena *et al.*, 2015), que depende de la transmisión de señales de las paredes estresadas a la proteína G de señalización Rho1 GTPasa, lo que lleva a la

formación de varios polímeros de carbohidratos utilizados para remodelar la pared celular (Levin, 2011). Otro mecanismo para resistir el ácido inorgánico fuerte es una vía de respuesta general al estrés, una respuesta esencial contra cualquier alteración, donde la conductancia de la vía de la proteína quinasa C es fundamental (Lucena *et al.*, 2020).

Además, en condiciones de pH bajo, la ineficiencia temporal de la vía de detección de glucosa en la levadura y la inhibición del crecimiento son las principales causas de la reducción de la actividad de la proteína quinasa A, lo que libera respuestas generales de estrés y conduce a la remodelación de la expresión de genes celulares para adaptarse a la condición de pH bajo (De Melo *et al.*, 2010; de Lucena *et al.*, 2015, Lucena *et al.*, 2020). Además, el metabolismo del calcio podría afectar las respuestas de la levadura al pH externo bajo (Brandão *et al.*, 2014), en el que la eliminación de Mid1p o Cch1pm, como canales de calcio, es vital para las células de levadura cuando se someten a estrés por ácidos inorgánicos (Claret *et al.*, 2005; De Lucena *et al.*, 2012).

Con respecto al pH, como se mostró anteriormente, los recuentos de levaduras viables en el presente trabajo indicaron generalmente que los aislamientos tenían mayor tolerancia a pH 3 y mayor sensibilidad a pH 2, consecuente a la teoría mencionada anteriormente. Levaduras de los géneros *Debaryomyces*, *Pichia* y *Wickerhamomyces* registraron tasas de supervivencia moderada a altas (Tabla 3.1). Es bien sabido que estas especies pueden crecer a diferentes valores de pH extremos y concentraciones de sal debido a la fluidez y composición lipídica de sus membranas plasmáticas (Turk *et al.*, 2007). Otros autores también reportaron aislamientos de las especies *P. kluyveri*, *P. kudriadzevii* y *W. anomalus* como tolerantes al pH ácido (García-Hernández *et al.*, 2012). Se podría inferir que, dado que la acidez es un factor común en la elaboración del vino, estas levaduras presentan adaptaciones favorables para sobrevivir a esta condición extrema. Por otro lado, Menezes *et al.*, (2020) informaron que levaduras de los géneros *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Candida* y *Hanseniaspora* aisladas de alimentos fermentados indígenas brasileños, fermentación de granos de cacao y kéfir mostraron alta tasa de supervivencia a pH 2, estos resultados difieren de los presentados ya que la mayoría de los aislamientos de estos géneros fueron sensibles a este valor de pH.

Por otra parte, luego de atravesar las barreras presentes en el estómago, uno de los principales obstáculos para la supervivencia de la levadura probiótica son las altas concentraciones de sales biliares y ácidos orgánicos (Alkalbani *et al.*, 2022). Además, País *et al.* (2020) destacó que las enzimas pancreáticas e hidrolíticas, los productos metabólicos secundarios del microbioma intestinal y el borde en cepillo epitelial en el intestino delgado, podrían afectar de forma negativa a la supervivencia de los microorganismos, incluidas las levaduras. Como vimos en la introducción, las sales biliares generalmente se generan a partir del colesterol en el hígado y son secretadas en el intestino para contribuir al proceso digestivo (Aguilar-Ballester *et al.*, 2020). Urdaneta y Casadesús (2017) reportaron que las sales biliares tienen propiedades detergentes y, efectos antimicrobianos, siendo dañinas para la microbiota aloctona del TGI, por lo tanto, los probióticos deben demostrar tolerancia a la bilis para sobrevivir en el intestino (Kumar *et al.*, 2012).

Otro desafío es el estrés alcalino al que inevitablemente están expuestos las cepas de levadura candidatas a probióticos en el tracto intestinal (Alkalbani *et al.*, 2022). Por ejemplo, *S. cerevisiae* crece mejor en condiciones de pH ácido que en condiciones alcalinas según Chen *et al.* (2009). Estas cepas no proliferan cuando el pH excede de 8,0 a 8,2 (Canadell *et al.*, 2015). Estudios realizados en cepas de *P. kudriavzevii*, *W. anomalus* y *P. kluyveri* reportan la resistencia de las mismas a concentraciones de 0,5 % de bilis de buey (García-Hernández *et al.*, 2012; Chelliah *et al.*, 2016; Fernandez-Pacheco *et al.*, 2018), los resultados son comparables con los alcanzados en este estudio. Diosma *et al.* (2014) y Moradi *et al.* (2018) informaron sobre aislamientos de *K. marxianus*, *S. cerevisiae* e *Issatchenkia occidentalis* (anamorfo de *P. occidentalis*) como resistentes a concentraciones de 1 % de sales biliares, no coincidiendo con los reportes del presente trabajo para las dos últimas especies dado que presentaron alta sensibilidad.

En la Tabla 3.3 se muestran los 15 aislamientos que mostraron tolerancia a las condiciones del TGI ensayadas: crecimiento a 37, 39 y 42 °C, tolerancia a pH 2 y 3 (crecimiento $\geq$ cepa control *S. cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745) y 1% de resistencia a sales biliares (IR_{bilis} 15 o 10). El crecimiento bajo estas condiciones estresantes debería permitir que suficientes células viables ingresen al intestino delgado asegurando la supervivencia para que logren efectuar su actividad de manera adecuada.

Mediante el ensayo de digestión simulada (etapas gástricas y pancreáticas) se logró analizar la supervivencia de las levaduras autóctonas seleccionadas a lo largo del camino que deben recorrer para llegar a su sitio de acción. Los principales factores de estrés fueron previamente ensayados por separado, sin embargo, resulta necesario someter a las levaduras a estrés continuo de las etapas sucesivas presentes en el tracto gastrointestinal.

Syal y Vohra (2012) informaron resultados comparables con los presentados en este trabajo, donde los aislamientos *S. cerevisiae* mostraron una alta tolerancia a pH 2 (≥ 93 %), mientras que los aislamientos de *P. masnhurika* fueron más sensibles (61 %) después de una exposición de hasta 3 h durante la prueba gástrica. Piraine *et al.* (2023) trabajaron con levaduras aisladas de flores, frutos, hojas y cervezas de fermentación mixta, pertenecientes a los géneros *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Issatchenkia*, *Cryptococcus* y *Candida* y no observaron una disminución significativa de la viabilidad durante el paso por la fase gástrica, donde todos los aislamientos presentaron ≥ 93 % de supervivencia después de la digestión gástrica. Después de la digestión pancreática, estas tasas disminuyeron a aproximadamente el 88 % para *H. uvarum* y el 75 % para *P. kluyveri*, porcentajes similares a los obtenidos para los aislamientos de estas especies en este estudio, siendo la fase más restrictiva la pancreática. Bonatsou *et al.* (2015) y Cassanego *et al.* (2017) reportan resultados similares donde la fase gástrica generalmente no inhibe a las levaduras, tal como se observó en nuestro estudio. Por otro lado, Merchán *et al.* (2020) observaron que los aislamientos de los géneros *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Yarrowia* y *Candida* fueron más restrictivos en la fase gástrica, que duodenal. Además, si bien en este estudio se registró una disminución mayor al 8 % en la fase gástrica, se evidenció una mayor sensibilidad en la fase duodenal, esto podría deberse a que la capacidad de respuesta óptima de las levaduras ante sucesivas exposiciones a estrés va disminuyendo su capacidad de supervivencia.

El análisis de la viabilidad celular durante la simulación in vitro del tracto gastrointestinal es importante, porque está comprobado que los efectos relacionados con los probióticos dependen de la dosis, lo que sugiere una dosis efectiva entre 107-109 UFC/ml por día (Minelli y Benini, 2008). Además, según los datos publicados por Pennacchia *et al.* (2008), se consideró una tasa de supervivencia del 70% para la selección de cepas de levadura como potenciales

probióticos. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que la concentración de células viables después del paso por el tracto gastrointestinal de las levaduras analizadas es suficiente para que la levadura potencial probiótica ejerza un efecto positivo en el organismo hospedador.

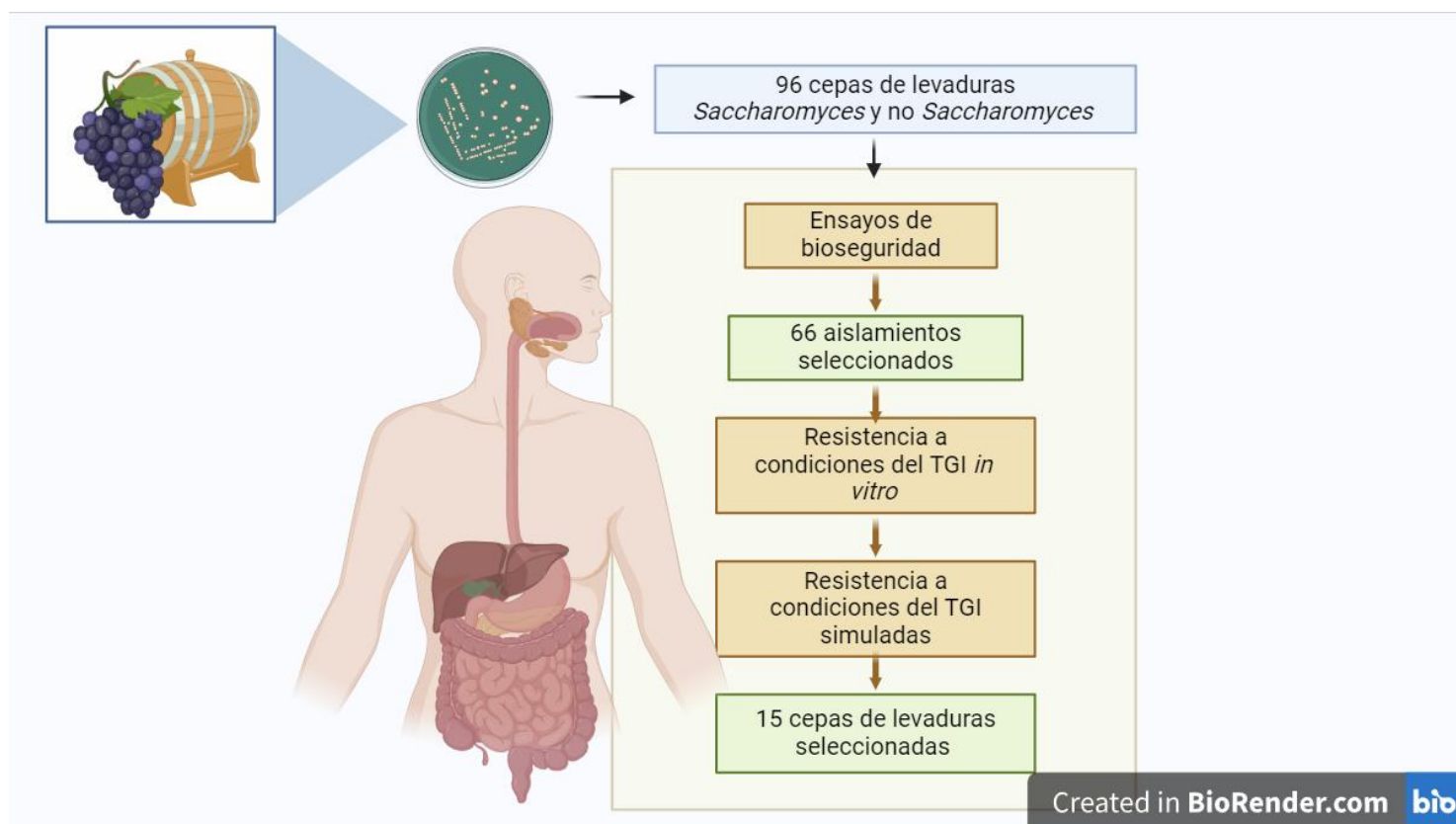
CONCLUSIONES

- Las levaduras han sido utilizadas en la producción de vino durante miles de años, lo que les ha permitido desarrollar funciones adaptativas para sobrevivir en un entorno de fermentación vinícola fluctuante. Estas adaptaciones no solo se aplican a dicho entorno, sino que también podrían ser útiles en una amplia gama de ambientes altamente selectivos y estresantes, como es el entorno gastrointestinal y los entornos industriales.
- De las 66 levaduras previamente seleccionadas, 15 presentaron las características requeridas. Estas mostraron una alta tolerancia a las condiciones gastrointestinales al ser sometidas tanto a estrés por separado como a condiciones de estrés sucesivo, lo cual confirma la hipótesis que las levaduras de origen enológico presentan aptitudes para tolerar las condiciones adversas del TGI

CAPÍTULO 4

ATRIBUTOS DE LAS LEVADURAS RELACIONADAS CON LA ADHESION

A continuación, se presenta un Grafico que resume el Capítulo 3



INTRODUCCIÓN

Una de las características cruciales evaluadas en las cepas candidatas a ser probióticas es su capacidad para colonizar las células epiteliales del intestino grueso. En términos generales, se reconoce que los probióticos deben llegar al intestino y **adherirse** a las células epiteliales de la pared intestinal antes de poder ejercer sus efectos beneficiosos, y esta capacidad adherente desempeña un papel fundamental en la colonización transitoria (Fernández-Pacheco *et al.*, 2018). El proceso de adhesión microbiana a las células epiteliales implica la interacción entre ambos y depende de la composición química y propiedades físicas de la superficie celular de la cepa probiótica. Existen estudios que evidencian que este comportamiento está influenciado por el equilibrio de las interacciones electrostáticas y de Van der Waals en la superficie de destino y que los componentes extracelulares del microorganismo y la composición circundante pueden afectar la adhesión (Boonaert y Rouxhet, 2000; Duary *et al.*, 2011).

La adhesión de los microorganismos a las células epiteliales está directamente relacionada tanto con la capacidad de autoagregación y con las propiedades hidrófobas de la superficie celular (Kochkodan *et al.*, 2008). La

capacidad de autoagregación de las células microbianas asegura que el probiótico alcance una alta densidad celular en el intestino, contribuyendo al mecanismo de adhesión. Simultáneamente, la hidrofobicidad de la superficie celular facilita una interacción más efectiva entre el microorganismo y las células epiteliales humanas (Lugea *et al.*, 2000).

La hidrofobicidad superficial en mamíferos, incluyendo humanos, es especialmente alta en la parte superior de la mucosa gástrica y el colon (Lugea *et al.*, 2000). Esto se atribuye a la capa de fosfolípidos tensioactivos que recubre la parte superior del moco que protege el epitelio (Farhadi *et al.*, 2003). La hidrofobicidad, como característica fisicoquímica de la superficie celular microbiana, involucra la mediación de una proteína de superficie celular, facilitando una interacción no específica entre las células microbianas y las células huésped (Willaert, 2018; Hirayama *et al.*, 2012). Para evaluar la hidrofobicidad de la superficie celular de levaduras recién aisladas, se requiere el uso de diferentes hidrocarburos, como *n*-hexadecano, xileno y octano, para simular la eficiencia de adhesión en el epitelio intestinal.

La propiedad de autoagregación se define como la capacidad de las cepas de levadura para unirse entre sí y producir flóculos como una respuesta de supervivencia, lo que les confiere una ventaja competitiva frente a otros microorganismos, incluidos los patógenos bacterianos entéricos, especialmente en condiciones adversas en el tracto gastrointestinal humano (Gut *et al.*, 2019). Esta capacidad es esencial para los probióticos seleccionados. Además, la formación de agregados celulares amplía la protección celular en entornos adversos (Suvana *et al.*, 2018). Dado el mayor tamaño y peso de las células de levadura en comparación con las bacterias, tienden a sedimentarse más rápidamente y en mayor proporción (de Lima *et al.*, 2017).

La autoagregación de las cepas de levadura se asocia con la promoción de la colonización en el intestino humano, la inmunomodulación de la mucosa colónica y la prevención de infecciones patógenas (Isenring *et al.*, 2021;). Las células epiteliales intestinales, cubiertas por la capa mucosa del glicocálix, contienen electrolitos, inmunoglobulinas, glicolípidos y proteínas glicosiladas (mucinas) con residuos de glúcidos (Monteagudo-Mera *et al.*, 2019). La propiedad de adhesión se

atribuye a ciertas proteínas de la superficie celular, conocidas como 'floculinas' o 'adhesinas', presentes en la superficie de las células de levadura que se unen a residuos de glúcidos, como en las mucinas de las células epiteliales o ciertos aminoácidos en la superficie de otras células (Verstrepen *et al.*, 2006).

La **autoagregación**, o 'floculación', en levaduras es un fenómeno complejo que ocurre principalmente después del agotamiento del glúcido durante las fases exponencial o estacionaria (Gil-Rodríguez *et al.*, 2015). En estas circunstancias, la autoagregación se ve influenciada por diferencias en la composición de la pared celular, la presencia y tipo morfológico de apéndices celulares, así como macromoléculas que sobresalen de la pared celular (Stewart, 2018).

Además de la autoagregación, la **hidrofobicidad** desempeña un papel crucial en la capacidad de adhesión y colonización de los probióticos en las células epiteliales del tracto gastrointestinal humano, con impactos profilácticos y terapéuticos que previenen la colonización de patógenos mediante sus interacciones (Liu *et al.*, 2020; Somashekaraiah *et al.*, 2019). La afinidad de los microorganismos por la adhesión puede variar según el tipo de superficie (Krasowska *et al.*, 2014), por ende, las células con altas propiedades hidrofóbicas se adhieren más fuertemente a las superficies hidrofóbicas (Kochkodan *et al.*, 2008).

Una **biopelícula o biofilm** es un consorcio de microorganismos en el que las células se adhieren entre sí y, a menudo, también a una superficie: las células están incrustadas y protegidas dentro de una matriz extracelular que está compuesta de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) producidas por los mismos microorganismos involucrados (Sardi Jde *et al.*, 2014; Speranza y Corbo, 2017). Debido a la formación de estos polímeros orgánicos, el aglomerado de células se vuelve lo suficientemente grande como para atrapar desechos orgánicos e inorgánicos, nutrientes y otros microorganismos, lo que conduce a la formación del biofilm microbiano maduro. El biofilm puede estar formado por una o varias especies, incluidas células que funcionan activamente o inactivas: la tendencia a adherirse a las superficies es, de hecho, un proceso que ocurre naturalmente y potencialmente podría formarse de cualquier tipo de microorganismos, incluidos aquellos que causan deterioro y enfermedades (McLean *et al.*, 1994).

El biofilm formado por hongos (tanto levaduras como hongos filamentosos) siempre han sido de gran interés y se han descrito varias especies como capaces de crecer en comunidades (Costa-Orlandi *et al.*, 2014; Sardi Jde *et al.*, 2015), incluidas especies patógenas. La mayoría de los estudios se han realizado en especies de *Candida* (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*) con potencial patogenicidad en experimentos *in vitro* e *in vivo* (Seleem *et al.*, 2016; Khoury *et al.*, 2020; Carradori *et al.*, 2022). Otros estudios han reportado la formación de biofilm por cepas de levadura *Saccharomyces* (Bojsen *et al.*, 2012), *Cryptococcus* (Ajesh y Sreejith, 2012), *Malassezia* (Bumroongthai *et al.*, 2016), *Trichosporon* (Iturrieta-González *et al.*, 2014) y *Fusarium* (Peiqian *et al.*, 2013).

El desarrollo de biofilm es muy complejo y se ve afectado por diversas variables, como las condiciones ambientales (pH, disponibilidad de nutrientes, temperatura, proteínas/adhesinas del huésped, dinámica de fluidos), morfologías de la superficie (química, topografía, fisicoquímica) y factores microbiológicos (forma microbiana, estructura, composición molecular, especies, fisicoquímica, fase de crecimiento, cápsulas o sustancias exopoliméricas, etc.). Algunos factores como la temperatura, el pH y la composición del medio tienen efectos importantes en la conversión de células planctónicas a la forma sésil (Speranza y Corbo, 2017).

Específicamente, el ecosistema del vino proporciona un nicho ecológico en el que las presiones bióticas, en forma de interacciones ecológicas, alteran significativamente la trayectoria evolutiva de las levaduras participantes (Conacher *et al.*, 2019). Sumado a esto, varias especies que participan del proceso fermentativo enológico presentan propiedades de hidrofobicidad, producción de exopolisacáridos y/o formación de biofilm, características especiales que les permiten adherirse mejor a la superficie de la uva, además de crear una barrera protectora contra otros microorganismos y/o factores fisicoquímicos adversos (Renouf *et al.*, 2005). Además, el ambiente fermentativo del vino no solo aporta un entorno físico-químico estresante para las levaduras ya que también podría considerarse como un excelente modelo para examinar el efecto de las asociaciones microbianas de un producto fermentado (Zilelidou y Nisiotou, 2021). El contacto físico célula- célula de levadura parece ser otro modo de interacción a través de las cual ciertas especies de levadura pueden regular la presencia y persistencia de otras especies (Kemsawasd *et al.*, 2015; Petitgonnet *et al.*, 2019).

Es por ello que el **objetivo** de este capítulo fue evaluar propiedades relacionadas con la adhesión, estas características no se consideran requisitos mutuamente excluyentes. Por tanto, se evaluó la capacidad de hidrofobicidad, autoagregación, y formación de biofilm de 15 levaduras que mostraron ser bioseguras y tolerantes a las condiciones presentes en el tracto gastrointestinal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Tal como se observa en la tabla 3.3, los 15 aislamientos de levaduras fueron seleccionados de acuerdo con los siguientes parámetros:

- 1- Rasgos de bioseguridad: actividad hemolítica y ureasa negativa, resistencia a antibacterianos (ampicilina 25, gentamicina 10, levofloxacina 10, rifampicina 20, tetraciclina 80, cloranfenicol 60µg/mL) y sensibilidad al menos a 4 antifúngicos ensayados (ketoconazol 50, clotrimazol 10, fluconazol 10, itraconazol 10, miconazol 50, nistatina 100 µg/mL). Supervivencia mayor al 90% en larvas de *G. mellonella*.
- 2- Tolerancia a las condiciones del tracto gastro-intestinal: Crecimiento a 37, 39 y 42 °C, resistencia a valores de pH ácidos (2 y 3) y sales biliares (1%).

Evaluación de propiedades relacionadas con la adhesión

Hidrofobicidad

La capacidad hidrófoba de las levaduras se evaluó indirectamente como la capacidad de las células para unirse al xileno. Los ensayos se realizaron según el protocolo de Gong *et al.* (2012) con modificaciones: las levaduras previamente activadas, se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min y se lavaron 3 veces con solución buffer PBS. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en solución PBS. Los tubos con un volumen final de 9 mL a una concentración de 5×10^7 UFC/mL de cada levadura se midieron espectrofotométricamente a 600 nm. Posteriormente se añadió el hidrocarburo a la suspensión en una proporción de 1:3 (xileno: suspensión de levadura). Las muestras se agitaron durante 2 min y se dejaron en condiciones estáticas durante 1 h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ y se midió la capacidad del

xileno para atrapar células. El índice de hidrofobicidad (H) se calculó según lo descrito por Collado *et al.* (2008) mediante la siguiente fórmula:

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

donde A_0 y A son las absorbancias antes y después de la extracción con solventes orgánicos, respectivamente.

Autoagregación

La autoagregación (Au) se realizó según la metodología reportada por Ogunremi *et al.* (2015) con modificaciones. Las levaduras se activaron en caldo YEPD durante 24 h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ a 150 rpm, se cosecharon mediante centrifugación a 3000 rpm durante 15 min a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ y se lavaron 2 veces con solución buffer PBS. Las células se resuspendieron en solución buffer PBS a una concentración de 5×10^7 UFC/ mL con un volumen final de 30 mL en tubos Falcon de 50 mL, posteriormente se agitaron durante 10 s y se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. La absorbancia se midió a 600 nm después de 0, 2, 4 y 24 h extrayendo la muestra de la capa de suspensión superior (2,5 mL). La autoagregación se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Autoagregación: Au (\%): } 1 - (A_t / A_i) * 100$$

donde A_t es la absorbancia en el tiempo de lectura y A_i es la absorbancia inicial del ensayo.

Formación de biofilm

La formación de biopelículas se evaluó siguiendo el protocolo de Růžicka *et al.* (2007) con modificaciones. Las levaduras previamente activadas se suspendieron en agua hasta alcanzar una concentración de 1×10^6 UFC/ mL. Se añadió un volumen de 200 μL de cada suspensión de levadura en caldo YEPD ($37 \pm 1^\circ\text{C}$, 28 h) a una microplaca de 96 pocillos. Se utilizó caldo YEPD sin inoculación de levadura como control negativo. Después del período de incubación, se eliminó el medio y los pocillos se enjuagaron 2 veces con PBS y se dejaron secar. La capa de biopelícula adherida a las paredes del pozo se tiñó con 200 μL de una solución de cristal violeta al 1 % durante 30 min y se enjuagó dos veces con agua destilada. El colorante adjunto se eluyó con 200 μL de etanol al 96 %. Se colocaron 100 μL de la solución en una microplaca nueva y se midió la absorbancia de cada pocillo

a 620 nm. La formación de biopelícula se confirmó cuando la absorbancia fue mayor que la del control negativo mas 3 veces su desviación estándar correspondiente (YEPD+(2± DE)).

Análisis de datos

Cada ensayo se realizó de forma independiente por triplicado y los resultados representan el promedio de las tres determinaciones con la desviación estándar correspondiente ($\pm$ DE). Los datos experimentales se procesaron con análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para supuesto de normalidad y la prueba de Levene para homogeneidad de varianza. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba de Tukey y los resultados se consideraron significativos si el valor de p asociado era $\leq 0,05$. Para analizar los datos no paramétricos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis o la prueba de Friedman equivalente a la prueba ANOVA para medidas repetidas. Para todas las pruebas se utilizó SPSS versión 19.0, Statistics R 3.6.2. y *Graphpad Prism* 9.4.1.

RESULTADOS

Propiedades relacionadas con la adhesión

Hidrofobicidad

Las levaduras seleccionadas mostraron resultados de hidrofobicidad muy variables, desde 1,05 % a 79,67 %. La afinidad de *S. cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745 (cepa de referencia) hacia xileno fue del 35 %. Las cepas de *P. kudriavzevii* (PB50, PB51, PB52, PB53, PB100) y *W. anomalus* (PB97) mostraron los valores más altos (>43 %). Los aislamientos de *Hanseniaspora guilliermondii* (PB15) junto con *P. kudriavzevii* (PB 48) y *P. masmurika* PB54, *P. occidentalis* PB56, y PB58 mostraron porcentajes de hidrofobicidad inferiores al 25%, mientras que el aislamiento *S. cerevisiae* PB101 registró valores prácticamente nulos. Los aislamientos de *W. anomalus* PB98 y 99 tuvieron comportamientos distintos, con porcentajes del 25% y casi nulo, respectivamente (Figura 4.1).

Autoagregación

Se encontraron diferencias significativas entre los valores de autoagregación (Au %) al inicio (después de 2 y 4 h) y al final del ensayo (24 h) ($p \leq 0,05$). Mientras

que no hubo diferencias significativas después de 2 h y 4 h ($p < 0,05$). Después de 2 h, 4 especies de levaduras (PB 48, PB56, PB58 y PB101) demostraron valores superiores al 35 %, mientras que el resto obtuvo valores inferiores al 20 %, sin cambios significativos después de 4 h. Se observó un aumento entre 68 % y 94 % para todos los aislamientos después de 24 h de incubación (Figura 4.1). Los resultados obtenidos muestran que el Au % entre 2 y 4 h fue variable dependiente de la cepa, pero alcanzaron valores estables similares a las 24 h. Es de destacar que todas las cepas del género *Pichia* obtuvieron porcentajes superiores al 90 % junto con *P. kudriadzevii* PB100 y la cepa de referencia (Figura 4.1).

Considerando ambos parámetros evaluados, no se observó correlación entre Au % e hidrofobicidad ($r = 0.15$; $p > 0.05$), aunque las cepas *P. kudriadzevii* PB50, PB51, PB52, PB53, PB100 y PB97 mostraron valores altos de hidrofobicidad y Au % (Figura 4.1).

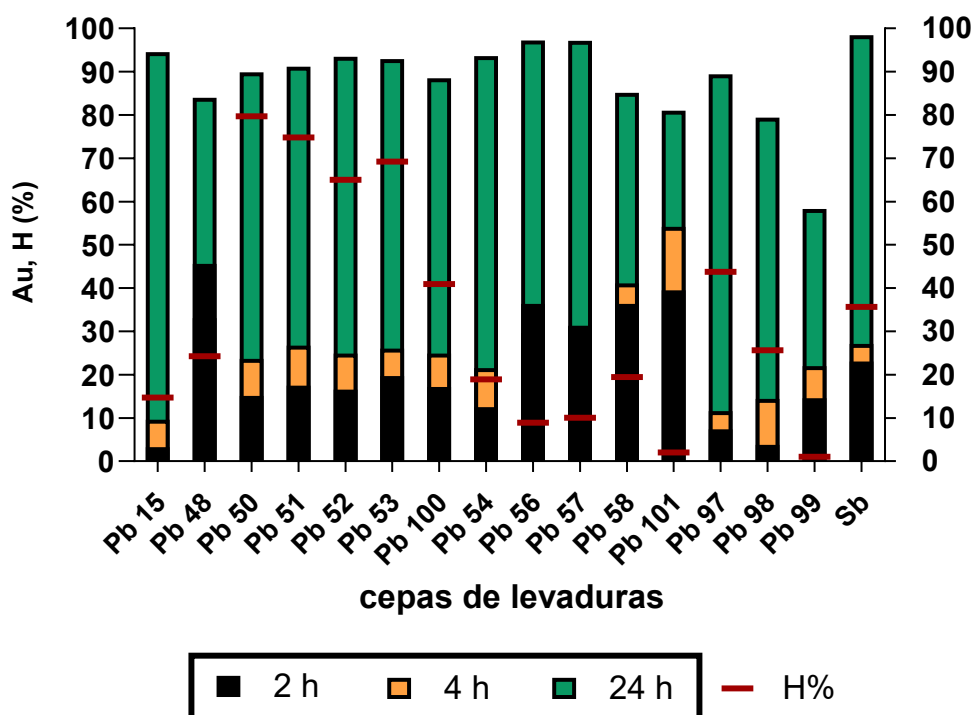


Figura 4.1: Porcentaje de autoagregación (Au%) a las 2, 4, 24 h de incubación; porcentaje de Hidrofobicidad (H%) de aislamientos con potencial probiótico seleccionados y de cepa de referencia *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745 (Sb).

Formación de biofilm.

Para este ensayo, se estableció el valor umbral para la formación de biofilm en $Abs_{620}=0,102$, de acuerdo con el valor registrado para el control negativo (Růžička *et al.*, 2007). Se observaron diferencias significativas en la producción de biofilm entre las diferentes cepas ($p < 0,05$). La cepa probiótica de referencia, *S. cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745, podría considerarse productora pobre de biofilm (como lo reportan para cepas de la misma especie Zullo *et al.* (2019)) junto con las cepas PB98, PB15, PB99 y PB101), mientras que PB100, PB50 y PB53 mostraron la mayor capacidad de formación de biofilm. Los aislamientos restantes mostraron una capacidad de producción moderada (Figura 4.2). En cuanto a la correlación entre los parámetros relacionados con la adhesión, no se observó correlación entre la formación de biofilm y el % de Au ($r = 0,44$; $p > 0,05$), pero sí entre la formación de biofilm y la hidrofobicidad ($r = 0,66$; $p \leq 0,05$).

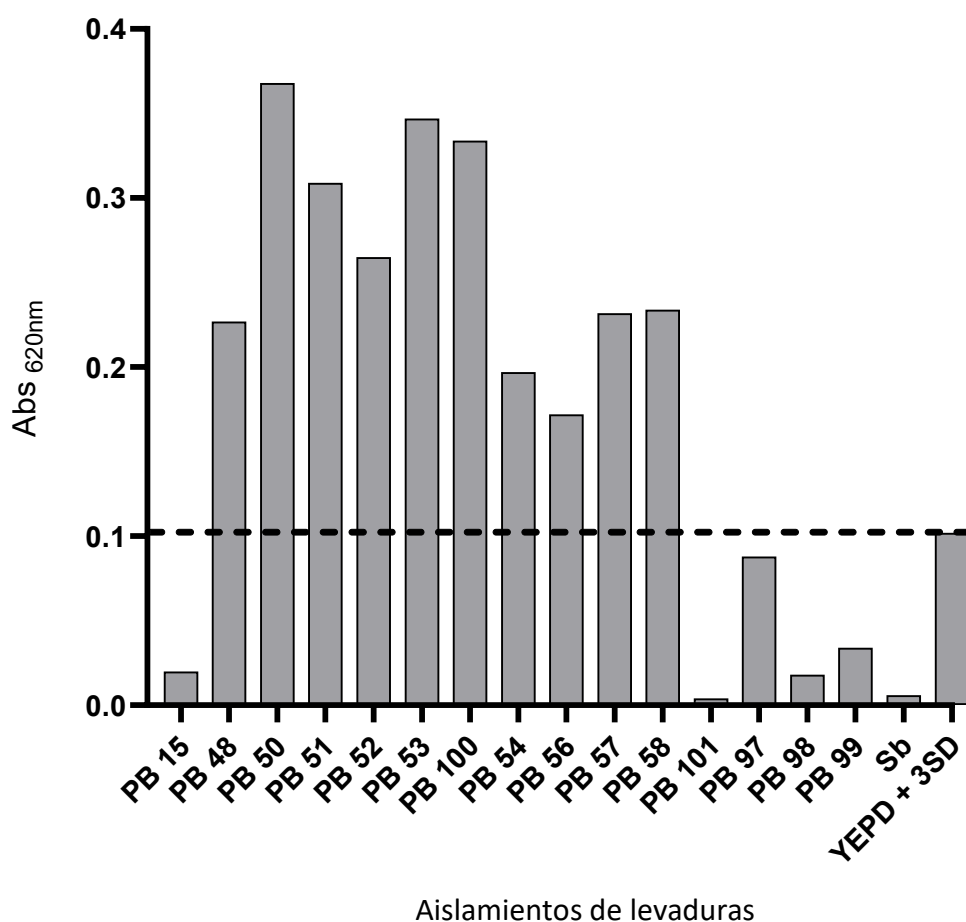


Figura 2: Capacidad de formación de biopelículas ($Abs_{620\text{ nm}}$) de aislamientos de levadura autóctonos, control negativo (YEPD + 3SD) y cepa de referencia probiótica *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745 (Sb).

DISCUSIÓN

Además de tolerar las condiciones del tránsito gastrointestinal superior, otro desafío para un microorganismo probiótico eficaz es adherirse, al menos temporalmente, a las células del intestino grueso (colón). La adhesión a las células epiteliales intestinales es un prerrequisito importante para la colonización de cepas probióticas en el tracto gastrointestinal, ya que esto evita su eliminación inmediata por peristaltismo y proporciona una ventaja competitiva en este ecosistema (Ouwehand *et al.*, 1999; Kos *et al.*, 2003). Por lo tanto, resulta importante evaluar la hidrofobicidad, la autoagregación y la capacidad de formación de biopelículas.

La hidrofobicidad de la superficie celular se considera un factor importante en la adhesión y proliferación de microorganismos en las células epiteliales intestinales (Sourabh *et al.*, 2011). La hidrofobicidad en el presente estudio fue muy variable, oscilando entre 1,05 % y 79,67 % para las levaduras seleccionadas. Estos resultados son comparables con los informados por Binetti *et al.* (2013) ya que reportaron valores cercanos al 80% para cepas de *P. kudriadzevii*. La adhesión es un rasgo complejo que generalmente involucra un proceso de varios pasos con interacciones electrostáticas y fuerzas hidrofóbicas, que involucra interacciones específicas entre las características físicas y químicas de la superficie microbiana y la mucosa intestinal (Menezes *et al.*, 2020).

