Alimentos fermentados:
microbiología, nutrición, salud y cultura

Editores:
Alejandro Ferrari
Gabriel Vinderola
Ricardo Weill

ASOCIACIÓN CIVIL DANONE PARA LA NUTRICIÓN, LA SALUD Y LA CALIDAD DE VIDA
MIEMBRO DE LA RED:
INSTITUTO DANONE
INTERNACIONAL
REGIÓN CONO SUR
CONO SUR

Alimentos fermentados

MICROBIOLOGÍA, NUTRICIÓN, SALUD Y CULTURA

Tapa y contratapa: Victoria Weill

Diseño de interiores: Blaunt

Edición general: Alejandro Ferrari

Ferrari, Alejandro
Alimentos fermentados : microbiología, nutrición, salud y cultura / Alejandro Ferrari ; Gabriel Vinderola ; Ricardo Weill. - 1a ed . - Ciudad Autónoma de Buenos Aires : Instituto Danone del Cono Sur, 2020.
Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga
ISBN 978-987-25312-2-5

1. Microorganismo. 2. Salud. 3. Alimentación. I. Vinderola, Gabriel. II. Weill, Ricardo. III. Título.
CDD 664.001579

Quedan rigurosamente prohibidas, sin la autorización escrita de los titulares del copyright, bajo las sanciones establecidas en las leyes, la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático, y la distribución de ejemplares de ella mediante alquiler o préstamo públicos.

1ª edición, Asociación Civil Danone para la Nutrición, la Salud y la Calidad de Vida, 2020.

© de todas las ediciones
Asociación Civil Danone para la Nutrición,
la Salud y la Calidad de Vida
Moreno 877 - Piso 13 - C.A.B.A.
secretaria@institutodanoneconosur.org

Queda hecho el depósito que previene la Ley 11.723
Impreso en Argentina – Printed in Argentina

Alimentos fermentados

microbiología, nutrición, salud y cultura

Danone Cono Sur // 2020

Editores:
Alejandro Ferrari
Gabriel Vinderola
Ricardo Weill

ASOCIACIÓN CIVIL DANONE PARA LA NUTRICIÓN, LA SALUD Y LA CALIDAD DE VIDA
MIEMBRO DE LA RED:
INSTITUTO DANONE
INTERNACIONAL
REGIÓN CONO SUR
CONO SUR

Índice

Prólogo 17

• Capítulo 1

La fermentación: una mirada antropológica 19

I. Introducción 21

II. Principales hitos históricos 22

II.A. Los grandes simios: el agrado por el etanol 24

II.B. Los hombres prehistóricos y las bebidas alcohólicas fermentadas: cerveza y ritual 25

III. Bebidas y alimentos fermentados en Mesoamérica y América del Sur: diversidad de productos 26

III.A. El pulque y el pozol: nutrición con y sin alcohol 27

III.B. El cacao y el chocolate: sabor, energía y ritual 28

III.C. La leche y los productos lácteos fermentados: sin presencia en la América del Sur prehispánica 29

IV. Bebidas y alimentos fermentados en el Cercano Oriente 30

IV.A. La cerveza y el pan, básicos y sagrados 30

IV.B. El vino; lo permitido y lo prohibido 31

IV.C. Las bebidas fermentadas lácteas. Preservación y beneficios para la salud 32

V. Pescados fermentados en el Ártico y Escandinavia; quesos de cabra en América del Sur. Importancia de lo social 34

VI. Algunas invariantes 35

VII. La revolución industrial: pérdidas y ganancias. Louis Pasteur. 36

VIII. Los últimos 100 años 38

IX. Conclusiones 39

X. Declaración de posibles conflictos de interés 39

XI. Bibliografía citada 40

• **Capítulo 2**

Variedad de alimentos fermentados en Japón y otros países del este asiático, y los microorganismos involucrados en su fermentación 43

I. Introducción 45

II. Bebidas alcohólicas 45

II.A. Sake 45

II.B. Shochu 48

II.C. Awamori 49

II.D. Bebidas alcohólicas de China y Corea del Sur 49

III. Condimientos fermentados 50

III.A. Miso (pasta de porotos de soja) 50

III.B. Shoyu (salsa de soja) 50

III.C. Kurozu (kurosu) 51

III.D. Condimentos fermentados en China y Corea del Sur 52

IV. Vegetales fermentados 52

IV.A. Vegetales fermentados únicos de Japón 52

IV.B. Vegetales fermentados de China y Corea del Sur 54

V. Otros 54

VI. Conclusiones 56

VII. Declaración de posibles conflictos de interés 56

VIII. Bibliografía citada 56

• Capítulo 3

Introducción a la microbiota intestinal: su rol en la salud y la enfermedad 61

I. Introducción 63

II. La microbiota intestinal, un órgano único 63

III. Composición y distribución 65

IV. Conformación y evolución de la microbiota intestinal 68

V. Funciones de la microbiota intestinal 74

V.A. Funciones inmunológicas 74

V.B. Funciones estructurales 76

V.C. Funciones nutricionales 78

V.D. Funciones metabólicas. 79

VI. La microbiota intestinal en la salud y en la enfermedad 81

VII. Enfermedad y microbiota intestinal 82

VII.A. Intrusos microbianos en el tracto gastro-intestinal (TGI) 82

VII.B. Alteraciones del TGI 83

VIII. ¿Cómo lograr una MBT sana? 88

IX. Conclusiones 89

X. Declaración de posibles conflictos de interés 89

XI. Bibliografía citada 89

• Capítulo 4

Consumo de leches fermentadas probióticas y su impacto sobre el sistema inmune 97

I. Introducción 99

II. Organización del sistema inmune de mucosa intestinal 99

II.A. Inducción de la respuesta inmune en el intestino 101

III. Probióticos y salud 102

III.A. Probióticos en la modulación del sistema inmune intestinal 103

III.B. Probióticos y sus efectos sobre células del timo 107

IV. Declaración de posibles conflictos de interés 108

V. Bibliografía citada 108

• **Capítulo 5**

Leches fermentadas, yogures y probióticos 117

I. Una introducción a la transformación de la leche en yogur 119

II. ¿Cómo empezó el hombre a consumir leches fermentadas y yogures? 119

III. El recorrido del yogur desde la antigüedad hasta nuestros días 120

IV. Probióticos: de Argentina al mundo 121

V. Leches fermentadas y yogures con probióticos 122

VI. Recuento de células viables de probióticos en yogures 124

VII. El yogur y su potencial relevancia en las guías alimentarias. 125

VIII. Concepciones popularizadas entorno al yogur: antibióticos, cadena de frío y riesgo de Síndrome Urémico Hemolítico 127

IX. Conclusiones 130

X. Declaración de posibles conflictos de interés 130

XI. bibliografía citada 131

• **Capítulo 6**

El kefir y los alimentos fermentados artesanales 135

I. Introducción 137

II. El kefir 137

III. Efectos beneficiosos sobre la salud atribuidos al kefir 142

IV. Kefir de agua 145

V. Kombucha 149

VI. Conclusiones 152

VII. Declaración de posibles conflictos de interés 153

VIII. Bibliografía citada 153

• **Capítulo 7**

Embutidos fermentados cárnicos: contribución de bacterias lácticas en la calidad global 165

I. Introducción 167

II. Embutidos fermentados y curados 168

III. Función de los aditivos en la elaboración de embutidos fermentados 169

IV. Tipos de embutidos fermentados 169

V. Maduración de embutidos fermentados; importancia de la proteólisis cárnica 170

VI. Microbiota de los embutidos fermentado-curados 171

VI.A. Bacterias lácticas en embutidos fermentados espontáneamente 172

VI.B. Cocos Gram positivos, catalasa positivos, en embutidos fermentados espontáneamente 173

VII. Cultivos iniciadores para productos cárnicos 174

VII.A. Propiedades de los cultivos iniciadores 174

VII.B. Cultivos iniciadores autóctonos 175

VII.B.1. *Lactobacillus curvatus* CRL705, una cepa autóctona argentina 176

VIII. Carnes fermentadas en América Latina 177

IX. Situación del sector productor de embutidos en Argentina 177

X. Tendencias de consumo de embutidos fermentados 178

XI. Parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y organolépticos como descriptores de calidad en embutidos fermentados argentinos 179

XII. Evolución de la proteólisis durante la fermentación y maduración de embutidos fermentados argentinos 181

XIII. Contribución de un cultivo iniciador autóctono a la proteólisis cárnica, estudios *in vitro* 182

XIV. Rol del cultivo iniciador autóctono en la calidad de embutidos fermentados elaborados en planta piloto 186
XV. Conclusiones 187
XVI. Declaración de posibles conflictos de interés 188
XVII. Bibliografía citada 188

• **Capítulo 8**

Fermentación láctica de cereales y granos ancestrales andinos 195

I. Introducción 197
II. Cereales 198
III. Pseudocereales 200
IV. Fermentación 201
IV.A. Fermentación de cereales y pseudocereales 202
IV.A.1. Masa madre 202
V. Alimentos fermentados derivados de cereales 209
V.A. Panificados 209
V.B. Pastas 210
V.C. Alimentos y bebidas africanos tradicionales derivados de cereales fermentados 212
V.D. Alimentos y bebidas latinoamericanos tradicionales derivados de cereales fermentados 216
VI. Conclusiones 218
VII. Declaración de posibles conflictos de interés 218
VIII. Bibliografía citada 218

• **Capítulo 9**

Hortalizas y legumbres fermentadas 231

I. Introducción 233
II. El laberinto metabólico de la fermentación de vegetales 234

III. El arte o la ciencia de fermentar vegetales 239
III.A. Fermentación espontánea 240
III.B. Fermentación controlada 242
IV. Modalidades de fermentación de los vegetales 245
IV.A. Fermentación sumergida (FSm)/ Fermentación Líquida (FL) 245
IV.A.1. Salado en seco 246
IV.A.2. Salado en salmuera 246
IV.A.3. Vegetales fermentados no salados 247
IV.B. Fermentación en Sustrato Sólido (FSS) 247
V. Las estrellas del mercado: vegetales fermentados tradicionales y emergentes 249
V.A. Pepinos chicos o pepinillos 250
V.B. Chucrut 250
V.C. Aceitunas 251
V.D. Salsa de soja 252
V.E. Kimchi 253
V.F. Silos para consumo animal 254
V.G. Legumbres fermentadas 256
V.H. Vegetales fermentados de América Latina 258
VI. Conclusión 258
VII. Declaración de posibles conflictos de interés 259
VIII. Bibliografía citada 259

• **Capítulo 10**

Fermentación de jugos y bebidas a base de frutas 273

I. Las frutas como alimento y sus efectos benéficos para la salud 275
II. Desafíos a superar para incrementar el consumo de frutas 278
III. Fermentación láctica de frutas como alternativa de preservación y de valor agregado 279

IV. Compuestos fenólicos en frutas 281

IV.A. Metabolismo de los CF por BAL 282

IV.B. Metabolismo de ácidos fenólicos: una ventaja energética 284

V. Formación de compuestos de aroma en jugos de frutas fermentadas 285

VI. Bacterias probióticas en jugos de fruta 287

VII. Alimentos fermentados artesanales y comerciales a base de frutas 290

VII.A. Vino: la bebida alcohólica fermentada a base de jugo de uva mundialmente aceptada 292

VII.A.1. Producción de vino en Argentina 292

VII.A.2. Composición del mosto de uva y vino 293

VII.A.3. Tipos de fermentaciones que ocurren durante la vinificación 294

VII.A.4. Importancia de las BAL en la producción del vino 294

VII.A.5. Estrategias de inoculación: fermentación secuencial vs. simultánea 295

VIII. Conclusiones y perspectivas 295

IX. Declaración de posibles conflictos de interés 296

X. Bibliografía 296

• **Capítulo 11**

Levaduras en cerveza y panificados, aportes desde la Patagonia Argentina 307

I. Breve historia de la cerveza y el pan 309

I.A. Producción de cerveza 309

I.B. Producción de pan 312

II. Levaduras asociadas a pan y cerveza 313

II.A. Levaduras de la cerveza 313

II.A.1. Levaduras *ale* *313*

II.A.2 Levaduras *lager* *314*

II.B. Levaduras del pan 315

III. El caso del híbrido *lager* y sus orígenes patagónicos 316

IV. Alimentos fermentados con *S. eubayanus*: el desafío de la vinculación público-privada 317

V. Declaración de posibles conflictos de interés 319

VI. Bibliografía citada 320

• **Capítulo 12**

El Papel de los Alimentos Fermentados en la Alimentación 323

I. Introducción 325

II. La fermentación de los alimentos: cultura, gastronomía y ciencia 326

III. Beneficios nutricionales de los alimentos fermentados 328

III.A. Leches fermentadas y productos lácteos fermentados 330

III.B. Cereales fermentados 331

III.C. Legumbres fermentadas 332

IV. Alimentos fermentados más allá de sus beneficios nutricionales 333

V. Conclusiones y recomendaciones 334

VI. Agradecimientos 335

VII. Declaración de posibles conflictos de interés 335

VIII. Bibliografía citada 335

• **Capítulo 13**

Rol del ácido láctico en los efectos benéficos de los alimentos fermentados 341

I. Introducción 343

II. Rol del lactato sobre células inmunes 345

III. Efecto del lactato sobre la biología epitelial 347

IV. Mecanismos de acción del lactato 349

IV.A. Modificación del metabolismo celular 349

IV.B. El lactato como molécula de señalización: rol del GPR81 351
IV.C. El lactato como modificador de la expresión génica y su participación en procesos de reparación del ADN 352
V. Conclusiones 354
VI. Declaración de posibles conflictos de interés 354
VII. Bibliografia 354

• **Capítulo 14**

Seguridad microbiológica de los alimentos fermentados 359

I. Introducción y conceptos generales 361
II. Seguridad microbiológica de los alimentos fermentados 365
III. Sugerencias para elaborar alimentos fermentados seguros 367
III.A. Utilizar agua y materias primas seguras 367
III.B. Mantener la limpieza 368
III.B.1. Lavar y desinfectar las materias primas que se utilizarán 369
III.B.2. Trabajar sobre superficies limpias 370
III.B.3. Proteger los alimentos y las áreas de elaboración de las plagas, mascotas y otros animales 370
III.C. Separar alimentos crudos y cocidos 371
III.D. Tratar térmicamente los alimentos que así lo requieran 371
III.E. Mantener los alimentos a temperaturas seguras 372
III.F. Utilizar materiales de grado alimenticio 372
III.G. Utilizar cultivos iniciadores adecuados 373
III.H. Adicionar una concentración salina adecuada 374
III.I. Controlar tiempos, temperaturas y condiciones de fermentación 374
III.J. Rotular los alimentos fermentados elaborados 375
IV. Declaración de posibles conflictos de interés 377
V. Bibliografía citada 377

• Capítulo 15

Alimentos fermentados y enfermedades crónicas no transmisibles: una revisión narrativa de la literatura 381

I. Introducción 383

II. Alimentos fermentados en el manejo y enfermedades inmunológicas 385

III. Alimentos fermentados, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2 385

IV. Alimentos fermentados e hipertensión arterial 386

V. Alimentos fermentados y exceso de peso 387

VI. Aproximación al impacto económico potencial de la promoción del consumo de ciertos alimentos fermentados sobre los sistemas de salud públicos y privados 388

VII. Declaración de posibles conflictos de interés 389

VIII. Bibliografía citada 389

• Capítulo 16

La Fermentación y la Gastronomía
Un cocinero entre los científicos, un científico entre los cocineros 395

I. Martín Russo por Martín Russo 397

I.A. El camino a la cocina 397

I.B. Orden y disciplina: Mugaritz 399

I.C. La Partida de Fermentos 401

II. Los alimentos fermentados, aquí y ahora 401

II.A. ¿Qué implica fermentar alimentos? 401

II.B. ¿Qué alimentos fermentados se consumen en la Argentina, y en la región? 402

II.C. En busca de la vanguardia de la fermentación 404

II.D. La estandarización como meta 406

III. Las fronteras: investigación y futuro de la fermentación gastronómica 407

IV. Declaración de posibles conflictos de interés 407

V. Bibliografía citada 408

Prólogo

Volver a las fuentes…

Los alimentos fermentados se consumen desde la antigüedad y si hoy están aún vigentes, algo importante existirá atrás de los mismos o…."en" los mismos. Que algunos alimentos sean obtenidos por actividad microbiana podría mal interpretarse. Sin embargo, en lo "raro" está el milagro y este milagro se refiere nada más ni nada menos a la mejora de nuestra salud… alimentándonos. Leche, carnes, vegetales, cereales, hortalizas, frutas, harinas, son las matrices alimentarias capaces de ser fermentadas y transformadas en alimentos saludables. Todo estaba claro desde el inicio y, sin embargo, hoy algunos ignoran su valor. ¿Falta de difusión del conocimiento? Quizás. Imposible no reconocer el rol y el valor de algunas bacterias, levaduras y mohos en la generación de los alimentos fermentados. Un motivo más para amigarnos con organismos invisibles pero con una capacidad de transformación formidable. Esta obra opera posicionándolos claramente por si quedan dudas. Si los antiguos lo tenían en claro, ¿por qué no imitarlos? La ventaja que hoy tenemos es el conocimiento acerca de porqué y como estos microorganismos hacen lo que hacen. El efecto fue, es y será el mismo a lo largo de la historia. Este libro revisa las capacidades microbianas y sus efectos en nuestra alimentación. La elección de nuestros alimentos es protagonista en nuestra salud. Desconocerlo, es casi imperdonable. El que los investigadores autores de este libro hayan elegido a los alimentos fermentados como objeto de estudio es una elección formidable. Sus conocimientos generados contribuyen a dejar en claro que nuestra salud depende también de los microorganismos. Casi increíble pensar que algunos de ellos nos ayudan a estar mejor, ¿no? Solo resta felicitar a quienes se motivaron para generar este libro. Ahora solo queda valorarlo… y disfrutarlo.

Jorge Reinheimer
Dr. en Química, Investigador Superior de CONICET, Profesor Titular (Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral), Ex Director del Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET), Miembro de la Academia de Ciencias Médicas de la Pcia. de Santa Fe, Premio Asociación Argentina de Microbiología (AAM) 2019 en reconocimiento a la trayectoria profesional y aportes a la comunidad científica.

1

La fermentación: una mirada antropológica

Patricia Schneier
patschneier@gmail.com

- *Antropóloga. UBA - Investigadora independiente*
- *Consultora del Complejo Museístico Perito Moreno. Santa Cruz. Argentina*

Resumen

Los alimentos y bebidas fermentados están en la base misma de la alimentación. Pueden provenir de materias primas tan diversas como la fruta, los cereales, la leche, la carne, los pescados, vegetales y tubérculos, dando lugar a una enorme variedad de productos que van desde bebidas alcohólicas como chichas, vinos y cervezas, bebidas no alcohólicas –como las leches fermentadas– y alimentos sólidos como los quesos, chacinados, pescados, "pickles", condimentos, papillas y panes de todo tipo.

Tomando como base la definición de fermentación, que asume que "*es el proceso microbiológico que consiste en la conversión de carbohidratos en alcoholes, utilizando dióxido de carbono o ácidos orgánicos, bacterias y levaduras o una combinación de éstos, en condiciones anaeróbicas*", una visión antropológica de la misma nos invita a adoptar diferentes perspectivas, que van desde la cultura material a la organización social, hasta llegar hasta al mundo simbólico que la fermentación tiene asociado.

Mediante la exposición de diferentes casos emblemáticos provenientes de regiones y temporalidades diversas, nuestro propósito es mostrar la gran variedad de productos y técnicas de elaboración, generados por los ecosistemas y la historia. También nos interesa mostrar algunas invariantes de las funciones de los productos fermentados en la vida de las personas. Cada una de estas funciones tuvo y tiene un diferente destaque según el tipo de producto, la época y el lugar de referencia.

Con esta mirada de diversidades e invariantes, nuestra misión es contribuir a una mejor comprensión de los procesos de fermentación, traerlos al presente para entender mejor sus desafíos a la hora actual y poder actuar sobre algunos de ellos.

I. Introducción

La fermentación tiene cuatro funciones principales, que contribuyen en al proceso de alimentación de las sociedades:

- Enriquecimiento de la dieta humana a través del desarrollo de una gran diversidad de sabores, aromas y texturas en los alimentos, así como de los conocimientos relacionados con la fermentación.

- Preservación de cantidades substanciales de comida a través del ácido láctico, acético, alcohol o de la sal, suprimiendo el crecimiento de microorganismos indeseables. Así, los productos fermentados pueden ser guardados y conservados para su consumo diferido, permitiendo paliar la escasez alimentaria en épocas y lugares donde no se haya conocido la esterilización ni la pasteurización.

- Mejoramiento nutricional de los sustratos de la alimentación, incrementando vitaminas, digestibilidad de proteínas, disponibilidad de aminoácidos esenciales y ácidos grasos, así como reducción de antinutrientes (en cereales) y aumento de la digestibilidad de la materia prima base (función de los lácteos fermentados).

- Disminución de la energía necesaria para la cocción de alimentos y de los requerimientos de combustible.

Estas 4 funciones se encuentran todavía vigentes, si bien la de preservación y seguridad alimentaria –que fueron atributos fundamentales en el pasado de la humanidad– tienen menor importancia en la actualidad.

A continuación mencionaremos otras cuatro funciones, más intangibles pero no por eso menos importantes. Existen porque la fermentación, además de producir una transformación físicoquímica en la materia prima, también produce una transformación simbólica en ella: los productos fermentados son nutritivos y apetecibles, a la par que representan o simbolizan algo más.

- Los alimentos y bebidas fermentadas tienen una función social muy marcada, con una fuerte presencia en consumos celebratorios y festivos. Lo complejo de su elaboración y la participación comunitaria en la misma generalmente da lugar a celebraciones al consumirse. También son facilitadores de la convivialidad por sus efectos psicoactivos, función que aún actualmente subsiste y es fácilmente identificable en las bebidas alcohólicas. La chicha en América del Sur y el pulque en Mesoamérica circularon siempre en encuentros y celebraciones. En el Ártico y Escandinavia los

pescados y mamíferos fermentados son consumidos en situaciones festivas o especiales.

- Tanto bebidas como alimentos fermentados son portadores de un gran valor social, por la excelencia de su materia prima, por el saber que implica fermentar, por el trabajo y el tiempo que requiere su elaboración. Es por ello que los productos fermentados son prácticamente mayoría entre los inscriptos como DOC en el Cono Sur (Denominación de Origen Controlada) o AOC (*Appellation d´Origine Controlée*, en francés).

- Las habilidades para fermentar y los productos así obtenidos forman parte del patrimonio cultural de pueblos nativos y campesinos de muchas áreas del mundo y su conocimiento se mantiene y propaga oralmente. Ellos contribuyen a la identidad cultural, al sentido de pertenencia y a la cohesión del grupo familiar y social. La circulación familiar o comunitaria de los "*starters*" o iniciadores (en aquellas fermentaciones que los utilizan) cumple funciones de aseguramiento de la calidad a la vez que refuerza el sentido de pertenencia e identidad de las personas a su espacio y su cultura. Un buen ejemplo es la elaboración de quesos de cabra en la puna argentina.

- Finalmente, una función ritual, sagrada, que a lo largo de la historia han tenido las bebidas fermentadas alcohólicas. Estas facilitan el contacto con los dioses y con los antepasados, ya sea porque los representan simbólicamente, o porque se utilizan como ofrendas, o por los efectos psicoactivos que produce su ingesta. Dentro de este marco, la embriaguez estuvo en el pasado siempre pautada y contenida por reglas y usos rituales. La chicha en Bolivia y en Colombia se ofrecía a los dioses, así como en el norte argentino aún hoy se derrama vino en la tierra para la Pachamama, o la cachaça para los antepasados en Brasil. Algunos alimentos fermentados, como el cacao en Mesoamérica eran usados como ofrenda para dioses y jerarcas.

II. Principales hitos históricos

La existencia de alimentos y bebidas fermentadas puede rastrearse desde la prehistoria de la humanidad [1]. Han acompañado la vida del hombre, con diferentes características según regiones y épocas. Una conología detallada se incluye en la Tabla 1, puntualizando los hitos más importantes.

Tabla 1. Principales desarrollos documentados por fuentes arqueológicas o históricas.

Período	Principales desarrollos documentados por Fuentes Arqueológicas o Históricas
11700 - 9700 a.C.	Cerveza: Los Natufienses (cazadores-recolectores del Medio Oriente) desarrollan una tecnología para elaborar cerveza fermentando cereales silvestres, antes de haber desarrollado la agricultura.
8000 a.C.	Leches fermentadas consumidas en Medio Oriente y en Africa
7000 a.C.- 6600 a.C.	Cerveza (Kiu) hecha con arroz, miel y uvas, es elaborada en Jiahu (neolítico Antigua China)
7000 a.C.	Cerveza y Pan forma parte de la alimentacion básica, entre los antiguos egipcios
7000 a.C.	Queso producido en Iraq, a partir de la domesticación de animales
6000 a.C.	Vino producido en el Cercano Oriente (Irán)
6000 a.C.- 4000 a.C.	Dahi : Leche ácida coagulada se encuentra muy difundida como alimento en India
5000 a.C.- 4000 a.C.	Leche fermentada, manteca y quesos es elaborada por los Sumerios.
4000 a.C.	Levaduras son utilizadas hacer pan y vino, entre los Egipcios
3500 a.C.	Chicha: aparecen los primeros registros su consumo en Mesoamerica y América del Sur. Vino entre los antiguos Asirios y en China; Cerveza en la antigua Armenia
3200 a.C.	Queso es producido en el antiguo Egipto
3000 a.C.	Leches fermentadas escurridas tipo queso en Oriente Medio (Labneh) y en India (Panir)
2000 a.C.- 1200 a.C.	Registro de múltiples tipos de leches fermentadas, consumidas en diferentes regiones de Asia
1750 a.C.	Cerveza fermentada a partir de la cebada, entre los Sumerios
1500 a.C.	Salchichas de carne elaboradas entre los antiguos Babilonios
1500 a.C.- 500 a.C.	Chocolate hecho a partir de bayas de cacao fermentadas, entre los Olmecas (antiguo México)
1000 a.C.	Desarrollo de la viticultura y vinificación en Europa
800 a.C.	Primer registro de la denominacion y consumo de 'Yogur', en el antiguo pueblo nomade turco.
500 a.C. - 1000 a.C.	Habas de soya fermentadas utilizadas como antibiótico, en China
300 a.C.	Vegetales fermentados para preservar, en China
500 - 1000	Alimentos fermentados con base de legumbres y cereales
200 - 900	Chocolate elaborado por los Mayas y posteriormente por los Aztecas (900 d.C.-1521 d.C.)
1276	Primera destilería establecida en Irlanda
1500	Ingreso del Yogur a Francia durante el Renacimiento

1500	Sauerkraut : registros mas antiguos de su elaboración en Europa
1851	L. Pasteur demuestra que son los microbios los que originan la fermentación; inventa la pasteurización
1877	J. Lister descubre el Bacterum lactis (Lactococcus lactis) en la leche fermentada
1907	E.Metchnikoff describe los beneficios terapéuticos de las leches fermentadas
1900 - 1930	Aplicación de la microbiología a los procesos de fermentación, con uso de cultivos definidos
1905	R. Koch recibe el Premio Nobel, al relacionar la tuberculosis con un tipo definido de bacteria
1928	Descubrimiento del Nisin , antibiotico usado como bioconservante especialmente en quesos.
1970 al presente	Desarrollo de alimentos conteniendo culturas probióticas amigables para el intestino
1980	Se sienta jurisprudencia internacional para patentar microorganismos (artificiales o modificados) (US Supreme Court patent case of Diamond vs. Chakrabarty)
1990 y siguientes	Descifrado del código genético de varias LAB, aisladas en alimentos fermentados
2002	Primera lista autorizada de microorganismos para cultivos lácteos, emitida por IDF y EFFCA
2012	Lista de cultivos microbianos alimentarios considerados GRAS*para uso en fermentación alimentaria, publicada la IDF y la EFFCA**
2012	Comunidades microbianas completas de pan, cerveza, vino, queso, kimchi, etc., son secuenciadas
2017	Más de 1.000 LAB y genomas relacionados son secuenciados

GRAS significa "generally recognized as safe"; IDF significa "International Dairy Federation"; EFFCA significa "European Food & Feed Cultures Association". (Cuadro elaborado a partir de la referencia [18]).