Numerosos autores han informado que una hidrofobicidad del 30 al 40 % permitiría a los probióticos interactuar con el moco y realizar una adhesión al menos temporal (Abdulla *et al.*, 2014; Ilavenil *et al.*, 2016; Sidira *et al.*, 2015). Por lo tanto, las levaduras del presente estudio con valores más altos podrían considerarse hidrofóbicas, *P. kudriadzevii* (PB50, PB51, PB52, PB53, PB100) y *W. anomalus* (PB97).

En cuanto a la propiedad de Au (%) los resultados obtenidos muestran que el % de Au entre 2 y 4 h fue variable y dependiente de la cepa, sin embargo, después de 24 h, las especies seleccionadas alcanzaron valores estables similares. Es de destacar que todas las cepas del género *Pichia* y la cepa de referencia obtuvieron porcentajes superiores al 90 %. De Acuerdo a Menezes *et al.* (2020), los valores de Au% < 30 se consideran bajos, 30-60 intermedios y > 60 altos, por lo

tanto, se indica que todas las cepas de levadura analizadas presentaron valores altos de Au % (>60%).

Amorim *et al.* (2018) evaluaron aislados de levadura de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Debaryomyces* y reportaron un comportamiento similar al de las levaduras en este estudio: un valor de % de Au < 16 después de 2 h de incubación que aumentó a > 96 después de 24 h. Por otro lado, Bonatsou *et al.* (2018) evaluaron la autoagregación en cepas de *Rhodotorula*, *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia* y *Saccharomyces* entre otras, las cuales fueron aisladas de la fermentación de aceituna de mesa Kalamata, e informaron que 20 de 38 cepas, mostraron un alto % de Au con valores medios que oscilan entre 72 y 91 % dentro de las primeras 4 h de incubación; es decir porcentajes superiores a los obtenidos en este trabajo. Después de 24 h, sus resultados coincidieron con los resultados obtenidos y 34/38 de las cepas de levadura mostraron Au % >90.

Como se mencionó previamente, las levaduras de ambientes vitivinícolas muestran ciertas adaptaciones evolutivas al ambiente estresante del vino. La floculación (relacionada con la presencia de genes FLO) es un tipo de interacción célula- célula que resulta en agregados celulares (Conacher *et al.*, 2019), siendo un mecanismo central en la organización estructural de las comunidades de levaduras (Honigberg, 2011), así como un mecanismo protector en situaciones de estrés en las que las células internas están protegidas por las externas (Smukalla *et al.*, 2008, Conacher *et al.*, 2019). Se puede inferir que los altos valores de % de Au de las cepas de este estudio se deben a la presencia de esta característica adaptativa en las comunidades microbianas de ambientes vitivinícolas.

Cabe señalar que no siempre se ha detectado una buena correlación entre hidrofobicidad (ensayos *in vitro*) y adherencia intestinal (ensayos *in vivo*) (Martins *et al.*, 2009, Kourelis *et al.*, 2010, Binetti *et al.*, 2013, Perricone *et al.*, 2014) y que el porcentaje de Au se ha asociado más con la adherencia intestinal. La composición de la pared celular afecta la hidrofobicidad y las propiedades del % de Au, lo que explica porqué ciertas cepas de levadura tienen una cinética de eliminación relativamente más lenta en el tracto gastrointestinal (Rodríguez *et al.*, 2018; Van Mulders *et al.*, 2010). Por lo tanto, una buena capacidad de Au a pesar de bajos valores de hidrofobicidad pueden predecir la propiedad de adhesión de los aislamientos (Sourabh *et al.*, 2011).

En el norte de la Patagonia, Argentina, se realizaron experimentos de la formación de biopelículas por cepas de levaduras epífitas de peras después del almacenamiento en 2 cámaras frigoríficas diferentes, los resultados mostraron que los aislamientos del género *Pichia* eran pobres formadores de biofilm, lo que difiere a los resultados registrados en este trabajo para las levaduras de este género (Lutz *et al.*, 2013). Recientemente, se han reportado la presencia de levaduras formadoras de biofilms como *Candida* spp. y *Pichia* spp. (género con mejor producción en el presente estudio) en aceite de oliva por Santana *et al.* (2018), las cuales se creen que pueden contribuir positivamente a la fermentación y maduración de la aceituna (Camiolo *et al.*, 2017; Porru *et al.*, 2018). Específicamente, la manifestación visual es la formación de un velo sobre toda la superficie del vino se ha atribuido a la formación de biofilm por parte de especies como *P. membranifaciens*, géneros con los que se trabajó en este estudio y que coincide como productor de biofilm (Zara *et al.*, 2020).

La colonización intestinal por microorganismos suele estar precedida por una adhesión a la mucosa intestinal que conduce a la formación de biofilm y estos fenómenos (adhesión y formación de biofilm) están correlacionados positivamente (Arévalo-Villena *et al.*, 2017). En una revisión sobre el establecimiento y desarrollo de la microbiota intestinal, Macfarlane y Dillon (2007) describen el mecanismo y la importancia de la formación de biofilm tanto en la superficie como en la luz intestinal. Los microorganismos necesitan resistir las fuerzas producidas por el arrastre del flujo de material en la luz intestinal para evitar la eliminación física de las superficies epiteliales mediante movimientos peristálticos intestinales (Iñiguez-Palomares *et al.*, 2010). La capacidad de formar biofilm está muy extendida en numerosas especies de levaduras relacionadas con la elaboración del vino. Esta formación resulta una estrategia para colonizar y sobrevivir en la superficie de la uva y en la bodega, proporcionando resistencia a los agentes antimicrobianos y desinfectantes de uso común, a las temperaturas extremas, a bajo pH y a las diferencias de osmolaridad (Perpetuini *et al.*, 2021; Eldarov *et al.*, 2021). Por lo tanto, los ensayos *in vitro* sobre el desarrollo de biofilm pueden proporcionar información sobre la capacidad de las levaduras seleccionadas para colonizar el intestino humano (di Cagno *et al.*, 2020).

Aunque este mecanismo se da frecuentemente en las interacciones entre levaduras en el vino, su importancia es objeto de debate (Conacher *et al.*, 2019). No obstante, la idea de que las levaduras provenientes de ambientes fermentativos poseen adaptaciones las convierten en prometedoras candidatas probióticas.

Además del contacto físico, se ha planteado la hipótesis de que ciertas moléculas, como los alcoholes aromáticos (triptofol), son moléculas que participan del *quorum sensing*, un modo de interacción basado en la comunicación celular, es decir que pueden controlar las poblaciones de levaduras a través de la señalización celular (Valera *et al.*, 2019; González *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

En relación con los resultados de Au %, hidrofobicidad y formación de biofilm determinados en el presente trabajo, son consideradas propiedades importantes que contribuyen a la adhesión, sin embargo, no son excluyentes, dado que los microorganismos probióticos también pueden actuar de forma libre. Por lo tanto, los 15 aislamientos de levaduras autóctonas evaluados en este estudio, necesitan estudiarse más a fondo para considerarlos como candidatos a probióticos.

CAPITULO 5

PROPIEDADES BENÉFICAS

INTRODUCCIÓN

La selección de candidatos probióticos incluye un largo camino de numerosas etapas de investigación *in vitro*. La razón principal de emplear una cepa probiótica es proporcionar beneficios para la salud de los consumidores, prevenir el desarrollo de complicaciones clínicas de una infección o incluso complementar los enfoques médicos modernos en el tratamiento de algunas enfermedades (Rwubuzizi *et al.*, 2023). Por tanto, el cribado preliminar y la evaluación de las principales propiedades funcionales benéficas específicas como “candidatos probióticos” son de vital importancia (Rwubuzizi *et al.*, 2023).

Luego de superar puntos críticos claves de selección preliminar *in vitro*, expuestos en los capítulos previos, tales como confirmación de seguridad de las cepas y adecuación, adaptación y supervivencia a las condiciones del tracto gastrointestinal (humana), el siguiente punto clave de selección es la expresión de propiedades que puedan asociarse con un efecto positivo en el bienestar del huésped (Rwubuzizi *et al.*, 2023).

El rango de propiedades benéficas a estudiar es amplio, variable y existe vasta bibliografía relacionada al grupo de bacterias probióticas, los cuales van desde la prevención y/o el tratamiento de la diabetes, el asma, enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Kocsis *et al.*, 2020, Mueller y Lorentz, 2022, Wu *et al.*, 2022), prevención de cálculos renales (Klimesova *et al.*, 2015), efecto inhibitor sobre la melanogénesis (Huang *et al.*, 2012), prevención de obesidad (An *et al.*, 2011), mitigación de autismo (Navarro *et al.*, 2016), mitigación de Alzheimer (Kobayashi *et al.*, 2019), propiedades anticarcinogénicas (Altonsy *et al.*, 2010) entre muchas otras.

El mercado de productos biofuncionales necesita continuamente la implementación y diversificación de los productos disponibles. Para ello, un número creciente de estudios científicos ha implicado la selección de nuevas cepas con propiedades funcionales diferentes y específicas, y se asocian nuevos grupos microbianos a estas características. Además, si bien el mercado actual de probióticos ofrece una amplia gama de productos (de origen bacteriano) los probióticos de levadura están ganando cada vez más interés, tanto en la investigación como en el consumo (Staniszewski y Kordowska-Wiater, 2021). El creciente interés por los probióticos de levadura se debe a su amplia aplicabilidad

en la industria alimentaria y a sus propiedades distintivas aplicadas al tracto digestivo (Staniszewski y Kordowska-Wiater, 2021; Vergara *et al.*, 2023a). Específicamente, las levaduras *Saccharomyces* y no- *Saccharomyces* se convirtieron en candidatos probióticos prometedores durante la última década. Estos microorganismos generalmente se aíslan de fuentes no convencionales para probióticos, tales como alimentos y bebidas fermentados tradicionales, verduras, jugos de frutas, frutas frescas y cereales (Rodríguez Machado *et al.*, 2024; Fernández-Pacheco *et al.*, 2021).

Los estudios sobre propiedades benéficas que pueden ofrecer los candidatos de levaduras a probióticos son más acotados. Algunos criterios de selección propuestos por los autores están relacionados con los efectos como la producción de vitaminas y/o enzimas (esterasa, proteasa o lipasa) que favorecen la digestión, la actividad antioxidante, el efecto antagonista contra patógenos y la reducción de los niveles de colesterol en el torrente sanguíneo (Silva *et al.*, 2011, Ogunremi *et al.*, 2015a, Fernandez-Pacheco *et al.*, 2021, Simoes *et al.*, 2021).

Otra propiedad interesante es la actividad β -glucosidasa, como un rasgo importante en la nutrición por su capacidad para catalizar la hidrólisis de varios β -glucanos que se encuentran en varios cereales (Seng *et al.*, 2014; Serventi *et al.*, 2020). Además, contribuyen con la liberación de compuestos fenólicos, que ejercen actividad antioxidante. Por otro lado, las células de levadura pueden hidrolizar proteínas mediante la acción de las proteasas (Mirzaei *et al.*, 2021). Estas contribuyen a la descomposición de proteínas, generando estructuras más pequeñas, como péptidos bioactivos con diversas propiedades, incluidos efectos antihipertensivos, inmunomoduladores, opioides, antimicrobianos y antioxidantes (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1998).

Por otra parte, dadas las tendencias dietéticas actuales de consumir alimentos con alto contenido en grasas saturadas (Espejo-Venegas *et al.*, 2022), se vuelve imprescindible la búsqueda de microorganismos con producción de enzimas lipasas las cuales desempeñan un papel crucial en la digestión de los triglicéridos, descomponiéndolos en productos más pequeños como ácidos grasos libres y glicerol, y, de esta manera, complementar la acción de las lipasas propias del ser humano.

En condiciones fisiológicas normales, las células de levadura poseen diversos mecanismos de defensa frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS) generados durante el metabolismo respiratorio para mantener en niveles no tóxicos y/o reparar el daño celular (França *et al.*, 2007; Herrero *et al.*, 2008; Vergara *et al.*, 2023a). Las defensas enzimáticas incluyen la actividad catalasa (Cta1 peroxisomal y Ctt1 citoplasmática). Estas enzimas desempeñan un papel en la protección de la actividad de las proteínas contra el daño oxidativo mediante la reparación de proteínas modificadas químicamente o la modulación del estado redox de los grupos sulfhidrilo de las proteínas (Gómez-Pastor *et al.*, 2010; Gamero-Sandemetrio *et al.*, 2014; Okada *et al.*, 2014).

Durante los últimos años, ha aumentado la conciencia sobre la relación entre el colesterol y el riesgo de desarrollar enfermedades coronarias (Psomas *et al.*, 2003). El hipercolesterolemia, un factor importante en las enfermedades cardiovasculares, contribuye hasta el 45% de la incidencia de infarto de miocardio (Kumar *et al.*, 2012). Un estudio ha revelado que una disminución del 1% en el colesterol resulta en una reducción del 2-3% en el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Manson *et al.*, 1992). En este contexto, la capacidad de los probióticos para reducir el colesterol se ha convertido en un área de investigación relevante, considerando el limitado éxito de los fármacos actuales (Kumar *et al.*, 2012).

Por otra parte, la actividad antimicrobiana contra patógenos gastrointestinales es un rasgo muy buscado en cepas potencialmente probióticas. La resistencia de patógenos a los antibióticos comunes es actualmente una seria amenaza para la salud global, resultando en una morbilidad y mortalidad significativa a nivel mundial (Wang *et al.*, 2020). El uso excesivo de antibióticos y su suministro inadecuado han llevado a la aparición y propagación de patógenos resistentes y multidrogorresistentes tanto en entornos nosocomiales como comunitarios (Bonnet *et al.*, 2019). Por lo tanto, a lo largo de los años, los tratamientos antibacterianos resultan menos efectivos debido al impacto negativo de los antibióticos en la microbiota intestinal normal (Gut *et al.*, 2018).

En comunidades microbianas complejas, los microorganismos co-existentes pueden recurrir a la producción de compuestos antimicrobianos para la

supervivencia y/o se ven comprometidos a competir por los recursos finitos (Mullis *et al.*, 2019). En este contexto, se ha observado de manera *in vitro* e *in vivo* la competencia por nutrientes y sitios de adhesión en la mucosa del huésped, así como la inducción de respuestas proinflamatorias para la eliminación de patógenos (Walsham *et al.*, 2016; Tuo *et al.*, 2018).

Una de las principales ventajas de las levaduras probióticas frente a las bacterias probióticas es que las primeras no se ven afectadas por los antibacterianos generalmente administrados para tratar infecciones enteropatógenas y, por lo tanto, pueden utilizarse como terapia complementaria. A diferencia de las bacterias, las levaduras no propagan genes de resistencia a antibióticos y no se han encontrado reportes de su translocación (Sen y Mansell, 2020). Además, las levaduras tienen la capacidad de reducir la adherencia de patógenos a las superficies mucosas y, existen antecedentes que indican su papel positivo en enfermedades causadas por un cambio en la microbiota intestinal saludable, como las enfermedades inflamatorias intestinales (Ianiro *et al.*, 2014).

En particular, la presencia de levaduras probióticas en el tracto gastrointestinal puede ejercer antagonismo contra microorganismos enteropatógenos, tanto de manera directa como indirecta. El antagonismo directo tiene lugar mediante la adhesión a las células epiteliales efectuando la exclusión competitiva de sitios de unión o nutrientes, impedimento estérico y/o colonización temporal. De manera indirecta, actúan mediante la producción de compuestos bioactivos, como ácidos orgánicos, etanol, toxinas *killer*, biosurfactantes y péptidos bioactivos y pueden tener un efecto antimicrobial contra otros microorganismos. En cambio, el antagonismo indirecto puede ocurrir mediante la modulación del sistema inmunológico, induciendo vías de señalización proinflamatorias y antiinflamatorias (González-Orozco *et al.*, 2022).

Las complicaciones asociadas con el estudio de la adhesión bacteriana *in vivo* han impulsado el desarrollo de sistemas modelo *in vitro* para investigar preliminarmente cepas adherentes (Vesterlund *et al.*, 2005). Este desarrollo es aplicable a la selección de levaduras probióticas. Estos modelos se fundamentan en la adhesión a líneas celulares de cultivo de tejidos, como Caco-2 y HT-29, que se diferencian y asemejan a los enterocitos del intestino delgado humano, así como

al moco intestinal humano (Ouwehand *et al.*, 2003). Particularmente, las células Caco-2, son una línea celular adherente bien diferenciada, se emplean para evaluar la adhesión de microorganismos intestinales, estudios de transporte transmembrana y análisis de invasión de patógenos bacterianos (Kieps *et al.*, 2023). Se prefiere el cribado de aislamientos basado en el porcentaje de adhesión a células HT-29 y Caco-2, ya que simula condiciones *in vivo* (Duany *et al.*, 2011). Por ende, estudiar el comportamiento de las cepas candidatas probióticas respecto a las propiedades relacionadas con la adhesión y actividad antagónica se consideran criterios de selección importantes. Como se mencionó en el capítulo anterior, si bien el criterio de estudio y selección a través de las propiedades relacionadas con la adhesión son importante, no debe considerarse excluyentes. Un mecanismo de acción antagónico comprobado de los probióticos levurianos es evitar que ciertos patógenos se adhieran a las células epiteliales intestinales adhiriéndose primeramente a estos ocupando así sus sitios de unión (Andrade Carvalho *et al.*, 2021), siendo este eliminado con la ayuda de la levadura si esta no tiene buena adherencia (Czerucka *et al.*, 2007). Este mecanismo se denomina exclusión competitiva y los probióticos lo utilizan para limitar la colonización de patógenos en el tracto gastrointestinal.

Estudiar la inmunomodulación en levaduras como un rasgo antagónico resulta de relevancia. La quimiotaxis es un factor de virulencia conocido en una amplia variedad de patógenos, lo que permite a las bacterias optimizar la adquisición de nutrientes, evitar sustancias tóxicas y/o moverse hacia sitios ideales de infección (Ottemann y Miller, 1997). *Salmonella* es un género que utiliza la quimiotaxis para moverse hacia un nicho metabólico ideal en el intestino, lo que le confiere ventajas competitivas (Rivera-Chávez *et al.*, 2013; Palmer y Slauch, 2017). Esta bacteria induce la inflamación al inyectar proteínas a través del sistema de secreción tipo III (T3SS), la detección de flagelina es a través del receptor TLR5 en la superficie celular. Esto activa la vía de señalización NFkB contribuyendo a la activación de la respuesta inflamatoria (Keestra *et al.*, 2011) y provocan la detección inmune de la flagelina y del propio T3SS (Crowley *et al.*, 2016; Sellin *et al.*, 2015; Winter *et al.*, 2009). La inflamación aumenta la producción de mucina, rica en glicoconjugados y aminoácidos, que *Salmonella* puede utilizar como fuentes de carbono (Stecher y Hardt, 2008).

Además, la afluencia de neutrófilos produce especies reactivas de oxígeno (ROS) que reaccionan con tiosulfato para formar tetrionato, un aceptor de electrones que solo algunas bacterias, incluyendo *Salmonella*, pueden utilizar (Winter *et al.*, 2010). Así, *Salmonella* se beneficia de la respuesta inflamatoria al acceder a nuevas fuentes de carbono y aceptores de electrones. Durante la inflamación intestinal, *Salmonella* también puede respirar usando tetrionato y nitrato, lo que le permite utilizar fuentes de carbono no fermentables como etanolamina y propanodiol, superando a las bacterias fermentativas de la microbiota intestinal del huésped (Thiennimitr *et al.*, 2011; López *et al.*, 2012; Winter *et al.*, 2013; Faber *et al.*, 2017).

Con respecto a la inmunomodulación, se conoce que es uno de los modos de acción empleados por las levaduras probióticas para controlar patógenos. Se ha confirmado que los β -glucanos, polímeros naturales de glucosa presentes en las paredes celulares de ciertas levaduras, tienen efectos estimulantes en las células inmunes innatas como macrófagos, neutrófilos y células asesinas naturales, así como actividades antibacterianas y antitumorales, y la inducción de la producción de citoquinas (Shruthi *et al.*, 2022). Otros estudios indican que algunas levaduras pueden modular el sistema inmunológico para reducir la inflamación y contrarrestar la enteropatogénesis (Diosma *et al.*, 2014; González Orozco *et al.*, 2022). Específicamente, la quimiocina CCL20 se expresa en el tracto gastrointestinal bajo condiciones proinflamatorias como infecciones y enfermedades inflamatorias intestinales (Rumbo *et al.*, 2004).

En el contexto enológico, las levaduras adaptadas a ambientes altamente selectivos, tales como el fruto de uva y el proceso fermentativo del vino, adquieren características específicas para lograr prosperar en esos entornos (Sgouros *et al.*, 2018; Bordet *et al.*, 2020). Estas adaptaciones determinan la ocupación espacio-temporal del sustrato por parte de las levaduras. Es importante destacar que durante el proceso de vinificación ocurren diversas interacciones que influyen en la variación y dominancia de las poblaciones de microorganismos a lo largo del proceso (Zilelidou y Nisiotou, 2021). Estas interacciones pueden ser de distintos tipos, como mutualismo, comensalismo, competencia o amensalismo, y tienen

efectos positivos o negativos en las poblaciones microbianas y las características del producto final (Fleet, 2003).

Las interacciones positivas incluyen la modificación del entorno de crecimiento mediante el intercambio de metabolitos y la liberación de compuestos como aminoácidos (Fleet, 2003; Cheraiti *et al.*, 2005). Por otro lado, la competencia por nutrientes esenciales como nitrógeno, glucosa, vitaminas e iones metálicos, así como la asimilación de oxígeno, puede afectar negativamente a las especies con menor capacidad de absorción de sustratos (Rollero *et al.*, 2018; Seguinot *et al.*, 2020). Además, la liberación de compuestos antimicrobianos como toxinas *killer*, ácido acético, etanol, ácidos grasos de cadena corta o péptidos de baja masa molecular pueden inhibir el crecimiento o provocar la muerte de otros microorganismos durante la fermentación del vino (Sgouros *et al.*, 2020; Melvydas *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2015). El contacto físico entre las células de levadura también puede regular la presencia y persistencia de diferentes especies (Kemsawasd *et al.*, 2015; Petitgonnet *et al.*, 2019). Bajo este contexto, es posible inferir que las levaduras de ambientes fermentativos y pre-fermentativos poseen diferentes estrategias antagónicas contra enteropatógenos.

Por tanto, en el presente capítulo el **objetivo** fue evaluar diferentes propiedades benéficas de las levaduras seleccionadas en relación al objetivo específico 4. Además, se determinaron los posibles efectos beneficiosos, como producción de diferentes enzimas, reducción de los niveles de colesterol, adhesión a las células Caco-2/TC-7, actividad antagonista contra enteropatógenos y efecto inmunomodulador. Asimismo, se estudió el efecto en los factores de virulencia relevantes de *Salmonella enteritidis*, como su capacidad de asociación y/o invasión en células epiteliales intestinales Caco-2/TC-7. Por último, se determinó su actividad inmunomoduladora de la respuesta inmunológica innata epitelial como indicador de la capacidad antiinflamatoria de los candidatos probióticos utilizando el sistema Caco-2: luc CCL20.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Los 15 aislamientos (Tabla 3.3) fueron seleccionados de acuerdo con los siguientes parámetros, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los capítulos anteriores:

1. Rasgos de bioseguridad: actividad hemolítica y ureasa negativa, resistencia a antibacterianos (ampicilina 25, gentamicina 10, levofloxacin 10, rifampicina 20, tetraciclina 80, cloranfenicol 60µg/mL) y sensibilidad al menos a 4 antifúngicos ensayados (ketoconazol 50, clotrimazol 10, fluconazol 10, itraconazol 10, miconazol 50, nistatina 100 µg/mL). Supervivencia mayor al 90% en larvas de *G. mellonella*.
2. Tolerancia a las condiciones del tracto gastrointestinal: Crecimiento a 37, 39 y 42 °C, resistencia a valores de pH ácidos (2 y 3) y sales biliares (1%).
3. Tolerancias a condiciones del tracto gastro-intestinal simuladas.
4. Propiedades para adherirse a las células epiteliales del intestino: hidrofobicidad, producción de biofilm (>cepa control) y autoagregación (> 85%).

Las bacterias patógenas utilizadas para el ensayo de actividad antimicrobiana fueron: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Cándida albicans* ATCC 10231 (American type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD, EE.UU.), y *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (S. Enteritidis) las cuales se activaron utilizando caldo nutritivo, durante 24 h a 37 ±1°C.

Actividades enzimáticas

Actividad de β-glucosidasa:

Cualitativa

La actividad de β-glucosidasa se determinó según lo descrito por Rosiet *al.*, (1994), utilizando un medio que contiene (g/L): arbutina (hidroquinona β-D-glucopiranosido,) 5, YNB (medio base nitrogenada de levadura) con aminoácidos

6,7 y agar-agar 20. Antes de la esterilización, el pH del medio se ajustó a 5,0. Se agregaron 2 mL de citrato de amonio férrico estéril (1%) a 100 mL del medio antes de verterlo en las placas. Las cepas se inocularon puntualmente (5 μ L) en el medio y las placas se incubaron a 25 ± 1 °C durante 7 días. La actividad de β -glucosidasa se determinó cuando el medio alrededor de la colonia viró a color marrón.

Cuantitativa

Los aislamientos de levaduras que mostraron resultados positivos en los ensayos cualitativos, fueron activados durante 24 h, a 25 ± 1 °C, con agitación constante. Posteriormente, fueron inoculados en los medios para inducción de producción de enzimas β -glucosidasas (g/L): YNB sin aminoácidos, 7; (NH₄)₂SO₄, 5; Extracto de levadura, 5; Peptona, 5; Glucosa, 5 en buffer Citrato- Fosfato 50 mM pH 5 (Rodríguez *et al.*, 2004). Posteriormente se incubaron durante 72 h, a 25 ± 1 °C, con agitación constante. Con el fin de estudiar la localización de la actividad enzimática, las levaduras desarrolladas en el medio para producción de β -glucosidasa fueron centrifugadas (13.000 rpm durante 10 min) para obtener:

-*pellet* el cual fue resuspendido en buffer citrato- fosfato 50mM pH 5.0 (enzimas del espacio periplasmático)

-el sobrenadante de cultivo libre de células (enzimas extracelulares).

Los sistemas de reacción, conformados por 300 μ L de sustrato (g/L): *p*-nitrophenil- β -D-glucosido (pNPG), 0.75, en buffer Citrato-Fosfato 100mM pH 5.0 (Rodríguez *et al.*, 2004) y 300 μ L de solución enzimática (*pellet* o sobrenadante), fueron incubados por 1 h a 30 ± 1 °C. Posteriormente, se detuvieron las reacciones con 1500 μ L de Na₂CO₃ 1M y los *p*-nitrofenoles liberados se midieron espectrofotométricamente a 400nm. Una unidad (U) de β -glucosidasa fue definida como la cantidad de μ M de *p*-nitrofenol/ hora liberado por la acción enzimática, bajo las condiciones del ensayo (Maturano *et al.* 2012. Se realizó una curva de calibración utilizando el sistema de reacción nitrofenol.

Actividad proteasa y lipasa

Se inoculó una suspensión estandarizada de 5 μ L de cada levadura previamente activada (1×10^6 UFC/mL) en la superficie de la placa de agar

solidificada para ensayar las actividades específicas y luego se incubó a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 h.

- Actividad proteasa (g/mL): para determinar esta actividad se preparó el medio como sigue: extracto de levadura 3, extracto de malta 3, peptona 5, glucosa, NaCl 5, agar 15. La leche se disolvió en agua destilada estéril (leche descremada en polvo 100 g/mL). En condiciones estériles, se mezclaron ambas soluciones y se vertieron en placas de Petri. La presencia de un halo translúcido alrededor de la colonia indica actividad enzimática positiva (Mestre *et al.*, 2017).

- Actividad lipasa (g/mL): el medio de cultivo que se preparó contenía: peptona 5, extracto de levadura 3, agar 15, tributirina 10. El resultado positivo se indicó mediante halos traslúcido alrededor de las colonias (Maturano *et al.*, 2009).

Actividad catalasa

Las levaduras previamente activadas se sembraron en forma puntual (5 μL) en YEPD agar y se incubaron a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24-48 h. Posteriormente se agregó 3% de peróxido de hidrógeno sobre cada colonia y se observó la formación de burbujas (Mestre *et al.*, 2017).

Asimilación de colesterol

La capacidad de reducir el colesterol se determinó utilizando el método de Alakeji *et al.* (2015) con modificaciones. Se inocularon levaduras previamente activadas a una concentración de 1×10^6 células/ mL durante 48 h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en medio YPGCHO que contenía (g/L): peptona 20, glucosa 20, extracto de levadura 10, bilis 3 y colesterol 0,050. Posteriormente, se centrifugaron 5 mL (15 min, 8000 rpm) y se midió el contenido de colesterol del sobrenadante con el kit de prueba de colesterol (Colestat, AA enzimática).

El porcentaje de reducción de colesterol por cepa de levadura se calculó usando la fórmula.

$$COL \% = \left(1 - \left(\frac{A}{A_0} \right) \right) \times 100$$

COL % = Reducción de colesterol

A = contenido de colesterol en caldo de cultivo

A₀ = contenido de colesterol en caldo no inoculado

Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se evaluó mediante la técnica de doble capa de agar de Perricone *et al.* (2014), con modificaciones. En una primera instancia se inoculó cada levadura de forma puntual sobre la superficie del YEPD-Agar e incubaron a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h. Posteriormente, se distribuyó una segunda capa de CN (agar al 0,7%) sobre el YEPD-Agar e inocularon las bacterias patógenas (1×10^6 UFC/mL) y *C. albicans* (1×10^6 cél/mL, YEPD-Agar). Las placas se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24h. La presencia de una zona de inhibición mostró la actividad antimicrobiana de las levaduras frente a los patógenos.

Actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células

Las levaduras fueron cultivadas por 48 h en caldo YEPD a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ a 150 rpm, posteriormente se centrifugaron durante 10 min. a 13.000 rpm. Los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro de $0,22 \mu\text{m}$ para eliminar las células residuales.

La evaluación de la actividad antagonista del sobrenadante libre de células (SLC) frente a *S. Enteritidis* CIDCA 101 se desarrolló mediante el ensayo de difusión por well utilizado por Chelliah *et al.* (2021) con modificaciones. Brevemente, cada cultivo de bacterias patógenas, desarrollado durante la toda la noche, se distribuyó en forma de Law (10^6 UFC/mL) en agar nutritivo fundido y se colocaron en una placa de Petri estéril. Posteriormente se realizaron pocillos de 7 mm de diámetro con 100, 200 y 300 μL de SLC de cada levadura. Las placas se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h y se observó zona de inhibición. Los experimentos de control se realizaron en las mismas condiciones con solución buffer PBS (control negativo).

Adhesión de levaduras a células Caco-2 /TC-7

Las células Caco-2/TC-7 que simulan los enterocitos maduros del intestino grueso se cultivaron de forma rutinaria siguiendo el procedimiento descrito por Zavala *et al.* (2016). Para evaluar la capacidad de adhesión de las levaduras seleccionadas, se utilizaron placas de 24 pocillos de células Caco-2/TC-7 cultivadas en monocapa confluyente (durante 7 días). Las levaduras activadas se lavaron (4200 rpm durante 5 min) 2 veces con solución buffer PBS y se resuspendieron en medio esencial mínimo de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, GIBCO BRL Life Technologies Rockville, EE.UU.) ajustado a una densidad óptica (DO) de aproximadamente 0,5 a 610 nm. Cada monocapa se lavó dos veces con PBS a temperatura ambiente y se añadieron 0,5 mL de suspensión microbiana a cada pocillo. Las placas se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 1 h en una atmósfera controlada (5% CO₂ - 95% aire). Posteriormente, las monocapas se lavaron 3 veces con solución buffer PBS y se lisaron con 0,5 mL de agua milliQ estéril. La placa se incubó nuevamente durante 1h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en atmósfera controlada. Para determinar el número de UFC/mL adheridas a Caco-2/TC-7, se tomó todo el volumen y se realizaron diluciones apropiadas en solución fisiológica sobre placa de YGC-Agar por el método de la gota. Los recuentos de UFC se realizaron tras 24 h de incubación a $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Los resultados se expresaron como porcentaje de adhesión de levaduras:

$$\text{ADH\%} = (\text{UFC}_f / \text{UFC}_i) \times 100$$

Donde UFC_f representa las unidades formadoras de colonias finales de levaduras adherentes y UFC_i son las unidades formadoras de colonias iniciales de levaduras añadidas al pocillo.

Efecto de las levaduras en la asociación e invasión de *Salmonella enteritidis* CIDCA 101 a células Caco-2/TC-7.

La asociación e invasión de *S. enteritidis* a células Caco-2/TC-7 se evaluó según Zavala *et al.* (2016) con modificaciones. En primer lugar, las monocapas confluentes Caco-2/TC-7 se lavaron 2 veces con solución buffer PBS. Posteriormente, se añadieron 0,5 mL de suspensión de *S. enteritidis* en DMEM (107 UFC/ml) y se incubaron 1h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en atmósfera controlada. Para los ensayos

de asociación, las monocapas se lavaron tres veces con solución buffer PBS tras la incubación y luego se lisaron añadiendo 0,5 mL de agua miliQ estéril. El número de *S. Enteritidis* viables asociados (adherentes más invasores) a las células Caco-2/TC-7 se determinó sembrando las diluciones adecuadas en agar nutritivo y contando las colonias tras la incubación (24h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$). El porcentaje de asociación de *S. Enteritidis* se calculó como:

$$\text{ASC\%} = [(\text{UFC}_{\text{asc}})/\text{UFC}_i] \times 100$$

donde UFC_{asc} es el recuento final de *S. enteritidis* asociado y CFU_i corresponde al recuento inicial añadido al pocillo.

La invasión por *S. Enteritidis* se determinó mediante el recuento de bacterias en el interior de las células Caco-2/TC-7. Para ello, las monocapas incubadas con *S. Enteritidis*, se trataron con 0,5 mL/pocillo de gentamicina (100µg/mL PBS) durante 1h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Por último, se lisaron las células y se contaron las colonias como se ha descrito anteriormente. El porcentaje de *S. enteritidis* internalizado se calculó como:

$$\text{INV\%} = [(\text{UFC}_{\text{int}})/\text{UFC}_i] \times 100$$

donde UFC_{int} representa el recuento final de *Salmonella* internalizada mientras que UFC_i es el recuento inicial de *Salmonella* añadido al pocillo.

Para evaluar el efecto de las levaduras sobre la asociación/ invasión de *S. Enteritidis* a las células epiteliales intestinales, se analizó el comportamiento del patógeno en tres tratamientos diferentes:

a) Efecto sobre los enterocitos pretratados con levadura (efecto levadura, EL), donde las células se preincubaron con 0,5 ml de suspensión de levadura en DMEM ($\text{DO}_{610\text{nm}}=0,5$ a 610 nm) durante 1 h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en 5% CO_2 - 95% aire y luego se lavaron tres veces con PBS antes de añadir la suspensión de *Salmonella*.

b) Efecto de la co-incubación de *Salmonella* con la levadura antes de encontrarse con los enterocitos (CC), donde las suspensiones de levadura (107 UFC/mL) y *Salmonella* (107 UFC/mL) se mezclaron y co-incubaron en PBS (pH 7.2) durante 1h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. A continuación, la suspensión mezclada se centrifugó (2900

rpm durante 4 min), se resuspendió en el mismo volumen de DMEM y se añadieron 0,5 mL de la mezcla a cada pocillo.

c) Efecto de los metabolitos producidos por la levadura (sobrenadante libre de células, SLC) sobre *Salmonella* antes del contacto con las células epiteliales. En este caso, el SLC se obtuvo por centrifugación (4200 rpm durante 5 min) y filtración (0,22 μ m de diám de poro) de un cultivo fresco de levadura. *Salmonella* (107 UFC/mL) se incubó 1 h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en SLC de levaduras y, posteriormente, se centrifugó la suspensión, se resuspendió el pellet en DMEM y se añadieron 0,5 mL de esta suspensión a cada pocillo. La asociación e invasión de *S. Enteritidis* tras estos 3 tratamientos diferentes se determinó como se ha descrito anteriormente.