II.A. Los grandes simios: el agrado por el etanol

El consumo de frutos y bebidas fermentadas es tan antiguo como la humanidad. Los simios africanos tuvieron hace 10 millones de años, una mutación genética que hizo que su ADH4 (alcohol deshidrogenasa, la enzima encargada de metabolizar el etanol) fuera 40 veces más eficaz en hacerlo, lo que generó un beneficio adaptativo. Esta época de la prehistoria coincide con un período de cambio climático en el cual era sin duda más difícil encontrar la fruta madura en los árboles. Aproximadamente fue en esa época que nuestros ancestros comenzaron a adaptarse a la vida terrestre y probablemente se encontraron con frutas descompuestas en el suelo de los bosques, con alto contenido de etanol.

La tolerancia al etanol favoreció la selección natural contribuyendo con la alimentación de estos simios, ya que era en sí misma fuente de calorías, les abría el apetito, permitiéndoles acceder a una mayor diversidad y cantidad de frutas alimenticias en diferentes estados de maduración y descomposición. Es por ello que uno de los

principales investigadores en el tema concluye que nuestro gusto por el alcohol proviene de estos antepasados, que comían frutos muy maduros y en estado de descomposición, relacionando el consumo de etanol con la recompensa nutricional [2].

En tiempos actuales, entre los chimpancés salvajes de Bossou (Guinea) se ha registrado el consumo recurrente, espontáneo y motivado por el agrado, de etanol de la palma de la rafia. Consumen la dulce savia que se ha fermentado naturalmente, utilizando las hojas de la palma a modo de esponja (sumergiéndolas en contenedores de savia de los pobladores que también la recogen), las cargan con ese líquido y lo ingieren, muchas veces en gran cantidad. Con un promedio de etanol de 3,1% (v/v), pudiendo llegar hasta 6,9% (v/v), esto no es un freno (o tal vez sea un aliciente) para su consumo.

II.B. Los hombres prehistóricos y las bebidas alcohólicas fermentadas: cerveza y ritual

En tiempos prehistóricos, el alcohol se obtenía a través de la fermentación de azúcares presentes en ciertos productos por la acción de levaduras naturales. Las principales materias primas utilizadas para preparar bebidas alcohólicas provienen de fuentes de azúcares tales como frutas ricas en azúcar y miel (fructosa y glucosa), grano malteado (maltosa), savia de árbol (sacarosa) y leche (lactosa). Por lo tanto, la variedad de bebidas alcohólicas en la prehistoria incluía vinos de frutas, hidromiel, cerveza y bebidas fermentadas hechas de productos lácteos.

El registro más antiguo de elaboración de la cerveza es bastante anterior al Neolítico y se encontró en el Cercano Oriente, donde se hallaron restos arqueológicos de pobladores de la cultura Natufiense. Esta región es la más próxima al Mediterráneo (o Asia Occidental). Generalmente allí se incluye a Arabia Saudita, Armenia, Azerbaiyán, Baréin, Catar, Chipre, Egipto, Emiratos Árabes Unidos, Georgia, Irak, Irán, Israel, Jordania, Kuwait, Líbano, Omán, Palestina, Siria, Turquía y Yemen. El Cercano Oriente es la región histórica donde apareció primero la agricultura, el pastoreo, la civilización y la escritura, es lo que también se denomina Antiguo Oriente Próximo. Los pobladores de la cultura Natufiense vivieron en distintos sitios de esa región entre 11700 a.C. y el 9700 a.C., como cazadores de ciervos pequeños y recolectores en vastas extensiones de gramíneas (las antecesoras de los cereales). Se trataba de una población sedentaria o semi sedentaria, que aún no practicaba la agricultura. Se documentaron restos de cultivos silvestres fermentados, indicadores de consumo de cerveza, la cual podría haber tenido un papel importante en las fiestas rituales entre esas comunidades epipaleolíticas del Natufiense [3]. Los investigadores creen incluso que fue el interés por tener cerveza lo que impulsó a estas comunidades a iniciar una rudimentaria agricultura.

Casi 2.000 años después, durante el período Neolítico en el Cercano Oriente, numerosos restos arqueológicos comprueban el consumo de cerveza, junto con los inicios de la agricultura, la ganadería y la sedentarización de grupos humanos. La ciudad de Jericó, con sus murallas, data de esta época. Aparecen ya técnicas de transformación y conservación de los alimentos, como las vasijas de cerámica.

III. Bebidas y alimentos fermentados en Mesoamérica y América del Sur: diversidad de productos

En Mesoamérica y en el Cono Sur, se ha registrado una enorme variedad de bebidas alcohólicas y no alcohólicas a base de cereal, para consumo cotidiano y para celebraciones, siendo además una fuente de nutrientes importante. Muchos de estos productos utilizan materias primas básicas como maíz, yuca, cacao, café, uva, caña de azúcar, plátano y otras.

Los cultivos de cereales –en particular el maíz, que tiene su origen en México– son muy importantes en toda la región; el maíz se ha consumido en forma fermentada durante cientos de años, principalmente como bebidas alcohólicas y ocasionalmente no alcohólicas. En toda Mesoamérica y América del Sur, el maíz tiene un profundo significado religioso y mágico; la bebida de maíz fermentada, la "chicha", ha desempeñado un importante papel en los ritos de fertilidad, rogativas para las lluvias, festivales del sol y de las cosechas.

La chicha es una bebida alcohólica que se elabora con un proceso tradicional milenario único en Mesoamérica y América del Sur. El mismo consiste en la masticación de los granos del cereal y es la amilasa, una enzima hidrolítica presente en la saliva, la que actúa como tijera molecular para convertir el almidón en azúcares capaces de ser fermentados. Ya desde su época neolítica (3500 a.C. en América del Sur) existe registro del consumo de esta bebida asociada a celebraciones y rituales. Llegó hasta los Andes septentrionales de la actual Argentina, donde se difundió ampliamente por su zona norte.

Para elaborar el vino, con anterioridad a la llegada de las vides de Europa, en la zonas tropicales de Mesoamérica y el Cono Sur se usaron una enorme diversidad de frutas como la banana, el mango, la cereza, el ananá y el coco. Las uvas recién fueron usadas a partir del siglo XIV, provenientes de vides traídas por los españoles. El desarrollo del vino de uva ha dado lugar a una importante industria, en la cual Argentina tiene dos productos de Denominación de Origen Controlada (D.O.C.).

La cachaça es la bebida tradicional destilada más popular aún hoy en Brasil, con un uso festivo y convivial muy amplio. Está elaborada con jugo de caña de azúcar cuyo origen es tardío ya que data de la llegada de los conquistadores a Brasil, quienes introdujeron métodos de destilación de origen europeo.

Aquí interesa destacar cómo un producto relativamente reciente se integró a las creencias y rituales religiosos. Efectivamente, con la llegada de los esclavos, los ritos africanos se impusieron en Brasil y usaron la cachaça como parte de sus ceremonias y ritos de sanación. Con ella curaban a los tambores para agradar a los espíritus que viven dentro de ellos; la cachaça forma parte de casi todas las ofrendas a los distintos dioses y entidades espirituales y aún hoy día, antes de beberla, se derrama un poco en el suelo "*para o santo*", que es el tributo que los africanos hacían a los antepasados. Suele beberse pura o en cócteles, siendo el más conocido la caipirinha.

Otros productos fermentados son el pisco, el almidón de yuca agria, queso, café,

chocolate, vinagre, etc. La diversidad de los productos varía según el área geográfica, las técnicas de fermentación, las costumbres locales e incluso las creencias religiosas; la mayoría se producen en pequeña escala utilizando recetas tradicionales [4].

III.A. El pulque y el pozol: nutrición con y sin alcohol

Estas bebidas revisten especial interés por su antigüedad y la vigencia de su consumo. En el caso del pulque, como todos los bienes culturales de los pueblos prehispánicos, su origen se confunde con mitos y leyendas. El más conocido cuenta que luego de la unión de la diosa del Maguey con el dios Quetzacòatl –el de la Serpiente Emplumada, uno de los más extendidos de la zona mesoamericana prehispánica– ambas deidades crearon la planta del maguey, cuya savia o aguamiel los campesinos fermentaban para hacer la bebida (ver Figura 1).

Figura 1. Quetzacòatl, el Dios de la Serpiente emplumada.

Según investigaciones recientes, el pulque aportaba agua y nutrientes en la dieta en la ciudad de Teotihuacán (150 a.C. a 650 d.C.), uno de los centros urbanos y de poder más grandes que controlaba el Golfo de México y zonas adyacentes. Con una población de casi 100.000 habitantes, era sometido en ciertas épocas a un "estrés nutricional" especialmente en sus clases bajas. Según la hipótesis de los investigadores, el pulque habría funcionado a la manera de suplemento dietario como un "amortiguador" de riesgo alimentario especialmente en dichos sectores sociales [5]. Efectivamente, análisis microbiológicos actuales indican que es una excelente fuente de prebióticos y microorganismos con efectos similares a los probióticos, si bien su

consumo debe limitarse debido a su contenido alcohólico.

Varios siglos después, entre los aztecas o mexicas (1325 d.C. a 1521d.C.) el consumo del pulque continuaba y estaba estrictamente pautado para uso ceremonial; la embriaguez era severamente castigada, y solo estaba permitida entre mayores de 60 años, en las festividades y dentro del hogar.

A partir de la conquista española, el consumo del pulque se vació de su significado ritual (al impedirse las celebraciones originarias) y aumentaron los episodios de embriaguez al dejarse de lado las rígidas leyes indígenas sobre la misma.

Por su parte, el pozol es una bebida fermentada no alcohólica, espesa, refrescante y nutritiva. Su origen es maya y forma parte de la alimentación básica de muchos grupos étnicos del sur y el sureste de México y de la población mestiza; antiguamente también participaba en los rituales a los dioses. Se prepara con bolas de masa de maíz nixtamalizado (cocinado con agua y cal viva), envueltas en hojas de plátano, dejándolas fermentar en tiempos variables. Muchas veces se agregan granos de cacao molido a la masa de maíz. Estas bolas fermentadas se disuelven en agua y se consume el pozol acompañando la comida o en cualquier momento como una bebida refrescante, hábito que se mantiene en la actualidad.

El pozol tiene numerosos beneficios: un alto contenido de proteína, mayor al de la masa del maíz sin fermentar, así como niacina debido al proceso inicial de nixtamalización. Se han registrado también usos medicinales de esta bebida (bajar la fiebre, control de la diarrea) y debido a su alto grado de conservación, las bolas de pozol suelen ser utilizadas como provisiones en viajes largos [6].

III.B. El cacao y el chocolate: sabor, energía y ritual

Aunque el origen exacto del cacao (cacahuat) sigue siendo una incógnita, se sabe que el uso del chocolate (xocolatl) comenzó en las Altas Culturas de Mesoamérica, durante la civilización Olmeca (1500 a 500 a.C.); allí lo mezclaban con especias con fines curativos o como obsequio. Ya desde sus inicios, el cacao tenía sus tres funciones principales: energizante, obsequio y ritual (como ofrenda a los dioses y vínculo con ellos). Su hallazgo más temprano se encontró en una urna funeraria con restos de una bebida de chocolate, asociada a objetos suntuarios en un entierro en la costa del Golfo de México. Todos los hallazgos arqueológicos apuntan a que esta bebida era consumida exclusivamente por jerarcas o personas con prestigio social.

La civilización Maya (200 a 900 d.C.) continuó utilizando el chocolate tal como los Olmecas y posteriormente fueron los Aztecas o Mexicas (900 a 1521 d.C.) quienes aprendieron de los Mayas el cultivo y el uso del cacao.

Las antiguas comunidades de Mesoamérica practicaban un proceso muy laborioso para elaborar el cacao. Descripto con la mirada actual, las bayas de cacao pasan por un proceso de fermentación natural, con levaduras que degradan la pulpa de la baya, seguido por un aumento de temperatura debido a la fermentación láctica de la pulpa del cacao, todo lo cual contribuye a disminuir la acidez y generar los

precursores de sabor. Por último, los granos se dejan secar al sol durante días, para molerlos y retirar la cáscara.

A pesar de no ser un cultivo originario de la región, pensaban que había sido descubierto por sus dioses, que lo entregaron a los hombres. La mitología prehispánica de México nombra a dos dioses: Quetzalcòatl, representado como "Serpiente emplumada" (de origen Azteca; ver Figura 1) y Ek-Chuah, "Dios del cacao, de la guerra y benefactor de los mercaderes" (de origen Maya).

Los mayas celebraban un festival anual con rituales en honor al dios del cacao, Ek Chuah, existiendo actualmente evidencias arqueológicas de estas ceremonias.

El xocolatl era muy valorado por sus beneficios de energizante: se lo consumía como reconstituyente para dar fuerza y despertar el apetito sexual, tratar la fatiga, aumentar el peso de los desnutridos, estimular el sistema nervioso de los apáticos, agotados o débiles, etc. También se lo apreciaba por su sabor: los nobles mexicanos hacían cocer el cacao con agua y para hacerlo más rico le agregaban miel silvestre, jugo de arce y vainilla, mientras que la población más humilde le agregaba atole de maíz para hacerlo nutritivo.

Tanto se valoraba el cacao que sus bayas no fermentadas se utilizaban también como monedas de cambio. Este uso perduró hasta años después de consumada la Conquista; de hecho Hernán Cortés le pagaba a sus soldados con cacao. En 1528, a solo siete años de consumada la Conquista, Cortés enviaba cacao al emperador Carlos V, que pronto lo empezó a usar en España como bebida medicinal fortificante, ya despojado de toda función ritual o sagrada. Al principio, solo era utilizado por los nobles de la Corte por su escasez y alto valor, pero posteriormente su uso medicinal se generalizó [7].

III.C. La leche y los productos lácteos fermentados: sin presencia en la América del Sur prehispánica

No existió en Mesoamérica ni en América del Sur, antes de la conquista española, ganado bovino ni caprino para provisión de leche. En la zona andina de lo que es hoy el noroeste argentino abundaban los camélidos (llama y alpaca domesticadas) que podrían haber sido fuente de leche y de bebidas lácteas fermentadas, tal como en el Medio Oriente. Sin embargo, los pueblos andinos no ordeñaban las llamas ni las alpacas, por lo que el consumo de la leche les era desconocido. Hay múltiples explicaciones de esto, sin que ninguna sea concluyente. Por una parte, la intolerancia a la lactosa de la leche está muy difundida entre la población andina; además la llama estaba destinada a las funciones de transporte, lana, trueque y carne (charque). Finalmente debemos sumar un intangible factor cultural y es que la mujer andina valora especialmente su leche para amamantar, no aceptando la de los animales para sus niños.

Con la conquista española, también fueron llegando caballos, vacas, ovejas y cabras. Comenzó el ordeñe de vacas y cabras y un lento desarrollo de artesanías e industrias de la leche y derivados, siendo muy importante la de quesos de cabra en el norte. Pero la técnica del ordeñe nunca fue trasladada a las llamas, que eran animales autóctonos.

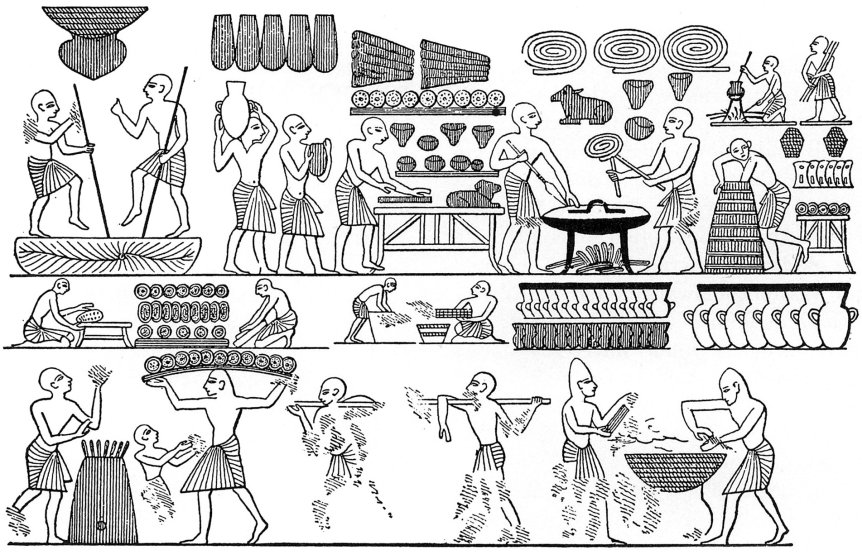
IV. Bebidas y alimentos fermentados en el Cercano Oriente

IV.A. La cerveza y el pan, básicos y sagrados

Después de los Natufienses (cazadores-recolectores del Cercano Oriente) hay que avanzar hasta el período Neolítico en China (pueblo de Jiahu, entre 7000 a.C. y 6600 a.C.) para encontrar la evidencia temprana de una bebida tipo cerveza, elaborada a base de de arroz, frutas y miel [8].

En el Antiguo Egipto, el pan y la cerveza fueron los alimentos básicos de su dieta (ver Figura 2). El pan era consumido en todos los estamentos de la sociedad; tuvo un rol clave en su cultura y se lo consideraba símbolo de la vida. Los antiguos egipcios creían que era un alimento de sus dioses y frecuentemente les ofrendaban pan en los ritos de veneración. El pan acompañaba también a los muertos en su paso al más allá, por lo que la mayor parte de las rodajas de pan recuperadas en el Antiguo Egipto proviene de tumbas y enterratorios [9]. Preparar este alimento era parte de la rutina diaria, tanto en hogares como en centros religiosos. El trigo fue la materia prima más utilizada y para agregar sabor a veces se usaban frutas o especias. Se hacía a partir de un engrudo *(gruel)* que se dejaba fermentar, siendo un proceso largo y trabajoso, generalmente hecho por mujeres.

Figura 2. El pan fue uno de los alimentos básicos en la dieta de los egipcios.



La figura muestra escenas de la elaboración del pan, tal como fueron plasmadas en la tumba de Ramsés III.

Alrededor del 4000 a.C., registros arqueológicos encuentran que los antiguos egipcios ya estaban usando malta y levaduras para hacer la cerveza y el pan. Preparaban

malta cocida y cruda mezclada con agua, y la filtraban para luego inocularle la levadura.

En el caso del pan, la fuente más común de levadura era retener un trozo de masa del día anterior para utilizarlo como iniciador, o masa madre.

El pan llegó incluso a ser moneda de intercambio, ya que el valor de los objetos se basaba en cuántos granos o rodajas de pan valía. También se utilizó para el pago de mano de obra.

Respecto de la cerveza, se ha podido rastrear su difusión analizando los residuos de la fermentación de la cebada encontrados en vasijas de barro, y la presencia de estas vasijas con residuos dentro de tumbas y sitios ceremoniales.

La tecnología cervecera fue tomada del Medio Oriente por tribus germánicas y celtas alrededor del siglo I. Desde esos tiempos, las tecnologías de bebidas y panes fermentados se expandieron desde Asia, Mesopotamia y Egipto hacia el viejo continente y el resto del mundo.

IV.B. El vino; lo permitido y lo prohibido

Se sabe que cada civilización tiene un vino, una cerveza u otro alcohol característico. El vino es uno de los productos fermentados más antiguos conocidos. Su origen podría haber sido accidental, con la transformación de un jugo de unas frutas en una bebida con propiedades estimulantes.

Se han detectado restos de vino fechados alrededor del 6000 a.C. en una jarra encontrada cerca de los Montes Zagros de Irán. También fue conocida la elaboración del vino en Oriente Medio entre los Asirios alrededor de 3500 a.C. y en China alrededor del año 3000 a.C. Más adelante en la línea de tiempo, en la India (tiempos védicos 1500 a.C.) se menciona al vino en los libros sagrados.

El Antiguo Testamento habla de 2 productos fermentados, el pan y el vino. El pan aparece con la pérdida del Paraíso: después de haber vivido en plena naturaleza, comiendo sus frutos, el hombre peca (a instancias de la mujer) y come un fruto prohibido. Esta transgresión (en la que muchos ven la metáfora de la búsqueda del conocimiento) hace que el ser humano sea expulsado del Paraíso. Dios lo echa de allí y lo amonesta, diciéndole que tendrá que ganar el pan con el sudor de su frente, o sea tendrá que trabajar. Así es como el pan pasa a simbolizar el trabajo humano y el fermentar (para hacerlo) se ubica en los orígenes mismos de la cultura, en contraposición a la pura naturaleza del Paraíso.

En el Antiguo testamento, el vino aparece después, cuando el hombre es castigado por segunda vez con el Diluvio universal, que arrasa con todo. El justo Noé se salva con su familia, sus animales y sus plantas. Cuando baja a tierra firme, planta una vid, hace el vino y se embriaga. Otra vez, un producto fermentado está en el arranque de una nueva etapa de la humanidad y también de las restricciones que tiene el consumo del alcohol.

Según los datos arqueológicos e históricos, la difusión de la viticultura y el desarrollo de la vinificación en la Europa templada y el Mediterráneo occidental tuvo lugar a partir del 1000 a.C., durante la Edad del Hierro, vinculados a la expansión

comercial de fenicios, griegos, etruscos y romanos.

Los griegos consumían vino en estado puro solo en el desayuno y con pan, ya que durante el resto del día lo tomaban diluido con agua. Es que en la antigüedad greco romana se pensaba que el vino era un desencadenante de comportamientos agresivos y de posesión ritual y era necesario pautar la ingesta, estableciendo situaciones permitidas y prohibidas para su consumo. Por ejemplo, el uso de los efectos psicoactivos en el campo de batalla era juzgada como un signo de cobardía, perteneciente al mundo barbárico. Pero la ebriedad alcohólica se toleraba en las fiestas dionisíacas; en estas ocasiones el vino, junto a la danza, era el instrumento para lograr el entusiasmo y la posesión por parte del dios.

IV.C. Las bebidas fermentadas lácteas. Preservación y beneficios para la salud

Las bebidas fermentadas con bajo o sin alcohol tienen una larga tradición y son apreciadas en muchas culturas por sus beneficios para la salud. Todas ellas tienen un origen regional y han sido tradicionalmente consumidos por las poblaciones europeas y asiáticas. Dentro de las no lácteas, la más conocida es la kombucha, que se ha visto revivir en occidente en fermentaciones hogareñas.

La mayor parte son a base de leche y su origen puede rastrearse en los comienzos del Neolítico (hace 10.000 años en el Cercano Oriente). Durante este período ocurrieron numerosos cambios, el clima se hizo más cálido lo que produjo modificaciones en la flora y en la fauna. Muchos animales emigraron buscando mejores condiciones climáticas y esto obligó a los seres humanos a buscar nuevas alternativas para sobrevivir. Lentamente comenzó a difundirse una nueva forma de vida basada en la producción de alimentos a partir de vegetales y animales domesticados, lo cual convivió en un principio con la caza y la recolección. Esta domesticación fue generando excedentes estacionales de alimentos a conservar. Para esta revolución neolítica los especialistas consideran como la fecha más antigua los 8500 a.C. en el Cercano Oriente (hace unos 10.000 años) para extenderse después por Egipto, Oriente Medio y el sur de Asia, y en Europa con una fecha más tardía, de 5000 a.C.

Se considera que la leche comenzó a fermentarse para conservar sabor y sus elementos nutritivos y poder diferir su consumo en tiempo y espacio, manteniendo sus beneficios. Hay registros que permiten rastrear los orígenes de esta práctica en la región denominada Medialuna Fértil y en particular en la Mesopotamia, pero también en las estepas asiáticas y en el Cáucaso, con una posterior difusión hasta llegar a la India, Escandinavia, el Mediterráneo y Egipto. Las diferentes denominaciones de las leches fermentadas en las distintas regiones mencionadas están indicando una posible multiplicidad de lugares de origen independientes.

Se cree que su descubrimiento fue casual, durante el transporte de leche en "bolsas "naturales hechas con el estómago del camello, por ejemplo, en los que la leche entera entra en contacto con los jugos gástricos del animal, dando lugar a una leche

fermentaba que se podía conserver por más tiempo [10].

Las leches fermentadas merecen una especial atención, por su gran difusión en espacio y tiempo, siempre asociado a una fuerte valoración de sus propiedades nutritivas y curativas, incluso el promover la longevidad.

Los lácteos fermentados más antiguos y conocidos son el leben en Medio oriente, el kumys en Asia Central y el kefir en el Cáucaso.

El Kumys estaba ya ampliamente difundido en Asia y Europa del este, cuando el historiador Jenofonte documentó su consumo en el 500 a.C. entre los escitas, un pueblo nómade de criadores de caballos; también Marco Polo lo registró en sus viajes por Asia a mediados del siglo XIII.

El Kefir es otra bebida láctea de gran interés. Se considera que su lugar de origen fue las laderas del norte de la China caucásica, donde los montañeses hacían una bebida refrescante de leche de cabra o de vaca, poniéndolas a fermentar junto con unos gránulos de Kefir (su *"starter"*). Si bien se desconoce su procedencia, un mito de origen narra que los granos de Kefir les fueron dados a los creyentes por Mahoma, quien les enseñó a usarlos. Junto con los gránulos, también les comunicó la prohibición de pasarlos a cualquier persona ajena a la comunidad, pues perderían su fuerza mágica. Esta narración mítica explica por qué todo lo relacionado con el Kefir se mantuvo en secreto durante muchos años. Como la mayor parte de las fermentaciones tradicionales, el método casero de hacer Kefir se fue perfeccionando a través de una larga experiencia. El producto se preparaba en bolsas de cuero, las cuales durante el día se sacaban al sol, y por las noches se entraban en las casas, colgándose al lado de la puerta. En la actualidad se lo produce también de modo industrial, utilizando generalmente cepas de bacterias y levaduras seleccionadas en reemplazo de los gránulos tradicionales, aunque hay algunos reportes de producción industrial de Kefir a partir de una primera fermentación a menor escala realizada con los gránulos [11].

El yogur ya era conocido desde hace 5000 años y fue rápidamente adoptado en distintas culturas por sus múltiples beneficios para la salud. Entre estos beneficios, se encuentran los nutritivos, debido a los cambios en la digestibilidad de la leche, su capacidad para proteger el tracto gastrointestinal y su capacidad curativa para las diarreas y otras dolencias. También se suponía, a partir de datos empíricos, que podía existir una relación entre la ingesta del yogur y la longevidad.

Ya a comienzos de la civilización helénica, después en la judeocristiana y en el Asia, se utilizaban las leches fermentadas como un alimento para los niños y factor de protección para los soldados, siendo utilizadas por los turcos y romanos.

Se cree que el yogur se convirtió en un alimento fundamental para los pueblos nómadas por su facilidad de transporte y de conservación. El historiador griego Heródoto (400 a.C.) en un viaje al norte del Mar Negro, había oído hablar de unas mujeres guerreras llamadas *"amazonas"* que recorrían a caballo las estepas y que criaban ovejas, caballos y algunos camellos, con cuya leche fermentada se alimentaban sus familias.

Las leches fermentadas también aparecen en los textos bíblicos como alimentos vitales que Dios otorga a su pueblo: a través de un ángel, Dios le entrega a Abraham

el secreto del yogur. Y cuando los ángeles le anuncian a Abraham que tendrá descendencia, éste les convida leche y cuajada, como signo de hospitalidad [10].

V. Pescados fermentados en el Ártico y Escandinavia; quesos de cabra en América del Sur. Importancia de lo social

La alimentación tiene una dimensión social que ha sido puesta en valor por investigadores de todo el mundo. Los alimentos fermentados la tienen aún más marcada pues muchos de ellos, debido a su especial elaboración, se consumen en celebraciones y fiestas como bodas o cumpleaños. Son sinónimo de convivialidad, celebración e intercambio.