Inmunomodulación en células Caco-2-CCL20: luc

Para la caracterización in vitro de las propiedades inmunomoduladoras de las levaduras, se empleó el sistema reportero Caco-2- ccl20: luc. Brevemente, la línea celular epitelial colónica humana Caco-2 transfectada de forma estable con una construcción reportera de luciferasa bajo control del promotor CCL20 (Caco-2-CCL20 :luc) (Nempont *et al.*, 2008) se mantuvo y cultivó rutinariamente según Iraporda *et al.* (2014).

La biomasa húmeda de cada cepa de levadura se suspendió en DMEM (GIBCO BRL Life Technologies Rockville, EE.UU.) a OD600nm = 0,5 (~107 UFC/mL). Las células Caco-2 CCL20: luc cultivadas se incubaron con la suspensión de levadura durante 30 min en medio libre de suero en placas de 48 pocillos. A continuación, se estimularon las células con flagelina de *Salmonella typhimurium* (FliC, 1 μ g/mL) y se incubaron durante 5 h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en una atmósfera con un 5 % de CO₂ y un 95 % de aire. En todos los experimentos se incluyó una condición basal sin ningún tratamiento, mientras que FliC se utilizó como control para la inducción del 100 % de la respuesta proinflamatoria. A continuación, las células se lisaron con tampón de lisis (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Se utilizó el luminómetro Labsystems Luminoskan TL Plus (Thermo Scientific, EE.UU.) para medir la actividad de la luciferasa utilizando un sistema de ensayo de luciferasa (Promega, Madison WI, EE.UU.).

Análisis de datos

Cada ensayo se realizó de forma independiente por triplicado y los resultados representan el promedio de las tres determinaciones con la desviación estándar correspondiente ($\pm$ DE). Los datos experimentales se procesaron con análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para supuesto de normalidad y la prueba de Levene para homogeneidad de varianza. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba de Tukey y los resultados se consideraron significativos si el valor de p asociado era $< 0,05$. Para analizar los datos no paramétricos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis o la prueba de Friedman equivalente a la prueba ANOVA para medidas repetidas. Para todas las pruebas se utilizó SPSS versión 19.0, Statistics R 3.6.2. y *Graphpad Prism* 9.4.1.

La luminiscencia se normalizó con respecto a las células de control estimuladas y se expresó como el porcentaje de luminiscencia media normalizada $\pm$ desviación estándar (NAL $\pm$ SD) de al menos 3 experimentos independientes.

RESULTADOS

Actividad de β -glucosidasa

A pesar de que en la detección en placa se lograron resultados en un periodo de tiempo significativamente mayor que el informado en la bibliografía (Rossi *et al.*, 1994), 5 levaduras, de las 15 ensayadas mostraron actividad enzimática β -glucosidasa, pertenecientes a las especies *W. anomalus* (PB97, PB98, PB99), *H. guilliermondii* (PB15) y *P. kudriadzevii* (PB100).

En el ensayo cuantitativo de actividad β -glucosidasa, las levaduras *W. anomalus* (PB97, PB98, PB99) se destacaron por su concentración en el espacio extracelular, con concentraciones de 1592,51, 1901,67 y 2722,58 U/g/L, respectivamente. Le sigue en orden descendente la levadura de referencia *S. boulardii* con un valor de 138,10 U/g/L. Además, los aislamientos de levaduras *W. anomalus* registraron la mayor producción de enzimas en el espacio periplásmico (con valores de 483,57, 265,16 y 347,83 U/g/L, respectivamente) tal como puede observarse en Figura 5.1.

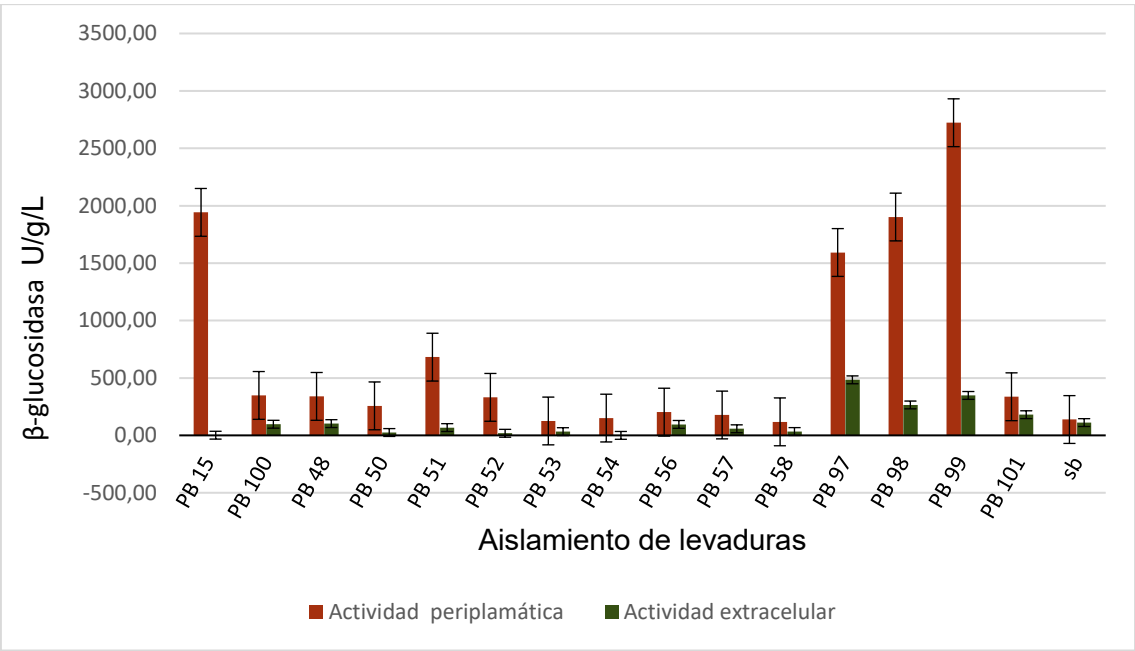


Figura 5.1: Actividad β -glucosidasa periplasmática y extracelular en U/g/L (eje “y”) de los aislamientos con aptitudes probióticas (eje “x”).

- Actividad lipasa, proteasa y catalasa

Las 15 levaduras demostraron la capacidad de degradar la tributirina, lo que indica la presencia de enzimas lipasa, como lo demuestra la formación de un halo translúcido. Mientras que, sólo los aislados de *H. guilliermondii* (PB15), *P. kudriadzevii* (PB50), *P. masmurika* (PB54), *W. anomalus* (PB97, PB98) mostraron actividad proteasa en medio suplementado con leche.

Con respecto a la actividad catalasa, todas las levaduras ensayadas mostraron tener esta acción (Figura 5.2).

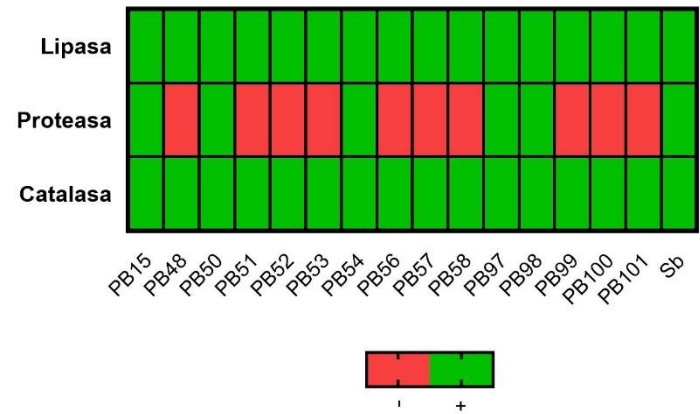


Figura 5.2: Actividad proteasa, lipasa y catalasa de aislamientos de levaduras con potencialidad probiótica

Referencia: positiva (verde), negativa (rojo), cepa de referencia (Sb)

Asimilación de colesterol

Los resultados indicaron que las levaduras ensasadas fueron capaces de reducir la concentración de colesterol en el medio mostrando un amplio espectro que osciló entre 0,38 y 47,50 %. La levadura que presentó el mayor porcentaje de reducción fue *P. kudriavzevii* PB48 con un valor de 47,5 % $\pm 12,99$, siendo estadísticamente similar la *P. kudriavzevii* PB50, que redujo el 44,42 % $\pm 7,75$ y *W. anomalus* PB98 el 38,35 % $\pm 3,24$ (Tabla 5.1).

Tabla 5.1: Porcentaje de asimilación de colesterol de los aislamientos de origen vínico de levaduras

Especie	Nomenclatura	% Porcentaje de reducción de colesterol
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	PB15	2.13±3.69 ^A
<i>Pichia kudriavzevii</i>	PB100	29.15±6.77 ^{ABCD}
	PB48	47.5±12.99^D
	PB50	44.42±7.75^D
	PB51	19.92±11.16 ^{ABCD}
	PB52	32.21±3.43 ^{BCD}
	PB53	2.16±3.73 ^A
<i>P. manshurika</i>	PB54	35.42±7.91 ^{CD}
<i>P. occidentalis</i>	PB56	0.38±0.53 ^A
	PB57	4.53±7.84 ^{AB}
	PB58	7.82±3.56 ^{ABC}
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB97	26.78±8.63 ^{ABCD}
	PB98	38.35±3.24 ^D
	PB99	22.71±4.31 ^{ABCD}
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PB101	10,93±3.41 ^{ABCD}
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> CNCM I-745	S. b.	4.17±5.2 ^{ABC}

Referencia: En negrita se resaltan los valores destacables, letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$)

Actividad antimicrobiana

Un total de 4/15 cepas presentaron actividad antimicrobiana sobre alguna de las cepas patógenas. Los aislamientos *W. anomalus* PB98 y PB99 inhibieron el crecimiento de: *K. pneumonia* ATCC700603, *E. coli* ATCC25922, *E. coli* ATCC35218, *P. aeruginosa* ATCC 25853, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis*

ATCC29212 y *S. Enteritidis* CIDCA 101, aunque en el caso de esta última bacteria los resultados no fueron contundentes. En cuanto a las cepas de PB 54 y PB 97 presentaron actividad inhibitoria frente a *E. faecalis* ATCC29212 y *S. Enteritidis* CIDCA 101, al igual que sucedió con los aislamientos anteriores en el caso de esta última bacteria no pudo evidenciarse claramente el halo inhibitorio. No se observó inhibición de crecimiento de las levaduras ensayadas frente a *C. albicans* (Tabla 5.2).

Tabla 5.2: Actividad antimicrobiana de las levaduras con aptitudes pobióticas frente a enteropatógenos.

Nomenclatura	Especie	Cepas patógenas							
		1	2	3	4	5	6	7	8
PB 98	<i>Wickeranomyces anomalus</i>	+	+	+	-	+	+	-	+/-
PB 100	<i>Pichia kudriazevii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
PB 15	<i>Hanseniaspora guillermoidii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
PB 99	<i>Wickeranomyces anomalus</i>	+	+	+	-	+	+	-	+/-
PB 48	<i>Pichia kudriazevii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
PB 50	<i>Pichia kudriazevii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
PB 51	<i>Pichia kudriazevii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
PB 52	<i>Pichia kudriazevii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
PB 53	<i>Pichia kudriazevii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
PB 54	<i>Pichia masmurika</i>	-	-	-	-	-	+	-	+/-
PB56	<i>Pichia occidentalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
PB57	<i>Pichia occidentalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
PB 58	<i>Pichia occidentalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
PB 97	<i>Wickeranomyces anomalus</i>	-	-	-	-	-	+	-	+/-
PB 101	<i>Wickeranomyces anomalus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

Referencias: (+) actividad, (-) sin actividad, +/- posible actividad. *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 (1), *Escherichia coli* ATCC 25922(2), *E. coli* ATCC 35218(3), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853(4), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (5), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (6), *Candida albicans* ATCC 10231(7) (American Type Culture Collection ATCC, Rockville, MD, USA) y (8) *Salmonella enterica* serovar enteritidis CIDCA 101.

Actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células

Los resultados de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células (SLC) de las 4 levaduras que no lograron visualizarse posible actividad en el ensayo anterior (PB 98, 99, 54 y 97) evidenciaron un creciente efecto a medida que aumentaba la concentración (X1, X2, X3) (Tabla 5.3).

Tabla 5.3: Actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células de aislamientos de levaduras frente a *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* CIDCA, X1 indica 100 µL, X2 indica 200 µL y X3 300 µL.

Cepa	Especie	Concentración de sobrenadante libre de células		
		X1	X2	X3
PB 98	<i>Wickeranomyces anomalus</i>	+/-	+	++
PB 100	<i>Pichia kudriadzevii</i>	-	-	-
PB 15	<i>Hanseniaspora guillermoidii</i>	-	-	-
PB 99	<i>Wickeranomyces anomalus</i>	+/-	+	++
PB 48	<i>Pichia kudriadzevii</i>	-	-	-
PB 50	<i>Pichia kudriadzevii</i>	-	-	-
PB 51	<i>Pichia kudriadzevii</i>	-	-	-
PB 52	<i>Pichia kudriadzevii</i>	-	-	-
PB 53	<i>Pichia kudriadzevii</i>	-	-	-
PB 54	<i>Pichia manshurika</i>	+/-	+	++
PB56	<i>Pichia occidentalis</i>	-	-	-
PB57	<i>Pichia occidentalis</i>	-	-	-
PB 58	<i>Pichia occidentalis</i>	-	-	-
PB 101	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-
PB 97	<i>Wickeranomyces anomalus</i>	+/-	+	++

Referencia: (++) buena actividad (-) sin actividad, +/- posible actividad.

Adhesión de levaduras a células Caco-2 /TC-7

Como se observa en la Tabla 5.4, la capacidad de adhesión de las levaduras a las células Caco-2/TC-7 cambió significativamente, mostrando los valores más bajos para *P. manshurika* PB 54 (47.56%) y los más altos por *W. anomalus* PB97 (100%).

Tabla 5.4: Levaduras con aptitudes probióticas, nomenclatura y porcentaje de adhesión a las células Caco-2/TC-7.

Género y especie	Nomenclatura	Porcentaje de adhesión a células Caco-2/TC-7
<i>Pichia manshurika</i>	PB 54	47.56 ± 9.69
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB 97	100.00 ± 6.43
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB 98	56.10 ± 6.90
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PB 99	75.93 ± 2.61

Referencia: En negrita se resaltan los valores destacables

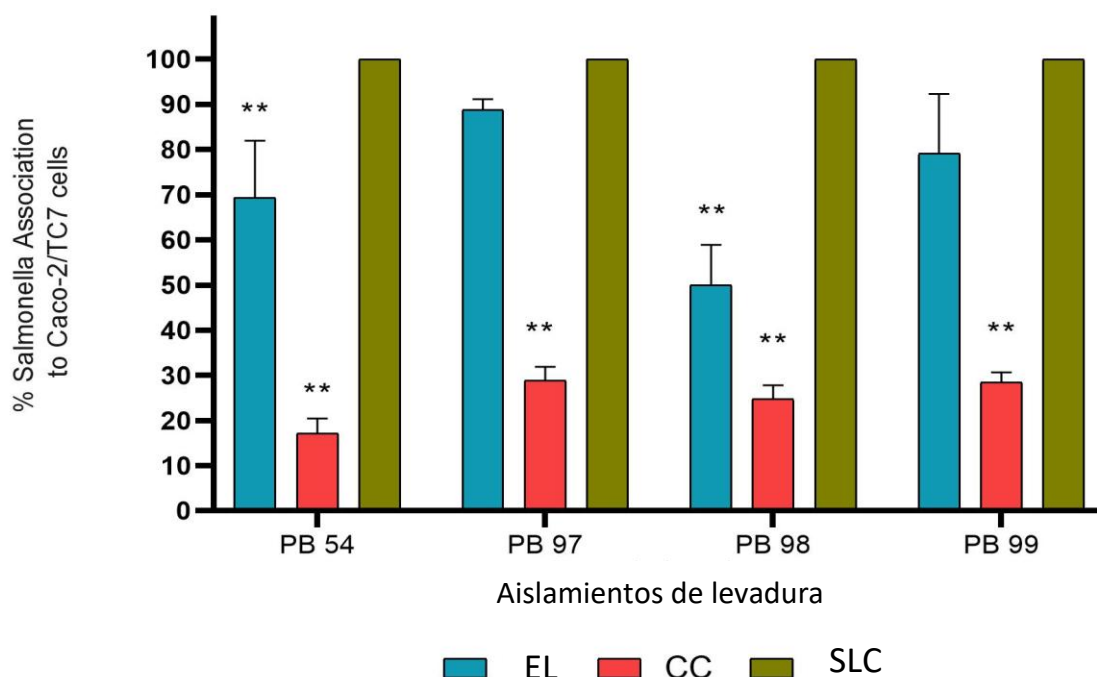


Figura 5.3: Efecto de las levaduras con aptitudes probióticas sobre la asociación de *S. enteritidis* a Caco-2/TC-7. Porcentaje de asociación de *S. enteritidis* a células Caco-2/TC-7 tratadas con levaduras antes de la adición del patógeno (EL), *S. enteritidis* precultivadas con levaduras (CC) y *S. enteritidis* pretratadas con sobrenadantes de cultivos libres de células de levaduras (SLC).

**Diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) respecto al control representando 100% de asociación.

Efecto de las levaduras en la asociación e invasión de *Salmonella Enteritidis* CIDCA 101 a células Caco-2/TC-7.

Los resultados indicaron que cuando los enterocitos se tratan previamente con las levaduras *W. anomalus* PB 98 y *P. manshurika* PB 54, la asociación de *S. enteritidis* a las células epiteliales se reduce significativamente en un 50 y un 30%, respectivamente (Figura 5.3). Por otra parte, todas las levaduras disminuyeron significativamente el porcentaje de asociación de *S. enteritidis* entre el 67 y 82 % mediante pretratamiento del patógeno con cepas de levadura en co-cultivo (CC). Además, no se observó ningún efecto sobre la asociación de *S. enteritidis* a las células Caco-2/TC-7 cuando se pretrataron con cualquiera de los sobrenadantes de cultivo libres de células (SLC) de las levaduras.

En cuanto al porcentaje de invasión de *S. Enteritidis* a las células Caco-2/TC-7, el tratamiento con todas las levaduras ensayadas, excepto PB97, lo redujo

significativamente entre un 32 y un 65 % (Figura 5.4). Para el tratamiento en co-cultivo, todas las cepas mostraron una reducción en el porcentaje de invasión de *S. Enteritidis* superior al 70 %. Cuando el patógeno se incubó con el SLC de levaduras, se produjo una reducción significativa de su capacidad de invasión (entre el 57 y el 76 %). En general, el tratamiento con el efecto más notable sobre la mayoría de las cepas fue la preincubación con CC, ya que disminuyó el porcentaje de asociación e invasión de *S. Enteritidis* en más de un 50% en la mayoría de las levaduras.

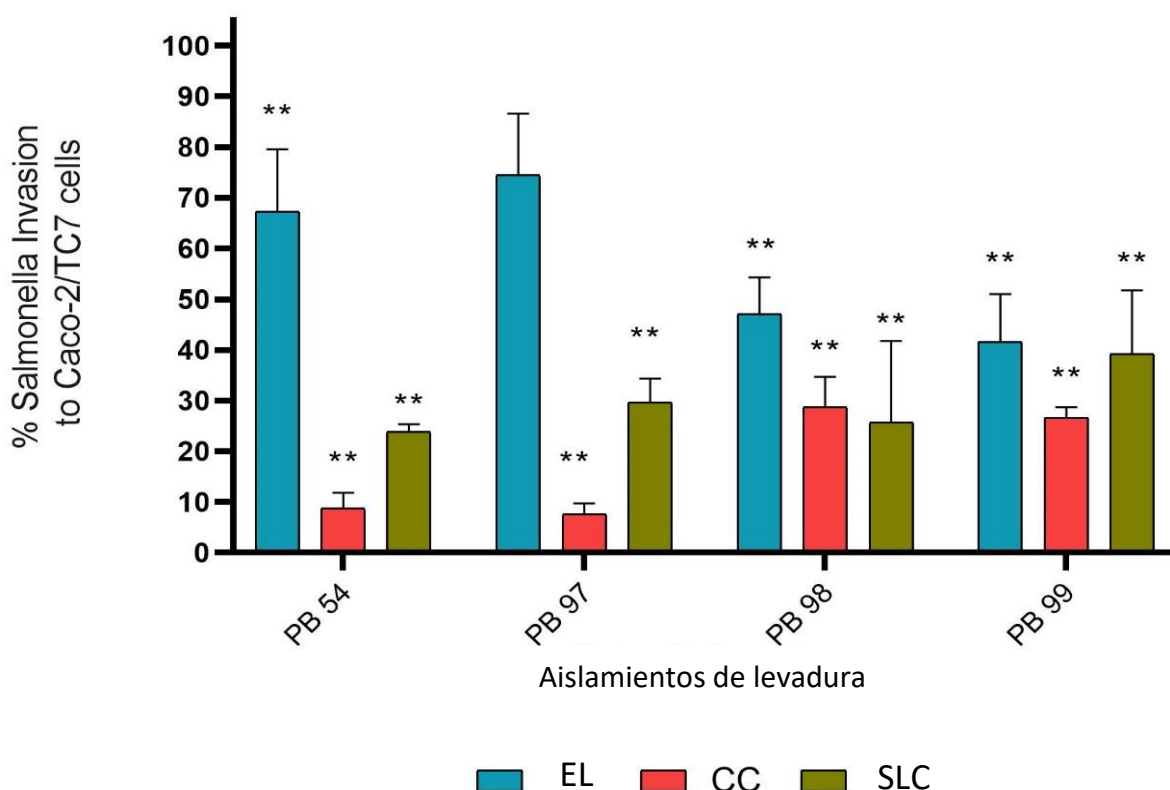


Figura 5.4: Efecto de las levaduras con aptitudes probióticas sobre la invasión de *S. enteritidis* a Caco-2/TC-7. Porcentaje de invasión de *S. enteritidis* a células Caco-2/TC-7 tratadas con levaduras antes de la adición del patógeno (EL), *S. enteritidis* precultivadas con levaduras (CC) y pretratamiento de *S. enteritidis* con sobrenadantes de cultivos libres de células de levadura (SLC).

Inmunomodulación de la respuesta innata epitelial mediada por las levaduras

Todas las levaduras ensayadas mostraron capacidad para reducir la respuesta inmune innata de Caco-2 inducida por FliC, disminuyendo la luminiscencia en

valores entre el 60 y el 81 %, demostrando de este modo la capacidad antiinflamatoria de las levaduras con aptitudes probióticas (Figura 5.5).

Es importante mencionar que la disminución de la expresión de luciferasa no fue debido a daño celular ya que el porcentaje de actividad LDH para todos los tratamientos no fue significativamente diferente al del control ($p < 0,05$), obteniéndose valores inferiores al 3% en todos los casos (datos no mostrados).

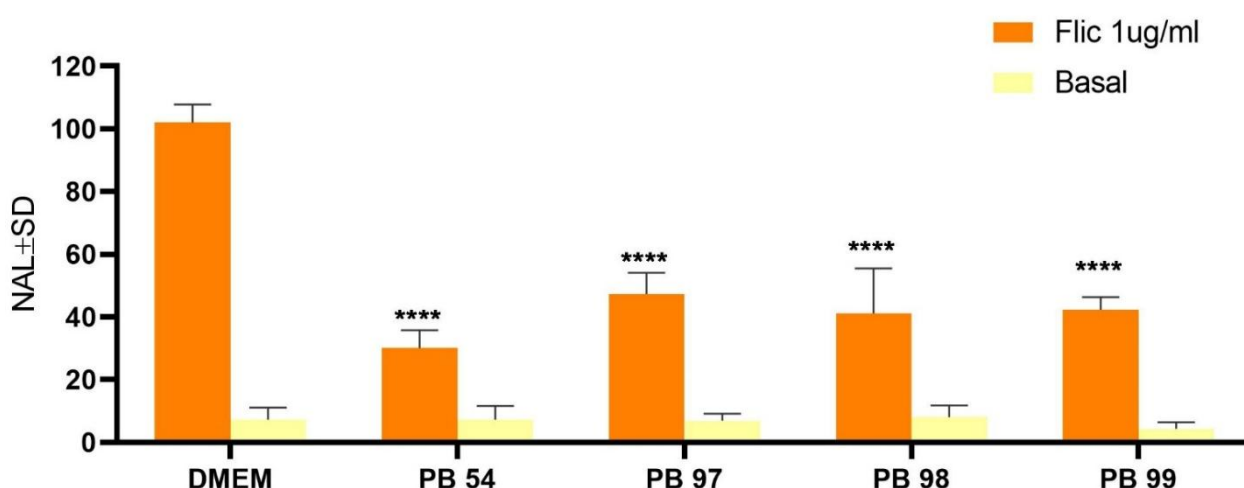


Figura 5.5: Efecto de las levaduras sobre la inmunomodulación de células Caco-2-CCL20: luc. Se muestran los resultados representativos de dos experimentos diferentes. Los resultados se expresan como actividad luciferasa normalizada (NAL), utilizando los niveles de células estimuladas en ausencia de células de levadura como 100 % de activación.

Referencia: **** $p < 0,0001$.

DISCUSIÓN

Algunos autores han reportado la producción de proteasas por levaduras no-*Saccharomyces*, evaluando su producción cualitativamente (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1998; Ogunremi *et al.*, 2015a; Mestre-Furlani *et al.*, 2017). Asimismo, Ogunremi *et al.* (2015) en los mismos géneros que en el presente trabajo y, en concordancia, informaron que cepas de la especie *P. kudriavzevii* mostraron actividad proteasa positiva. Además, Merchán *et al.* (2022) detectaron actividad proteolítica en cepas de *P. jadinii* y *P. kudriavzevii* (especie evaluada en este estudio), esta última mostró mayor capacidad proteolítica. Por último, Elhalis *et al.* (2021) detectaron actividad proteasa *W. anomalus*, y de *H. uvarum* igual que en nuestro estudio.

En cuanto a la actividad lipasa si bien observamos esta actividad en todas las levaduras evaluadas, existen discrepancias con otros autores. Syal *et al.* (2013) y Bonatsu *et al.* (2018) realizaron sus ensayos en aislamientos del género *Pichia*, pero no encontraron resultados positivos. Por el contrario, Maturano *et al.* (2009) y Onguremi *et al.* (2015b) encontraron esta propiedad en todas las levaduras no-*Saccharomyces* analizadas en las mismas condiciones ensayadas, particularmente en levaduras de las especies *Pichia* y *Hanseniaspora*. Utilizando otra técnica, Parafati *et al.* (2022) informaron cepas de *P. kluyveri* y *W. anomalus* con actividad lipasa extracelular. Asimismo, en un trabajo realizado por Fernandez-Pacheco *et al.* (2021) se realizaron estudios a 10 cepas de levadura *S. cerevisiae* y 10 no-*Saccharomyces* (pertenecientes a los géneros *Pichia*, *Hanseniaspora*, entre otras) aisladas de diferentes ecosistemas alimentarios, y en contraste con nuestro estudio no detectaron esta actividad, mientras que Merchán *et al.* (2022) detectaron actividad lipasa en cepas de *P. jadinii* y *P. kudriavzevii* (especie evaluada en este estudio).

Es importante aclarar, que otra característica importante a buscar en las levaduras probióticas es su capacidad de actuar como antioxidantes o mejorar la biodisponibilidad de los compuestos antioxidantes (Vergara *et al.* 2023b). En este estudio, todas las levaduras produjeron la enzima catalasa, esta capacidad de un microorganismo para producir esta enzima le otorga una ventaja competitiva, ya que el peróxido de hidrógeno puede “capturar” electrones y átomos de las células microbianas, provocando la muerte de esos microorganismos (Zhao y Drlica *et al.*, 2014; Jia *et al.*, 2015; Zimo *et al.*, 2020). Resultados comparables reportaron Fernandez-Pacheco *et al.* (2021) al evaluar 10 cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y 10 no-*Saccharomyces* (pertenecientes a los géneros *Pichia*, *Hanseniaspora*, entre otras). Los autores infirieron que estas levaduras poseen un sistema de defensa mediado por esta enzima (França *et al.*, 2007; Herrero *et al.*, 2008). Por otro lado, Zhao *et al.* (2021) también encontraron actividad catalasa en una cepa de *W. anomalus*. Los autores reportan que esta actividad además podría ser eficaz para aliviar la inflamación intestinal, además de tener propiedades antioxidantes y antagónicas (Tomusiak-Plebanek *et al.*, 2018).

En cuanto a la actividad β - glucosidasa, en este estudio se observó que los 4 aislamientos que fueron positivos en el ensayo cualitativo alcanzaron los valores

más destacados en el ensayo cuantitativo, a excepción de *P. kudriavzevii* PB100. Si bien se ha reportado previamente a cepas del género *Pichia* como buenos productores de enzimas β -glucosidasas, aportando a las propiedades organolépticas del vino (Yang *et al.*, 2020, Vicente *et al.*, 2021), en este estudio todos los aislamientos pertenecientes a este género no fueron buenos productores. Por otro lado, en concordancia con los resultados del presente estudio, Maturano *et al.* (2009) y Huang *et al.* (2021) reportaron cepas de las especies *Hanseniaspora guilliermondii* y *W. anomalus* con alta actividad de β -glucosidasa, destacándose los valores enzimáticos registrados en el espacio periplasmático.

En el presente trabajo, se ha indicado que todos los aislamientos de levaduras exhiben la capacidad de reducir el colesterol, aunque la magnitud de esta reducción varía según el aislamiento. Coincidentemente con estos hallazgos, Chen *et al.* (2010) observaron que después de 48 h, *P. kudriavzevii* demostró una capacidad de reducción de colesterol del 44.3 %. Además, Ogunremi *et al.* (2015), bajo las mismas condiciones, encontraron una reducción de más del 60 % en 3 cepas de *P. kudriavzevii*. Aunque se ha informado que las cepas de *S. cerevisiae* logran reducciones de más del 80% (Psomas *et al.*, 2003; Fernández-Pacheco *et al.*, 2021), en nuestro estudio *S. cerevisiae* PB101 y los aislamientos de referencia probiótica *S. boulardii* lograron valores significativamente más bajos. Existen numerosos reportes sobre diversos mecanismos a través de los cuales las cepas probióticas pueden influir en la reducción del colesterol (como la asimilación, la unión a la superficie celular, la incorporación a la membrana celular, la desconjugación de la bilis y la coprecipitación de colesterol, entre otros), se ha observado que las levaduras reducen principalmente el colesterol a través de la asimilación mediante el crecimiento celular (Psomas *et al.*, 2003).

El aumento de la resistencia a los antibióticos se ha convertido en un desafío significativo para combatir las bacterias enteropatógenas. De este modo, los probióticos son una estrategia muy atractiva, particularmente las levaduras con esta propiedad, debido a las múltiples ventajas previamente descritas.

Por esta razón una de las propiedades más deseables de las levaduras probióticas es su actividad antagonista contra la adherencia y translocación de patógenos que afectan varios sitios de la mucosa (Boirivant y Strober, 2007). Para

detectar actividad antimicrobiana es esencial realizar ensayos in vitro, y de este modo determinar la capacidad de los probióticos para inhibir el crecimiento de otras especies contaminantes o patógenas (Monika *et al.*, 2021). Los resultados de este trabajo fueron positivos para la actividad antimicrobiana en 4 cepas de las 15 levaduras ensayadas: *Pichia masmurika* PB54 y *Wickerhamomyces anomalus* PB97, PB98 y PB99. Estos resultados son muy valiosos ya que otros autores informaron que las levaduras de estas especies no mostraron actividad antimicrobiana frente a diversas bacterias enteropatógenas (Binetti *et al.*, 2013; Kourelis *et al.*, 2010; Amorim *et al.*, 2018). Por otro lado, similar a este estudio, Merchán *et al.* (2020) informó que 16/54 cepas mostraron actividad antimicrobiana para el género *Pichia* (*P. fermentans*, *P. kudriavzevii*) frente a *E. coli* y *S. aureus*. Además, Bajaj *et al.* (2013) y Saber *et al.* (2017) también informaron actividad antimicrobiana de la cepa *P. kudriavzevii* RY55 contra *E. coli*, *Salmonella* spp. y *S. aureus*. Por otro lado, la levadura *W. anomalus* ha sido investigada durante varios años por su amplio potencial biotecnológico. Su efecto se ha asociado generalmente con la producción de toxinas killer (KT) y volátiles (Cappelli *et al.*, 2014; de Ingeniis *et al.*, 2009; Oro *et al.*, 2018).

Si bien, 4 aislamientos presentaron actividad antimicrobiana bajo las condiciones ensayadas, no debe descartarse a las levaduras restantes como posibles candidatas probióticas. Se han propuesto numerosos mecanismos de acción para explicar la protección probiótica de las levaduras contra infecciones bacterianas. Esta actividad puede ocurrir a través de la exclusión competitiva, la disminución del potencial redox, la coagregación o la producción de sustancias antimicrobianas que incluyen ácidos orgánicos, otros metabolitos primarios como el peróxido de hidrógeno y compuestos especiales como bacteriocinas y antibióticos (Dey, 2017).

Como los resultados de las levaduras ensayadas en este trabajo no fueron concluyentes para *Salmonella entérica serovar* Enteritidis CIDCA se decidió evaluar el sobrenadante libre de células en 3 concentraciones diferentes. A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron 4 aislamientos de levaduras para realizar los estudios de antagonismo concretamente contra *S. Enteritidis* en líneas celulares Caco-2/TC-7 y Caco-2:ccl20luc inducida por FliC. Por lo tanto, en este estudio se evaluaron algunos de los principales mecanismos antimicrobianos que las

levaduras probióticas pueden emplear: la adhesión de los probióticos a la mucosa formando una barrera (previniendo la adhesión de patógenos), la interacción probiótico-patógeno, el efecto antimicrobiano de las sustancias secretadas por los probióticos (amensalismo) y la propiedad de la inmunomodulación, como un efecto antagonista.

Aunque las propiedades relacionadas con la adherencia epitelial se consideran un criterio de selección importante para cepas con aptitudes probióticas, no es un rasgo que deba mirarse solo desde un punto de vista. Para la evaluación *in vitro*, se han utilizado líneas celulares de tumores de colon humano como Caco-2 para aproximarnos a dilucidar los mecanismos implicados en las interacciones entre el microorganismo y la mucosa intestinal (Gheziel *et al.*, 2018). Los 4 aislamientos no- *Saccharomyces* mostraron una buena adhesión, con valores que oscilan entre el 47,56 % y el 100% de adherencia a las células Caco-2/TC-7 a pesar de su baja hidrofobicidad. En contraste con los resultados obtenidos, numerosos autores informaron una adhesión baja a moderada (<14%) para diferentes cepas no-*Saccharomyces* de los géneros *Kluyveromyces* y *Pichia* (Chen *et al.*, 2010; Fadda *et al.*, 2017; Bonatsou *et al.*, 2018; Menezes *et al.*, 2020; Motey *et al.*, 2020; González-Orozco *et al.*, 2023). En concordancia con este estudio, Diosma *et al.*, (2014) informaron una adhesión del 60% para cepas que no- *Saccharomyces* y menos del 30% para cepas *Saccharomyces*. Recientemente, Fernández-Pacheco *et al.*, (2021) analizaron características funcionales y tecnológicas de varias cepas *Saccharomyces* y no- *Saccharomyces* aisladas de diversas fuentes, en donde la adhesión aproximada fue entre 60% y 65 % para 2 cepas de *W. anomalus* (aisladas de una destilería) mientras que para 2 cepas del género *Pichia* aisladas de bodegas de vino, el porcentaje de adhesión fue entre 45 – 60 %.