Beber cerveza de mandioca en América del Sur, de milo o de sorgo en África, es un acontecimiento en sí mismo que reúne a toda la comunidad. Los Inuit (esquimales) consumen mamíferos marinos (focas y morsas) y peces fermentados, y este proceso les sirve para preservarlos, diversificar y enriquecer su sabor. Su consumo es altamente apreciado, dando lugar a verdaderos festines, produciéndose incluso un efecto euforizante en la degustación.

Los pescados fermentados de los países escandinavos (así como los del sudeste asiático) se consumen crudos, tienen un sabor y olor muy pronunciado y son socialmente valorados. En los países escandinavos se les ha vuelto a prestar atención y se los aprecia como parte de un patrimonio cultural viviente. Este es el caso del Rakefisk de los noruegos, que conocido ya desde la Edad Media, siguió siendo silenciosamente consumido a través del tiempo, hasta que varios siglos después comenzó a ser muy valorizado por la moderna elite urbana. Actualmente se industrializa para atender a su demanda creciente.

Así como lo fermentado contribuye con lo social, también requiere de lo social para su elaboración y esto es tan válido para los pescados fermentados como para otras categorías de producto.

Yendo al otro extremo del globo, para América del Sur la función social de la fermentación ha sido bien descripta en el pormenorizado estudio acerca de la fabricación de quesos de cabra en la Puna Argentina [12]. Se necesitan las redes sociales de convivencia y de reciprocidad familiar y comunitaria para que los saberes para fermentar puedan ser transmitidos, para obtener ayuda y poder identificar los lugares aptos para la fermentación, así como para conocer la duración y envergadura de los procesos de fermentación. Lo social también se evidencia en la circulación de los iniciadores para fermentar o "*starters*" dentro de una familia o de la comunidad. Resulta interesante ver cómo el queso de cabra se involucra en la conformación y el sostenimiento de las relaciones de parentesco por lo que necesita de los otros, en cuanto a la manipulación diaria, estacional e incluso generacional de cuajos, sueros, fermentos y "pancheras" (recipientes donde se guardan los cuajos).

VI. Algunas invariantes

Hemos visto que la fermentación de las materias primas permite obtener una amplia paleta organoléptica. Diversas encuestas realizadas en el campo de la alimentación muestran una verdadera búsqueda de variedad en los sabores mediante la fermentación, en especial en las regiones donde la dieta es monótona. Estos sabores buscados y específicos, que son resultado de saberes locales tradicionales, permiten trazar grandes áreas culinarias en el mundo contemporáneo. Así como en el Ártico los pescados son el objeto más común para fermentar, en África son los cereales, en Asia las verduras, el cerdo y la leche. La fermentación de las carnes ocupan un lugar de importancia en la campiña de Europa del sur y del centro.

Y dentro de cada área, a partir de un mismo ingrediente básico sometido a los diferentes procesos de fermentación, se logran productos de una diversidad asombrosa. Se constituyen así en una marca de identificación cultural de la zona y de sus preferencias culinarias [13]. Tiene sentido entonces que gran parte de los productos D.O.C. sean fermentados, desde el *champagne* y el queso roquefort francés, pasando por el Kimchi coreano y la cerveza, y tantos otros sabores y aromas que citan a sus lugares y saberes de origen.

En los cinco continentes, incluyendo América del Sur, aparece como invariante que el consumo de bebidas fermentadas alcohólicas se incluye dentro de un contexto social, sea ceremonial o religioso. El alcohol aparece en las historias míticas, en los sistemas simbólicos y en las prácticas culturales, ritos de pasaje, rituales religiosos, etc., siempre acompañado de una regulación social del consumo, como modo de controlar sus efectos psicoactivos.

Con una mirada más global, nos preguntamos qué tipo de transformación produce la fermentación en una materia prima que la habilita para todas estas funciones. Siempre fue muy diferente de las prácticas culinarias habituales basadas en la utilización del fuego, ya que a la inversa de la cocción –que vuelve inerte a todos los productos de la agricultura y de la cría de animales– la fermentación está estrechamente ligada a la vida. Prolonga la vida y la modifica según modalidades que pueden parecer "misteriosas", y esto es posible en gran parte porque reposa en la intervención de microorganismos no perceptibles a la simple vista e incluso desconocidos como concepto hasta mediados del siglo XIX.

La fermentación ocupa un lugar diferente entre lo crudo y lo cocido, ya que desarrolla y modifica lo vivo, con todo lo que esto implica de exploración, de riesgo y de control. No es de sorprender entonces que los productos de la fermentación hayan adquirido, a lo largo de la historia, una dimensión simbólica representando el ciclo de la vida y la muerte. La fermentación introduce en la materia inerte una especie de "animación espectacular", hace salir la vida de la muerte y puede simbolizar perfectamente la resurrección [14].

En el caso del vino, la transformación mediante la fermentación del mosto perecedero en vino perdurable, era interpretada en la Grecia antigua como una alegoría

del pasaje de la vida terrestre a la vida eterna [15].

En numerosas sociedades tradicionales, los productos fermentados representan a la fertilidad subyacente, siempre lista a desarrollarse y crecer desmesuradamente, representando al mismo tiempo la vida y la muerte. Muchas bebidas fermentadas son consideradas como portadoras de un poder regenerativo vital, lo que puede verse en una cantidad muy grande de usos medicinales y de mitos y leyendas sobre las bebidas y alimentos fermentados.

VII. La revolución industrial: pérdidas y ganancias. Louis Pasteur.

Nos interesa comentar este período en Europa porque en él se producen cambios que van a impactar fuertemente en el modo de vida de la población y en particular, en su alimentación.

Básicamente, la dieta se empobrece, ya que la variedad de plantas y animales de las que disponen las poblaciones rural y campesina para la alimentación es mayor que aquella de la que dispone la población que vive en las ciudades.

Es también cuando comienza a decaer la práctica hogareña de elaboración de los productos fermentados de modo tradicional.

La Primera Revolución industrial se desarrolla en Europa, inicialmente en Inglaterra (1780-1840) y se transfiere rápidamente a los Países Bajos y Alemania. Es impulsada por el descubrimiento de la máquina de vapor, que transforma las técnicas productivas tradicionales y potencia la industria textil, la metalurgia y la química, acelerando la producción de mercancías. Es una época de grandes inventos, nacen el ferrocarril y el barco a vapor.

Se pasa del mundo rural al mundo industrial y el campo, que también comienza a mecanizarse, produce una fuerte migración de campesinos a la ciudad. Por una parte, la ciudad atrae ya que el salario de los obreros que trabajan en la industria triplica lo que gana un campesino; también mejoran sus condiciones sanitarias, se descubre el principio de las vacunas y crece la seguridad y la expectativa de vida.

Por otra parte hay un creciente problema alimentario y pérdida de saberes y actividades tradicionales ligados a la preparación de la comida y la comensalidad. Es en este contexto social cuando se van a ir abandonando los saberes tradicionales de la fermentación, por falta de espacio y tiempo de las personas.

Entre 1850-1870 se produce en Europa la 2ª Segunda Revolución Industrial, que continúa con la anterior y la potencia. Significará el triunfo de la automatización en las fábricas y de la gran industria sobre la mediana y pequeña, con un aumento de la producción y la expansión del mercado mundial de productos. Los ferrocarriles siguen siendo un fuerte motor, pero se buscan nuevos combustibles en el petróleo y energía eléctrica.

En el campo de la alimentación, hay importantes avances en la conservación, con la refrigeración por compresión a vapor (que actualmente se sigue utilizando en la

industria cervecera) y casi simultáneamente se trabaja en un sistema más complejo, con amoníaco. Surge el transporte refrigerado de alimentos y se producen importantes desarrollos en la química.

Es aquí donde aparece la figura del Dr. Pasteur (ver Figura 3). La carrera de Pasteur puede sintetizarse como la respuesta a un debate de siglos de duración sobre si la enfermedad y la podredumbre son los resultados de la generación espontánea o si se propagan o contagian a través de seres vivos móviles. Pasteur hace un descubrimiento revolucionario y responde que son los microbios los que producen tanto la fermentación de los alimentos como las infecciones en los humanos. A Pasteur se debe la técnica conocida como pasteurización (eliminar parte o todos los gérmenes de un producto elevando su temperatura sobre los 60°C durante un determinado período de tiempo, la pasteurización clásica consiste en calentar a 63°C durante 30 min) lo que permitió desarrollar luego la esterilización por autoclave (121°C, 15 min). A través de experimentos, refutó definitivamente la teoría de la generación espontánea y desarrolló la teoría de las enfermedades infecciosas.

Figura 3. Louis Pasteur.

El sociólogo Bruno Latour ha demostrado que la pasteurización no fue un descubrimiento repentino sino que fue el resultado de la confluencia de varios factores culturales, sociológicos y políticos. Básicamente, fue por interés nacional que el emperador francés Napoleón III le solicita a Pasteur entender por qué, en la floreciente industria vitivinícola, algunas partidas fermentaban adecuadamente mientras que otras se arruinaban. Asimismo había que responder a las necesidades de las guerras de expansión (de Francia) entendiendo por qué se enfermaban los soldados, cómo

debían ser tratados y cuáles eran los gérmenes nocivos a destruir y los buenos a encauzar.

Estas inquietudes, llevadas al extremo de destruir gérmenes, dieron lugar a un higienismo y una sanitización muy fuerte, tanto en Europa como en los Estados Unidos. En un afán excesivo de dominar a los microbios perjudiciales, se destruía también los beneficiosos, con el consiguiente impacto negativo en el sistema inmune y también en su sistema digestivo de los humanos [16]. Estos conceptos están en la base de la llamada Teoría de la Higiene, la cual hacia fines del siglo XX, preconiza que estar en contacto con microorganismos de circulación habitual desde edades tempranas puede ayudar a prevenir el desarrollo de enfermedades alérgicas y asma.

Para frenar los los efectos negativos que esta hipersanitización produce, algunas propuestas hablan de seguir el ejemplo de numerosas personas que consumen alimentos fermentados con bacterias productoras de ácido láctico, en diversos puntos del planeta, particularmente en Egipto, los Balcanes, la India, Palestina, Sudáfrica y muchos otros lugares más.

VIII. Los últimos 100 años

Haciendo una síntesis rápida de los últimos 100 años (después de la 1era Guerra mundial) y de los principales eventos que han impactado en la historia de la fermentación, podemos señalar que los cambios provienen en su mayor parte del fuerte desarrollo de la ciencia y la industria, dentro de un contexto de globalización de los mercados y la creciente urbanización (ver Tabla 1).

Hacia fines del siglo XX se llega a un período crítico en el que la ciencia occidental estaba explorando el mundo con nuevas escalas, utilizando tecnología de punta para investigar procesos bioquímicos a nivel microscópico. Es el período la ciencia de la Microbiología tiene un gran impulso.

El crecimiento exponencial de la población, junto con su concentración en ciudades, produce un aumento de la demanda de alimentos y un alargamiento de las cadenas de comercialización. Los volúmenes de producción aumentan exponencialmente y las empresas alimentarias buscan responder a estas necesidades crecientes. En todos los campos de la alimentación se va produciendo una centralización, estandarización y empobrecimiento o de las elecciones alimentarias. En 1980, luego de intensos debates, se patenta por primera vez la vida microbiana, condicionado a que ésta no se encuentre en estado natural sino que haya tenido alguna modificación por la acción humana.

Frente a este panorama, voces de alerta surgen para proteger la diversidad local de las culturas viendo en ellas una capacidad de conectarse con el mundo natural y los recursos de salud que en él puedan hallarse [17]. El resurgimiento desde hace años de la fermentación hogareña de lácteos, vegetales, bebidas como la kombucha y otros productos busca tanto los beneficios gustativos, nutricionales y de salud para

la microbiota, como retomar un empoderamiento en la alimentación y en las elecciones saludables, siendo clave tener presentes los conceptos de seguridad alimentaria.

También está ganando conocimiento público y aceptación la visión de los microorganismos fermentadores como parte natural de nuestra vida, lo cual abre un camino a una mejor calidad de alimentación.

IX. Conclusiones

Hemos recorrido rápidamente los principales hitos en la historia de la fermentación de alimentos y bebidas, y la hemos encontrado siempre ligada a la vida humana.

Vimos que cumple una gran cantidad de funciones manifiestas a favor de la salud humana, que han sido descriptas y están en constante ampliación a través de nuevos estudios científicos, muchos de los cuales figuran en este libro. Ellas son preservar, brindar seguridad alimentaria, agregar nutrición al alimento base, hacerlo benéfico al funcionamiento gastrointestinal e inmunitario, diversificar y enriquecer la paleta alimentaria y en resumen, mejorar la alimentación de los pueblos. Más intangibles pero no menos importantes han sido las funciones religiosas y sociales que ha tenido y aun tienen los alimentos y bebidas fermentadas, contribuyendo a dar cohesión, identidad y seguridad a las personas.

Entre los humanos y sus dioses (o sus ancestros), lo fermentado alcohólico ha sido siempre un ayudante para entrar en contacto con lo sobrenatural, en ese vínculo que siempre se presenta desigual y deseado. Bajando a la tierra, entre los humanos mismos, lo fermentado (alcohólico o no) ha sido siempre el facilitador de la convivialidad, función que aún se mantiene en la actualidad.

Pensando en la materia prima natural y el alimento final logrado, podríamos decir, junto con algunos pensadores, que la fermentación se ubica entre lo crudo lo cocido. Ya que hemos visto que la fermentación opera sobre los productos naturales, pero en lugar de quitarles la vida con el fuego (como lo cocido) toma lo crudo y le ayuda a desplegar su vida interna, a crecer sin que se desborde. Entonces la fermentación sería una especie de bisagra entre la naturaleza y la cultura.

Sin embargo, pensando en los conocimientos y los trabajos necesarios para fermentar, pensando también en la domesticación de los microbios y en las muchas funciones de tipo espiritual que los alimentos y bebidas fermentadas cumplen, hemos llegado a la conclusión que la fermentación pertenece definitivamente al campo de la cultura humana. Y como tal, es digna de valorar, preservar y desarrollar.

X. Declaración de posibles conflictos de interés

Patricia Schneier ha desempeñado su actividad profesional en Danone Argentina en el área de Investigación de Mercado.

XI. Bibliografía citada

[1] International Journal of Enhanced Research in Science, Technology & Engineering ISSN: 2319-7463, Vol. 4 Issue 10, October-2015 Page | 134 Cereal Based Beverages and Fermented Foods: A Review Suman Kumari, Prixit

[2] Dudley Robert, Ethanol, Fruit Ripening, and the Historical Origins of Human Alcoholism in Primate Frugivory, Integrative and Comparative Biology, Volume 44, Issue 4, August 2004, Pages 315–323, https://doi.org/10.1093/icb/44.4.315

[3] Dietrich, O., M. Heun, J. Notroff, K. Schmid y M. Zarnkow. 2012. El rol del culto y los festines en la emergencia de las comunidades del Neolítico. Nuevas evidencias de Göbekli Tepe, sudeste de Turquía. Antiquity 86: 674–695.

[4] Fátima C. O. Gomes, Inayara C. A.,Lacerda, Diego Libkind, Christian A. Lopes, Javier Carvajal and Carlos A. Rosa (2009). Traditional Foods and Beverages from South America: Microbial Communities and Production Strategies. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador. In: Industrial Fermentation… Ed. Jurgen Krause and Oswald Fleischer.

[5] Correa-Ascencio, Marisol & Robertson, Ian & Cabrera-Cortés, Oralia & Cabrera-Castro, Rubén & Evershed, Richard. (2014). Pulque production from fermented agave sap as a dietary supplement in Prehispanic Mesoamerica. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 111. 10.1073/pnas.1408339111.

[6] WACHER Rodarte, Carmen "La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados " Revista Digital Universitaria [en línea]. 1 de agosto de 2014, Vol. 15, No.8 [Consultada:]. Disponible en Internet: <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num8/art64/index.html> ISSN: 1607-6079.

[7] McNeil, Cameron L. (ed.) (2006) Chocolate in Mesoamerica: A Culture History of Cacao, University Press of Florida (Gainesville), xvi +542 pp

[8] McGovern, P.E.; Zhang, J.; Tang, J.; Zhang, Z.; Hall, G.R.; Moreau, R.A.; Nuñez, A.; Butrym, E.D.; Richards, M. P.; Wang, C.H.; Cheng, G.; Zhao, Z.; Wang, C.H. (2004). Fermented Beverages of Pre and Protohistory in China, PNAS, 101, 17593-17598.

[9] Delwen, Samuel. Bread Making and Social Interactions at the Amarna Workmen's Village, Egypt. World Archaeology, Vol.31, N°1 Food technology and its Social Context: Production, Processing and Storage (Jun 1999), pp.121-144

[10] Weill, R. El Yogur, un alimento milenario a la luz del siglo XXI; compilado por Alejandro Ferrari; ilustrado por Florencia Abd; Juliana Vido. - 1a ed. - Buenos Aires: Asociación Civil Danone para la Nutrición, la Salud y la Calidad de Vida, 2017. 180 p.

[11] Koroleva,N.S. Technology of kefir and kumys. [1988] All-Union Dairy Research Inst. - VNIMI, Moscow (USSR) Ain-Shams Univ., Cairo (Egypt). Faculty of Agriculture.

[12] Bérard. et Marchenay P.: Les dimensions culturelles de la fermentation. En: Les fermentations au service des produits de terroir Marie-Christine Montel, Claude Béranger, Joseph Bonnemaire, coordonnateurs. INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE 147, rue de l'Université, 75338 Paris Cedex 07. 2005. Pag 13-28

[13] Pazzarelli, F. Un queso entre otros. Sueros, familias y relaciones en los cerros jujeños. En: rca VOL 50 N°2, Julio- Diciembre del 2014. PP 95-118

[14] Courtois, M., 1999. Aliments fermentés dans la Bible. In Stäuble-Tercier N., Raboud-Schüle I. (dir) Ferments en Folie, Fondation Alimentarium, Vevey (Suisse) 15-17

[15] Brun J.P., 1999. Le vin Antique. In Stäuble-Tercier N., Raboud-Schüle I. (dir) Ferments en Folie, Fondation Alimentarium, Vevey (Suisse) 19-23

[16] Latour, Bruno,The Pasteurization of France. Alan Sheridan and John Law, trans. (Cambridge, MA: Harvard University Press, 1988: 36).

[17] Sandor Ellix Katz, Wild Fermentation: The Flavor, Nutrition, and Craft of Live-Culture Foods (White River Junction, VT: Chelsea Green Publishing, 2003)

[18] Prajapati JB, and Nair BM. The History of Fermented Foods. Handbook of Fermented Functional Foods, edited by Farnworth ER, 2nd ed., CRC Press, 2017 pp 1-22

[19] Hutkins, R. Microbiology and Technology of Fermented Foods. 2019. John Wiley & Sons, Inc.

2

Variedad de alimentos fermentados en Japón y otros países del este asiático, y los microorganismos involucrados en su fermentación

Akihito Endo
a3endou@nodai.ac.jp

• *Department of Food, Aroma and Cosmetic Chemistry, Tokyo University of Agriculture, Japan*

Resumen

Japón y otros países del este asiático (por ejemplo China y Corea del Sur) tienen muy diferentes culturas alimentarias, cuando se las compara con países de occidente, y la comida fermentada es crucial en su cultura. La mayor proporción de alimentos fermentados en Japón son los condimentos fermentados, los vegetales fermentados, las bebidas alcohólicas y otros, y las variedades propiamente dichas de condimentos y vegetales fermentados son características de Japón.

La cultura de fermentación de alimentos de Japón está caracterizada por la ausencia de los tradicionales productos lácteos fermentados. Para la producción de bebidas alcohólicas y condimentos fermentados, frecuentemente se utiliza el *Aspergillus* spp. como microorganismo iniciador para la hidrólisis del almidón de los ingredientes. La glucosa que se produce en esa hidrólisis es luego utilizada para la producción de etanol y/o las sustancias químicas aromáticas. Los vegetales fermentados son una fuente rica de bacterias ácido-lácticas viables, que tendrían efectos benéficos sobre la salud de la población. En esta revisión se incluye una introducción a los alimentos fermentados tradicionales en Japón, China y Corea del Sur, así como a los microorganismos que están involucrados en esa fermentación.

I. Introducción

Los países del este asiático, incluyendo Japón, se diferencian entre otras cosas de los países de occidente, por sus hábitos dietarios tradicionales. Los japoneses consumen principalmente arroz en lugar de pan, como fuente de carbohidratos, y poseen muchos vegetales fermentados únicos, así como también condimentos fermentados. Por otro lado, el consumo de productos lácteos es en general un hábito moderno en Japón y otros países del este asiático, y por lo tanto no se los ve mucho, salvo en Mongolia. Como consecuencia, históricamente, los vegetales fermentados son la fuente principal para el consumo de bacterias-ácido-lácticas viables (LAB, por sus siglas en inglés) en esta región. En esta revisión se introducen las características y microorganismos de los alimentos fermentados en Japón. También se describen brevemente los alimentos fermentados de Corea del Sur y China.

II. Bebidas alcohólicas

En Japón, Corea del Sur y China, las bebidas alcohólicas habitualmente utilizan cereales y/o papa como ingredientes principales. Como estos ingredientes contienen grandes cantidades de almidón, pero menos mono y disacáridos, la hidrólisis de los almidones es un paso esencial previo a la fermentación alcohólica. A diferencia de las bebidas alcohólicas occidentales, esta hidrólisis es llevada a cabo por cultivos de *Aspergillus* en forma de moho, en la producción de bebidas alcohólicas japonesas. Estos cultivos están disponibles en negocios especializados en forma de moho crecido sobre muestras de arroz, y las levaduras que realizan la fermentación alcohólica están disponibles en la *Brewing Society* de Japón, en la forma deshidratada, cultivo activo o inóculos.

II.A. Sake

El sake es una bebida alcohólica tradicional japonesa hecha a partir de arroz, producida en las regiones frías de Japón, en invierno. Para la producción, el arroz hecho al vapor es inoculado con moho de *Aspergillus oryzae* incubado a 30ºC por dos días. Este arroz crecido con moho es denominado *koji* (ver figura 1) y el *Aspergillus oryzae* es denominado *moho-koji* en Japón. Durante la incubación, el A. oryzae acumula amilasas (fundamentalmente α-amilasa and glucoamilasa) para degradar el almidón en glucosa (ver Figura 2). El *koji* luego es mezclado con agua y la levadura fermentadora productora de alcohol denominada *Saccharomyces cerevisiae,* e incubado por 2 a 4 semanas para producir la semilla de levadura (ver Figura 3). Esta semilla de levadura es luego mezclada con más *koji*, más arroz hecho al vapor, y agua, para producir la fermentación alcohólica. Esta última generalmente es realizada a 10-15ºC por 4 semanas. En la etapa de preparación de la semilla de levadura y en la etapa de

fermentación alcohólica, los LAB que crecen espontáneamente producen lactato a partir de glucosa (ver Figura 2), y este lactato previene el crecimiento de otros microorganismos que podrían echar a perder el proceso. Este fenómeno posiblemente se debe a su psicrotolerancia y capacidad de crecimiento a baja temperatura. Al final de la fermentación, la concentración de alcohol y el pH en la mezcla generalmente alcanzan el 15-17% v/v y 4.0 respectivamente.

Figura 1. Arroz koji (crecido con A. oryzae) para la producción de sake (Hakkaisan brewery ©HAKKAISAN).

Figura 2. Microorganismos involucrados en la fermentación del sake.

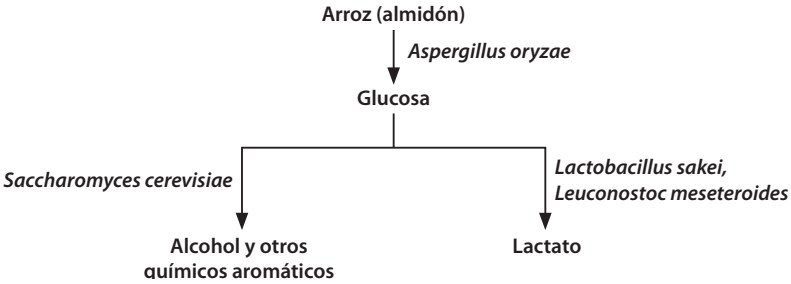


Figura 3. Superficie de la semilla de levadura de sake (Hakkaisan brewery ©HAKKAISAN).

Las burbujas son generadas por la producción de CO_2 por parte de S. cerevisiae.

Hay estudios que demuestran que la expresión de genes en la levadura *S. cerevisiae* se incrementa a 1012, representando un 15,9% del total de sus genes [1]. Los genes involucrados en este proceso están asociados a la respuesta al estrés, la organización de la pared celular, la biogénesis y el transporte de electrones, sugiriendo que podrían estar asociados a la tolerancia al alcohol de la levadura. Durante la fermentación alcohólica, *S. cerevisiae* también produce varios compuestos aromáticos, entre ellos el acetato de isoamilo, al cual se le atribuye el aroma característico del sake [2]. Esta sustancia es producida a partir del acetil-CoA y alcohol isoamílico por la levadura.

Los productos fermentados son habitualmente filtrados para remover las partículas de arroz remanentes, y el sake clarificado resultante es luego vendido en los mercados con o sin calentamiento posterior. Dicho calentamiento tiene la función de eliminar los microorganismos contaminantes que podrían producir amargor o cambios en el sabor y turbidez del producto final. Estos microorganismos podrían ser *Lactobacillus acetotolerans, L. fructivorans, L. hilgardii,* y *L. paracasei* [3, 4]. Los japoneses degustan el sake frío o tibio, y también lo utilizan en la preparación de platos japoneses típicos.

Estudios recientes arrojaron un poco de luz sobre las propiedades de cada uno de los microorganismos involucrados en la fermentación del sake. La caracterización genómica del *A. oryzae* reveló que su genoma contiene abundantes genes relacionados con el metabolismo, por ejemplo genes que codifican para enzimas amilolíticas y pectinolíticas, cuando se lo compara con el genoma de sus "parientes filogenéticos" [5]. El moho es también es un gran degradador de proteínas/péptidos y posee 134 peptidasas codificadas en su genoma, número muy superior al de otros Aspergillus [5]. Se cree que estas características serían clave para acelerar el uso biotecnológico de *A. oryzae* en numerosas fermentaciones de alimentos. El genoma de *S. cerevisiae*

cepa K7 para la producción de sake fue caracterizado en comparación con la cepa S288C de *S. cerevisiae,* de laboratorio. Dicha comparación mostró una gran similitud en el genoma de ambas cepas, pero diferencias en las regiones subteloméricas [6]. Este reporte podría implicar que la adecuación de *S. cerevisiae* para la producción de sake es dependiente de la cepa, no tanto por la presencia/ausencia de los genes correspondientes, sino por el perfil de expresión de los genomas.

II.B. Shochu

El *shochu* es una bebida espirituosa destilada tradicional japonesa, principalmente producida en la región sur Kyushu de Japón. Para la producción de *shochu* es prepara koji como se hace con el sake. El ingrediente de este *koji* generalmente es cebada, arroz o batata. Estos ingredientes son cocinados al vapor e inoculados con moho. Para ello se utilizan el moho-negro de Aspergillus awamori, o moho-blanco de Aspergilus kawachii, que taxonómicamente corresponden a *Aspergillus luchuensis* y *Aspergillus niger* [7] respectivamente. Estos mohos se utilizan para la hidrólisis del almidón de los ingredientes. Además, producen citrato, que contribuye a preservar el sustrato del crecimiento de microorganismos que podrían arruinarlo durante la fermentación. El koji es luego mezclado con agua y levaduras *S. cerevisiae* e incubado durante 7 a 10 días, para producir el inóculo de levaduras. El inóculo de levaduras es diluido en agua y el ingrediente principal cocinado al vapor (el que corresponda), e incubado durante 10 a 15 días para producir la fermentación alcohólica principal. Dichos ingredientes suelen ser arroz, cebada, batata o azúcar morena. Si el ingrediente principal suele es arroz o cebada, se utilizan esos mismos ingredientes para preparar el koji. En cambio, cuando el ingrediente principal es batata, el koji también puede producirse con cebada. Finalmente, cuando el ingrediente principal es azúcar morena, el koji se prepara con arroz.