Es importante señalar que cada célula de levadura puede poseer numerosas adhesinas diferentes, y la expresión diferencial de sus genes asociados está altamente adaptada a un entorno particular (Verstrepen y Klis, 2006), lo que podría explicar las diferencias observadas en este estudio con respecto a los trabajos discutidos. El valor del porcentaje de adhesión nos permite predecir la colonización temporal del tracto gastrointestinal y, además, la formación de una barrera física que prevenga la adhesión de patógenos a la mucosa (Menezes *et al.*, 2020). Además, se han reportado otros mecanismos que no implican necesariamente una

buena adhesión. Por ejemplo, las bacterias enteropatógenas, incluidas las especies de *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. typhi* y levaduras como *Candida albicans*, se unen preferencial e irreversiblemente a las superficies de *S. boulardii* (Rajkowska y Kunicka-Styczyńska, 2012; Tiago *et al.*, 2012; Posadas *et al.*, 2017). La unión de estos microorganismos patógenos a la pared celular de la levadura limita su infectividad, ya que *S. boulardii* no se une a las células epiteliales del intestino y, en consecuencia, las bacterias adherentes pasan transitoriamente a través del tracto gastrointestinal y posteriormente se excretan en las heces (Czerucka *et al.*, 2007). Se ha reportado que, además de la propiedad de adherirse y eliminar patógenos, las levaduras probióticas también pueden adsorber a su pared fuertemente ciertas toxinas como la del cólera, o compuestos producidos por *Clostridium difficile*, con el mismo efecto de arrastre y eliminación (Tiago *et al.*, 2012).

La asociación e invasión de *Salmonella* spp. al epitelio intestinal representan un paso crítico para iniciar la infección. En este trabajo, se evaluó la actividad antimicrobiana de cepas de levaduras de vino bajo 3 tratamientos para proteger el epitelio intestinal contra el daño causado por *S. Enteritidis*: El Efecto de la Levadura (EL), pretratamiento de *Salmonella* con cultivo de levadura (CC) y pretratamiento de *Salmonella* con sobrenadante de cultivo libre de células (SLC). En general, los ensayos demostraron que cuando las levaduras y *S. Enteritidis* fueron cocultivadas, la capacidad de adhesión e invasión de este patógeno a las células Caco-2/TC-7 disminuye, mostrando el efecto antagonista de las levaduras sobre las bacterias en la invasión a las células intestinales. Sin embargo, los 3 tratamientos fueron muy efectivos para inhibir la invasión de *Salmonella* a las células Caco-2/TC-7, ya que se evidenció una reducción significativa en la mayoría de las condiciones. Aunque la competencia por sitios de unión en la mucosa intestinal parece ser un efecto protector común de los probióticos contra los enteropatógenos, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el antagonismo contra *Salmonella*, como lo evidencian estas cepas no-*Saccharomyces*, está mediado principalmente por la compleja interacción entre los probióticos y el patógeno en lugar de un simple efecto de barrera. Estas interacciones pueden involucrar tanto el contacto celular como la producción de metabolitos por la levadura; esto podría afectar a las adhesinas de superficie e invasinas expresadas por *Salmonella*, reduciendo así el riesgo de infección. En este contexto, hay evidencia que respalda la idea de que

Saccharomyces boulardii ejerce un biocontrol contra *Clostridium difficile* mediante actividad proteolítica y obstrucción estérica (Tasteyre *et al.*, 2002). Por otro lado, Fu *et al.* (2023) sugieren que la actividad antibacteriana de las levaduras puede originarse a partir de metabolitos proteicos, como ciertas enzimas como toxinas killer o micocinas, así como ácidos orgánicos como el ácido acético.

Específicamente, las células epiteliales intestinales y las uniones estrechas (Tigh Junctions –TJ-) constituyen la primera línea de defensa contra la invasión de microorganismos patógenos y compuestos tóxicos. Su alteración implica la entrada al lumen intestinal (permeabilidad paracelular) y, en última instancia, la invasión circulatoria y tisular (Slifer y Blikslager, 2020). Estas alteraciones conducen a la activación de vías inflamatorias y niveles elevados de citoquinas proinflamatorias (Bhat *et al.*, 2019).

Dado que las características probióticas dependen de la cepa y de su estado fisiológico, es preciso demostrar las propiedades beneficiosas de las levaduras, como su capacidad para modular la respuesta inmunitaria innata. Así pues, se analizó la capacidad de estas levaduras no- *Saccharomyces* procedentes del entorno vitivinícola para modular la respuesta a estímulos proinflamatorios en células epiteliales intestinales.

En este sistema de evaluación, todas las cepas de levaduras analizadas fueron capaces de inhibir la activación inducida por flagelina, siendo la cepa PB54 del género *Pichia* la más inmunomoduladora. Hasta la fecha, no se han reportado estudios sobre cepas enológicas del género estudiado con propiedades inmunomoduladoras. Diversos estudios infieren que las propiedades promotoras de la salud de los microorganismos probióticos son específicas de cada aislamiento. Los miembros de la misma especie pueden inducir actividad proinflamatoria o antiinflamatoria, modular diferencialmente la microbiota intestinal y provocar efectos antimicrobianos específicos (Ramos *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2017). Como se mencionó anteriormente, uno de los mecanismos de patogénesis de *Salmonella* sp. es la inducción de la inflamación, por lo que los resultados obtenidos en este estudio son muy relevantes, proporcionando evidencia de que los cuatro aislamientos analizados provenientes del ambiente vitivinícola y pertenecientes a diferentes

géneros tienen la capacidad de modular la respuesta inmune inflamatoria innata, que es un mecanismo antagonista contra este enteropatógeno.

Finalmente, la actividad antimicrobiana es una característica interesante y especialmente considerada para los probióticos, por lo que este estudio podría ser utilizado como base para seleccionar levaduras con este potencial, estudiar posibles mecanismos de acción y abrir un camino hacia posibles aplicaciones terapéuticas, destacándose la relevancia de los resultados encontrados en el presente estudio.

CONCLUSIONES

- Algunas de las levaduras evaluadas presentaron actividad lipasa, proteasa, catalasa y β -glucosidasa.
- Los cuatro aislamientos (*W. anomalous* PB 97, 98 y 99; *P. manshurika* PB 54) de levaduras que mostraron actividad antagonista contra *S. Enteritidis* se comportaron de manera diferente en los diversos modelos de interacción estudiados, infiriendo mecanismos antagónicos específicos a nivel cepa.
- Aunque no todas las levaduras mostraron actividad antimicrobiana en las pruebas realizadas, esto no invalida su potencial, ya que solo se evaluaron contra ocho cepas patógenas.
- Es destacable indicar que para las levaduras no- *Saccharomyces* provenientes de ambientes vitivinícolas, estos son los primeros estudios que demuestran su potencial probiótico.
- Estos resultados son prometedores para el desarrollo de nuevas alternativas a los antibióticos clásicos, especialmente en la lucha contra enteropatógenos y en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la hipercolesterolemia. Estos hallazgos abren la puerta para seguir explorando nuevas líneas de investigación.

CAPÍTULO 6

CARACTERIZACION TECNOLÓGICA Y
EMPLEO COMO CULTIVOS STARTER EN
LOS PROCESOS FERMENTATIVOS DE
CERVEZA ARTESANAL TIPO ALE Y
ACEITUNA DE MESA.

INTRODUCCIÓN

Es bien sabido que los alimentos son fuentes de nutrientes, vitaminas y minerales que favorecen las funciones corporales y la salud (por ejemplo, la respiración, la producción de energía y la respuesta inmunitaria). Los alimentos se consumen principalmente como sustratos celulares para la obtención de energía y la diferenciación y proliferación celular, y como base de las barreras químicas contra la oxidación celular. Dentro de los diferentes tipos de alimentos, los alimentos con fines dietéticos específicos (por ejemplo, light, dietéticos, bajos en grasa) y los categorizados como alimentos funcionales son las principales categorías estudiadas en los últimos 20 años (Granato *et al.*, 2020).

El término “alimento funcional” apareció por primera vez en Japón, en 1984. El gobierno japonés definió una nueva categoría de producto, Alimentos para Usos Sanitarios Específicos (FOSHU), como “alimento que contiene un ingrediente con funciones para la salud y aprobado oficialmente para afirmar sus efectos fisiológicos sobre la salud del cuerpo humano” en un marco legislativo específico (Alongi y Anese, 2021). Desde entonces el interés de la investigación por los alimentos funcionales experimentó un fuerte aumento (Alongi y Anese, 2021) y esta creciente atención a nivel mundial ha influido enormemente en su mercado (Kaur y Das, 2011). Además, se define como alimento funcional a “cualquier alimento que tenga un impacto positivo en la salud, el rendimiento físico o el estado de ánimo de un individuo, además de su valor nutritivo” (Aguiar *et al.*, 2019).

En el país la definición de los alimentos funcionales no está presente como tal en el Código Alimentario Argentino (CAA), por tanto, no hay reglamentación vigente. Sin embargo, esta definición y su incorporación al CAA es analizada por un grupo de trabajo ad-hoc creado en el año 2009 por la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL). Asimismo, y en estrecha relación con lo antes mencionado, la CONAL incorporó el Art. 236 al Capítulo V: Rotulación del CAA, referido a las declaraciones de propiedades saludables, que fue presentada por la Coordinadora de las Industrias de Productos Alimenticios (COPAL), en marzo de 2009. En ese marco, se considera como “declaración de propiedad saludable” a cualquier representación que exprese, sugiera o implique la existencia de una relación entre

el alimento -o un constituyente de dicho alimento- y la salud. Y las divide en tres tipos:

1-Declaración de propiedades de función de nutrientes

2-Declaración de otras propiedades de función o declaración de propiedades de incremento de función

3 -Declaraciones de propiedades de reducción de riesgo de enfermedad.

Hoy en día, los consumidores demandan alimentos que se produzcan y procesen de forma sostenible, que se consideren seguros, frescos y naturales, y que tengan valor nutricional (Ballini *et al.*, 2023). Esto ha producido una intensa búsqueda de innovación en el campo de los alimentos funcionales y abre camino para investigar diversas estrategias para generar una amplia gama de compuestos bioactivos que promueven la salud, como probióticos, prebióticos, fitoquímicos o hierbas, antioxidantes naturales, péptidos bioactivos, etc. (Fernandes *et al.*, 2019). Las manifestaciones de estos productos biológicos activos de forma natural en los alimentos o en el enriquecimiento externo señalan la funcionalidad de los alimentos (Konar *et al.*, 2018; Martirosyan y Singh, 2015). Los probióticos son el grupo de complementos alimenticios funcionales de más amplio y rápido crecimiento en todo el mundo (Champagne *et al.*, 2018). Se ha demostrado que también los microorganismos asociados a los alimentos que se encuentran de forma natural pueden llegar al intestino como células viables, interactuar con el huésped humano y potencialmente proporcionar beneficios para la salud intestinal (David *et al.*, 2014). En este contexto, una dieta puede representar no sólo una fuente de nutrientes para el cuerpo, sino que también puede ser un vehículo de microorganismos exógenos con efectos positivos para la salud humana (Sekirov *et al.*, 2010; O'Hara *et al.*, 2006).

Por otro lado, en los últimos años, el consumo de alimentos y bebidas fermentados se ha incrementado sustancialmente en todo el mundo, ya que juegan un papel central en la dieta diaria de varias culturas debido a sus múltiples beneficios para la salud como antimicrobianos, antidiabéticos, antiateroscleróticos, antioxidantes y antiinflamatorios (Sanlier *et al.*, 2019). Sumado a esto, el aumento de la conciencia del consumidor sobre la salud, bienestar, prevención de

enfermedades en relación a la alimentación ha adquirido relevancia. Por ende, ha provocado un aumento en la oferta de alimentos funcionales en el mercado. Bajo este contexto, los microorganismos fermentadores, el proceso de fermentación y sus productos atraen el interés científico en el campo de la microbiología aplicada (Canonico *et al.*, 2021). Paralelamente, con el aumento del vegetarianismo y el veganismo, también existe una demanda colectiva de productos probióticos fermentados no lácteos (Canonico *et al.*, 2021).

Los aminoácidos representan componentes clave para el proceso de crecimiento de la levadura, ya que están estrictamente relacionados con la producción de biomasa, así como con la síntesis de compuestos aromáticos (Silva Ferreira *et al.*, 2014; Burin *et al.*, 2015; Stribny *et al.*, 2015; Fairbairn *et al.*, 2017). Sin embargo, el metabolismo de los aminoácidos en las levaduras también podría plantear problemas de seguridad (factores tóxicos y alergénicos), ya que es a partir de la descarboxilación de los aminoácidos que se producen las aminas biógenas (Speranza *et al.*, 2019). Las aminas biógenas (AB) son compuestos orgánicos nitrogenados que se producen por la descarboxilación de aminoácidos (AA), en una reacción catalizada por enzimas decarboxilasas. Si bien algunas AB son producidas fisiológicamente en el organismo humano cumpliendo funciones importantes, el consumo de alimentos que contengan estos compuestos puede causar efectos tóxicos en los consumidores. Este efecto depende del nivel y toxicidad de cada AB, la sensibilidad de cada individuo y la coexistencia de factores potenciadores de los efectos (EFSA, 2011). Aunque generalmente se supone que hay pocos riesgos asociados con las levaduras en términos de producción de AB (Izquierdo-Pulido *et al.*, 1995; Filipe-Ribeiro *et al.*, 2019), algunas cepas de diferentes especies de levadura ya han sido descritas como productoras de aminas biógenas (Gardini *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2009; Fernández-Pacheco *et al.*, 2021).

Las matrices alimentarias por excelencia donde se pueden encontrar probióticos son productos lácteos. Sin embargo, la mayor incidencia de intolerancia a la lactosa, la preocupación por el colesterol y, por otro lado, la amplia difusión de nuevos estilos de vida (veganos y vegetarianos) impulsaron nuevas investigaciones hacia alimentos probióticos no lácteos, como frutas y verduras, que son ricas en

vitaminas, minerales, carbohidratos, fibras y compuestos antioxidantes (Granato *et al.*, 2010; Vijaya *et al.*, 2015).

La cerveza no solo es una fuente de nutrientes como vitaminas, aminoácidos y compuestos fenólicos, sino que es bien aceptada y consumida por la mayoría de las personas en todo el mundo (Zendeboodi *et al.*, 2021). La cerveza es una bebida popular, y puede ser una interesante fuente de alimento o fuente de probióticos. Debe tenerse en cuenta que para ser considerada un alimento funcional debe consumirse en cantidades moderadas entre 330 a 370cm³ diarios y dentro del marco legal establecido por cada país (Sohrabvandi *et al.*, 2010). Particularmente, la cerveza artesanal ha registrado un acelerado y continuo proceso de expansión tanto a nivel nacional como mundial. Esto último promueve la búsqueda e incita a desarrollar nuevas cervezas artesanales que combinen una alta calidad organoléptica y un mayor valor nutricional (Canocico *et al.*, 2021). En ese sentido, los consumidores buscan productos saludables e innovadores (Senkarcinova *et al.*, 2019).

Para su producción se emplea principalmente agua, lúpulo, cereales malteados y levaduras comerciales. De los 150 géneros de levaduras, representados por unas 1500 especies (Kurtzman *et al.*, 2011), tan solo el género *Saccharomyces* es empleado tradicionalmente en la fermentación alcohólica de cervezas tipo *ale* y *lager* (Bokulich & Bamforth, 2013; Martins *et al.*, 2016; Capece *et al.*, 2018). Las microcervecías centran principalmente su atención a la calidad de las materias primas para obtener cerveza artesanal caracterizada y diversificada por perfiles aromáticos y nutricionales peculiares. Estas cervezas artesanales se diferencian significativamente de las industrializadas donde el principal objetivo es entregar un producto de calidad estandarizada reconocida por el consumidor. Las cervezas artesanales suelen tener un sabor único como resultado de procesos tecnológicos específicos y la selección de materias primas, a menudo de origen local (Cipollaro *et al.*, 2018; Schnell y Reese, 2003). Probablemente, esta sea la razón principal por la que las cervezas artesanales atraen a los consumidores que buscan una “revolución del sabor” (Alfeo *et al.*, 2019). Por estas razones, el mercado de bebidas impulsa el desarrollo de cervezas especiales como cervezas bajas en alcohol, bajas en calorías, sin gluten, con sabores novedosos y que

promueven la salud (funcionales). Entre las cervezas funcionales, se destaca la cerveza xantohumulol, la cerveza estrogénica y la cerveza probiótica (Yeo y Liu, 2014).

La cerveza probiótica sin filtrar es una de las innovaciones en cervezas funcionales, que se produce mediante la incorporación de microorganismos probióticos como microorganismos fermentadores, co-fermentador o la incorporación de microorganismos probióticos vivos en el producto final (Zendeboodi *et al.*, 2021).

Las aceitunas de mesa son frutos fermentados con un impacto significativo en la economía a nivel mundial, y, particularmente en la Argentina, con una importancia a nivel regional (Castillo, 2013). El proceso de fermentación no solo garantiza la conservación de las aceitunas, sino que también mejora sus características nutricionales y tecnológicas, a la par que ofrece beneficios para la salud. Gracias a su elevado valor nutricional y contenido de fibras, aminoácidos, ácidos grasos insaturados, vitaminas y compuestos antioxidantes, se consideran un importante alimento funcional (Bonatsou *et al.*, 2017). En el proceso fermentativo intervienen diversas poblaciones microbianas, destacando bacterias del ácido láctico (BAL) y levaduras como las especies dominantes, junto con otros microorganismos como *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y, ocasionalmente, mohos (Heperkan *et al.*, 2009). La actividad metabólica de estos microorganismos determina aspectos clave como el sabor, la textura y la seguridad del producto (Hammes, 1990).

Desde hace más de una década, varios estudios han investigado la microbiota de levaduras asociada con las fermentaciones de aceitunas de mesa, con el objetivo de identificar posibles candidatos probióticos para su uso como cultivos iniciadores (Argyri *et al.*, 2013; Bautista-Gallego *et al.*, 2013; Botta *et al.*, 2014; Pérez Montoro *et al.*, 2016; Prete *et al.*, 2017; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2019; Prete *et al.*, 2020). Además, diferentes estudios ya han validado las aceitunas de mesa de diversos cultivares como portadores efectivos de cepas probióticas al tracto gastrointestinal humano (Lavermicocca *et al.*, 2005). Esto se debe a los nutrientes liberados por las aceitunas y a la presencia de una cera epicuticular hidrofóbica en la superficie de las drupas, que facilita la adhesión microbiana

(Lavermicocca *et al.*, 2005; Valerio *et al.*, 2011; Panagou, 2014; Benítez-Cabello *et al.*, 2015; Grounta y Argyri *et al.*, 2015; Grounta *et al.*, 2016; Perpetuini *et al.*, 2016; Bonatsou *et al.*, 2017; Pérez Montoro *et al.*, 2018). Existen reportes acerca de levaduras tales como *D. hansenii*, *T. delbrueckii*, *K. lactis* y *S. cerevisiae* asociadas con la microbiota de aceitunas de mesa, las cuales poseen características probióticas (Pennacchia *et al.*, 2008; Kourelis *et al.*, 2010; Moslehi-Jenabian *et al.*, 2010; Etienne-Mesmin *et al.*, 2011).

Recientemente, se ha demostrado que los productos derivados de vegetales (frutas, jugos de frutas, cereales y legumbres) pueden actuar como portadores de microorganismos debido a su estructura intrínseca; por lo que los microorganismos pueden colonizar los poros, lesiones, lenticelas e irregularidades presentes en la superficie (Martins *et al.*, 2013). Además, los vegetales también son ricos en compuestos prebióticos, que protegen a los microorganismos probióticos de las duras condiciones del tracto gastrointestinal y son una fuente de nutrientes que influye positivamente en la supervivencia bacteriana (Ranadheera *et al.*, 2010; Lamsal *et al.*, 2009).

En este contexto, dos cuestiones importantes a considerar son la evaluación de los factores tecnofuncionales de cultivos iniciadores con aptitudes probióticas y el efecto sobre el perfil sensorial del alimento en el cual se incorpore. Es por ello que en este capítulo se estudió la caracterización tecnológica e impacto en las propiedades organolépticas de las levaduras correspondiente a 2 alimentos funcionales fermentados: cerveza artesanal tipo *A/e* sin filtrar y aceituna de mesa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Los aislamientos de origen vitivinícola utilizados fueron, *Hanseniaspora guilliermondii* (PB15), *Pichia kudriadzevii* (PB48, 50, 51, 52, 53 y 100) *P. masmurika* (PB54), *P. occidentalis* (PB56, PB57, PB58), *Wickerhamomyces anomalus* (PB 97,98, 99), y *Saccharomyces cerevisiae* (PB101).

Estos aislamientos fueron seleccionados de acuerdo con los siguientes parámetros:

- Rasgos de bioseguridad: actividad hemolítica y ureasa negativa, resistencia a antibacterianos (ampicilina 25, gentamicina 10, levofloxacina 10, rifampicina 20, tetraciclina 80, cloranfenicol 60µg/mL) y sensibilidad al menos a 4 antifúngicos ensayados (ketoconazol 50, clotrimazol 10, fluconazol 10, itraconazol 10, miconazol 50, nistatina 100 µg/mL). Supervivencia mayor al 90% de larvas de *G. mellonella*.
- Tolerancia a las condiciones del tracto gastro-intestinal: Crecimiento a 37, 39 y 42°C, resistencia a valores de pH ácidos (2 y 3) y sales biliares (1%) IR_{bilis} mayor o igual a 10.
- Propiedades para adherirse a las células epiteliales del intestino: hidrofobicidad, producción de biofilm (>cepa control) y autoagregación (> 85%).
- Tolerancias a condiciones del tracto grastro-intestinal simuladas.
- Propiedades benéficas: Asimilación de colesterol; actividad antimicrobiana frente a enteropatógenos, inmunomodulación (levaduras seleccionadas), adhesión a células Caco-2/TC7 (levaduras seleccionadas), Efecto de levaduras seleccionadas sobre la asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis CIDCA101 en células CACO-2/TC7 (levaduras seleccionadas).

Como controles positivos se empleó a un aislamiento de la especie *Bretanomyces* spp. para producción de fenoles volátiles y *Picchia* spp, para producción de ácido sulfhídrico, ambas perteneciente al cepario del IBT – FI UNSJ. Además, como control positivo del proceso fermentativo de cerveza tipo *Ale* sin filtrar se utilizó la cepa comercial *Saccharomyces cerevisiae* US05 (Fermentis, France). Como cepa de referencia probiótica se utilizó a *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCMI-745.

Actividad de descarboxilación

La capacidad de las levaduras para descarboxilar aminoácidos, produciendo aminas biógenas, se evaluó según lo descrito por Zullo *et al.* (2019) con modificaciones. El medio contenía (g/L): glucosa 0,1, púrpura de bromocresol 0,06, YNB 6,7, agar 15, pH final se ajustado a 5,3. Después de la esterilización, se añadió la solución 1 g/L de cada aminoácido (L-Lisina, L-histidina, L-arginina), previamente esterilizada por filtración (0,22µm). Las levaduras fueron sembradas puntualmente

(5 µL) y después de 4 días de incubación a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, se designó como positiva si se visualizó un halo violeta alrededor de las colonias de levaduras.

Selección de cultivos *starter* para proceso fermentativo de cerveza tipo Ale sin filtrar:

Metabolización oxidativa de carbohidratos:

Una población inicial de 5×10^6 UFC/mL de las levaduras se hambreadon durante 48 h en 5 mL de agua estéril, luego se sembraron puntualmente 20 µl de cada aislamiento en medios de cultivos con diferentes fuentes carbonadas (g/L): YNB 6,7, azúcar en estudio 20 y agar 20. Los medios de cultivo fueron previamente esterilizados a 1 atm de sobrepresión en autoclave. Se evaluaron los principales azúcares pertenecientes a la matriz del mosto de cerveza: glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa. El pH del medio se reguló a 5,2 con ácido fosfórico 1N (pH regular de un mosto en inicio de fermentación). Las placas se incubaron durante 96 h a $19 \pm 2^\circ\text{C}$. Mediante este experimento se determinó la capacidad de asimilación de azúcares por parte de los aislamientos. El parámetro a medir fue crecimiento de colonias en placa comparado con el desarrollo en el control positivo (glucosa).

Metabolización de azúcares por metabolismo fermentativo:

En paralelo, una concentración de 5×10^6 UFC/mL de cada aislamiento se inocularon en tubos con 5 mL de solución líquida de los medios de cultivos anteriormente mencionados. Con este experimento se determinó la capacidad de metabolización de los azúcares vía fermentativa, dentro de cada tubo se colocó una campana de Dürham invertida para entrapamiento de gases, el tubo fue cerrado herméticamente (Suarez Lepe, 2006). Los tubos se incubaron durante 96 h a $19 \pm 2^\circ\text{C}$. El parámetro a medir fue el entrapamiento de CO_2 en los tubos con medio líquido (llenado completo de campana).

Metabolización de azúcares por vía fermentativa en mosto cervecero:

Una concentración de 5×10^6 UFC/mL de cada aislamiento se inocularon en tubos con 5 mL de mosto cervecero (20 IBU, densidad inicial 1048, pH 5,2), previamente esterilizado a 0.5 atm por 10 min para evitar la caramelización de los azúcares presentes en el mismo. Dentro de cada tubo se colocó una campana de

Dürham invertida para entrapamiento de gases, el tubo fue cerrado herméticamente (Suarez Lepe, 2006). Los tubos se incubaron durante 96 h a $19 \pm 2^\circ\text{C}$. El parámetro a medir fue el entrapamiento de CO_2 en los tubos con mosto cervecero (llenado completo de campana).

Determinación de compuestos *Off-flavors*.

Producción de fenoles volátiles

Las levaduras fueron sembradas en estría en medio Brett-agar que contenía (g/L): glucosa 10, extracto de levadura 10, agar 15, cloranfenicol 0,5, ciclohexamida 0,05, ácido p-cumárico 0,4, etanol 99.9 % 6 v/v, a pH 5,0. Paralelamente se sembró una concentración de 1×10^6 UFC/mL de cada aislamiento en 7 mL de medio Brett líquido. Tanto el medio agarizado como el líquido fueron incubados de 7 a 10 días a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Luego de incubación, se determinó cualitativamente los medios de cultivo, mediante olfacción.

Producción de ácido sulfhídrico (SH_2)

Las levaduras se sembraron en estrías y se evaluaron de forma semicuantitativa sobre BigGy-agar (BBLTM, Becton, Dickinson and Company, Sparks, EE.UU., Le Pont de Claix, Francia) siguiendo las instrucciones de elaboración. Incubación: 3 días a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Se utilizó una escala arbitraria propuesta por Comitini *et al.* (2011) para el color de la estría de 1, color blanco (sin producción); 2, marrón claro; 3, marrón; 4, marrón oscuro; 5, marrón oscuro/negro (alta producción).

Proceso fermentativo de cerveza tipo A/e a escala de laboratorio

Se inoculó 1×10^7 UFC/mL de levadura (previamente activada) en Erlenmeyer de 2000 mL con 1400 mL de mosto cervecero (1049°DI, 20 IBU, pH 5.2). Se incubaron en condiciones estáticas a $18 \pm 1^\circ\text{C}$. Se llevó a cabo el monitoreo de la cinética fermentativa mediante medición de densidad, pérdida de peso, recuento en placa de levaduras viables en YEPD-agar. El mosto cervecero empleado fue estilo Kolsh (dorada pampeana) facilitado por la cervecería Donata del Desierto, San Juan, Argentina.

-Parámetros medidos al final de la fermentación

- Atenuación aparente (AA): $100 * ((D_{\text{Inicial}} - D_{\text{Final}}) / D_{\text{Inicial}})$
- Poder fermentativo PF (% v/v): es la capacidad que posee una cepa para producir etanol.

$$\text{alcohol producido} = ((D_f - D_i) \times)$$

Donde **131.25**= constante estequiométrica de la fermentación alcohólica para cerveza.

Simulación del tracto gastrointestinal posterior a la fermentación de mosto cervecero.

Se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Zullo *et al.* (2019) con modificaciones. Se realizó soluciones que simulan las condiciones de digestión gástrica (GD) y pancreática (DP) in vitro. Para la GD, se preparó un jugo gástrico (JG) sintético en una solución buffer a pH 2.0 con NaCl (2.05 g/L), KH₂PO₄ (0.60 g/L), CaCl₂ (0.11 g/L) y KCl (0.37 g/L). Después de la esterilización del medio, se adiciono pepsina (3 g/L) esterilizada por filtración (0.22 µm), para completar la solución gástrica. La simulación de jugo pancreático (JP) se realizó utilizando una solución buffer con pH de 7.0, ajustado con HCl 1 M, formulado con sales biliares (3.0 g/L), pancreatina esterilizada por filtración (1 g/L), Na₂HPO₄ (26.9 g/L) y NaCl (8.5 g/L). Se analizó la resistencia del starters luego de la condición del proceso fermentativo (células libres concentración aproximada 1x 10⁸ UFC/mL). Para la fase gástrica se inoculó la levadura en 7 ml de jugo JG estéril, luego de 3 h de incubación a 37°C a 100 rpm, se recolectaron las levaduras y se resuspendieron en 7 mL de JD simulado estéril. La suspensión se incubo a 37 °C durante 3h a 100 rpm. En ambas fases se determinó el porcentaje de supervivencia en placa a los 0 y 3 h.

$\% \text{ supervivencia: } (\ln N^{\circ} \text{ UFC/ mL}_{\text{final}} / \ln N^{\circ} \text{ UFC/ mL}_{\text{inicial}}) * 100$
--

Dónde:

- $\ln n^\circ$ inicial UFC/mL es el logaritmo natural del número inicial de unidades formadoras de colonias
- $\ln n^\circ$ final UFC/mL es el logaritmo natural del número final de unidades formadoras de colonias

Evaluación sensorial

Al finalizar el proceso fermentativo, las cervezas se llevaron a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ para su maduración, durante 2 semanas. Luego fueron sometidas a un análisis sensorial hedónico a ciegas con personal de la Cervecería Ancestral SRL y Donata del Desierto. El panel fue conformado por 8 personas de entre 25 y 45 años (1 mujer, 7 varones). Se evaluaron caracteres olfativos y gustativos con una valoración estructurada de 1 a 5; y una valoración general del producto puntuada con valores de entre 1 a 10. Las muestras fueron proporcionadas en vasos de plástico a una temperatura de $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Cabe aclarar que la valorización visual y de espumas no se llevó a cabo por que los tratamientos no fueron carbonatados para su degustación. Los parámetros evaluados olfativos y gustativos, son presentados en la Figura Anexo 1, 2 y 3.

Selección de cultivos *starter* para proceso fermentativo de aceitunas de mesa:

- Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl y valores de pH:

Se inoculó 1×10^6 UFC/mL de las levaduras previamente activadas en tubos con YEPD ajustado a los siguientes valores de pH: 4,0, 8,0; y con diferentes concentraciones de NaCl (2, 8%). Los tubos sembrados se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 3 días. El crecimiento se evaluó diariamente mediante espectrofotometría (600 nm) comparando con el control (medio YEPD sin siembra de levadura). Los datos se utilizaron para la evaluación del índice de crecimiento (IC) (Bevilacqua *et al.*, 2013):

$$\text{IC} = (\text{Abs}_m / \text{Abs}_c) * 100$$

donde, para cada momento de muestreo, Abs_m es la absorbancia de las muestras y Abs_c la absorbancia del control.

Conducción de procesos fermentativos

- Proceso fermentativo de aceituna de mesa a escala de laboratorio:

Se cosecharon aceitunas Olea europea var Arauco, provenientes del Banco de germoplasma de olivos ubicado en Campo Anexo San Martín de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA San Juan. Se realizó una selección previa del lote de aceitunas eliminando aquellas coloreadas, maduras, muy marcadas, heridas por granizo o insectos, con cochinilla, etc., también se separó hojas, palillos, tierras y elementos extraños. Se consideró el calibre 6 que corresponde a 14/16 aceitunas en 100 g (CODEX 66-1981).

El proceso de fermentación a escala de laboratorio se llevó a cabo según el protocolo de Laza *et al.* (2020) con modificaciones. El lote completo fue sometido a tratamiento alcalino con NaOH al 2,0 % por 10 a 12 h. Se realizaron cortes transversales a la drupa para observar penetración de NaOH por cambio de coloración con fenolftaleína al 1%. Una vez que se llegó a los 2/3 de penetración en la carne de la drupa se realizó un lavado de 2 h y, posteriormente, otro lavado de 7 a 10 h. En 6 frascos de 3 L de vidrio estériles se colocaron 1300 g de aceitunas y 1450 mL de salmuera al 10%. Los mismos fueron incubados por 5 días a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ para favorecer el inicio de la fermentación láctica. Posteriormente se inoculó a las levaduras seleccionadas en una concentración 1×10^6 UFC/mL. Se incubaron por 3 meses a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Se llevó a cabo el monitoreo de la cinética fermentativa mediante el recuento en placa de levaduras y bacterias lácticas viables en medio WL.

Evaluación sensorial

Después del periodo fermentativo, se llevó a cabo el análisis sensorial de las aceitunas con el panel entrenado de la Asociación Sanjuanina de Sommeliers. El mismo estuvo conformado por 12 personas de entre 25 y 50 años (4 hombres y 8 mujeres). Los panelistas se ubicaron a distancia prudencial en un ambiente a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, con luz adecuada. Las muestras de cada tratamiento fueron proporcionadas en recipientes de plástico de 100 cm³, conteniendo 3 drupas al azar. La hoja de

valoración sensorial de aceitunas fue proporcionada por las Asociación Sanjuanina de Sommeliers donde se evaluaron aspectos externos, olor/sabor, aspectos internos y valoración global (Anexo figura 4, 5 y 6).

Análisis de datos

Cada ensayo se realizó de forma independiente por triplicado y los resultados representan el promedio de las tres determinaciones con la desviación estándar correspondiente ($\pm$ DE). Los datos experimentales se procesaron con análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para supuesto de normalidad y la prueba de Levene para homogeneidad de varianza. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba de Tukey y los resultados se consideraron significativos si el valor de p asociado era $< 0,05$. Para analizar los datos no paramétricos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis o la prueba de Friedman equivalente a la prueba ANOVA para medidas repetidas. Para todas las pruebas se utilizó SPSS versión 19.0, Statistics R 3.6.2. y *Graphpad Prism* 9.4.1.

RESULTADOS

Actividad de descarboxilación

Ninguna de las levaduras ensayadas presentó actividad de descarboxilación de aminoácidos (L-Lisina, L-histidina, L-arginina) en el presente estudio.

Metabolización de carbohidratos:

Todos los aislamientos (15) ensayados metabolizaron fructosa. Un total de 7 levaduras asimilaron maltosa, mientras que 8 asimilaron sacarosa. Siete levaduras metabolizaron todos los azúcares ensayados. La cepa de referencia probiótica metabolizó todos los azúcares (Tabla 6.1).

Tabla 6.1: Metabolización por vía oxidativa de carbohidratos sacarosa, fructosa y maltosa.

Aislamiento	Especie	Glucosa	Sacarosa	Fructosa	Maltosa
PB 15	<i>Hanseniaspora guillermondii</i>	+	+	+	+
PB 48	<i>Pichia kudriadzevii</i>	+	-	+	-
PB 50	<i>Pichia kudriadzevii</i>	+	-	+	-
PB 51	<i>Pichia kudriadzevii</i>	+	-	+	-
PB 52	<i>Pichia kudriadzevii</i>	+	-	+	-
PB 53	<i>Pichia kudriadzevii</i>	+	±	+	±
PB 54	<i>Pichia masmurika</i>	+	-	+	-
PB 56	<i>Pichia occidentalis</i>	+	+	+	±
PB 57	<i>Pichia occidentalis</i>	+	+	+	±
PB 58	<i>Pichia occidentalis</i>	+	+	+	-
PB 97	<i>Wickeranomyces anomalus</i>	+	+	+	+
PB 98	<i>Wickeranomyces anomalus</i>	+	+	+	+
PB 99	<i>Wickeranomyces anomalus</i>	+	+	+	+
PB 100	<i>Pichia kudriadzevii</i>	+	-	+	-
PB 101	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+
Sb	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> CNCM I-745	+	+	+	+
US05	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+

Referencia: En verde se presentan aquellos aislamientos que metabolizaron los 3 azúcares ensayados. Se muestra el símbolo "+" para aquellos aislamientos que crecieron igual al control (YNB agar ^{glucosa}), mientras que el símbolo "±" indica los aislamientos crecieron, pero no igual que a su respectivo control o con "-" aquellos que no crecieron.

Metabolización de azúcares por vía fermentativa:

Los aislamientos de la especie *W. anomalus*, PB 98 y PB 99 metabolizaron los 3 glúcidos ensayados por vía fermentativa, mientras que PB 97 no fermentó maltosa. Los aislamientos que lograron iniciar fermentación en los 4 azúcares ensayados en menor tiempo fueron la cepa PB 101 *S. cerevisiae* junto con la cepa de referencia probiótica (*S. cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745) (Tabla 6.2).

Tabla 6.2: Metabolización por vía fermentativa de carbohidratos sacarosa, fructosa y maltosa

Nomenclatura	Especie	Glucosa (control)				Sacarosa				Fructosa				Maltosa			
		24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
PB 15	<i>Hanseniaspora guillermoidii</i>												+				
PB 56	<i>Pichia occidentalis</i>												+				
PB 57	<i>Pichia occidentalis</i>												+				
PB 97	<i>Wickeranomyces anomalus</i>		+				+				+						
PB 98	<i>Wickeranomyces anomalus</i>		+				+				+					+	
PB 99	<i>Wickeranomyces anomalus</i>		+				+					+				+	
PB 101	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		+				+				+				+	+	
Sb	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> CNCM I-745	+				+	+				+				+		
US05	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+				+				+				+			

Referencia: En verde se presentan aquellas cepas que llenaron la campana de Dürham más de un 50% del volumen total. Se muestra el símbolo "+" para aquellos aislamientos metabolizaron azúcares por vía fermentativa igual al control (YNB agar_{glucosa}). En amarillo se muestran aquellas cepas que llenaron de gases la campana de Dürham en un 50% o menos.

Metabolización de azúcares por vía fermentativa en mosto cervicero:

La mayor velocidad fermentativa fue registrada por el aislamiento PB 101 similar al comportamiento obtenido por el control positivo *S. cerevisiae* US05 (Tabla 6.3).

Tabla 6.3: Metabolización por vía fermentativa en mosto cervicero.

Nomenclatura	Especie	Mosto Cervicero			
		24 h	48 h	72 h	96 h
PB 15	<i>Hanseniaspora guillermoidii</i>				
PB 56	<i>Pichia occidentalis</i>		+		
PB 57	<i>Pichia occidentalis</i>		+		
PB 97	<i>Wickeranomyces anomalus</i>		+		
PB 98	<i>Wickeranomyces anomalus</i>		+		
PB 99	<i>Wickeranomyces anomalus</i>		+		
PB 101	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		+		
Sb	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> CNCM I-745	+			
US05	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+			

Referencia: En verde se presentan aquellas cepas que llenaron la campana de Dürham más de un 50% del volumen total. Se muestra el símbolo "+" para aquellos aislamientos metabolizaron azúcares por vía

fermentativa igual al control (YNB agar glucosa). En amarillo se muestran aquellas cepas que llenaron de gases la campana de Dürham en un 50% o menos.

Determinación de compuestos *Off-flavors*

El aislamiento PB 15 (*Hanseniaspora guilliermondii*) y PB98 (*Wickeranomyces anomalus*) crecieron en el medio ensayado y produjeron fenoles volátiles. En cuanto a la producción de H₂S (medio Biggy-agar), los aislamientos de género *Pichia* presentaron valores de 4 dentro de la escala (alta producción de H₂S), la cepa PB 15 no creció en el medio (Tabla 4). Los aislamientos *W. anomalus*, PB97, PB 98 y PB 99 presentaron una leve coloración marrón (baja producción), mientras que PB101 presentó valor de escala 1 (producción nula) (Figura 6.1).

Tabla 6.4: Producción de fenoles volátiles (medio BRETT) y producción de H₂S (medio Biggy-agar).

Nomenclatura	Especie	BRETT		Biggy-agar
		agar	liquido	Valor de escala
PB 15	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	+	+	-
PB 48	<i>Pichia kudriadzevii</i>	-	-	4
PB 50	<i>Pichia kudriadzevii</i>	-	-	4
PB 51	<i>Pichia kudriadzevii</i>	-	-	4
PB 52	<i>Pichia kudriadzevii</i>	-	-	4
PB 53	<i>Pichia kudriadzevii</i>	-	-	4
PB 54	<i>Pichia masmurika</i>	-	-	4
PB 56	<i>Pichia occidentalis</i>	-	-	4
PB 57	<i>Pichia occidentalis</i>	-	-	4
PB 58	<i>Pichia occidentalis</i>		-	4
PB 97	<i>Wickeranomyces anomalus</i>	-	-	2
PB 98	<i>Wickeranomyces anomalus</i>	-	+	2
PB 99	<i>Wickeranomyces anomalus</i>	-	-	2
PB 100	<i>Pichia kudriadzevii</i>	-	-	4
PB 101	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	1
Sb	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> CNCM I-745	-	-	1
Control	<i>Pichia spp</i>			3
Control	<i>Bretanomyces spp.</i>	+	+	

Referencia: Con + se muestran aquellos aislamientos que crecieron en medio agarizado o que produjeron volátiles fenólicos en medio líquido. Los números indican la escala arbitraria propuesta por Comitini *et al.*, (2011) para el color de los aislamientos estridados de 1, color blanco (sin producción); 2, marrón claro; 3, marrón; 4, marrón oscuro; 5, marrón oscuro/negro (alta producción). En rojo se destacan los aislamientos con producción alta de H₂S.

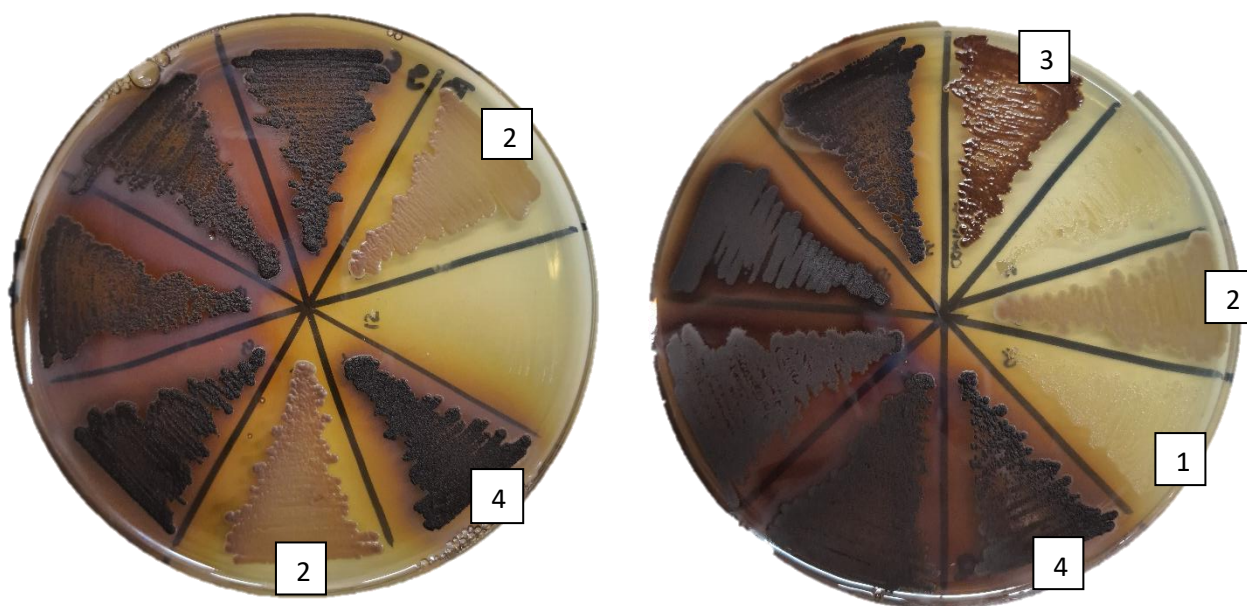


Figura 6.1: Resultados para la producción de H_2S (medio BigGy-agar) de las 16 levaduras ensayadas. Los números indican la escala arbitraria propuesta por Comitini *et al.*, (2011) para el color de los aislamientos estriados de 1, color blanco (sin producción); 2, marrón claro; 3, marrón; 4, marrón oscuro; 5, marrón oscuro/negro (alta producción).

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de metabolización y asimilación de azúcares y los ensayos de determinación de compuestos Off-flavors, se seleccionó el aislamiento de levadura PB 101 (*S. cerevisiae*) para la conducción del proceso fermentativo de cerveza tipo Ale sin filtrar.

Fermentación de cerveza tipo Ale con la levadura con aptitudes probióticas seleccionada

La cerveza fermentada con la levadura control (cepa comercial) presentó 5,64 % v/v de alcohol, pH 4,32 y una Df de 1006, mientras que la cerveza fermentada por la levadura PB101 registró valores de 4,85 % v/v de etanol, pH 4,07 y Df 1012. En cuanto a la atenuación aparente, la misma fue de 90 y 80%, para US05 y PB101, respectivamente.

En cuanto a la viabilidad de la levadura comercial y al rendimiento fermentativo (reflejado por la curva de producción de CO_2) fue mayor en la

fermentación conducida por la cepa comercial (US05). La curva resultante de la producción de CO_2 para PB101 presenta una pendiente distinta, que implicaría una menor velocidad de fermentación (Figura 6.2). Se determinó el recuento de células de levadura comercial y probiótica durante el proceso fermentación que transcurrió en 14 días (Figura 6.3). Como se muestra en la figura 6.3, la concentración celular de levaduras aumentó con el tiempo de fermentación.

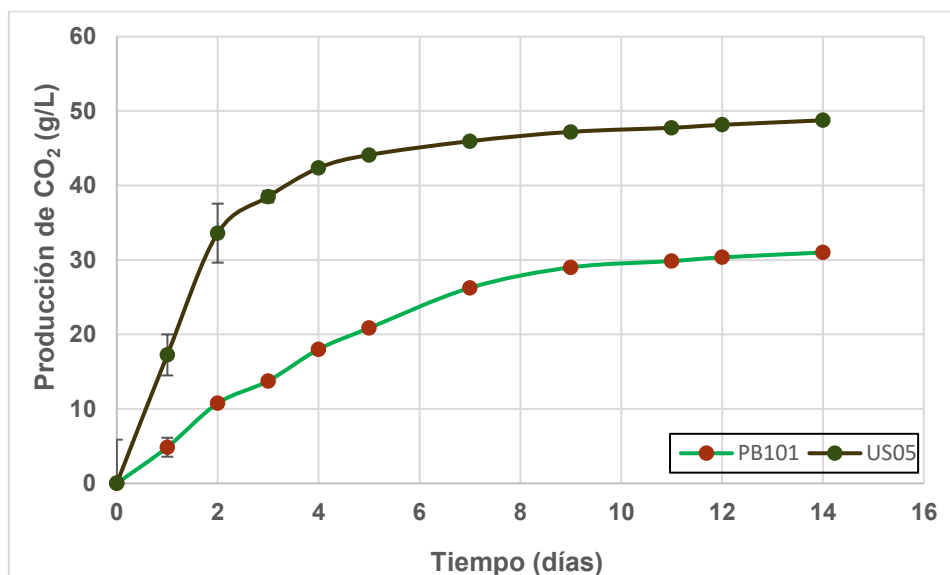


Figura 6.2: Producción de CO_2 (g/L) a lo largo del proceso fermentativo (días) de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* PB101 (levadura autóctona) y US05 (levadura comercial).

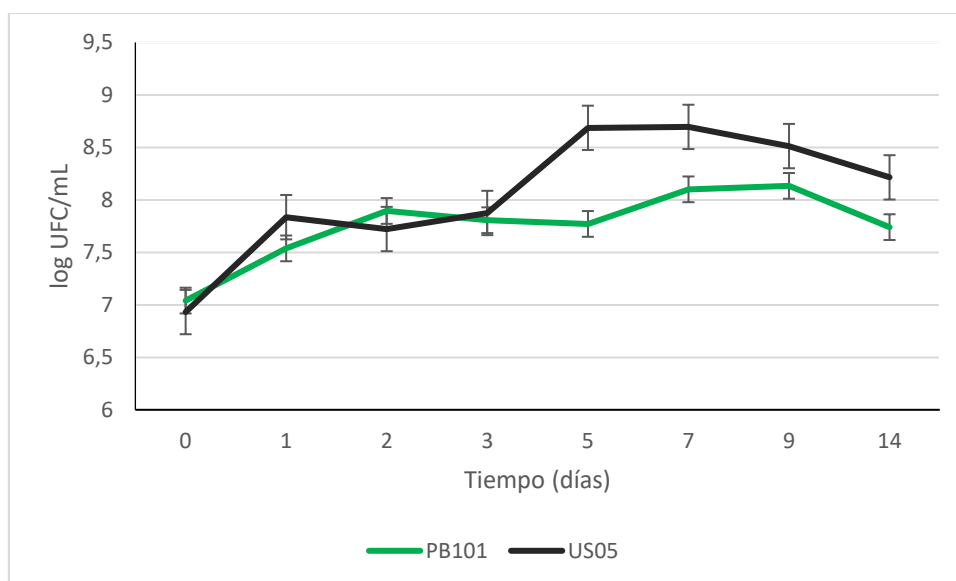


Figura 6.3: Cinética de crecimiento de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* PB101 (levadura autóctona) y US05 (levadura comercial).

Simulación del tracto gastrointestinal

Se llevó a cabo la simulación del tracto gastrointestinal de muestras con la levadura con aptitudes probióticas luego de haber llevado a cabo el proceso fermentativo de cerveza. El ensayo se inició con un recuento inicial de 1.6×10^8 UFC/mL y al final de la fase gástrica se registró la supervivencia del 88.22% (1.73×10^7 UFC/mL). Con respecto a la fase final duodenal se registró una supervivencia de 73,49 % (1.07×10^6 UFC/mL).

Evaluación sensorial

Los resultados obtenidos a partir de la cata hedónica, tanto de la cerveza fermentada con levadura comercial, como la obtenida con la levadura PB101, presentaron buena apreciación general. Se destaca que, en la fase aromática, la levadura con aptitudes probióticas PB101, registró un aumento en la percepción de los aromas a clavo de olor y banana (Figura 6.4). De acuerdo al perfil organoléptico otorgado por esta levadura, se consultó a los evaluadores acerca de que estilo sería el más adecuado para fermentar con la misma, y de manera unánime, asintieron que un estilo de cerveza belga con mayor expresión fenólica sería la matriz ideal para emplear este aislamiento. Respecto al sabor, puede observarse que debido a que la levadura comercial resaltó el amargor en la cerveza lo cual coincide con la expresión del lúpulo en la fase aromática. En general el sabor para la cerveza fermentada por la levadura PB101, no presentó ningún aspecto destacable, sin embargo, esto puede deberse a que no es la matriz adecuada para emplear esta levadura (estilo Kolsh).

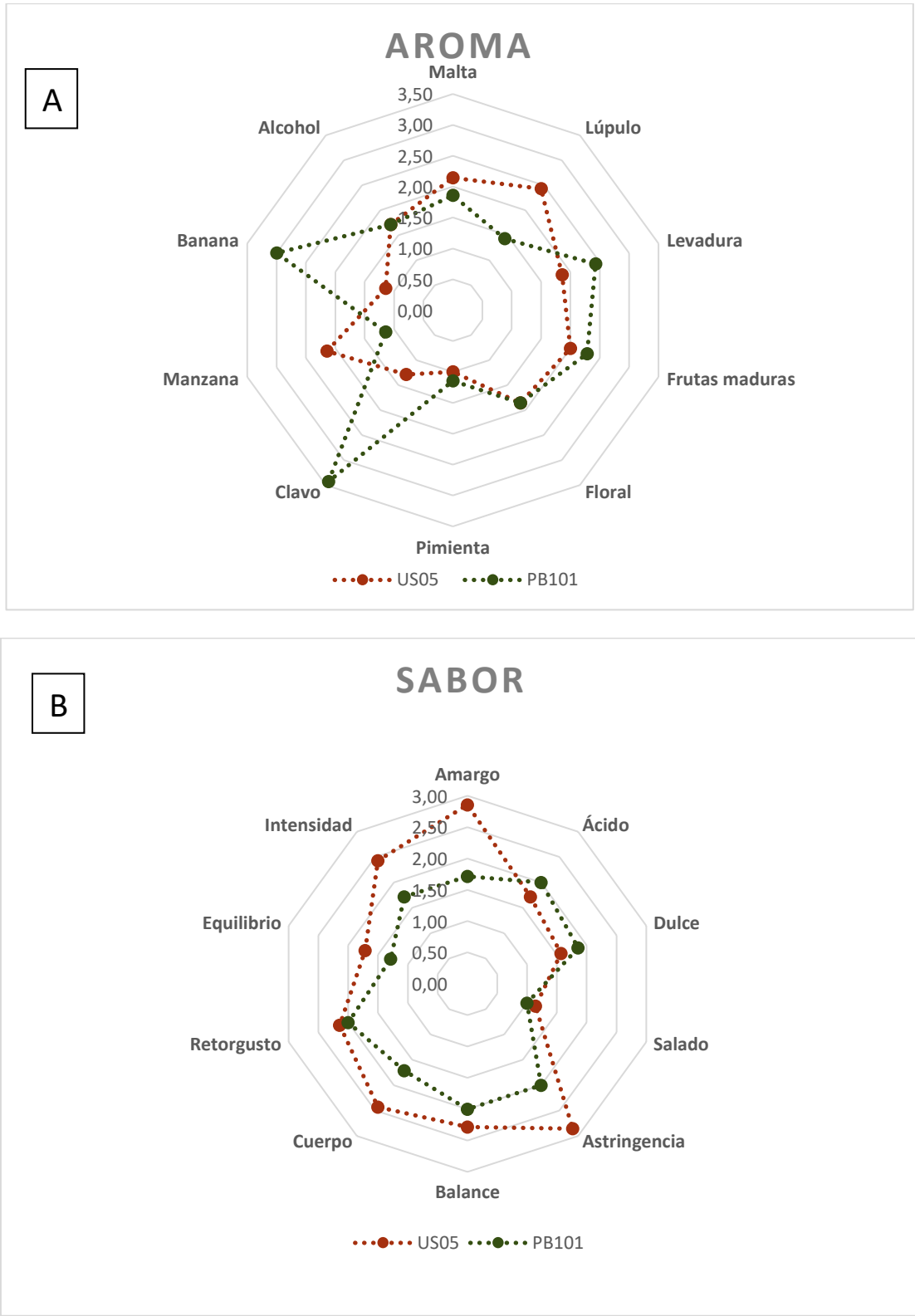


Figura 6.4: Análisis sensorial hedónico de cerveza elaborada con levadura autóctona PB101 y comercial US05. Aspectos aromáticos evaluados por el panel (A), Aspectos relacionados con el sabor (B). Escala máxima 5 y mínima 1.

Selección de cultivos *starter* para proceso fermentativo de aceitunas de mesa:

- Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl y valores de pH:

Todas las cepas ensayadas tuvieron un porcentaje de crecimiento mayor al 50% en 3 de los tratamientos (NaCl 2%-pH 4; NaCl 8%-pH 4; NaCl 2%-pH 8). El tratamiento NaCl 8%-pH 8 fue el más restrictivo, solos las cepas PB 97, 98, 99 y 101 obtuvieron porcentajes de supervivencia superior al 70% (Tabla 6.5).

Tabla 6.5: Índice de crecimiento en porcentaje de los aislamientos sometidos a 4 tratamientos (CINa 2% -pH 4; CINa 8%-pH 4; CINa 2% -pH 8; CINa 8%- pH 8) luego de 72 h.

Aislamiento	Especie	Tratamientos			
		CINa 2%-pH 4	CINa 8%-pH 4	CINa 2%-pH 8	CINa 8%-pH 8
15	<i>Hanseniaspora guillermoidii</i>	101,2	64,9	89,1	14,1
48	<i>Pichia kudriadzevii</i>	110,0	44,8	104,5	16,6
50	<i>Pichia kudriadzevii</i>	88,0	70,2	101,3	14,4
51	<i>Pichia kudriadzevii</i>	104,3	66,5	121,9	26,7
52	<i>Pichia kudriadzevii</i>	71,1	46,2	83,5	12,6
53	<i>Pichia kudriadzevii</i>	100,0	64,6	115,4	16,0
54	<i>Pichia masmurika</i>	88,1	52,3	88,9	23,0
56	<i>Pichia occidentalis</i>	91,0	60,6	107,4	13,6
57	<i>Pichia occidentalis</i>	89,7	58,8	105,3	15,0
58	<i>Pichia occidentalis</i>	111,0	64,8	108,2	15,0
97	<i>Wickeranomyces anomalus</i>	92,3	75,7	110,1	81,8
98	<i>Wickeranomyces anomalus</i>	84,1	76,1	106,8	82,0
99	<i>Wickeranomyces anomalus</i>	67,7	77,3	95,2	82,4
100	<i>Pichia kudriadzevii</i>	95,3	63,6	106,2	26,1
101	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,9	45,2	100,2	71,9

Con Verde se marcan los aislamientos con mejor índice de crecimiento.

En base a los resultados obtenidos se seleccionaron los aislamientos de levadura PB 98 y PB 99 (*Wickeranomyces anomalus*), quienes obtuvieron mejor porcentaje de índice de crecimiento en los tratamientos más restrictivos (CINa 8% -pH 4; CINa 8% -pH 8), para llevar a cabo la conducción del proceso fermentativo con cada aislamiento.

Fermentación de aceitunas de mesa con levaduras autóctonas con aptitudes probióticas

Se observó que las poblaciones de *W. anomalus* oscilaron entre $1,75 - 2,63 \times 10^5$ UFC/mL luego de 30 días de fermentación, llegando al final (90 días) de la misma con una concentración poblacional total de $3,5 \times 10^4$ UFC/mL para la fermentación espontánea y $3,2 \times 10^5$ UFC/mL para el tratamiento inoculado con la levadura PB 98 y $1,4 \times 10^5$ UFC/mL para el tratamiento inoculado con PB 99. En cuanto a la población de bacterias lácticas en todos los tratamientos a los 30 días de iniciada la fermentación los valores oscilaron entre $4,74 \times 10^6$ y $8,01 \times 10^6$. Se puede observar un crecimiento poblacional hasta llegar al final de la fermentación (90 días) a una concentración entre $8,77 \times 10^6$ y $1,04 \times 10^7$ UFC/mL.

Tabla 6.6: Seguimiento de la viabilidad (UFC/mL) de la población de los diferentes tratamientos con levaduras y tratamiento control.

Tratamiento	9-jul		28-jul		11-ago		31-ago	
	W	BAL	W	BAL	W	BAL	W	BAL
FE (control)	2,63E+05	4,74E+06	4,00E+05	2,40E+06	1,30E+05	9,03E+06	3,50E+04	9,00E+06
PB98	4,38E+05	8,01E+06	2,65E+05	4,55E+06	1,23E+05	7,09E+06	3,20E+05	1,04E+07
PB99	1,75E+05	5,96E+06	4,35E+05	7,38E+05	5,00E+04	9,64E+06	1,40E+05	8,77E+06

Referencias: tratamiento de *Wickerhamomyces anomalus* PB 98 (PB 98), *Wickerhamomyces anomalus* PB 99 (PB 99) y el control (fermentación espontánea -FE-). Población de *Wickerhamomyces* (W) y de bacterias lácticas (BAL) en 4 puntos de toma, posterior a la inoculación y final de la fermentación.

Evaluación sensorial

Al final de la fermentación los 3 tratamientos, *W. anomalus* PB 98 (PB 98); *W. anomalus* PB 99 (PB 99) y el control (fermentación espontánea -FE-) fueron dividido en 2 sub-tratamientos que se muestran en la Tabla 6.7.

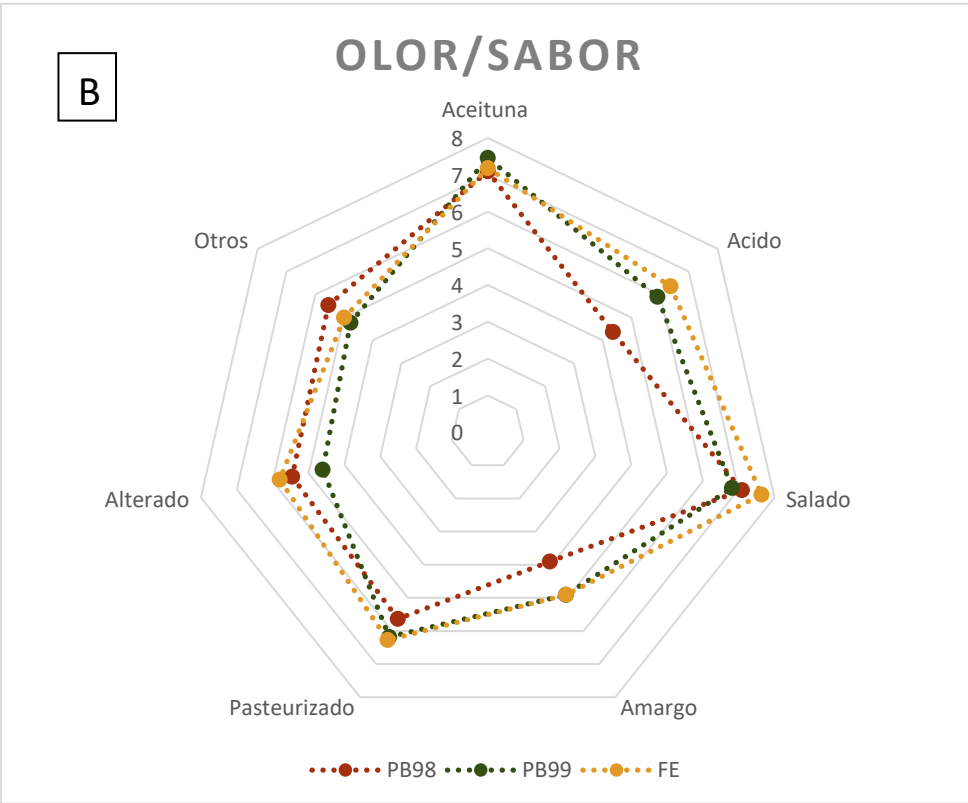
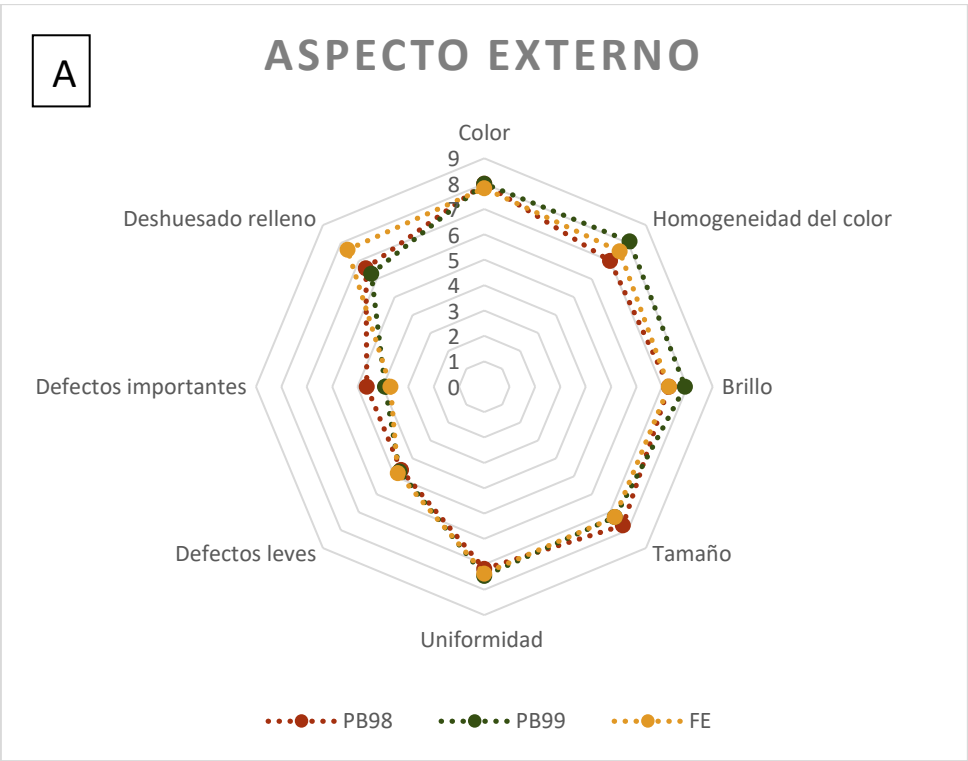
Tabla 6.7: representación de los tratamientos *Wickerhamomyces* (PB 98; PB 99) y control (fermentación espontánea -FE-) con salmuera a 2 concentraciones 6% y 8% con levaduras al final de la fermentación.

	FE		PB 98		PB 99	
Tratamientos iniciales	Salmuera 8%		Salmuera al 8%		Salmuera al 8%	
Sub tratamientos	Salmuera 8%	Salmuera 6%	Salmuera 8%	Salmuera 6%	Salmuera 8%	Salmuera 6%

Los resultados obtenidos a partir de la evaluación sensorial realizada por el panel entrenado indicaron una buena apreciación de los seis tratamientos. En cuanto a los aspectos externos, los tratamientos con salmuera al 6% (Figura 6.5A) y 8% (Figura 6.6A) no mostraron diferencias significativas en la valoración. Solo el tratamiento FE (fermentación espontánea) con salmuera al 8% (Figura 6.6A) obtuvo una puntuación mayor (4,72) que los otros tratamientos, con defectos importantes. En términos de uniformidad, el tratamiento PB 99 destacó con una puntuación ligeramente superior (8,36).

En la valoración de olor y sabor, el tratamiento PB 98 presentó menor acidez y amargor con salmuera al 6%. En general, para el mismo aspecto, pero con salmuera al 8%, se observó un aumento del amargor y un mayor sabor a aceituna, aunque también un sabor más pronunciado a pasteurizado (levadura). La evaluación del aspecto interno para los tres tratamientos con salmuera al 6% no mostró diferencias significativas. Sin embargo, el tratamiento PB 99 con salmuera al 8% se destacó notablemente, obteniendo las mejores puntuaciones en firmeza, fibrosidad, piel, homogeneidad, desprendimiento del hueso y relación pulpa-hueso.

En la valoración global, los dos subtratamientos de fermentación inoculada con la levadura PB 99. con salmuera al 6% y al 8% fueron los más destacados (Figura 6.7).



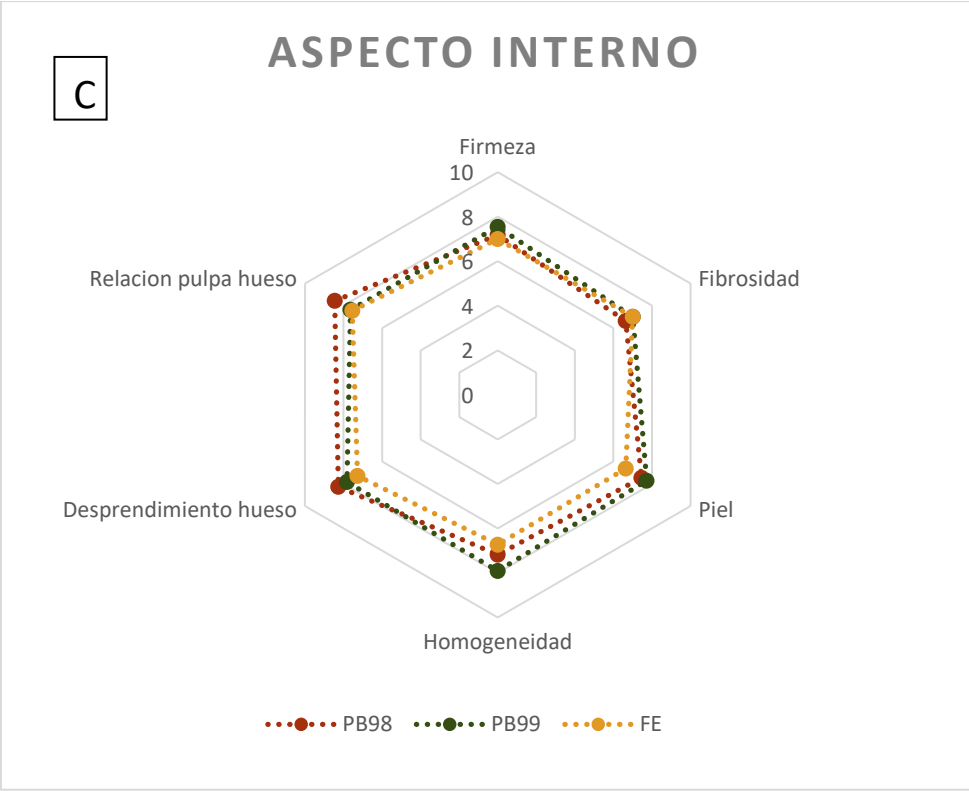
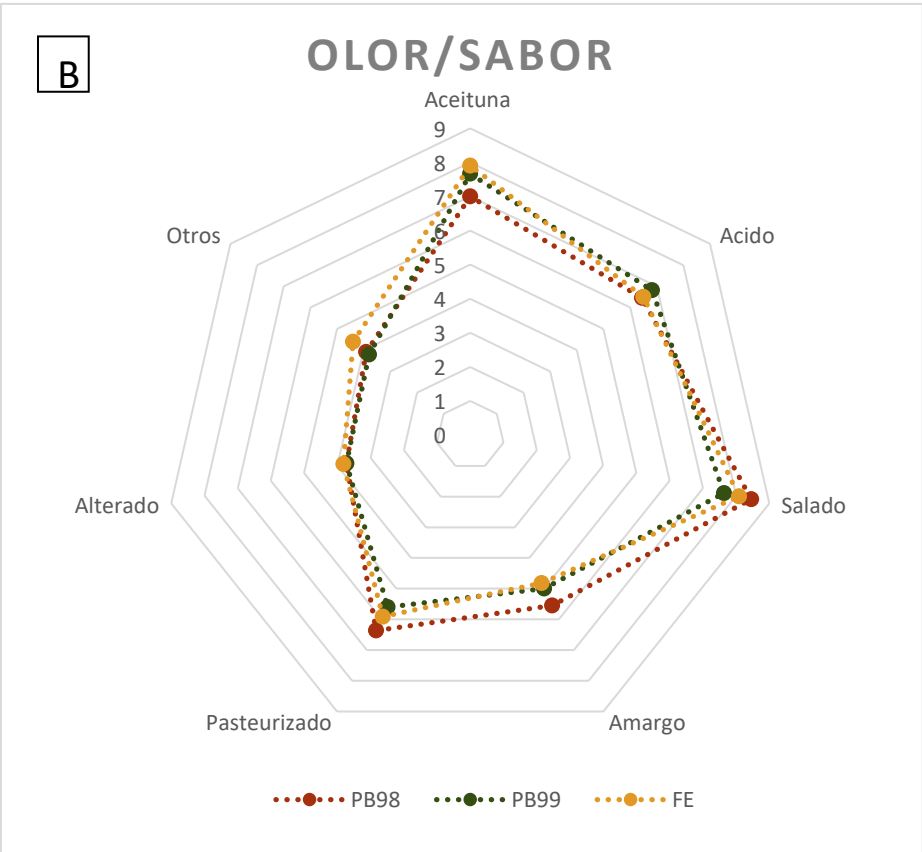
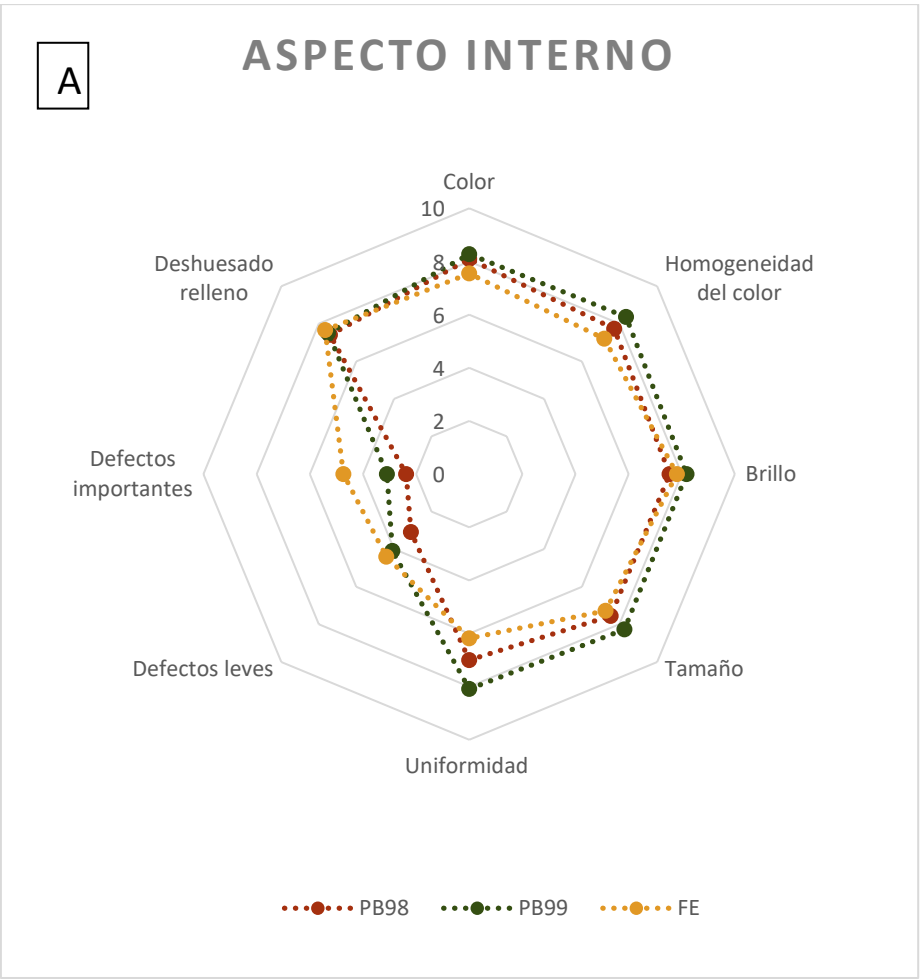


Figura 6.5: Análisis sensorial hedónico de tratamientos (PB98, PB99 y fermentación espontánea (FE)) de elaboración de aceituna de mesa con salmuera al 6%. Aspectos externos evaluados (A), Aspectos relacionados con el olor/sabor (B) y Aspectos internos (C). Escala máxima 10 y mínima 0.