Durante la fermentación, el citrato acumulado por el moho reduce el pH hasta cerca de 3-3,5 en el inóculo de levadura, y a 4-4,5 en las mezclas de fermentación alcohólica. Durante la fermentación alcohólica utilizando batata, puede observarse el crecimiento de *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. y *Lactococcus lactis* de manera espontánea [8]. Los LAB se han observado raramente en la fermentación alcohólica realizada utilizando cebada o arroz como ingredientes principales. Luego de la fermentación alcohólica, las mezclas son sometidas a una destilación simple con o sin presión reducida. Algunas veces se utiliza la destilación continua, aunque conduce a productos con menor aroma. Los productos destilados habitualmente tienen tiempos de envejecimiento que van desde unos pocos meses hasta años en vasijas de barro, tanques de acero inoxidable o barriles de jerez, con excepción del shochu preparado a partir de batata, que no se añeja tanto tiempo luego de la destilación. El shochu habitualmente es degustado con hielo, luego de la dilución con agua, o con agua caliente.

II.C. Awamori

El awamori es una bebida destilada espirituosa tradicional japonesa, solamente producida en el área de Okinawa, en las pequeñas islas del sur de Japón. Tal como ocurre con el sake y el shochu, la producción del awamori comienza con la preparación del koji. En este caso, el koji se prepara únicamente con arroz. Para ello se utiliza el moho negro de *Aspergillus awamori,* que también se utiliza para la hidrólisis del almidón del arroz cocinado al vapor. La fermentación se realiza por 2 a 3 semanas. A diferencia del shochu, la fermentación del awamori no posee una etapa previa de preparación de un inóculo de levadura, y tampoco se agregan otros ingredientes. Las mezclas fermentadas habitualmente son destiladas sin presión reducida. Los productos son luego añejados en vasijas de barro o tanques de acero inoxidable durante años. El awamori generalmente se degusta con hielo, luego de la dilución con agua, o con agua caliente.

II.D. Bebidas alcohólicas de China y Corea del Sur

El makgeolli, también llamado takju, es una bebida alcohólica turbia tradicional de origen coreano, producida a partir de arrox y trigo. La producción del Makgeolli también tiene un paso incial de preparación de koji. El arroz y/o trigo, junto con *Aspergillus* spp. son utilizados para la producción de ese koji. Este, luego, es diluido en agua, y esa dilución es fermentada por *S. cerevisiae*. El producto fermentado habitualmente contiene entre 6 y 8% de etanol. Los lactobacilos que crecen espontáneamente contribuyen a la producción de lactato y ciertos compuestos aromáticos. El producto está disponible en mercados, en forma de una bebida turbia, y usualmente se lo consume frío.

El huangjiu, también llamado vino amarillos, es el más famoso de los vinos chinos, principalmente hecho de arroz. El Huangjiu también emplea koji en su preparación, pero se lo llama gu. Ese gu está hecho a partir de trigo molido y contiene *Aspergillus oryzae, Rhizopus oryzae,* y *Rhizopus microsporus* como agentes para la hidrólisis del almidón [9]. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es la responsable de la fermentación alcohólica, y durante ese proceso se acumula 14 a 18% de etanol en el producto final. *Saccharopolyspora* da cuenta de la mayor población de microorganismos en la fermentación del huangjiu, y la abundancia relativa de este género se incrementa durante la fermentación [10]. Estudios metagenómicos sugieren que este microorganismo posiblemente contribuye a la formación del sabor durante la fermentación del huangjiu, junto con las bacterias -ácido-lácticas y otros microorganismos. El huangjiu usualmente se degusta frío o tibio, y se emplea para preparar numerosos platos de comida tradicionales chinos.

III. Condimientos fermentados

Japón tiene un rico repertorio de condimentos fermentados tradicionales, que son esenciales para preparar numerosos platos japoneses. Estos condimentos tienen largas historias, de más de 1000 años. En general, son producidos a partir de cereales y porotos de soja. Tal como ocurre con las bebidas alcohólicas, la producción de muchos de estos condimentos fermentados comienza con la producción de koji, utilizando moho. Estos mohos están disponibles en negocios especializados en la provisión de microorganismos iniciadores, en la forma de arroz con moho ya crecido, y las levaduras involucradas en la fermentación están disponibles en la Brewing Society de Japón, en la forma de productos deshidratados, cultivos activos o inóculos.

III.A. Miso (pasta de porotos de soja)

El miso es una pasta de porotos de soja utilizada en numerosos platos en Japón. La producción de miso también comienza con la preparación de koji. Los ingredientes de este koji pueden ser arroz, trigo, cebada o porotos de soja. El *Aspergillus oryzae* es el microorganismo de elección para realizar la hidrólisis de los almidones presentes en el koji. El koji es luego mezclado con sal, una pequeña cantidad de agua, la levadura *Zygosaccharomyces rouxii* [11] y porotos de soja cocinados al vapor y prensados, para dar lugar a la fermentación durante varios meses (de 2 a 6). La concentración de sal es generalmente del 10 al 13% (p/v); tal concentración de sal en los productos constituye una preocupación en torno a la salud de la población, especialmente en personas con hipertensión, y por eso existen variantes de este producto con baja concentración de sal (8 a 10%), que se han vuelto populares en las últimas dos décadas. Las razones para las elevadas concentraciones de sal, son que estas cantidades son inhibidores fuertes del crecimiento de microorganismos. El koji y la levadura son seleccionados de manera que toleren dicha concentración salina. El *Tetragenococcus halophilus,* un LAB halófilo también está involucrado en la fermentación [12], contribuyendo al desarrollo del sabor en el producto final. El miso es un ingrediente principal de la sopa de miso, una sopa tradicional y popular en Japón, y los japoneses tradicionalmente toman esta sopa al menos una vez al día. El miso también se emplea para preparar los fideos ramen en sopa saborizada con miso (el ramen puede prepararse con distintos sabores acompañantes), y algunas veces también se lo emplea para saborizar carnes, pescados y vegetales. El consumo promedio de miso en Japón es de 1,8 kilos, por persona, por año (datos de 2016).

III.B. Shoyu (salsa de soja)

La shoyu es una salsa tradicional fermentada japonesa de soja, preparada a partir de porotos de soja, trigo, sal y agua. El proceso de fermentación de la shoyu también implica la preparación de koji. Los porotos de soja y el trigo son cocinados al vapor,

mezclados e incoulados con moho de koji, preparado con *Aspergillus sojae* o *A. oryzae*. Estos dos mohos tienen actividades de peptidasa similares, pero se diferencian en su contenido de enzimas amilo-líticas. El *Aspergillus sojae* posee actividades amilolíticas relativamente débiles, en relación con el *A. oryzae*. Esta actividad más débil en *Aspergillus sojae* puede deberse a un menor número de copias de los genes que codifican para las amilasas, en su genoma [13], cuando se lo compara con el genoma de *A. oryzae*. El koji se coloca en salmuera y fermentado por 6 a 8 meses. Esta salmuera contiene 14 a 18% (p/v) de cloruro de sodio. Durante dicha fermentación, la levadura halófilas *Z. rouxii* y el LAB *T. halophilus* son inoculados como microorganismos iniciadores. La levadura produce una proporción importante de la sustancia que da el sabor característico a la shoyu, el 4-hidroxy-2-etil-5-metil-2(2h)-furanona [14], que también tiene importantes propiedades antioxidantes y anticarcinogénicas [15]. El *T. halophilus* contribuye a la bipreservación y el sabor del shoyu, por asimilación de carbohidratos y aminoácidos, y por la producción de lactato. La coexistencia de estos microorganismos tiene impacto en los perfiles de producción de compuestos volátiles durante la fermentación [16]. Los productos fermentados son prensados para preparar el jugo shoyu. Dicho jugo es luego calentado para matar los microorganismos, y luego filtrado para obtener un producto clarificado. La shoyu es empleada para preparar numerosos platos en Japón, incluyendo la saborización de sopas (entre ellas, la sopa de fideos ramen saborizada con shoyu), vegetales cocidos, pescados cocidos, carnes cocidas, natto (porotos de soja cuya preparación se describe más adelante en este capítulo), etc. La shoyu es también importante en la degustación de sushi y sashimi. El consumo promedio de shoyu en Japón fue de 2,5 litros por persona, por año, en 2016.

III.C. Kurozu (kurosu)

El kurozu es un vinagre de arroz tradicional, producido en el área de Kagoshima, una región al sur de Japón. El proceso de producción de kurozu comienza también con la preparación de koji. El ingrediente primordial del koji es arroz no pulido, que también es utilizado para ser inoculado con el moho de *A. oryzae,* luego de su cocción al vapor. El arroz con el moho ya crecido es puesto luego en vasijas y cubierto con más arroz cocido al vapor, agua y koji. El *A. oryzae* hidroliza el almidón de maíz en glucosa, y esta es luego convertida en alcohol y lactato por la levadura *S. cerevisiae* y los lactobacilos, respectivamente. El alcohol es posteriormente transformado en acetato por el *Acetobacter pasteurianus* [17]. Estas tres etapas se producen de manera simultánea en vasijas de barro dejadas a la intemperie. La levadura, los LAB y las bacterias ácido-acéticas involucradas en la fermentación no son inoculadas como iniciadores, sino que son "habitantes" de las vasijas, a causa de su permanente uso en la producción de este vinagre. La fermentación toma entre 6 y 8 meses, y los productos fermentados son añejados luego en las mismas vasijas de barro por 1 o 2 años, también a la intemperie. El proceso de añejamiento cambia el sabor y el color final

del producto; los productos bien añejados son de color ámbar oscuro. El kurozu es utilizado para sazonar carnes y también para preparar un jugo, cuando se lo mezcla con miel y frutas. Los beneficios del kurozu para la salud son la prevención de la colitis, la inhibición del crecimiento tumoral y el mejoramiento de la disfunción cognitiva, según estudios en animales [18-20].

III.D. Condimentos fermentados en China y Corea del Sur

China y Corea del Sur también tiene numerosos condimentos fermentados tradicionales, que son importantes para la cultura de preparación de alimentos en esos países. El douchi, el tianmianjiang y el doubanjiang son los más importantes condimentos fermentados en pasta, de China, y están hechos esencialmente de porotos de soja [21]. El gochujang y el doenjang son los condimentos en pasta fermentados tradicionales más populares en Corea, y están hechos principalmente de porotos de soja, con o sin el agregado de pimientos rojos [21]. Estos son esenciales para la preparación de platos Coreanos tradicionales. Al igual que ocurre con el miso en Japón, sus fermentaciones generalmente se realizan por una combinación de mohos, levaduras y bacterias (LAB y otras) [22-24] a excepción del douchi, que algunas veces se prepara sin utilizar moho [25].

IV. Vegetales fermentados

IV.A. Vegetales fermentados únicos de Japón

Hay numerosos tipos de vegetales fermentados en Japón. Entre ellos, están el nozawanazuke (hecho de nozawana), el takanazuke (hecho de takana), el shibazuke (hecho de berenjenas, pepinos y albahaca roja japonesa), el sugukiduke (hecho de hojas, brotes y frutas de nabo), el hiroshimanazuke (hecho de hiroshimana), el sunki (hecho de hojas, y brotes de nabo rojo) (ver Figura 4.a), el shakushinazuke (hecho de shakushina), etc. Generalmente, cada uno de ellos es característico de una región de Japón. El nozawana, takana, hiroshimana y shakusina son vegetales locales cultivados únicamente en regiones específicas de Japón, y son todos de la familia *Brassicaceae* de vegetales. La fermentación se realiza de manera espontánea, y están invoucradas varias especies de LAB. Los LAB contribuyen a un sabor levemente agrio y a la prevención del crecimiento de microorganismos que pudieran arruinar el producto.

De los vegetales fermentados, el sunki se distingue de los demás porque su producción se realiza sin sal. La sal es importante para la producción de vegetales, para extraer agua y nutrientes de las células del vegetal por presión osmótica, lo que facilita el crecimiento de los LAB. Durante la producción del sunki, las hojas de nabo rojo

son blanqueadas y prensadas para extraer los nutrientes que luego permiten el crecimiento de los LAB. El sunki es un vegetal fermentado muy interesante, porque en su producción predomina el *Lactobacillus delbrueckii* [26, 27]. Esta especie generalmente se la considera como un lactobacilo propio de la fermentación de productos lácteos. Estos vegetales fermentados son luego consumidos como acompañamiento, sin calentamiento previo.

El nukaduke (ver Figura 4.b) y el hakusaizuke (hecho de repollo chino) son los vegetales fermentados más populares en todo el área de Japón. La producción del nukaduke comienza con la producción del nukadoko, que es una mezcla de salvado de arroz fermentado. Inicialmente, el salvado de arroz es mezclado con salmuera (5-10 % p/v de sal), y varios vegetales (principalmente berenjenas, pepinos, zanahorias, nabos, etc) se colocan en una pasta de salmuera de salvado de arroz, y mantenido varias semanas para preparar un nukadoko bien madurado. Durante este tiempo, los vegetales fermentados son retirados, y se agregan vegetales frescos dentro del nukadoko, cada 2 o 3 días, para proporcionar nutrientes para el crecimiento bacteriano. El nukadoko bien madurado es luego utilizado para la preparación del nukaduke. Los vegetales son colocados en el nukadoko y fermentados por 1 a 2 días. Luego son enjuagados con agua, y consumidos como acompañamientos. En el nukadoko, los lactobacilos crecen espontáneamente, y tienen roles importantes para desarrollar el sabor y la agriedad características del nukaduke. Varias especies de LAB pueden ser encontradas en la superficie de los vegetales, pero los que predominan son siempre lactobacilos. Esto podría ser una consecuencia de la tolerancia natural de los lactobacilos a la acidez. De hecho, el lactobacilo mayoritario en el nukadoko maduro es el *Lactobacillus acetotolerans,* que es tolerante al ácido [28, 29].

Figura 4. Foto de sunki fermentado (a) y nukaduke (nabos y pepinos) en el nukadoko (b).

Los vegetales del nukaduke habitualmente se cubren completamente con nukadoko (mezcla de salvado de arroz fermentado).