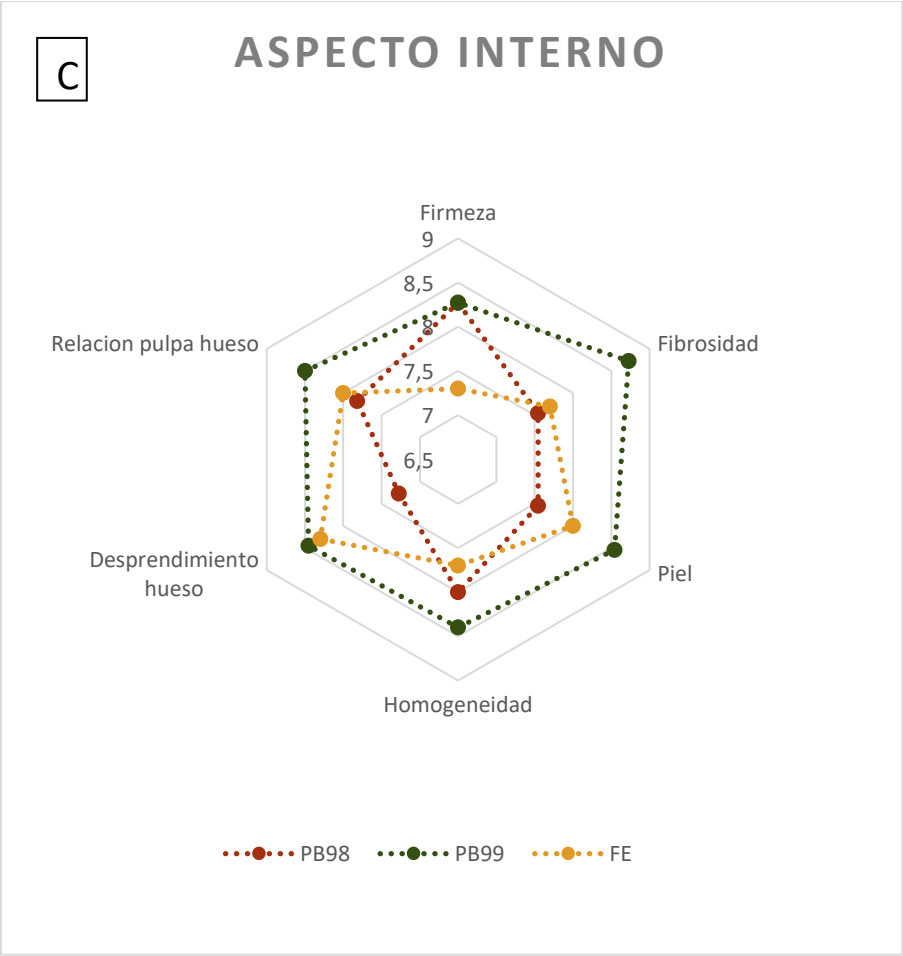


Figura 6.6: Análisis sensorial hedónico de tratamientos (PB98, PB99 y fermentación espontanea (FE) de elaboración de aceituna de mesa con salmuera al 8%. Aspectos externos evaluados (A), Aspectos relacionados con el olor/sabor (B) y Aspectos internos (C). Escala máxima 10 y mínima 0.

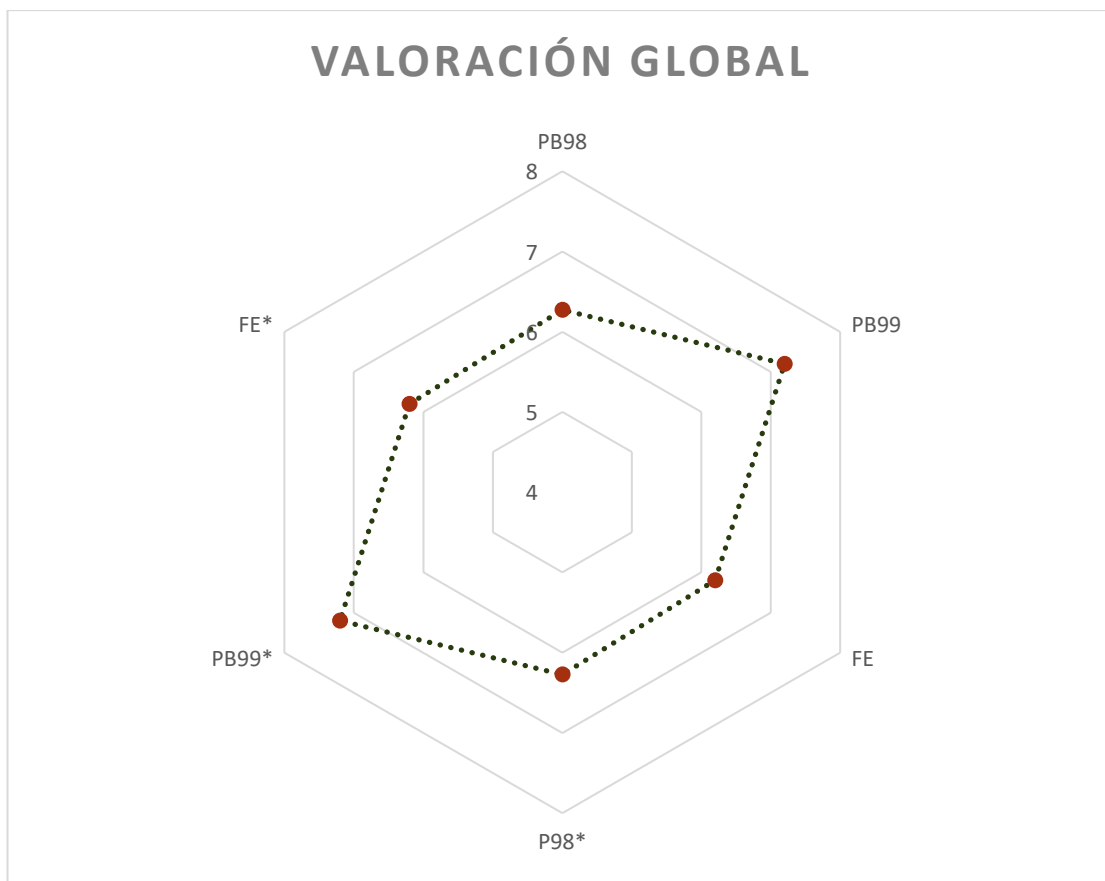


Figura 6.7: Valoración global de tratamientos (PB98, PB99 y fermentación espontánea (FE)) de elaboración de aceituna de mesa con salmuera al 6 y 8% (representadas con un *). Escala máxima 10 y mínima 0.

DISCUSIÓN

El sabor y aroma (en su conjunto denominado *flavors*) son factores claves en la evaluación de la calidad de la cerveza y un elemento crucial de aceptación por parte del consumidor (Betancur *et al.*, 2020). El empleo de aditivos (jugos, extractos de frutas o químicos sintéticos, entre otros) y manejos físicos de la fermentación, se generan en respuesta a dicha demanda. Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, la demanda de los consumidores por productos más saludables y funcionales ha mostrado un acelerado proceso de expansión. Las levaduras como agentes fermentativos y productores de aromas, en la actualidad, representan una herramienta relativamente inexplorada como medio de diversificación de las cervezas locales para obtener productos funcionales (Budroni *et al.*, 2017; Nasuti y Solieri, 2024).

La funcionalidad del producto elaborado está acompañada de la seguridad del mismo. Es ampliamente conocido que la descarboxilación de aminoácidos

representa una actividad potencialmente negativa porque conduce a la formación de aminas biogénicas (AB) en alimentos y bebidas fermentados en los que están presentes varios aminoácidos precursores (Goni y Azpilicueta, 2001). Diversos estudios llevados a cabo con las mismas especies evaluadas en el presente trabajo, determinaron la capacidad de producir AB a partir de arginina e histamina, por parte de levaduras como *W. anomalus*, *H. uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *P. kudriavzevii* (Zullo *et al.*, 2019; Siesto *et al.*, 2022; Fernández-Pacheco *et al.*, 2021). Los aislamientos evaluados en este trabajo de tesis no registraron producción de AB, a partir de los precursores evaluados, donde se destaca que esto es una característica intraespecífica. Además, en la cerveza, la malta y el lúpulo también pueden aportar aminas biógenas, especialmente putrescina, agmatina, espermidina y espermina. Sumado a esto, durante el malteado existe una evidente formación de aminas.

Una vez que se confirma la inocuidad de un cultivo *starter*, es posible emplearlo como agente fermentador seguro del mosto cervecero. En la actualidad, el uso de cultivos *starters* autóctonos está ganando atención ya que ofrecen varias ventajas en términos de adaptabilidad a nichos estresantes y diferenciación del producto final. Los alimentos funcionales con microorganismos multifuncionales, particularmente con características probióticas, son de interés en la investigación ya que responde a la demanda de los consumidores de productos que fomentan el bienestar y beneficios para la salud (Perpetuini *et al.*, 2020). El uso de este enfoque ha ido creciendo recientemente como resultado de un mayor interés en innovar y generar nuevas cervezas (Canónico *et al.*, 2021; Zendeboodi *et al.*, 2021). Además, las levaduras pueden contribuir positivamente durante la producción de bebidas alcohólicas con diferentes aromas y sabores.

Las fermentaciones conducidas por la levadura *S. cerevisiae* PB 101, presentaron menor liberación de CO₂ y, consecuentemente, menor producción de etanol comparada con la cepa comercial US05. Ambas fermentaciones finalizaron con pH acorde a una cerveza terminada. En cuanto al crecimiento poblacional del *starter*, se registró mayor crecimiento poblacional de la cepa comercial US05, a pesar de haber iniciado con la misma concentración inicial. Dicha levadura finalizó el proceso fermentativo con 8,21 Log UFC/mL, comparado con PB101 que finalizó

con 7,74 Log UFC/mL. Es importante destacar, que tanto la cantidad como la viabilidad microbiana en un producto con microorganismos probióticos es relevante a la hora de la ingesta por parte del consumidor. Por el contrario, Díaz *et al.* (2023) alcanzaron mayor población de las células de levaduras probióticas al finalizar el proceso fermentativo. Consideramos que es adecuada la viabilidad al final de la fermentación que se obtuvo en el presente estudio.

Luego del proceso de fermentación de la cerveza, la misma es sometida a una maduración en frío. Por lo tanto, resulta relevante evaluar la viabilidad y cantidad de células posterior a la etapa de maduración. En otros estudios, *S. boulardii* ha demostrado tener mayor porcentaje de viabilidad que *S. cerevisiae* luego de 36 días de almacenamiento en frío (Mulero-Cerezo *et al.*, 2019). Además, en el presente estudio se detectó una concentración de células viables superior a 1×10^7 UFC/mL después del tratamiento de simulación gástrico, post almacenamiento en frío. En el presente estudio, luego de 60 días de almacenamiento se registraron conteos superiores 1.07×10^6 UFC/mL al final en la fase duodenal. Es muy importante mantener el recuento viable de microorganismos probióticos en el producto final hasta su consumo (Sohrabvandi *et al.*, 2010). En general, se ha aceptado un nivel mínimo de 10^6 UFC/mL a partir del cual ejerce efectos benéficos sobre la salud del consumidor y, se recomienda que una ingesta diaria de productos probióticos contenga aproximadamente 10^9 células viables (Mortazavian *et al.*, 2006).

Respecto al comportamiento tecnológico a nivel fermentativo de las levaduras ensayadas, los valores de porcentaje de atenuación aparente alcanzados fueron altos. Un estudio llevado a cabo por Postigo *et al.* (2021), quienes emplearon levaduras del género *Saccharomyces* aisladas de ambientes enológicos, observaron que los aislamientos autóctonos como la levadura comercial empleada como control (US04), registraron una atenuación de 68.9-72% y 82.2 %, respectivamente.

Asimismo, las levaduras aisladas de ambientes enológicos, no cuentan con las enzimas necesarias para el consumo de maltotriosa perteneciente al mosto cervecero, es por este motivo que puede haber una atenuación menor comparada con las levaduras comerciales. Esto se debe a que las cepas *S. cerevisiae* de vino

presentan un gen *AGT1/ MAL11* que contiene un codón de parada prematuro, lo que conduce a una pérdida de función (Iattici *et al.*, 2020).

A nivel aromático, algunas cepas de levadura *Saccharomyces*, el fenotipo POF+ (polifenol positivo) resulta de la descarboxilación activa de derivados del ácido cinámico. Este carácter de “sabor fenólico” requiere 2 enzimas, una descarboxilasa del ácido fenilacrílico (PAD1) y una descarboxilasa del ácido ferúlico. Un estudio de levaduras cerveceras industriales reveló una amplia gama de actividad PAD (Vanbeneden *et al.*, 2008). De 157 cepas secuenciadas de *S. cerevisiae*, la mayoría de las cepas seleccionadas para su uso en bebidas alcohólicas han perdido la función de descarboxilación del ácido cinámico (Mukai *et al.*, 2010). Se encuentra una variedad de mutaciones de pérdida de función en Pad1, Fdc1 o en ambos entre las cepas de cerveza, vino y sake (POF-); sin embargo, todas las cepas secuenciadas que pertenecen a grupos "salvajes", industriales o de panificación conservan la actividad de POF +. Entre las cepas secuenciadas se encuentran 3 cepas de cerveza de trigo bávara, donde la actividad POF+ es esencial para el carácter de clavo/especia atribuido al 4-VG.

En cuanto al análisis sensorial, la cerveza fermentada con el *starter* PB101 reveló en aroma notas a banana, clavo de olor y fruta madura más pronunciados, diferenciándose al control por tener notas a lúpulo, malta y manzana. En cuanto al descriptor gustativos “acidez” y “dulce” se obtuvo mayor puntuación para la cerveza fermentada por PB101, además fue menos amarga y astringente con menor cuerpo e intensidad que la cerveza conducida por US05. Es importante destacar que las notas fenólicas no son deseadas en todos los estilos de cerveza, pero si en aquellas estilo Belgas.

El sabor, aroma y estilo de cualquier cerveza está determinado, en gran parte, por la cepa de levadura empleada junto con la composición del mosto (Stewart *et al.*, 2016). En este estudio se empleó una cepa *S. cerevisiae* PB101 que resultó en una cerveza con características aromáticas y de sabor que se sugiere para estilo belga. Este estilo de cerveza se caracteriza por un perfil sensorial ácido sabor a malta dulce y afrutado (Cantos *et al.*, 2023).

Postigo *et al.* (2021) del *pool* de levaduras evaluadas en su estudio un 70.9% presentaron una producción moderada de H₂S (Tipo II), mientras que el 10,3%

mostró una producción alta, incluyendo la cepa comercial S-04 (Tipo III) y el 18,8% una producción nula a baja. El H₂S es un compuesto volátil no deseado, ya que es responsable del olor a "huevo podrido", enmascarando así otros aromas en la cerveza (Briggs, 2004). En este mismo estudio, tres aislamientos de las que se seleccionaron para elaborar cerveza a pesar de estar dentro del tipo III en cuanto a producción de H₂S, al igual que la cepa S04, no presentaron aromas no deseados.

Por sus mejores aptitudes fermentativas se utilizó la única levadura del grupo *Saccharomyces* para llevar a cabo la fermentación de mosto cervecero, el resto de los aislamientos no-*Saccharomyces* podrían ser utilizadas para estudios posteriores para producción de cerveza baja en etanol en cultivos secuenciales. Hoy en día, las especies de levaduras denominadas 'no convencionales' han sido reevaluadas y han mostrado características interesantes para usos específicos. En los últimos años se está explorando el uso de levaduras no convencionales en la fermentación de la malta para obtener cervezas con contenido reducido de etanol, pero también para otras aplicaciones relacionadas con la calidad de la cerveza (Bellut *et al.*, 2019; Kozłowski *et al.*, 2021). La detección de levaduras en busca de variantes naturales que produzcan menos alcohol es una forma interesante de obtener cepas de levadura "bajas en alcohol". Varios estudios muestran que las levaduras no- *Saccharomyces* utilizadas en inoculación secuencial o co-inoculación con *S. cerevisiae* pueden desarrollar un menor rendimiento de etanol durante las fermentaciones de vinos o cervezas (Mestre *et al.*, 2019).

De acuerdo a Bonatsou *et al.* (2017), la presencia de levaduras durante el proceso fermentativo de las aceitunas de mesa en todo el mundo es muy común, particularmente especies de los géneros *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces* y *Wickerhamomyces*. La presencia de *Wickerhamomyces anomalus* (antes llamada *Pichia anomala*) en aceitunas en salmuera directa, y en aceitunas de mesa en general, ha sido previamente citada (Hernández *et al.*, 2007, Bautista-Gallego *et al.*, 2011, Arroyo-López *et al.*, , 2012, Doulgeraki *et al.*, 2012). Coincidentemente, en el presente estudio las levaduras con mayor tolerancia a condiciones de salinidad elevadas, y a valores de pH bajos y altos pertenecieron al a especie *W. anomalus* (PB 97, 98 y 99). Esta especie está adaptada para crecer en las condiciones ambientales que impulsan las

fermentaciones de las aceitunas de mesa, como el pH bajo y las altas concentraciones de NaCl (Bonatsou *et al.*, 2015).

En cuanto al seguimiento de la población de *W. anomalus* se observó que la población se mantuvo a lo largo de la fermentación y que no interfirieron en la fermentación láctica. Las levaduras pueden alcanzar niveles poblacionales superiores a 10^6 UFC/mL en este vegetal fermentado, afectando las características organolépticas y nutricionales del producto final (Garrido-Fernández *et al.*, 1997, Rodríguez-Gómez *et al.*, 2010; Arroyo-López *et al.*, 2012). En este estudio la población de *W. anomalus* no superaron el orden de 10^5 UFC/mL, de igual manera influyeron notablemente en las características del producto final.

Romero-Gil *et al.* (2013) y Bonatsou *et al.* (2015) informaron valores similares para NaCl de 166,9 g/L y 163,2 g/L para diversas cepas de *W. anomalus* aisladas del procesamiento de aceitunas de mesa, respectivamente, valores muchos mayores comparados con los registrados en el presente estudio. Bevilacqua *et al.* (2013) también reportó la resistencia de esta especie a elevadas concentraciones de salinidad ($> 8\%$) y pH alcalinos. Después de 48 h a pH 8, la cepa de *W. anomalus* tuvo un índice de crecimiento de 87,14%. Durante la última etapa de la fermentación, las levaduras se convierten en microorganismos dominantes y desarrollan las características organolépticas de la aceituna de mesa (Bevilacqua *et al.*, 2013). Por lo tanto, las levaduras deben tolerar diferentes rangos de pH, aunque el pH de la salmuera de los medios de fermentación naturales no desciende por debajo de 2,5 este valor es importante para comprobar las características probióticas de las levaduras de olivo (Bevilacqua *et al.*, 2013). Mujdeci *et al.* (2021) estudiaron diferentes especies de levaduras, pero solo las cepas que pertenecen a *C. hellenica*, *A. pullulans*, *K. apiculata*, *C. pelliculosa* y *W. anomalus* podrían crecer a un pH de 2,5. Si bien en este estudio para la caracterización tecnológica no se estudió la tolerancia a este pH, la evaluación de la tolerancia al tracto gastrointestinal hace inferir que toleran dicho pH. De igual manera, en este trabajo se considera que el rasgo más importante fue el crecimiento de la levadura a pH alcalinos, ya que es una característica importante para las aceitunas tratadas con lejía. Aunque las aceitunas generalmente se lavan al menos dos veces después del desamargo, inmediatamente después de la salmuera el pH es bastante alto. Por lo tanto, la capacidad de la levadura para crecer a un pH relativamente alto es un

rasgo positivo, ya que podría asegurar la prevalencia de la levadura también al comienzo de la fermentación, cuando el número de LAB es bastante bajo (Kailis y Harris, 2007).

En cuanto a lo que son las características enzimáticas de PB 98 y PB 99 (previamente expuesto en Capítulo 5), estas poseen actividad lipasa y catalasa y β -glucosidasa positiva. Las actividades enzimáticas son relevantes en las levaduras, ya que aportan a las características organolépticas de los productos finales, por ejemplo, sabor, textura y seguridad (Mujdeci *et al.*, 2021). Los lípidos son el principal componente de las aceitunas, por lo que el efecto lipolítico es una propiedad tecnológica deseable de las cepas de levadura que aumentan el perfil aromático de las aceitunas de mesa (Arroyo-Lopez *et al.*, 2012). Diferentes autores, (Hernández *et al.*, 2007; Rodríguez- Gómez *et al.*, 2010; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2012; Bevilacqua *et al.*, 2012) informaron que los componentes que contribuyen al sabor de la aceituna de mesa son glicerol, etanol, ésteres y otros compuestos volátiles que pueden generarse por el catabolismo de los ácidos grasos libres. Contrariamente a los resultados del presente trabajo, en un estudio realizado por Mujdeci *et al.* (2021) todas las levaduras de la especie *W. anomalus* ensayadas no presentaron actividad lipasa.

Se sabe que la enzima catalasa previene la oxidación de los ácidos grasos insaturados y la formación de peróxido (Bevilacqua *et al.*, 2009), por lo que la actividad catalasa es importante dado que ejerce un importante efecto beneficioso en la fermentación de aceitunas de mesa. Los resultados de levaduras *W. anomalus* catalasa positiva del presente estudio son coincidentes con los de otros autores (Hernández *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2011; Mujdeci *et al.*, 2021).

La presencia de actividad β - glucosidasa resulta destacable dado que contribuye con la hidrólisis del glucósido oleuropeína, eliminando el amargor natural presente en las aceitunas (Psani y Kotzekidou, 2006, Arroyo-López *et al.*, 2012). Si bien en el ensayo se realizó tratamiento con NaOH, estas levaduras pueden haber colaborado en la mejora de las propiedades organolépticas respecto al amargor por presentar esta actividad. Bautista-Gallego *et al.* (2011), Tofalo *et al.* (2013) y Mujdeci *et al.* (2021) han reportado alta actividad β -glucosidasa en cepas *W. anomalus* para la fermentación de aceitunas y evidenciaron una reducción del

amargor. Las cepas PB98 y PB99 del presente estudio podrían proyectarse para estudios de fermentación de aceitunas sin tratamiento de lejía. Esta actividad a la vez se relaciona con actividad antioxidante y antimicrobiano.

En cuanto a la actividad proteolítica, solo se detectó en PB98 (capítulo 5). Esta actividad es ambigua ya que varios autores la consideran indeseable porque podrían producir ablandamiento de los frutos (Hernández *et al.*, 2007; Bautista-Gallego *et al.*, 2011). Otros autores consideran que pueden promover el potencial probiótico (Syal & Vohra, 2013), ya que contribuyen a la mejora de la digestión de proteínas en el tracto gastrointestinal (Oliveira *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el análisis sensorial, las dos levaduras empleadas para la fermentación impactaron positivamente en la calidad general de las aceitunas de mesa. Las aceitunas de mesa elaboradas con la cepa PB99 obtuvieron una valoración general significativamente superior respecto al tratamiento PB98 y control (fermentación espontánea). Estos podrían indicar que esta levadura influye en las características organolépticas. Aunque es necesario profundizar en los estudios sobre este aspecto, numerosos estudios reportan que las levaduras en esta matriz fermentativa producen compuestos como glicerol, etanol, alcoholes superiores, ésteres y otros compuestos volátiles que pueden desempeñar un papel importante en la generación de sabor y el mantenimiento de la textura durante el procesamiento de aceitunas de mesa (Arroyo-López *et al.*, 2008; Garrido *et al.*, 1995). De esta forma, Sánchez *et al.*, (2000) y Montaña *et al.*, (2003) informaron sobre la formación de ácido acético, ácido succínico, ácido fórmico, etanol y acetaldehído durante la fermentación de aceitunas verdes. Aponte *et al.* (2010) mencionaron la presencia de un número considerable de compuestos volátiles durante la fermentación de la aceituna de mesa siciliana, dominada principalmente por levaduras. La mayoría de estos compuestos derivan de la degradación de ácidos grasos poliinsaturados a través de vías de lipoxigenasa. Encontraron hidrocarburos como el octano y aldehídos como el heptanal, el octanal y el 2-nonenal. Las actividades lipasa exhibidas por diversas especies de levaduras de olivo también podrían mejorar el perfil aromático de las aceitunas fermentadas al aumentar su contenido de ácidos grasos libres, que podrían ser precursores de diversos compuestos aromáticos como el propanol o el 2-butanol (Hernández *et al.*, 2007; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2010; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2012).

La influencia positiva de las cepas de levaduras en la calidad de las aceitunas de mesa destaca su papel crucial en la fermentación, abriendo nuevas posibilidades para optimizar y diversificar los procesos de elaboración de este apreciado alimento. Los datos obtenidos en este trabajo demuestran el alto potencial de aplicación tecnológica de los aislamientos de *W. anomalous* PB 98 y 99. Además, la posible adición de levaduras probióticas en la fermentación de aceitunas de mesa plantea nuevas cuestiones a resolver en términos de rentabilidad y aceptación por parte de los consumidores, pero también puede mejorar todo el proceso de producción, afectando positivamente el perfil aromático y sensorial, la vida útil del producto y proporcionando propiedades adicionales que promueven la salud de los consumidores. Además, el desarrollo de aceitunas de mesa probióticas podría tener un impacto económico positivo, teniendo en cuenta que es un producto de importancia regional, ya que agrega valor al producto otorgando mayor relevancia para el mercado.

CONCLUSIONES

- La levadura *S. cerevisiae* PB101 empleada como cultivo *starter* de cerveza tipo *Ale* sin filtrar alcanzó resultados deseables. De acuerdo con el perfil sensorial generado, aromas a clavo de olor y banana y sabores levemente más ácida y dulce, se propone evaluar su uso en fermentaciones estilo Belga. Además, resulta importante escalar las fermentaciones para analizar el comportamiento de la levadura.
- Las levaduras *W. anomalous* PB98 y PB99 se emplearon como cultivos *starters* de fermentaciones de aceituna de mesa culminando exitosamente las fermentaciones. Las levaduras con aptitudes probióticas se adaptaron al sistema fermentativo de aceitunas, no proporcionaron aromas ni sabores indeseados y no intervinieron con la fermentación láctica espontánea.

CONCLUSIONES GENERALES

➤ Los resultados obtenidos permiten aceptar la hipótesis planteada en este plan de trabajo.

Este trabajo investigación reveló una presencia notable de levaduras no-*Saccharomyces* con aptitudes para ser consideradas probióticas, superando en número a las cepas de *Saccharomyces*.

➤ A pesar de su origen de aislamiento en alimentos, se descartó el 31% de los aislamientos de levaduras debido a la detección de rasgos potencialmente virulentos. Se destaca que 15 levaduras demostraron resultados satisfactorios incluso en las condiciones adversas del tracto gastrointestinal.

➤ De las 15 levaduras seleccionadas, de acuerdo con los ensayos realizados, algunas no presentaron aptitudes relacionadas con la adhesión, sin embargo, no se consideró como criterio de eliminación.

➤ De las cepas seleccionadas, cuatro mostraron actividad antimicrobiana contra enteropatógenos del tracto gastrointestinal, mientras que otras cuatro demostraron una reducción significativa de los niveles de colesterol en ensayos *in vitro*.

➤ Es importante resaltar que, hasta la fecha, no se han registrado antecedentes de estudios de asociación e invasión de *Salmonella* realizados en líneas celulares Caco-2, ni de estudios de inmunomodulación en líneas celulares Caco-luc en levaduras de origen enológico.

➤ La levadura *Saccharomyces cerevisiae* PB 101 es capaz de conducir de forma satisfactoria el proceso fermentativo de la cerveza. De acuerdo con los resultados del análisis sensorial, se recomienda evaluar la Levadura PB101 en condiciones favorables para obtener cerveza estilo belga.

➤ En cuanto a las levaduras seleccionadas como *starters* para fermentación de aceitunas, las mismas no interfirieron con la fermentación láctica espontánea, ni aportaron características indeseables. Se destaca el tratamiento inoculado con *W. anomalus* PB 99, por sus propiedades organolépticas distintivas en comparación con una fermentación espontánea.

La caracterización de aislamientos autóctonos permite no solo explorar sus propiedades fisiológicas, tolerancia a condiciones estresantes, si no también nos llevará a explorar su uso potencial en la industria.

PROYECCIONES

Las proyecciones futuras de este estudio se centran en:

Evaluación y profundización de las propiedades benéficas reportadas en levaduras probióticas, con el objetivo de avanzar en la comprensión de su potencial aplicado. Aquí se describen las áreas claves a explorar:

Profundización en Estudios de Propiedades Benéficas:

- Investigar con mayor profundidad las propiedades benéficas detectadas en este trabajo en las levaduras, explorando su impacto en la salud y bienestar.
- Analizar los mecanismos subyacentes de las propiedades probióticas para obtener una comprensión más detallada de su acción y su posible aplicación en distintos contextos.

Coinoculación con Cepas Comerciales y *Saccharomyces cerevisiae* con aptitudes probióticas PB101:

- Optimizar las condiciones fermentativas y formular co-inoculos de las levaduras no-*Saccharomyces* seleccionadas con cepas comerciales y la levadura probiótica *Saccharomyces cerevisiae* PB101.
- Evaluar las interacciones entre las diferentes cepas y su impacto en la viabilidad y actividad probiótica, con el fin de identificar posibles sinergias beneficiosas.

Incorporación de Levaduras Probióticas Encapsuladas en Matrices Alimentarias:

Primero propondría Optimizar las condiciones de encapsulación y viabilidad....

- Investigar la viabilidad y eficacia de la incorporación de levaduras probióticas encapsuladas en diversas matrices alimentarias.
- Evaluar la estabilidad de las encapsulaciones y la liberación controlada de las levaduras probióticas en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.

Bioprospección con Aplicaciones Postbióticas, Prebióticas y Simbióticas:

-Realizar un estudio exhaustivo para identificar aplicaciones postbióticas, prebióticas y simbióticas de las levaduras probióticas seleccionadas.

-Explorar la posibilidad de utilizar estas levaduras en combinación con otros compuestos beneficiosos para potenciar sus efectos positivos.

Estas proyecciones no solo contribuirán al conocimiento científico en el campo de las levaduras probióticas, sino que también son directamente aplicables a la industria alimentaria y redundan en efectos beneficiosos sobre la salud del consumidor. Las estrategias de coinoculación y encapsulación, y las interacciones sinérgicas que resulten, son herramientas que promueven nuevas oportunidades para desarrollar productos alimentarios funcionales y terapias probióticas avanzadas.

BIBLIOGRAFIA

- Abid, R., Waseem, H., Ali, J., Ghazanfar, S., Muhammad Ali, G., Elsbali, A. M., & Alharethi, S. H. (2022). Probiotic yeast *Saccharomyces*: Back to nature to improve human health. *Journal of Fungi*, 8(5), 444.
- Agarbati, A., Canonico, L., Marini, E., Zannini, E., Ciani, M., & Comitini, F. (2020). Potential probiotic yeasts sourced from natural environmental and spontaneous processed foods. *Foods*, 9(3), 287.
- Aguiar, L. M., Geraldi, M. V., Cazarin, C. B. B., & Junior, M. R. M. (2019). Functional food consumption and its physiological effects. In *Bioactive compounds* (pp. 205-225). Woodhead Publishing.
- Aguilar-Ballester, M., Herrero-Cervera, A., Vinué, Á., Martínez-Hervás, S., & González-Navarro, H. (2020). Impact of cholesterol metabolism in immune cell function and atherosclerosis. *Nutrients*, 12(7), 2021.
- Alkalbani, N. S., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Olaimat, A. N., Liu, S. Q., Shah, N. P., ... & Ayyash, M. M. (2022). Assessment of yeasts as potential probiotics: A review of gastrointestinal tract conditions and investigation methods. *Journal of Fungi*, 8(4), 365.
- Alongi, M., & Anese, M. (2021). Re-thinking functional food development through a holistic approach. *Journal of Functional Foods*, 81, 104466.
- Altonsy, M. O., Andrews, S. C., & Tuohy, K. M. (2010). Differential induction of apoptosis in human colonic carcinoma cells (Caco-2) by *Atopobium*, and commensal, probiotic and enteropathogenic bacteria: mediation by the mitochondrial pathway. *International journal of food microbiology*, 137(2-3), 190-203.
- An, H. M., Park, S. Y., Lee, D. K., Kim, J. R., Cha, M. K., Lee, S. W., ... & Ha, N. J. (2011). Antiobesity and lipid-lowering effects of *Bifidobacterium* spp. in high fat diet-induced obese rats. *Lipids in health and disease*, 10, 1-8.
- Angulo, M., Ramos, A., Reyes-Becerril, M., Guerra, K., Monreal-Escalante, E., & Angulo, C. (2023). Probiotic *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 yeast enhanced immune responses in mice. *3 Biotech*, 13(1), 28.
- Aponte, M., Ventorino, V., Blaiotta, G., Volpe, G., Farina, V., Avellone, G., ... & Moschetti, G. (2010). Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses. *Food microbiology*, 27(1), 162-170.
- Aragon G, Graham DB, Borum M, Doman DB. Probiotic therapy for irritable bowel syndrome. *Gastroenterol Hepatol*. (2010) 6:39–44.
- Araya, M., Ugalde, R., Villalón, M., & Gómez, M. (2002). Potential probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from quinoa. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4), 949-955.
- Arévalo-Villena, M., Fernandez-Pacheco, P., Castillo, N., Bevilacqua, A., & Pérez, A. B. (2018). Probiotic capability in yeasts: Set-up of a screening method. *Lwt*, 89, 657-665.

- Arroyo-López, F. N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., & Garrido-Fernández, A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *International journal of food microbiology*, 128(2), 189-196.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., ... & Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *nature*, 473(7346), 174-180.
- Ballini, A., Charitos, I. A., Cantore, S., Topi, S., Bottalico, L., & Santacroce, L. (2023). About functional foods: The probiotics and prebiotics state of art. *Antibiotics*, 12(4), 635
- Banik, A., Halder, S. K., Ghosh, C., & Mondal, K. C. (2019). Fungal probiotics: Opportunity, challenge, and prospects. *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi: Volume 2: Perspective for Value-Added Products and Environments*, 101-117.
- Baquero, F., & Nombela, C. (2012). *El microbioma humano y la salud*. Editorial Planeta.
- Barnett, J. A., & Barnett, L. (2011). *Yeast research: a historical overview*. American Society for Microbiology Press.
- Bauer, F. F., & Pretorius, G. H. (2000). Yeast and bacterial interactions during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 59(1-2), 23-33.
- Bauer, F., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine.
- Bauer, F., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine.
- Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernández, A., & Arroyo-López, F. N. (2011). Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International journal of food microbiology*, 147(2), 89-96.
- Bellut, K., & Arendt, E. K. (2019). Chance and challenge: Non-saccharomyces yeasts in nonalcoholic and low alcohol beer brewing—A review. *Journal of the American society of brewing chemists*, 77(2), 77-91.
- Benítez-Cabello, A., Calero-Delgado, B., Rodríguez-Gómez, F., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R., & Arroyo-López, F. N. (2020). The use of multifunctional yeast-lactobacilli starter cultures improves fermentation performance of Spanish-style green table olives. *Food microbiology*, 91, 103497.
- Bennett, S. R., Clish, C. B., & Kaltenbach, T. S. (2021). Gut microbiome and the development of autoimmune disease. *Current Opinion in Immunology*, 73, 101859.
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D. *et al.*, Revisión de la definición de microbioma: viejos conceptos y nuevos desafíos. *Microbioma* 8 , 103 (2020). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Berin, A., Sterling, I., & Vermylen, G. (2014). The gastric mucus barrier: structure, function and importance. *Current Gastroenterology Reports*, 16(1), 1-7.
- Bevilacqua, A., Beneduce, L., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2013). Selection of yeasts as starter cultures for table olives. *Journal of food science*, 78(5), M742-M751.
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2012). Selection of yeasts as starter cultures for table olives: a step-by-step procedure. *Frontiers in Microbiology*, 3, 194.

- Bevilacqua, A., Perricone, M., Cannarsi, M., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2009). Technological and spoiling characteristics of the yeast microflora isolated from Bella di Cerignola table olives. *International journal of food science & technology*, 44(11), 2198-2207.
- Bienvenido, S. (2018). Digestion: an overview. *Nutrition Research Reviews*, 31(2), 167-175.
- Binetti, A., Carrasco, M., Reinheimer, J., & Suárez, V. (2013). Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 434-444.
- Binetti, A., Carrasco, M., Reinheimer, J., & Suárez, V. (2013). Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 434-444.
- Bonatsou, S., Benítez, A., Rodríguez-Gómez, F., Panagou, E. Z., & Arroyo-López, F. N. (2015). Selection of yeasts with multifunctional features for application as starters in natural black table olive processing. *Food Microbiology*, 46, 66-73.
- Bonatsou, S., Tassou, C. C., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2017). Table olive fermentation using starter cultures with multifunctional potential. *Microorganisms*, 5(2), 30.
- Bordet, F., Joran, A., Klein, G., Roullier-Gall, C., & Alexandre, H. (2020). Yeast–yeast interactions: mechanisms, methodologies and impact on composition. *Microorganisms*, 8(4), 600.
- Brandao, R. L., Rosa, J. C. C., Nicoli, J. R., Almeida, M. V., do Carmo, A. P., Queiros, H. T., & Castro, I. M. (2014). Investigating acid stress response in different *Saccharomyces* strains. *J Mycol* 2014: 9.
- Briggs, D. E. (2004). *Brewing: science and practice* (Vol. 108). Woodhead Publishing.
- Briggs, D. E. (2004). *Brewing: science and practice* (Vol. 108). Woodhead Publishing.
- Burin, V. M., Gomes, T. M., Caliari, V., Rosier, J. P., & Luiz, M. T. B. (2015). Establishment of influence the nitrogen content in musts and volatile profile of white wines associated to chemometric tools. *Microchemical Journal*, 122, 20-28.
- Camilleri, M. (2006). Mechanisms of gastrointestinal motility and motor disorders. *Gut*, 55(10), 1426-1434.
- Camiolo, S., Porru, C., Benítez-Cabello, A., Rodríguez-Gómez, F., Calero-Delgado, B., Porceddu, A., ... & Arroyo-López, F. N. (2017). Genome overview of eight *Candida boidinii* strains isolated from human activities and wild environments. *Standards in Genomic Sciences*, 12, 1-14.
- CampBell, N. A., Berry, R. T., & Liang, J. D. (2019). *Biology: a global approach*. Pearson.
- Canadell, D., García-Martínez, J., Alepuz, P., Perez-Ortín, J. E., & Ariño, J. (2015). Impact of high pH stress on yeast gene expression: A comprehensive analysis of mRNA turnover during stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(6), 653-664.

- Canonico, L., Comitini, F., & Ciani, M. (2014). Dominance and influence of selected *Saccharomyces cerevisiae* strains on the analytical profile of craft beer refermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(3), 262-267.
- Canonico, L., Zannini, E., Ciani, M., & Comitini, F. (2021). Assessment of non-conventional yeasts with potential probiotic for protein-fortified craft beer production. *Lwt*, 145, 111361.
- Cantos, M. Á. L., Villafuerte, A. N. M., Castro, C. R. P., & García-Loor, G. M. (2023). Proceso de Producción de Cerveza Artesanal. Explorando dos Formulaciones: IPA al Estilo Británico y Tripel Belga. *Revista Científica y Arbitrada del Observatorio Territorial, Artes y Arquitectura: FINIBUS-ISSN: 2737-6451.*, 6(11), 1-14.
- Carlson, A. J. (2019). *Human physiology: integrated approach*. Elsevier Health Sciences.
- Carradori, S., Ammazalorso, A., De Filippis, B., Şahin, A. F., Akdemir, A., Orekhova, A., ... & Simonetti, G. (2022). Azole-based compounds that are active against candida biofilm: in vitro, in vivo and in silico studies. *Antibiotics*, 11(10), 1375.
- Cassanego, D., Richards, N., Valente, P., Mazutti, M., & Ramirez-Castrillon, M. (2017). Identification by PCR and evaluation of probiotic potential in yeast strains found in kefir samples in the city of Santa Maria, RS, Brazil. *Food Science and Technology*, 38, 59-65.
- Castillo, P. (2013). El complejo olivícola argentino: principales tendencias para el aceite de oliva y aceituna de mesa. *Documentos del CIEA*, 9, 159-180.
- Chambers, R. K., Pretorius, G. H., & Swiegers, J. H. (2015). Selection and development of wine yeast strains for enhanced performance and sensory characteristics. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(12), 1677-1692.
- Champagne, C. P., & Møllgaard, H. (2008). Production of probiotic cultures and their addition in fermented foods. *Handbook of fermented functional foods*, 513-532.
- Champagne, Claude P., Adriano Gomes da Cruz, and Monica Daga. "Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods." *Current Opinion in Food Science* 22 (2018): 160-166.
- Chang, S. C., Lin, C. W., Jiang, C. M., Chen, H. C., Shih, M. K., Chen, Y. Y., & Tsai, Y. H. (2009). Histamine production by bacilli bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from fruit wines. *LWT-Food Science and Technology*, 42(1), 280-285.
- Chelliah, R., Ramakrishnan, S. R., Prabhu, P. R., & Antony, U. (2016). Evaluation of antimicrobial activity and probiotic properties of wild-strain *Pichia kudriavzevii* isolated from frozen idli batter. *Yeast*, 33(8), 385-401.
- Chelliah, R., Ramakrishnan, S. R., Prabhu, P. R., & Antony, U. (2016). Evaluation of antimicrobial activity and probiotic properties of wild-strain *Pichia kudriavzevii* isolated from frozen idli batter. *Yeast*, 33(8), 385-401.
- Chen, A. K. L., Gelling, C., Rogers, P. L., Dawes, I. W., & Rosche, B. (2009). Response of *Saccharomyces cerevisiae* to stress-free acidification. *The Journal of Microbiology*, 47, 1-8.
- Chen, L. S., Ma, Y., Maubois, J. L., He, S. H., Chen, L. J., & Li, H. M. (2010). Screening for the potential probiotic yeast strains from raw milk to assimilate cholesterol. *Dairy science & technology*, 90(5), 537-548.

- Cheraiti, N., Guezenec, S., & Salmon, J. M. (2005). Redox interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in mixed culture under enological conditions. *Applied and environmental microbiology*, 71(1), 255-260.
- Cid, V. J., Durán, A., del Rey, F. R. A. N. C. I. S. C. O., Snyder, M. P., Nombela, C., & Sánchez, M. (1995). Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews*, 59(3), 345-386.
- Cioch-Skoneczny, M., Satora, P., Skoneczny, S., & Skotniczny, M. (2021). Biodiversity of yeasts isolated during spontaneous fermentation of cool climate grape musts. *Archives of Microbiology*, 203, 153-162.
- Claret, S., Gatti, X., Doignon, F., Thoraval, D., & Crouzet, M. (2005). The Rgd1p Rho GTPase-activating protein and the Mid2p cell wall sensor are required at low pH for protein kinase C pathway activation and cell survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell*, 4(8), 1375-1386.
- Conacher, C. G., Rossouw, D., & Bauer, F. F. B. (2019). Peer pressure: evolutionary responses to biotic pressures in wine yeasts. *FEMS Yeast Research*, 19(7), foz072.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C., & Varela, C. (2014). Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Applied and environmental microbiology*, 80(5), 1670-1678.
- Conway, P. L., Gorbach, S. L., & Goldin, B. R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and upper small intestine. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(1), 10-15.
- Conway, P. L., Gorbach, S. L., & Goldin, B. R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of dairy science*, 70(1), 1-12.
- Cortina-Calderón, K. G., Delgado-Rivas, J. G., Ravina-Ripoll, R., & Galván-Vela, E. (2024). Qualitative approach to determine competitiveness factors in craft breweries: evidence from Mexico. *International Journal of Management and Decision Making*, 23(2), 188-209.
- Cui, Q., & Morris, A. P. (2016). The human microbiome: from diversity to function. *The Journal of Molecular Biology*, 428(1), 498-512.
- Cussotto, S., Sandhu, K. V., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2018). The neuroendocrinology of the microbiota-gut-brain axis: a behavioural perspective. *Frontiers in neuroendocrinology*, 51, 80-101.
- Czerucka, D., Piche, T., & Rampal, P. (2007). yeast as probiotics—*Saccharomyces boulardii*. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 26(6), 767-778.
- De Gaetano, G., Costanzo, S., Di Castelnuovo, A., Badimon, L., Bejko, D., Alkerwi, A., ... & Iacoviello, L. (2016). Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 26(6), 443-467.
- de Lucena, R. M., Elsztein, C., de Barros Pita, W., de Souza, R. B., de Sá Leitão Paiva Júnior, S., & de Moraes Junior, M. A. (2015). Transcriptomic response of *Saccharomyces cerevisiae* for its adaptation to sulphuric acid-induced stress. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 108, 1147-1160.
- de Lucena, R. M., Elsztein, C., de Barros Pita, W., de Souza, R. B., de Sá Leitão Paiva Júnior, S., & de Moraes Junior, M. A. (2015). Transcriptomic response of *Saccharomyces*

- cerevisiae for its adaptation to sulphuric acid-induced stress. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 108, 1147-1160.
- De Lucena, R. M., Elsztein, C., Simoes, D. A., & de Morais Jr, M. A. (2012). Participation of CWI, HOG and Calcineurin pathways in the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to low pH by inorganic acid. *Journal of applied microbiology*, 113(3), 629-640.
 - de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Júnior, A. I. M., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology advances*, 36(8), 2060-2076.
 - De Melo, H. F., Bonini, B. M., Thevelein, J., Simões, D. A., & Morais Jr, M. A. (2010). Physiological and molecular analysis of the stress response of *Saccharomyces cerevisiae* imposed by strong inorganic acid with implication to industrial fermentations. *Journal of applied microbiology*, 109(1), 116-127.
 - De Miranda, N. M. Z., De Souza, A. C., de Souza Costa Sobrinho, P., Dias, D. R., Schwan, R. F., & Ramos, C. L. (2023). Novel yeasts with potential probiotic characteristics isolated from the endogenous ferment of artisanal Minas cheese. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(2), 1021-1033.
 - De Nadal, E., Ammerer, G., & Posas, F. (2011). Controlling gene expression in response to stress. *Nature Reviews Genetics*, 12(12), 833-845.
 - Diosma, G., Romanin, D. E., Rey-Burusco, M. F., Londero, A., & Garrote, G. L. (2014). Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 43-53.
 - Doulgeraki, A. I., Hondrodinou, O., Iliopoulos, V., & Panagou, E. Z. (2012). Lactic acid bacteria and yeast heterogeneity during aerobic and modified atmosphere packaging storage of natural black *Conservolea* olives in polyethylene pouches. *Food Control*, 26(1), 49-57.
 - Elhalis, H., Cox, J., Frank, D., & Zhao, J. (2021). Microbiological and biochemical performances of six yeast species as potential starter cultures for wet fermentation of coffee beans. *Lwt*, 137, 110430.
 - Erkkilä, A., & Petaja, K. (2000). Does gastric acid kill bacteria? *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 35(12), 1087-1093.
 - Erkkilä, S., & Petäjä, E. (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat science*, 55(3), 297-300.
 - European Food Safety Authority (EFSA): <https://www.efsa.europa.eu/en>
 - Fadda, M. E., Mossa, V., Deplano, M., Pisano, M. B., & Cosentino, S. (2017). In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. *LWT*, 75, 100-106.
 - Fairbairn, S., McKinnon, A., Musarurwa, H. T., Ferreira, A. C., & Bauer, F. F. (2017). The impact of single amino acids on growth and volatile aroma production by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Frontiers in Microbiology*, 8, 310569.

- Fakruddin, M. D., Hossain, M. N., & Ahmed, M. M. (2017). Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 1-11.
- FAO/OMS. Directrices para la evaluación de probióticos en los alimentos: Informe de una reunión conjunta FAO/OMS . Grupo de trabajo sobre redacción de directrices para la evaluación de probióticos en alimentos (2002).
- Favero, D., Furlaneto-Maia, L., França, E. J., Góes, H. P., & Furlaneto, M. C. (2014). Hemolytic factor production by clinical isolates of *Candida* species. *Current microbiology*, 68, 161-166.
- Fernandes, S. S., Coelho, M. S., & de las Mercedes Salas-Mellado, M. (2019). Bioactive compounds as ingredients of functional foods: polyphenols, carotenoids, peptides from animal and plant sources new. In *Bioactive compounds* (pp. 129-142). Woodhead Publishing.
- Fernandez-Pacheco, P., Arévalo-Villena, M., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Pérez, A. B. (2018). Probiotic characteristics in *Saccharomyces cerevisiae* strains: Properties for application in food industries. *Lwt*, 97, 332-340.
- Fernández-Pacheco, P., Pintado, C., Briones Pérez, A., & Arévalo-Villena, M. (2021). Potential probiotic strains of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces*: functional and biotechnological characteristics. *Journal of Fungi*, 7(3), 177.
- Fiers, W. D., Gao, I. H., & Iliev, I. D. (2019). Gut mycobiota under scrutiny: fungal symbionts or environmental transients?. *Current opinion in microbiology*, 50, 79-86.
- Filipe-Ribeiro, L., Milheiro, J., Ferreira, L. C., Correia, E., Cosme, F., & Nunes, F. M. (2019). Biogenic amines and polyamines in wines: Does *Dekkera/Brettanomyces* red wine spoilage increases the risk of intake by consumers?. *LWT*, 115, 108488.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International journal of food microbiology*, 86(1-2), 11-22.
- França, M. B., Panek, A. D., & Eleutherio, E. C. A. (2007). Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(4), 621-631.
- Gallone, B., Mertens, S., Gordon, J. L., Maere, S., Verstrepen, K. J., & Steensels, J. (2018). Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. *Current opinion in biotechnology*, 49, 148-155.
- García-Hernández, Y., Rodríguez, Z., Brandão, L. R., Rosa, C. A., Nicoli, J. R., Iglesias, A. E., ... & Halaihel, N. (2012). Identification and in vitro screening of avian yeasts for use as probiotic. *Research in veterinary science*, 93(2), 798-802.
- García-Ríos, E., & Guillamón, J. M. (2019). Mechanisms of yeast adaptation to wine fermentations. *Yeasts in Biotechnology and Human Health: Physiological Genomic Approaches*, 37-59.
- Gardini, F., Tofalo, R., Belletti, N., Iucci, L., Suzzi, G., Torriani, S., ... & Lanciotti, R. (2006). Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. *Food Microbiology*, 23(7), 641-648.

- Garrido, P. García, M. Brenes (1995). Olive fermentations H.J. Rem, G. Reed (Eds.), Biotechnology, VCH, Weinheim, Germany.
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F., & Gramenzi, A. (2016). Probiotics history. *Journal of clinical gastroenterology*, 50, S116-S119.
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F., & Gramenzi, A. (2016). Probiotics history. *Journal of clinical gastroenterology*, 50, S116-S119.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., ... & Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular biology of the cell*, 11(12), 4241-4257.
- Ghannoum, M. A., Jurevic, R. J., Mukherjee, P. K., Cui, F., Sikaroodi, M., Naqvi, A., & Gillevet, P. M. (2010). Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS pathogens*, 6(1), e1000713.
- Gheziel, C., Russo, P., Arena, M. P., Spano, G., Ouzari, H. I., Kheroua, O., ... & Capozzi, V. (2019). Evaluating the probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains from Algerian infant feces: towards the design of probiotic starter cultures tailored for developing countries. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11, 113-123.
- Gil-Rodríguez, A. M., Carrascosa, A. V., & Requena, T. (2015). Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1156-1162.
- González, B., Vázquez, J., Morcillo-Parra, M. Á., Mas, A., Torija, M. J., & Beltran, G. (2018). The production of aromatic alcohols in non-*Saccharomyces* wine yeast is modulated by nutrient availability. *Food microbiology*, 74, 64-74.
- Gouba, M., & Drancourt, M. (2016). Role of the gut microbiota in
- Granato, D., Barba, F. J., Bursać Kovačević, D., Lorenzo, J. M., Cruz, A. G., & Putnik, P. (2020). Functional foods: Product development, technological trends, efficacy testing, and safety. *Annual review of food science and technology*, 11, 93-118.
- Granato, D., Branco, G. F., Faria, J. D. A. F., & Cruz, A. G. (2011). Characterization of Brazilian lager and brown ale beers based on color, phenolic compounds, and antioxidant activity using chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(3), 563-571.
- Granato, D., Nunes, D. S., & Barba, F. J. (2017). An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends in Food Science & Technology*, 62, 13-22.
- Gur, J., Mawuntu, M., & Martirosyan, D. (2018). FFC's advancement of functional food definition. *Functional Foods in Health and Disease*, 8(7), 385-397.
- Hallen-Adams, H. E., & Suhr, M. J. (2017). Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. *Virulence*, 8(3), 352-358.
- Hallen-Adams, H. E., Kachman, S. D., Kim, J., Legge, R. M., & Martínez, I. (2015). Fungi inhabiting the healthy human gastrointestinal tract: a diverse and dynamic community. *Fungal Ecology*, 15, 9-17.
- Hammes, W. P. (1990). Bacterial starter cultures in food production. *Food Biotechnology*, 4(1), 383-397.

- Hasan N, Yang H (2019) Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *Peer J*: 7–38
- Heperkan, D., Dazkır, G. S., Kansu, D. Z., & Karbancıoglu Güler, F. (2009). Influence of temperature on citrinin accumulation by *Penicillium citrinum* and *Penicillium verrucosum* in black table olives. *Toxin Reviews*, 28(2-3), 180-186.
- Herdt, R. (2020). Gastric acid secretion: a review. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 13(2), 220.
- Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., & Córdoba, M. G. (2007). Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food microbiology*, 24(4), 346-351.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., & Cabisco, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1780(11), 1217-1235.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G. *et al.*, (2014). The International Scientific Association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11, 506–514.
- Hillman, E. T., Lu, H., Yao, T., & Nakatsu, C. H. (2017). Microbial ecology along the gastrointestinal tract. *Microbes and environments*, 32(4), 300-313.
- Hirayama, S., Furukawa, S., Ogiwara, H., & Morinaga, Y. (2012). Yeast mannan structure necessary for co-aggregation with *Lactobacillus plantarum* ML11-11. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 419(4), 652-655.
- Hoffmann, C., Dollive, S., Grunberg, S., Chen, J., Li, H., Wu, G. D., ... & Bushman, F. D. (2013). Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PloS one*, 8(6), e66019.
- Homayouni-Rad, A., Azizi, A., Oroojzadeh, P., & Pourjafar, H. (2020). *Kluyveromyces marxianus* as a probiotic yeast: A mini-review. *Current Nutrition & Food Science*, 16(8), 1163-1169.
- Hsiung, R. T., Fang, W. T., LePage, B. A., Hsu, S. A., Hsu, C. H., & Chou, J. Y. (2021). In vitro properties of potential probiotic indigenous yeasts originating from fermented food and beverages in Taiwan. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13, 113-124.
- Huang, H. C., & Chang, T. M. (2012). Antioxidative properties and inhibitory effect of *Bifidobacterium adolescentis* on melanogenesis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 2903-2912.
- Huffnagle, G. B., & Noverr, M. C. (2013). The role of microbes in health and disease. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 83-105.
- Ianiro G, Bruno G, Lopetuso L, Beghella FB, Laterza L, D'Aversa F, Gigante G, Cammarota G, Gasbarrini A. (2014). Role of yeasts in healthy and impaired gut microbiota: the gut mycome. *Curr Phar Des* ; 20:4565-69;
- Iattici, F., Catallo, M., & Solieri, L. (2020). Designing new yeasts for craft brewing: When natural biodiversity meets biotechnology. *Beverages*, 6(1), 3.
- International Human Microbiome Consortium (IHMC): <https://human-microbiome.org/>

- Iyer, R., Tomar, S. K., Kapila, S., Mani, J., & Singh, R. (2010). Probiotic properties of folate producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Food Research International*, 43(1), 103-110.
- Izquierdo Pulido, M. (1991). Análisis, formación y evolución de aminas biógenas en cervezas.
- Izquierdo-Pulido, M., Font-Fábregas, J., & Vidal-Carou, C. (1995). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* on histamine and tyramine formation during beer fermentation. *Food chemistry*, 54(1), 51-54.
- Jarocki, P., Komoń-Janczara, E., Młodzińska, A., Sadurski, J., Kołodzińska, K., Łaczmański, Ł., ... & Frąc, M. (2023). Occurrence and genetic diversity of prophage sequences identified in the genomes of *L. casei* group bacteria. *Scientific Reports*, 13(1), 8603.
- Jethwani, P., & Grover, K. (2019). Gut microbiota in health and diseases—a review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 8(8), 1586-1599.
- Kailis, S., & Harris, D. J. (2007). Producing table olives. Landlinks press.
- Kapteyn, J. C., Ter Riet, B., Vink, E., Blad, S., De Nobel, H., Van Den Ende, H., & Klis, F. M. (2001). Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Molecular microbiology*, 39(2), 469-480.
- Kaur, Navdeep, and Devinder Pal Singh. "RETRACTED: Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: A literature review." *Appetite* 112 (2017): 167-187.
- Kaur, S., & Das, M. (2011). Functional foods: An overview. *Food Science and Biotechnology*, 20, 861-875.
- Kelesidis, T., & Pothoulakis, C. (2012). Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 5(2), 111-125.
- Kemsawasd, V., Branco, P., Almeida, M. G., Caldeira, J., Albergaria, H., & Arneborg, N. (2015). Cell-to-cell contact and antimicrobial peptides play a combined role in the death of *Lachancea thermotolerans* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology letters*, 362(14), fnv103.
- Kemsawasd, V., Branco, P., Almeida, M. G., Caldeira, J., Albergaria, H., & Arneborg, N. (2015). Cell-to-cell contact and antimicrobial peptides play a combined role in the death of *Lachancea thermotolerans* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology letters*, 362(14), fnv103.
- Kemsawasd, V., Viana, T., Ardö, Y., & Arneborg, N. Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 10191-10207.
- Khoury, Z. H., Vila, T., Puthran, T. R., Sultan, A. S., Montelongo-Jauregui, D., Melo, M. A. S., & Jabra-Rizk, M. A. (2020). The role of *Candida albicans* secreted polysaccharides in augmenting *Streptococcus mutans* adherence and mixed biofilm formation: in vitro and in vivo studies. *Frontiers in microbiology*, 11, 512488.
- Kirschner R, Hsu T, Tuan NN, Chen CL, Huang SL. (2015). Characterization of fungal and bacterial components in gut/fecal microbiome. *Curr Drug Metab* ; 16:272-83;.

- Klimesova, K., Whittamore, J. M., & Hatch, M. (2015). Bifidobacterium animalis subsp. lactis decreases urinary oxalate excretion in a mouse model of primary hyperoxaluria. *Urolithiasis*, 43, 107-117.
- Klingberg TD, Lesnik U, Arneborg N, Raspor P, Jespersen L. Comparación de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de origen clínico y no clínico mediante tipificación molecular y determinación de supuestos rasgos de virulencia. *FEMS Levadura Res.* (2008) 8:631–40. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00365.x
- Kobayashi, Y., Kuhara, T., Oki, M., & Xiao, J. Z. (2019). Effects of Bifidobacterium breve A1 on the cognitive function of older adults with memory complaints: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Beneficial microbes*, 10(5), 511-520.
- Kochkodan, V., Tsarenko, S., Potapchenko, N., Kosinova, V., & Goncharuk, V. (2008). Adhesion of microorganisms to polymer membranes: a photobactericidal effect of surface treatment with TiO₂. *Desalination*, 220(1-3), 380-385.
- Kocsis, T., Molnár, B., Németh, D., Hegyi, P., Szakács, Z., Bálint, A., ... & Solymar, M. (2020). Probiotics have beneficial metabolic effects in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Scientific reports*, 10(1), 11787.
- Konar, N., Toker, O. S., Palabiyik, I., & Polat, D. G. (2018). Importance of chocolates in functional foods: formulation, production process, and potential health benefits. *Bioprocessing technology in food and health: potential applications and emerging scope*. Apple Academic press, New York, 23-64.
- Kong, F., & Singh, R. P. (2008). Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of food science*, 73(5), R67-R80.
- Kordowska-Wiater, M., Pytko, M., Stój, A., Kubik-Komar, A., Wyrstek, J., & Waśko, A. (2022). A metagenetic insight into microbial diversity of spontaneously fermented polish red wines and an analysis of selected physicochemical properties. *Applied Sciences*, 12(9), 4373.
- Koshchayev, I., Lavrinenko, K., & Medvedeva, P. (2022). Probiotic drug based on *Kluyveromyces marxianus* for poultry. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 363, p. 03070). EDP Sciences.
- Kozłowski, R., Dziedziński, M., Stachowiak, B., & Kobus-Cisowska, J. (2021). Non-and low-alcoholic beer—popularity and manufacturing techniques. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 20(3), 347-357.
- Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., ... & Yadav, H. (2012). Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Journal of Diabetes Research*, 2012.
- Kumura, H., Tanoue, Y., Tsukahara, M., Tanaka, T., & Shimazaki, K. (2004). Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *Journal of dairy science*, 87(12), 4050-4056.
- Kunyeit, L., Rao, R. P., & Anu-Appaiah, K. A. (2023). Yeasts originating from fermented foods, their potential as probiotics and therapeutic implication for human health and disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-12.

- Kurtzman, C. P., Liu, Y., Roberson, R. D., Wolfe, G., & Clancy, J. (2011). Phylogenetic relationships among yeasts of the Saccharomycetales clade. *FEMS Yeast Research*, 11(2), 235-245.
- Lara-Hidalgo, C., Belloch, C., Dorantes-Alvarez, L., & Flores, M. (2020). Contribution of autochthonous yeasts with probiotic potential to the aroma profile of fermented Guajillo pepper sauce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(13), 4940-4949.
- Lara-Hidalgo, C., Belloch, C., Dorantes-Alvarez, L., & Flores, M. (2020). Contribution of autochthonous yeasts with probiotic potential to the aroma profile of fermented Guajillo pepper sauce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(13), 4940-4949.
- Larroque, M. N., Carrau, F., Fariña, L., Boido, E., Dellacassa, E., & Medina, K. (2021). Effect of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* native yeasts on beer aroma compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 337, 108953.
- Lee, Z. Y., Lew, C. C. H., Ortiz-Reyes, A., Patel, J. J., Wong, Y. J., Loh, C. T. I., ... & Heyland, D. K. (2023). Benefits and harm of probiotics and synbiotics in adult critically ill patients. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials with trial sequential analysis. *Clinical Nutrition*, 42(4), 519-531.
- LEGRAS, J. L., Merdinoglu, D., CORNUET, J. M., & Karst, F. (2007). Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular ecology*, 16(10), 2091-2102.
- Lengeler, K. B., Stovicek, V., Fennessy, R. T., Katz, M., & Förster, J. (2020). Never change a brewing yeast? Why not, there are plenty to choose from. *Frontiers in Genetics*, 11, 582789..”
- Levin, D. E. (2011). Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics*, 189(4), 1145-1175.
- Li, C., Yu, W., Wu, P., & Chen, X. D. (2020). Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology*, 96, 114-126.
- Li, J., Chen, D., Yu, B., He, J., Zheng, P., Mao, X., ... & Luo, Y. (2018). Fungi in gastrointestinal tracts of human and mice: from community to functions. *Microbial ecology*, 75, 821-829.
- Li, J., Chen, D., Yu, B., He, J., Zheng, P., Mao, X., ... & Luo, Y. (2018). Fungi in gastrointestinal tracts of human and mice: from community to functions. *Microbial ecology*, 75, 821-829.
- Limon, J. J., Skalski, J. H., & Underhill, D. M. (2017). Commensal fungi in health and disease. *Cell host & microbe*, 22(2), 156-165.
- Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Annual review of biochemistry*, 55(1), 1151-1191.
- Liu, X., Yu, Y., Liu, D., Li, J., Sun, J., Wei, Q., ... & Li, L. (2022). Porous microcapsules encapsulating β cells generated by microfluidic electrospray technology for diabetes treatment. *NPG Asia Materials*, 14(1), 39.
- Lodolo, E. J., Kock, J. L., Axcell, B. C., & Brooks, M. (2008). The yeast *Saccharomyces cerevisiae*—the main character in beer brewing. *FEMS yeast research*, 8(7), 1018-1036.

- Lucena, R. M., Dolz-Edo, L., Brul, S., de Morais Jr, M. A., & Smits, G. (2020). Extreme low cytosolic pH is a signal for cell survival in acid stressed yeast. *Genes*, 11(6), 656.
- Lugea, A., Salas, A., Casalot, J., Guarner, F., & Malagelada, J. R. (2000). Surface hydrophobicity of the rat colonic mucosa is a defensive barrier against macromolecules and toxins. *Gut*, 46(4), 515-521.
- Ma, T., Shen, X., Shi, X., Sakandar, H. A., Quan, K., Li, Y., ... & Sun, Z. (2023). Targeting gut microbiota and metabolism as the major probiotic mechanism-An evidence-based review. *Trends in Food Science & Technology*.
- Maione, A., Imparato, M., Buonanno, A., Salvatore, M. M., Carraturo, F., de Alteriis, E., ... & Galdiero, E. (2024). Evaluation of Potential Probiotic Properties and In Vivo Safety of Lactic Acid Bacteria and Yeast Strains Isolated from Traditional Home-Made Kefir. *Foods*, 13(7), 1013.
- Manson, J. E., Tosteson, H., Ridker, P. M., Satterfield, S., Hebert, P., O'Connor, G. T., ... & Hennekens, C. H. (1992). The primary prevention of myocardial infarction. *New England journal of medicine*, 326(21), 1406-1416.
- Marks, V. D., Ho Sui, S. J., Erasmus, D., Van Der Merwe, G. K., Brumm, J., Wasserman, W. W., ... & Van Vuuren, H. J. (2008). Dynamics of the yeast transcriptome during wine fermentation reveals a novel fermentation stress response. *FEMS yeast research*, 8(1), 35-52.
- Marsit, G., & Dequin, S. (2015). Diversity and evolution of yeasts in the winemaking ecosystem. *FEMS Yeast Research*, 15(6).
- Marsit, S., & Dequin, S. (2015). Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review. *FEMS Yeast Research*, 15(7), fov067.
- Marsit, S., & Dequin, S. (2015). Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review. *FEMS Yeast Research*, 15(7), fov067.
- Marsit, S., & Dequin, S. (2015). Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review. *FEMS Yeast Research*, 15(7), fov067.
- Martins, E. M. F., Ramos, A. M., Vanzela, E. S. L., Stringheta, P. C., de Oliveira Pinto, C. L., & Martins, J. M. (2013). Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, 51(2), 764-770.
- Martirosyan, D. M., & Singh, J. (2015). A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique?. *Functional foods in health and disease*, 5(6), 209-223.
- Martirosyan, D. M., & Singh, J. (2015). A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique?. *Functional foods in health and disease*, 5(6), 209-223.
- Marzano, M., Fosso, B., Manzari, C., Grieco, F., Intranuovo, M., Cozzi, G., ... & Santamaria, M. (2016). Complexity and dynamics of the winemaking bacterial communities in berries, musts, and wines from Apulian grape cultivars through time and space. *PLoS One*, 11(6), e0157383.
- Matallana, E., & Aranda, A. (2017). Biotechnological impact of stress response on wine yeast. *Letters in applied microbiology*, 64(2), 103-110.
- Maturano, Y. P., Mestre, M. V., Kuchen, B., Toro, M. E., Mercado, L. A., Vazquez, F., & Combina, M. (2019). Optimization of fermentation-relevant factors: A strategy to reduce

- ethanol in red wine by sequential culture of native yeasts. *International journal of food microbiology*, 289, 40-48.
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., & Weiss, J. (2009). Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49(6), 577-606.
 - McFarland, L. V. (2015). From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl_2), S85-S90.
 - Melvydas, V., Svediene, J., Skridlaite, G., Vaiciuniene, J., & Garjonyte, R. (2020). In vitro inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by *Metschnikowia* spp. triggered by fast removal of iron via two ways. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51, 1953-1964.
 - Menezes, A. G. T., Ramos, C. L., Cenzi, G., Melo, D. S., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2020). Probiotic potential, antioxidant activity, and phytase production of indigenous yeasts isolated from indigenous fermented foods. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12, 280-288.
 - Mestre, M. V., Maturano, Y. P., Gallardo, C., Combina, M., Mercado, L., Toro, M. E., ... & Dellacassa, E. (2019). Impact on sensory and aromatic profile of low ethanol Malbec wines fermented by sequential culture of *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* native yeasts. *Fermentation*, 5(3), 65.
 - Meyer, J. H., Jehlenger, R. K., & Carlson, G. M. (1981). Regulation of gastric emptying in man. *Gastroenterology*, 80(2), 252-263.
 - Min, M., Bunt, C. R., Mason, S. L., & Hussain, M. A. (2019). Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(16), 2626-2641.
 - Min, M., Bunt, C. R., Mason, S. L., & Hussain, M. A. (2019). Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(16), 2626-2641.
 - Mirzaei, M., Shavandi, A., Mirdamadi, S., Soleymanzadeh, N., Motahari, P., Mirdamadi, N., ... y Goriely, S. (2021). Péptidos bioactivos de levadura: una revisión comparativa sobre métodos de producción, bioactividad, relación estructura-función y estabilidad. *Tendencias en ciencia y tecnología de los alimentos*, 118, 297-315.
 - Montañó, A., Sánchez, A. H., Casado, F. J., De Castro, A., & Rejano, L. (2003). Chemical profile of industrially fermented green olives of different varieties. *Food Chemistry*, 82(2), 297-302.
 - Moors, E. H. (2012). Functional foods: regulation and innovations in the EU. *Innovation: The European Journal of Social Science Research*, 25(4), 424-440.
 - Morales, I., Romero-Calvo, I., & Ocon, E. (2022). The gut microbiota and its role in the development of obesity and cardio-metabolic diseases. *Nutrients*, 14(3), 545.
 - Morano, K. A., Grant, C. M., & Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4), 1157-1195.
 - More MI, Swidsinski A. *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 supports regeneration of the intestinal microbiota after diarrheic dysbiosis—a review. *Clin Exp Gastroenterol*. (2015) 8:237. doi: 10.2147/CEG.S85574

- Moré, M. I., & Swidsinski, A. (2015). *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 supports regeneration of the intestinal microbiota after diarrheic dysbiosis—a review. *Clinical and experimental gastroenterology*, 237-255.
- Morelli, L., & Capurso, L. (2012). FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later. *Journal of clinical gastroenterology*, 46, S1-S2.
- Moyes DL, Naglik JR (2012). The mycobiome: influencing IBD severity. *Cell Host Microbe* ; 11:551-2; PMID:22704612.
- Mueller, L., & Lorentz, A. (2022). Probiotics in the Treatment of Inflammatory Bowel Diseases in Adulthood: A Systematic Review. *Journal of Gastrointestinal & Liver Diseases*, 31(1).
- Mujdeci, G. N., & Ozbas, Z. Y. (2021). Technological and enzymatic characterization of the yeasts isolated from natural fermentation media of Gemlik olives. *Journal of Applied Microbiology*, 131(2), 801-818.
- Mukai, N., Masaki, K., Fujii, T., Kawamukai, M., & Iefuji, H. (2010). PAD1 and FDC1 are essential for the decarboxylation of phenylacrylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 109(6), 564-569.
- Mukherjee PK, Sendid B, Hoarau G, Colombel JF, Poulain D, Ghannoum MA. (2015). Mycobiota in gastrointestinal diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* ; 12:77-87.
- Mulero-Cerezo, Joaquín, Álvaro Briz-Redón, and Ángel Serrano-Aroca. "Saccharomyces cerevisiae var. boulardii: valioso iniciador probiótico para la producción de cerveza artesanal". *Ciencias Aplicadas* 9.16 (2019): 3250.
- Müller, K., Keller, M., Stoll, M., & Friedel, M. (2023). Wind speed, sun exposure and water status alter sunburn susceptibility of grape berries. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1145274.
- Munna, M. S., Humayun, S., & Noor, R. (2015). Influence of heat shock and osmotic stresses on the growth and viability of *Saccharomyces cerevisiae* SUBSC01. *BMC research notes*, 8, 1-8.
- Nagpal, R., Tsuji, H., Takahashi, T., Nomoto, K., Kawashima, K., Nagata, S., & Yamashiro, Y. (2017). Ontogenesis of the gut microbiota composition in healthy, full-term, vaginally born and breast-fed infants over the first 3 years of life: a quantitative bird's-eye view. *Frontiers in microbiology*, 8, 1388.
- Nash, A. K., Auchtung, T. A., Wong, M. C., Smith, D. P., Gesell, J. R., Ross, M. C., ... & Petrosino, J. F. (2017). The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome*, 5, 1-13.
- Nasuti, C., & Solieri, L. (2024). Yeast Bioflavoring in Beer: Complexity Decoded and Built up Again. *Fermentation*, 10(4), 183.
 - National Institutes of Health (NIH): <https://www.nih.gov/>
- Navarro, F., Liu, Y., & Rhoads, J. M. (2016). Can probiotics benefit children with autism spectrum disorders?. *World journal of gastroenterology*, 22(46), 10093.
- Nisiotou, A. A., Spiropoulos, A. E., & Nychas, G. J. E. (2007). Yeast community structures and dynamics in healthy and Botrytis-affected grape must fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 6705-6713.
- Nita, M., & Grzybowski, A. (2016). The role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of

- the anterior and posterior eye segments in adults. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Norton, J. E., Wallis, G. A., Spyropoulos, F., Lillford, P. J., & Norton, I. T. (2014). Designing food structures for nutrition and health benefits. *Annual review of food science and technology*, 5, 177-195.
 - Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H., Hashikura, N., Takahashi, S., Xiao, J. Z., ... & Osawa, R. (2016). Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC microbiology*, 16, 1-12.
 - Offei, B., Vandecruys, P., De Graeve, S., Foulquié-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M. (2019). Unique genetic basis of the distinct antibiotic potency of high acetic acid production in the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *Genome research*, 29(9), 1478-1494.
 - Ogunremi, O. R., Sanni, A. I., & Agrawal, R. J. J. O. A. M. (2015). Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3), 797-808.
 - Oliveira, T., Ramalhosa, E., Nunes, L., Pereira, J. A., Colla, E., & Pereira, E. L. (2017). Probiotic potential of indigenous yeasts isolated during the fermentation of table olives from Northeast of Portugal. *Innovative food science & emerging technologies*, 44, 167-172.
 - Ozen M, Dinleyici EC. La historia de los probióticos: la historia no contada. *Microbios beneficiosos*. 2015;6:159–165.
 - Pais, P., Almeida, V., Yilmaz, M., & Teixeira, M. C. (2020). *Saccharomyces boulardii*: what makes it tick as successful probiotic?. *Journal of Fungi*, 6(2), 78.
 - Panel de Peligros Biológicos de la EFSA (BIOHAZ), Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, *et al.*, Actualización de la lista de agentes biológicos recomendados por QPS añadidos intencionalmente a alimentos o piensos según lo notificado a EFSA 5: idoneidad de las unidades taxonómicas notificadas a EFSA hasta septiembre de 2016. EFSA J. (2017) 15:e04663. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4663
 - Panel de Peligros Biológicos de la EFSA. Opinión científica sobre el mantenimiento de la lista de agentes biológicos QPS añadidos intencionalmente a alimentos y piensos. EFSA J. (2010) 8:1944.
 - Parafati, L., Palmeri, R., Pitino, I., & Restuccia, C. (2022). Killer yeasts isolated from olive brines: Technological and probiotic aptitudes. *Food Microbiology*, 103, 103950.
 - Parafati, L., Palmeri, R., Pitino, I., & Restuccia, C. (2022). Killer yeasts isolated from olive brines: Technological and probiotic aptitudes. *Food Microbiology*, 103, 103950.
 - Passos, M. D. C. F., & Moraes-Filho, J. P. (2017). Intestinal microbiota in digestive diseases. *Arquivos de gastroenterologia*, 54, 255-262.
 - Peng, K., Koubaa, M., Bals, O., & Vorobiev, E. (2020). Recent insights in the impact of emerging technologies on lactic acid bacteria: A review. *Food research international*, 137, 109544.
 - Pennacchia, C., Blaiotta, G., Pepe, O., & Villani, F. (2008). Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 105(6), 1919-1928.

- Pereira, T., Vilaprinyo, E., Belli, G., Herrero, E., Salvado, B., Sorribas, A., ... & Alves, R. (2018). Quantitative operating principles of yeast metabolism during adaptation to heat stress. *Cell reports*, 22(9), 2421-2430.
- Pérez, J. C. (2021). Fungi of the human gut microbiota: Roles and significance. *International Journal of Medical Microbiology*, 311(3), 151490.
- Pérez, J. C., Kumamoto, C. A., & Johnson, A. D. (2013). *Candida albicans* commensalism and pathogenicity are intertwined traits directed by a tightly knit transcriptional regulatory circuit. *PLoS biology*, 11(3), e1001510.
- Pérez, JC (2021). Hongos de la microbiota intestinal humana: funciones y significado. *Revista Internacional de Microbiología Médica*, 311 (3), 151490.
- Pérez-Través, L., de Llanos, R., Flockhart, A., García-Domingo, L., Groenewald, M., Pérez-Torrado, R., & Querol, A. (2021). Virulence related traits in yeast species associated with food; *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, and *Wickerhamomyces anomalus*. *Food Control*, 124, 107901.
- Perpetuini, G., Prete, R., Garcia-Gonzalez, N., Khairul Alam, M., & Corsetti, A. (2020). Table olives more than a fermented food. *Foods*, 9(2), 178.
- Petitgonnet, C., Klein, G. L., Roullier-Gall, C., Schmitt-Kopplin, P., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., ... & Alexandre, H. (2019). Influence of cell-cell contact between *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* on yeast interactions and the exo-metabolome. *Food Microbiology*, 83, 122-133.
- Pietrafesa, R., Siesto, G., Tufariello, M., Palombi, L., Baiano, A., Gerardi, C., ... & Capece, A. (2023). A multivariate approach to explore the volatolomic and sensory profiles of craft Italian Grape Ale beers produced with novel *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1234884.
- Pilone, V., Di Pasquale, A., & Stasi, A. (2023). Consumer Preferences for Craft Beer by Means of Artificial Intelligence: Are Italian Producers Doing Well?. *Beverages*, 9(1), 26.
- Piraine, R. E. A., Retzlaf, G. M., Gonçalves, V. S., Cunha, R. C., Conrad, N. L., Bochman, M. L., & Leite, F. P. L. (2023). Brewing and probiotic potential activity of wild yeasts *Hanseniaspora uvarum* PIT001, *Pichia kluyveri* LAR001 and *Candida intermedia* ORQ001. *European Food Research and Technology*, 249(1), 133-148.
- Ponomarova, O., Gabrielli, N., Sévin, D. C., Mülleder, M., Zirngibl, K., Bulyha, K., ... & Patil, K. R. (2017). Yeast creates a niche for symbiotic lactic acid bacteria through nitrogen overflow. *Cell systems*, 5(4), 345-357.
- Porru, C., Rodríguez-Gómez, F., Benítez-Cabello, A., Jiménez-Díaz, R., Zara, G., Budroni, M., ... & Arroyo-López, F. N. (2018). Genotyping, identification and multifunctional features of yeasts associated to Bosana naturally black table olive fermentations. *Food microbiology*, 69, 33-42.
- Postigo, V., García, M., Cabellos, J. M., & Arroyo, T. (2021). Wine *Saccharomyces* yeasts for beer fermentation. *Fermentation*, 7(4), 290.
- Postigo, V., García, M., Cabellos, J. M., & Arroyo, T. (2021). Wine *Saccharomyces* yeasts for beer fermentation. *Fermentation*, 7(4), 290.

- Prasad, D., Adhikari, D. K., & Dwivedi, S. K. (1998). Effect of dahi (yogurt) consumption on human intestinal microflora. *Indian Journal of Medical Research*, 107(2), 132-136.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J., & Gopal, P. K. (1998). Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *International Dairy Journal*, 8(12), 993-1002.
- Precedence Research. Probiotics Market (By Ingredient: Bacteria and Yeast; By Application: Food & Beverage, Dietary Supplements, and Animal Feed; By End Use: Human, Animal; By Distribution Channel: Hypermarkets/Supermarkets, Pharmacies/Drugstores, Specialty Stores, Online Stores, Others)—Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, Regional Outlook, and Forecast 2022–2030. Available online: <https://www.precedenceresearch.com/probiotics-market> (accessed on 27 October 2022).
- Prieto-Santos, M. (2023). Microbioma intestinal: una visión actual. *Revista de Gastroenterología y Hepatología*, 40(2), 113-122.
- Probiotics in Food—Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. 2006. Available online: <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf> (accessed on 5 January 2024).
- Proctor, M. B. (2019). The microbiome: A new frontier in medicine? *The New England Journal of Medicine*, 380(22), 2146-2153.
- Psani, M., & Kotzekidou, P. (2006). Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 1329-1336.
- Psomas, E., Andrighetto, C., Litopoulou-Tzanetaki, E., Lombardi, A., & Tzanetakis, N. (2001). Some probiotic properties of yeast isolates from infant faeces and Feta cheese. *International journal of food microbiology*, 69(1-2), 125-133.
- Psomas, I. E., Logaras, V. G., & Mantalaris, A. (2001). The effect of probiotic yoghurt on intestinal microflora of healthy volunteers. *European Journal of Nutrition*, 40(2), 95-100.
- Putnik, P., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Roohinejad, S., Režek Jambrak, A., Granato, D., ... & Bursać Kovačević, D. (2018). Novel food processing and extraction technologies of high-added value compounds from plant materials. *Foods*, 7(7), 106.
- Pytka, M., Kordowska-Wiater, M., Wajs, J., Glibowski, P., & Sajnaga, E. (2022). Usefulness of potentially probiotic *L. lactis* isolates from polish fermented cow milk for the production of cottage cheese. *Applied Sciences*, 12(23), 12088.
- Querol, A., & Fleet, G. H. (Eds.). (2006). *Yeasts in food and beverages*.
- Quigley, E. M. (2013). Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterology & hepatology*, 9(9), 560.
- Rajilic-Stojanovic M, Smidt H, de Vos WM. (2007). Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ Microbiol* ; 9:2125-36; PMID:17686012
- Rankine, Bryce. *Making good wine*. Macmillan Publishers Aus., 2007.
- Rasmussen, M. L., Koziel, J. A., Jane, J. L., & Pometto III, A. L. (2015). Reducing bacterial contamination in fuel ethanol fermentations by ozone treatment of uncooked corn mash. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(21), 5239-5248.

- Renouf, V., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. L. I. N. E. (2005). Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 316-327.
- Requena, T., & Velasco, M. (2019). Microbioma intestinal y salud: un nuevo paradigma en la medicina del siglo XXI. *Gaceta Médica de México*, 155(9), 541-547.
- Richard ML, Lamas B, Liguori G, Hoffmann TW, Sokol H. (2015). Gut fungal microbiota: the Yin and Yang of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* ; 21:656-65.
- Richard, M. L., & Sokol, H. (2019). The gut mycobiota: insights into analysis, environmental interactions and role in gastrointestinal diseases. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(6), 331-345.
- Richter, K., Haslbeck, M., & Buchner, J. (2010). The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular cell*, 40(2), 253-266.
- Robles-Alonso, V., & Guarner, F. (2013). Progress in the knowledge of the intestinal human microbiota. *Nutrición hospitalaria*, 28(3), 553-557.
- Rodríguez, P. F. P., Arévalo-Villena, M., Rosa, I. Z., & Pérez, A. B. (2018). Selection of potential non-Sacharomyces probiotic yeasts from food origin by a step-by-step approach. *Food research international*, 112, 143-151.
- Rodríguez-Gómez, F., Arroyo-López, F. N., López-López, A., Bautista-Gallego, J., & Garrido-Fernández, A. (2010). Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation/storage phase of ripe olive processing. *Food Microbiology*, 27(5), 604-612.
- Rodríguez-Gómez, F., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A., & Arroyo-López, F. N. (2012). Multivariate analysis to discriminate yeast strains with technological applications in table olive processing. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1761-1770.
- Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F., Garrido-Mesa, J., Vezza, T., Utrilla, M. P., Chueca, N., ... & Gálvez, J. (2018). Intestinal anti-inflammatory effect of the probiotic *Saccharomyces boulardii* in DSS-induced colitis in mice: Impact on microRNAs expression and gut microbiota composition. *The Journal of nutritional biochemistry*, 61, 129-139.
- Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., & Divol, B. (2018). Altered fermentation performances, growth, and metabolic footprints reveal competition for nutrients between yeast
- Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., García-García, P., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., & Arroyo-López, F. N. (2013). Evaluating the individual effects of temperature and salt on table olive related microorganisms. *Food microbiology*, 33(2), 178-184.
- Rosenfeld-Yehoshua, N., Barkan, S., Abu-Kishk, I., Booch, M., Suhami, R., & Kozar, E. (2018). Hyperpyrexia and high fever as a predictor for serious bacterial infection (SBI) in children—a systematic review. *European journal of pediatrics*, 177, 337-344.
- Rossouw, D., Meiring, S. P., & Bauer, F. F. (2018). Modifying *Saccharomyces cerevisiae* adhesion properties regulates yeast ecosystem dynamics. *mSphere* 14: e00383–e00318.
- Russo, P., Peña, N., de Chiara, M. L. V., Amodio, M. L., Colelli, G., & Spano, G. (2015). Probiotic lactic acid bacteria for the production of multifunctional fresh-cut cantaloupe. *Food Research International*, 77, 762-772.

- Rwubuzizi, R., Kim, H., Holzapfel, W. H., & Todorov, S. D. (2023). Beneficial, safety, and antioxidant properties of lactic acid bacteria: A next step in their evaluation as potential probiotics. *Heliyon*, 9(4).
- Sadeghi, A., Ebrahimi, M., Shahryari, S., Kharazmi, M. S., & Jafari, S. M. (2022). Food applications of probiotic yeasts; focusing on their techno-functional, postbiotic and protective capabilities. *Trends in Food Science & Technology*, 128, 278-295.
- Salminen, S., Isolauri, E., & Korpela, R. (1998). Probiotics: how they may impact on human health. *Journal of the American Dietetic Association*, 98(7), 826-832.
- Sánchez, A. H., De Castro, A., Rejano, L., & Montaña, A. (2000). Comparative study on chemical changes in olive juice and brine during green olive fermentation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(12), 5975-5980.
- Santona, M., Sanna, M. L., Multineddu, C., Fancello, F., de la Fuente, S. A., Dettori, S., & Zara, S. (2018). Microbial biodiversity of Sardinian oleic ecosystems. *Food microbiology*, 70, 65-75.
- Scanlan PD, Marchesi JR. (2008). Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and independent analysis of feces. *ISMA J* ; 2:1183-93.
- Schubert, K. (2003). The role of gastric acid in the digestive system. *Current Gastroenterology Reports*, 5(4), 249-254.
- Schubert, K. (2017). Gastric acid secretion. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 32(6), 364-373.
- Scupham, A. J., Presley, L. L., Wei, B., Bent, E., Griffith, N., McPherson, M., ... & Borneman, J. (2006). Abundant and diverse fungal microbiota in the murine intestine. *Applied and environmental microbiology*, 72(1), 793-801.
- Sebastián, V., García-Miralles, M., & Ugarte, R. (2021). *Microbioma intestinal y salud*. Editorial Elsevier.
- Seed, A., & Collado, J. (2014). The role of the intestinal microbiome in the development and management of food allergy. *Frontiers in Microbiology*, 5, 349.
- Seguinot, P., Ortiz-Julien, A., & Camarasa, C. (2020). Impact of nutrient availability on the fermentation and production of aroma compounds under sequential inoculation with *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae*. *Frontiers in microbiology*, 11, 305.
- Seleem, D., Benso, B., Noguti, J., Pardi, V., & Murata, R. M. (2016). In vitro and in vivo antifungal activity of lichochalcone-A against *Candida albicans* biofilms. *PLoS One*, 11(6), e0157188.
- Sgouros, G., Chalvantzi, I., Mallouchos, A., Paraskevopoulos, Y., Banilas, G., & Nisiotou, A. (2018). Biodiversity and enological potential of non-Saccharomyces yeasts from Nemean vineyards. *Fermentation*, 4(2), 32.
- Sgouros, G., Mallouchos, A., Filippousi, M. E., Banilas, G., & Nisiotou, A. (2020). Molecular characterization and enological potential of a high lactic acid-producing *Lachancea thermotolerans* vineyard strain. *Foods*, 9(5), 595

- Shiferaw Terefe, N., & Augustin, M. A. (2020). Fermentation for tailoring the technological and health related functionality of food products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(17), 2887-2913.
- Shiferaw Terefe, N., & Augustin, M. A. (2020). Fermentation for tailoring the technological and health related functionality of food products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(17), 2887-2913.
- Shruthi, B., Deepa, N., Somashekaraiah, R., Adithi, G., Divyashree, S., & Sreenivasa, M. Y. (2022). Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review. *Biotechnology Reports*, 34, e00716.
- Siesto, G., Corbo, M. R., Pietrafesa, R., Sinigaglia, M., Romano, P., & Bevilacqua, A. (2022). Screening of *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* Wine Yeasts for Their Decarboxylase Activity of Amino Acids. *Foods*, 11(22), 3587.
- Silva Ferreira, A. C., Monforte, A. R., Teixeira, C. S., Martins, R., Fairbairn, S., & Bauer, F. F. (2014). Monitoring alcoholic fermentation: an untargeted approach. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(28), 6784-6793.
- Silva, T., Reto, M., Sol, M., Peito, A., Peres, C. M., Peres, C., & Malcata, F. X. (2011). Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behavior. *LWT-Food Science and Technology*, 44(6), 1349-1354.
- Simões, L. A., Cristina de Souza, A., Ferreira, I., Melo, D. S., Lopes, L. A. A., Magnani, M., ... & Dias, D. R. (2021). Probiotic properties of yeasts isolated from Brazilian fermented table olives. *Journal of Applied Microbiology*, 131(4), 1983-1997.
- Sirén, K., Mak, S. S. T., Fischer, U., Hansen, L. H., & Gilbert, M. T. P. (2019). Multi-omics and potential applications in wine production. *Current opinion in biotechnology*, 56, 172-178.
- Sitios web:
- Sommer, F., Anderson, J. M., Bharti, R., Raes, J., & Rosenstiel, P. (2017). The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 15(10), 630-638.
- Speranza, B., Campaniello, D., Petruzzì, L., Sinigaglia, M., Corbo, M. R., & Bevilacqua, A. (2019). Preliminary characterization of yeasts from Bombino Bianco, a grape variety of Apulian Region, and selection of an isolate as a potential starter. *Fermentation*, 5(4), 102.
- Staniszewski, A., & Kordowska-Wiater, M. (2021). Probiotic and potentially probiotic yeasts—Characteristics and food application. *Foods*, 10(6), 1306.
- Staniszewski, A., & Kordowska-Wiater, M. (2023). Probiotic yeasts and how to find them—polish wines of spontaneous fermentation as source for potentially probiotic yeasts. *Foods*, 12(18), 3392.
- Staniszewski, A., & Kordowska-Wiater, M. (2023). Probiotic Yeasts and How to Find Them—Polish Wines of Spontaneous Fermentation as Source for Potentially Probiotic Yeasts. *Foods*, 12(18), 3392.
- Stribny, J., Gamero, A., Pérez-Torrado, R., & Querol, A. (2015). *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* differ from *Saccharomyces cerevisiae* during the production of aroma-active higher alcohols and acetate esters using their amino acidic precursors. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 41-46.

- Suhr MJ, Hallen-Adams HE. (2015). The human gut mycobiome: pitfalls and potentials – a mycologist's perspective. *Mycologia* ; 107:1057-73
- Sundh I, Melin P. Seguridad y regulación de las levaduras utilizadas para el biocontrol o la bioconservación en la cadena alimentaria o alimentaria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. (2011) 99:113–9. doi: 10.1007/s10482-010-9528-z
- Syal, P., & Vohra, A. (2013). Probiotic potential of yeasts isolated from traditional Indian fermented foods. *International Journal of Microbiology Research*, 5(2), 390.
- Sybesma, W., Kort, R., & Lee, Y. K. (2015). Locally sourced probiotics, the next opportunity for developing countries?. *Trends in Biotechnology*, 33(4), 197-200.
- Szajewska, H., & Kołodziej, M. (2015). Systematic review with meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 42(7), 793-801.
- Szajewska, H., Horvath, A., & Piwowarczyk, A. (2010). Meta-analysis: the effects of *Saccharomyces boulardii* supplementation on *Helicobacter pylori* eradication rates and side effects during treatment. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 32(9), 1069-1079.
- Tamang, J. P., & Lama, S. (2022). Probiotic properties of yeasts in traditional fermented foods and beverages. *Journal of Applied Microbiology*, 132(5), 3533-3542.
- Tofalo, R., Schirone, M., Perpetuini, G., Suzzi, G., & Corsetti, A. (2012). Development and application of a real-time PCR-based assay to enumerate total yeasts and *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii* and *Pichia kluyveri* in fermented table olives. *Food Control*, 23(2), 356-362.
- Tomusiak-Plebanek, A., Heczko, P., Skowron, B., Baranowska, A., Okoń, K., Thor, P. J., & Strus, M. (2018). Lactobacilli with superoxide dismutase-like or catalase activity are more effective in alleviating inflammation in an inflammatory bowel disease mouse model. *Drug design, development and therapy*, 3221-3233.
- Torija, M. J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2003). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International journal of food microbiology*, 80(1), 47-53.
- Tsang, C. S. P., Chu, F. C. S., Leung, W. K., Jin, L. J., Samaranayake, L. P., & Siu, S. C. (2007). Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of medical microbiology*, 56(10), 1393-1398.
- Turk, M., Abramović, Z., Plemenitaš, A., & Gunde-Cimerman, N. (2007). Salt stress and plasma-membrane fluidity in selected extremophilic yeasts and yeast-like fungi. *FEMS Yeast Research*, 7(4), 550-557.
- Underhill, D. M., & Iliev, I. D. (2012). The intestinal microbiome and the regulation of mucosal immune responses. *Current Opinion in Immunology*, 24(4), 342-345.
- Urdaneta, V., & Casadesús, J. (2017). Interactions between bacteria and bile salts in the gastrointestinal and hepatobiliary tracts. *Frontiers in medicine*, 4, 163.
- Valera, M. J., Morcillo-Parra, M. Á., Zagórska, I., Mas, A., Beltran, G., & Torija, M. J. (2019). Effects of melatonin and tryptophol addition on fermentations carried out by

- Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast species under different nitrogen conditions. *International journal of food microbiology*, 289, 174-181.
- Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. (2008). Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. *Food chemistry*, 107(1), 221-230.
 - Veisseire, P., Bonnet, M., Saraoui, T., Poupet, C., Camarès, O., Gachinat, M., ... & Bornes, S. (2020). Investigation into in vitro and in vivo *Caenorhabditis elegans* models to select cheese yeasts as probiotic candidates for their preventive effects against *Salmonella Typhimurium*. *Microorganisms*, 8(6), 922.
 - Ventura M, O'flaherty S, Claesson MJ, Turrone F, Klaenhammer TR, Van Sinderen D, *et al.*, Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics. *Nat Rev Microbiol.* (2009) 7:61–71. doi: 10.1038/nrmicro2047
 - Vera-Santander, VE, Hernández-Figueroa, RH, Jiménez-Munguía, MT, Mani-López, E., & López-Malo, A. (2023). Beneficios para la salud del consumo de alimentos con probióticos bacterianos, posbióticos y sus metabolitos: una revisión. *Moléculas*, 28 (3), 1230.
 - Vergara, S. C., Aleiva, M. J., Mestre, M. V., Vazquez, F., Agresti, P. M., Nally, M. C., & Maturano, Y. P. (2023a). Bioprospecting of the probiotic potential of yeasts isolated from a wine environment. *Fungal Genetics and Biology*, 164, 103767.
 - Vergara, S. C., Leiva, M. J., Mestre, M. V., Vazquez, F., Nally, M. C., & Maturano, Y. P. (2023b). Non-saccharomyces yeast probiotics: revealing relevance and potential. *FEMS Yeast Research*, 23, foad041.
 - Vilela, A., Cosme, F., & Inês, A. (2020). Wine and non-dairy fermented beverages: A novel source of pro-and prebiotics. *Fermentation*, 6(4), 113.
 - Wang, B., Daszkiewicz, T., & Piotrowski, M. (2016). Contribution of the gut microbiome to the development of allergies and asthma. *Frontiers in Immunology*, 7, 192.
 - Wang, C., Mas, A., & Esteve-Zarzoso, B. (2015). Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 67-74.
 - Wang, G., Zhang, M., Zhao, J., Xia, Y., Lai, P. F. H., & Ai, L. (2018). A surface protein from *Lactobacillus plantarum* increases the adhesion of *Lactobacillus* strains to human epithelial cells. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2858.
 - Wang, R., Sun, J., Lassabliere, B., Yu, B., & Liu, S. Q. (2022). UPLC-Q-TOF-MS based metabolomics and chemometric analyses for green tea fermented with *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 and *Lactiplantibacillus plantarum* 299V. *Current Research in Food Science*, 5, 471-478.
 - Wibawa, T., Praseno, & Aman, A. T. (2015). Virulence of *Candida albicans* isolated from HIV infected and non infected individuals. *Springerplus*, 4, 1-10.
 - Willaert, R. G. (2018). Adhesins of yeasts: protein structure and interactions. *Journal of Fungi*, 4(4), 119.

- Wu, Z., Mehrabi Nasab, E., Arora, P., & Athari, S. S. (2022). Study effect of probiotics and prebiotics on treatment of OVA-LPS-induced of allergic asthma inflammation and pneumonia by regulating the TLR4/NF-kB signaling pathway. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 130.
- Zara, G., Budroni, M., Mannazzu, I., Fancello, F., & Zara, S. (2020). Yeast biofilm in food realms: occurrence and control. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36, 1-10.
- Zendeboodi, F., Gholian, M. M., Khanniri, E., Sohrabvandi, S., & Mortazavian, A. M. (2021). Beer as a vehicle for probiotics. *Applied Food Biotechnology*, 8(4), 329-337.
- Zhang, F., Aschenbrenner, D., Yoo, J. Y., & Zuo, T. (2022). The gut mycobiome in health, disease, and clinical applications in association with the gut bacterial microbiome assembly. *The Lancet Microbe*, 3(12), e969-e983.
- Zhao, L., Wang, Y., Dhanasekaran, S., Guo, Z., Chen, S., Zhang, X., & Zhang, H. (2021). Efficacy of *Wickerhamomyces anomalus* yeast in the biocontrol of blue mold decay in apples and investigation of the mechanisms involved. *BioControl*, 66(4), 547-558.
- Zilelidou, E. A., & Nisiotou, A. (2021). Understanding wine through yeast interactions. *Microorganisms*, 9(8), 1620.
- Zilelidou, E. A., & Nisiotou, A. (2021). Understanding wine through yeast interactions. *Microorganisms*, 9(8), 1620.
- Zommiti, M., Feuilloley, M. G., & Connil, N. (2020). Update of probiotics in human world: a nonstop source of benefactions till the end of time. *Microorganisms*, 8(12), 1907.

ANEXO

Tabla 1: Porcentajes de supervivencia de fase gástrica (G) y fase duodenal (D) simulada, respecto a lo al conteo inicial de cada fase en dos puntos de medición (T1) y (T2)

Nomenclatura	G inicial	G (T1)	G(T2)	D inicial	D (T1)	D (T2)
PB 15	9,12E+07	91,44	94,57	3,82E+07	87,09	83,83
PB 48	6,48E+07	93,55	93,49	3,10E+07	89,94	83,72
PB 50	3,35E+08	87,23	94,95	2,79E+07	86,68	79,67
PB 51	3,30E+07	99,74	96,33	8,50E+06	83,47	77,87
PB 52	2,94E+07	93,33	95,14	2,68E+07	88,79	83,73
PB 53	7,44E+07	98,00	93,47	6,54E+07	94,13	92,42
PB 100	8,22E+07	98,52	96,90	1,92E+07	81,00	83,23
PB 54	6,51E+07	91,29	92,01	4,68E+07	99,55	99,24
PB 56	4,53E+08	95,54	92,01	7,82E+07	97,84	94,52
PB 57	2,15E+08	98,78	92,01	8,21E+07	97,23	91,17
PB 58	2,91E+07	95,34	92,01	1,21E+07	95,94	87,27
PB 101	5,70E+07	99,55	92,24	1,43E+07	93,56	87,13
PB 97	8,94E+07	98,10	92,11	4,62E+07	90,82	84,70
PB 98	6,48E+07	98,00	99,26	2,88E+07	75,06	83,60
PB 99	7,44E+07	99,42	92,22	8,70E+06	93,14	84,01
PB 101	5,70E+07	99,55	92,24	1,43E+07	93,56	87,13

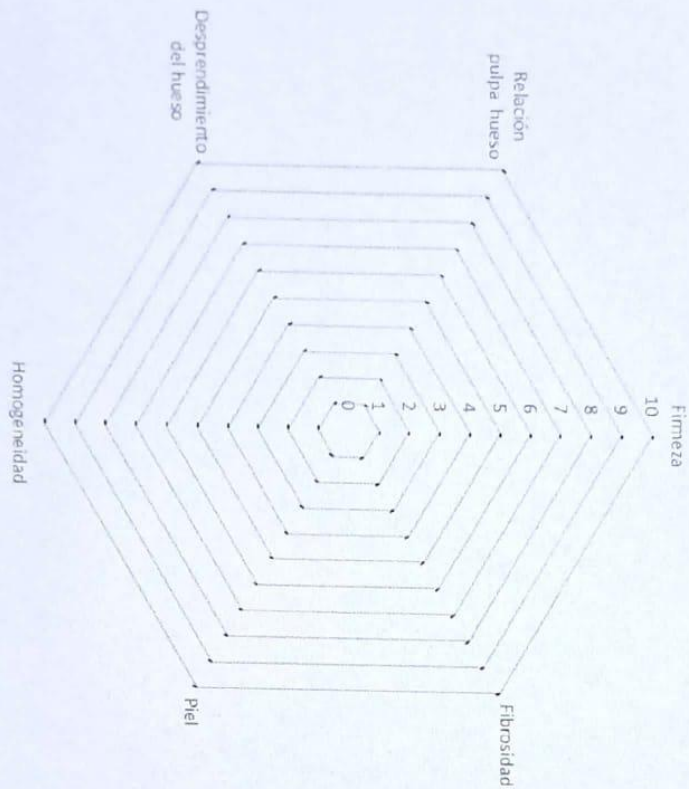
b) Olor/Sabor

Fecha:	Descripción:
.....	

The radar chart displays the sensory attributes of six different cheese types. The attributes are measured on a scale from 0 to 10. The attributes are: Aceituna (Oily), Acido (Acidic), Salado (Salty), Amargo (Bitter), Pasteurizado (Pasteurized), and Alterado (Altered). The data series are: Queso de Panela (solid line), Queso de Panela con Sal (dashed line), Queso de Panela con Aceite (dotted line), Queso de Panela con Hierba (dash-dot line), Queso de Panela con Miel (long-dashed line), and Queso de Panela con Chocolate (short-dashed line).

Attribute	Queso de Panela	Queso de Panela con Sal	Queso de Panela con Aceite	Queso de Panela con Hierba	Queso de Panela con Miel	Queso de Panela con Chocolate
Aceituna	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Acido	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Salado	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Amargo	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Pasteurizado	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Alterado	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

d) Valoración Global:



DEFECTOS	CARACTERÍSTICAS	VALORACION GLOBAL: PUNTOS
Ninguno	Típica aceituna aderezada con tratamiento de prebióticos fina Típica aceituna aderezada con tratamiento de prebióticos de buena calidad	9 Optima 8 Muy buena 7 Bastante buena
Leve casi imperceptible	Algún defecto externo Olores y sabores apagados Textura aceptable	6 Buena 5 Regular
Perceptibles	Aspecto externo algo defectuoso Olores y sabores anómalos Textura algo defectuosa	4 Mediocre
Notables	Defectos externos claros Olores y sabores desagradables Textura defectuosa	3 Mala
Grandes y/o claramente perceptibles	Defectos extremos inadmisibles Olores y sabores de alteración Textura inadmisibles	2 Muy mala 1 Pésima

192



Figura 3: cata de cerveza elaborada con asilamiento PB 101. Instalaciones de la cervecería artesanal Ancestral, San Juan Argentina.



Figura 4: cata de cerveza elaborada con asilamiento PB 101



Figura 5: tratamientos de aceitunas de mesa al inicio (A) de la fermentación y al final (B).



Figura 6: Panel entrenado de la Asociación Sanjuanina de Sommeliers, participando de la cata de aceituna de mesa elaborada con microorganismos potencialmente probióticos.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

A continuación, se listan los trabajos que se publicaron relacionados a este trabajo de

Tesis.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

- ✓ Vergara, S. C., Leiva, M. J., Mestre, M. V., Vazquez, F., Nally, M. C., & Maturano, Y. P. (2023). Non-saccharomyces yeast probiotics: revealing relevance and potential. FEMS Yeast Research, 23, foal041.
- ✓ Alvarez, S. C. V., Alaniz, M. J. L., Furlani, M. V. M., Vazquez, F., Agresti, P. M., Nally, M. C., & Maturano, Y. P. (2023). Bioprospecting of the probiotic potential of yeasts isolated from a wine environment. Fungal Genetics and Biology, 164, 103767.