La mayoría de los países del este asiático (a excepción de Mongolia) tienen una historia relativamente corta de consumo de productos lácteos; esta historia tiene tan solo 100 años en Japón. Por el contrario, los vegetales fermentados tienen una tradición en la dieta japonesa que supera los 1300 años. Los vegetales fermentados propiamente dichos, o en jugos, habitualmente contienen 106 a 108 células de LAB viables por gramo o por mililitro. Esto significa que los vegetales fermentados pero no los productos lácteos han sido fuentes de consumo de LAB viables en la historia de Japón. Se sabe que los LAB presentes en productos lácteos y vegetales fermentados son muy diferentes entre sí, en cuanto a sus especies. Por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus, L. helveticus, L. kefiranofaciens, L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, L. delbrueckii* subsp. *lactis, L. paracasei* y *Lactococcus lactis* son representativos de los LAB presentes en productos lácteos, y varios lactobacilos (incluyendo *Lactobacillus sakei, L. curvatus, L. fermentum, L. plantarum, L. brevis,* etc.), así como *Leuconostoc* spp. y *Pediococcus* spp. son los LAB mayoritarios de los vegetales. Estos LAB originalmente encontrados en vegetales fermentados son ahora utilizados como candidatos probióticos en productos lácteos y no lácteos [30,31].

IV.B. Vegetales fermentados de China y Corea del Sur

El kimchi es el vegetal fermentado tradicional más popular de Corea del Sur, y está hecho principalmente de repollo chino como el ingrediente principal, con varias especias, incluyendo polvo de pimiento rojo, ajo y jengibre, con o sin pescado fermentado. La producción del kimchi habitualmente implica una etapa de fermentación espontánea y se ha reportado que varios *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., y *Weissella* spp están involucrados en este proceso [32]. El zha cai y el suan tsai son vegetales tradicionales fermentados en China y Taiwán, y están hechos de brotes y hojas de la planta de mostaza, respectivamente. Los microorganismos involucrados mayoritariamente en estas fermentaciones son *Lactobacillus* spp. y *Leuconostoc* spp., y en menor medida *Weissella* spp. [33].

V. Otros

Hay numerosos otros alimentos fermentados que se producen en Japón. El natto, por ejemplo, es un producto tradicional y popular producido a partir de porotos de soja fermentados. Originalmente se lo producía poniendo porotos cocinados al vapor en espigas de arroz hervidas. Estas espigas eran cerradas e incubadas por 1 día. Los microbios de las espigas generalmente mueren con el hervor (de aproximadamente 15 minutos), mientras que solamente el *Bacillus subtilis,* un microorganismo formador de esporas, sobrevive en esas condiciones. Dicho microorganismo fermenta espontáneamente los porotos de soja contenidos en las espigas, resultando en un producto final pegajoso. El natto recientemente ha comenzado a ser producido

por la inoculación de cultivos puros de *Bacillus subtilis* en porotos de soja cocinados al vapor, en contenedores plásticos. El natto contiene varios compuestos bioactivos, incluyendo vitaminak y nattokinasa. La nattokinasa es considerada un aditivo alimentario funcional promisorio para tratar enfermedades cardiovasculares [34].

El kusaya es un producto de pescado deshidratado, producido únicamente en las islas Izu de Japón. Para su preparación, los pescados son embebidos en jugo de kusaya, lavados delicadamente con agua y secados al sol. El jugo de kusaya se produce con salmuera (5-15 % p/v de sal), remojando los filetes de pescado. El jugo de kusaya no se descarta, sino que se conserva por el agregado de salmuera fresca, llegando a durar años. A diferencia de la microbiota en otros alimentos fermentados, los LAB no son la población mayoritaria en el jugo de kusaya. La microbiota cambia considerablemente según la isla, siendo que en algunos casos domina el *Halanaerobium* spp., mientras que en otros *Tissierella* spp. [35]. La microbiota produce fuertes olores que se transfieren fácilmente a los productos finales. Los pescados más habitualmente utilizados son la macarela plátano (Decapterus muroadsi) o los peces voladores (Cypselurus agoo). Los peces preparados en el kusaya son luego grillados y comidos como acompañamiento.

El goishicha y el awabancha son hojas de te fermentadas por microorganismos en la isla de Shikou, de Japón. Para la producción del goishicha, hojas frescas de te son cocidas al vapor, y parcialmente descompuestas por moho (por el hongo *Aspergillus* spp., que tiene actividad celulasa), y luego fermentadas durante varias semanas y secadas al sol (ver Figura 5). La producción de awabancha tiene pasos similares, conexcepción de que la descomposición de las hojas no ocurre por moho, sino que es reemplazada por una máquina. Los microbios más representativos durante la fermentación son *Lactobacillus plantarum* y *L. vaccinostercus* [36]. Como consecuencia de los largos períodos de fermentación por lactobacilos, los productos finales contienen grandes cantidades de lactato y acetato, resultando en productos muy agrios. Los productos son luego bebidos como tés enriquecidos en posbióticos.

Figura 5. Goishicha fermentada antes (a) y durante el secado (b).

El Narezushi es una comida fermentada preparada a partir de arroz y pescado tratado con sal y vinagre, y es una comida precursora del sushi moderno. Varias especies de pescado son empleadas para su producción, incluyendo caballa, jurel y ayu. La fermentación habitualmente toma 1 a 3 meses, y el producto final contiene células de LAB viables entre 106 a 107 UFC/gramo. El lactato y el acetato son los ácidos orgánicos mayoritarios en los productos finales. Las tecnologías de Secuenciación de Nueva Generación (NGS) revelaron que los *Lactobacillus* spp. son dominantes durante el período de fermentación, y que *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* también tienen su cuota de participación [37]. El *Clostridium* sp. también fue detectado en una proporción minoritaria (con una abundancia relativa de aproximadamente el 6% al día 7 de fermentación), aunque su impacto no ha sido estudiado todavía. El producto fermentado es consumido como acompañamiento en platos sin calentar, lo que implica que es una rica fuente de LAB viables.

VI. Conclusiones

Como se describió antes, are numerosos alimentos fermentados tradicionales en Japón. Estos son consumidos como acompañamientos (principalmente vegetales fermentados), como aderezos de otros platos (fundamentalmente los condimentos fermentados, como el natto, kusaya y narezushi), y como bebidas (principalmente alcohólicas, hojas de té fermentadas y kurozu). Todos estos productos suelen contener grandes cantidades de microorganismos tanto viables como muertos. En Japón, el consumo de productos lácteos es relativamente reciente, sugiriendo que la introducción de probióticos y posbióticos ha ocurrido de la mano de alimentos fermentados y no de productos lácteos. La dieta habitual típica de los japoneses, contiene numerosos alimentos fermentados; los beneficios de estos alimentos tradicionales (especialmente aquellos preparados con porotos de soja) han sido parcialmente sugeridos [38, 39]. No obstante, se necesitan más estudios para caracterizar en detalle los beneficios de salud que estos alimentos fermentados pueden proporcionar.

VII. Declaración de posibles conflictos de interés

Los autores no declaran poseer conflictos de interés.

VIII. Bibliografía citada

[1] Wu H, Zheng X, Araki Y, Sahara H, Takagi H, Shimoi H. 2006. Global gene expression analysis of yeast cells during sake brewing. Appl Environ Microbiol 72:7353-7358.

[2] Takahashi T, Ohara Y, Sawatari M, Sueno K. 2017. Isolation and characterization of sake yeast mutants with enhanced isoamyl acetate productivity. J Biosci Bioeng 123:71-77.

[3] Taniguchi M, Ishiyama Y, Takata T, Nakanishi T, Kaneoke M, Watanabe K, Yanagida F, Chen YS, Kouya T, Tanaka T. 2010. Growth-inhibition of hiochi bacteria in namazake (raw sake) by bacteriocins from lactic acid bacteria. J Biosci Bioeng 109:570-575.

[4] Toh H, Morita H, Tsuji H, Iwashita K, Goto N, Nakayama J, Sekine M, Kato Y, Suzuki K, Fujita N. 2015. Complete genome sequence of Lactobacillus acetotolerans RIB 9124 (NBRC 13120) isolated from putrefied (hiochi) Japanese sake. J Biotechnol 214:214-215.

[5] Kobayashi T, Abe K, Asai K, Gomi K, Juvvadi PR, Kato M, Kitamoto K, Takeuchi M, Machida M. 2007. Genomics of Aspergillus oryzae. Biosci Biotechnol Biochem 71:646-670.

[6] Ogihara F, Kitagaki H, Wang Q, Shimoi H. 2008. Common industrial sake yeast strains have three copies of the AQY1-ARR3 region of chromosome XVI in their genomes. Yeast 25:419-432.

[7] Hong SB, Lee M, Kim DH, Varga J, Frisvad JC, Perrone G, Gomi K, Yamada O, Machida M, Houbraken J, Samson RA. 2013. Aspergillus luchuensis, an industrially important black Aspergillus in East Asia. PLoS One 8:e63769.

[8] Endo A, Okada S. 2005. Monitoring the lactic acid bacterial diversity during shochu fermentation by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, p 216-221, J Biosci Bioeng, vol 99, Japan.

[9] Mo X, Xu Y, Fan W. 2010. Characterization of aroma compounds in Chinese rice wine Qu by solvent-assisted flavor evaporation and headspace solid-phase microextraction. J Agric Food Chem 58:2462-2469.

[10] Liu S, Chen Q, Zou H, Yu Y, Zhou Z, Mao J, Zhang S. 2019. A metagenomic analysis of the relationship between microorganisms and flavor development in Shaoxing mechanized huangjiu fermentation mashes. Int J Food Microbiol 303:9-18.

[11] Sujaya IN, Tamura Y, Tanaka T, Yamaki T, Ikeda T, Kikushima N, Yata H, Yokota A, Asano K, Tomita F. 2003. Development of internal transcribed spacer regions amplification restriction fragment length polymorphism method and its application in monitoring the population of Zygosaccharomyces rouxii M2 in miso fermentation. J Biosci Bioeng 96:438-447.

[12] Kumazawa T, Nishimura A, Asai N, Adachi T. 2018. Isolation of immune-regulatory Tetragenococcus halophilus from miso. PLoS One 13:e0208821.

[13] Sato A, Oshima K, Noguchi H, Ogawa M, Takahashi T, Oguma T, Koyama Y, Itoh T, Hattori M, Hanya Y. 2011. Draft genome sequencing and comparative analysis of Aspergillus sojae NBRC4239. DNA Res 18:165-176.

[14] Kataoka S. 2005. Functional effects of Japanese style fermented soy sauce (shoyu) and its components. J Biosci Bioeng 100:227-234.

[15] Nagahara A, Benjamin H, Storkson J, Krewson J, Sheng K, Liu W, Pariza MW. 1992. Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by a principal flavor component of Japanese-style fermented soy sauce. Cancer Res 52:1754-1756.

[16] Devanthi PVP, Linforth R, Onyeaka H, Gkatzionis K. 2018. Effects of co-inoculation and sequential inoculation of Tetragenococcus halophilus and Zygosaccharomyces rouxii on soy sauce fermentation. Food Chem 240:1-8.

[17] Nanda K, Taniguchi M, Ujike S, Ishihara N, Mori H, Ono H, Murooka Y. 2001. Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (komesu) and unpolished rice vinegar (kurosu) produced in Japan. Appl Environ Microbiol 67:986-990.

[18] Kanouchi H, Kakimoto T, Nakano H, Suzuki M, Nakai Y, Shiozaki K, Akikoka K, Otomaru K, Nagano M, Matsumoto M. 2016. The Brewed Rice Vinegar Kurozu Increases HSPA1A Expression and Ameliorates Cognitive Dysfunction in Aged P8 Mice. PLoS One 11:e0150796.

[19] Fukuyama N, Jujo S, Ito I, Shizuma T, Myojin K, Ishiwata K, Nagano M, Nakazawa H, Mori H. 2007. Kurozu moromimatsu inhibits tumor growth of Lovo cells in a mouse model in vivo. Nutrition 23:81-86.

[20] Shizuma T, Ishiwata K, Nagano M, Mori H, Fukuyama N. 2011. Protective effects of Kurozu and Kurozu Moromimatsu on dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. Dig Dis Sci 56:1387-1392.

[21] Kwon YS, Lee S, Lee SH, Kim HJ, Lee CH. 2019. Comparative Evaluation of Six Traditional Fermented Soybean Products in East Asia: A Metabolomics Approach. Metabolites 9.

[22] Yang L, Yang HL, Tu ZC, Wang XL. 2016. High-Throughput Sequencing of Microbial Community Diversity and Dynamics during Douchi Fermentation. PLoS One 11:e0168166.

[23] Li Z, Rui J, Li X, Li J, Dong L, Huang Q, Huang C, Wang Z, Li L, Xuan P, Tang Y, Chen F. 2017. Bacterial community succession and metabolite changes during doubanjiang-meju fermentation, a Chinese traditional fermented broad bean (Vicia faba L.) paste. Food Chem 218:534-542.

[24] Jo YJ, Cho IH, Song CK, Shin HW, Kim YS. 2011. Comparison of fermented soybean paste (Doenjang) prepared by different methods based on profiling of volatile compounds. J Food Sci 76:C368-379.

[25] Fan J, Zhang Y, Chang X, Saito M, Li Z. 2009. Changes in the radical scavenging activity of bacterial-type douchi, a traditional fermented soybean product, during the primary fermentation process. Biosci Biotechnol Biochem 73:2749-2753.

[26] Endo A, Mizuno H, Okada S. 2008. Monitoring the bacterial community during fermentation of sunki, an unsalted, fermented vegetable traditional to the Kiso area of Japan, p 221-226, Lett Appl Microbiol, vol 47, England.

[27] Kudo Y, Oki K, Watanabe K. 2012. Lactobacillus delbrueckii subsp. sunkii subsp. nov., isolated from sunki, a traditional Japanese pickle. Int J Syst Evol Microbiol 62:2643-2649.

[28] Sakamoto N, Tanaka S, Sonomoto K, Nakayama J. 2011. 16S rRNA pyrosequencing-based investigation of the bacterial community in nukadoko, a pickling bed of fermented rice bran. Int J Food Microbiol 144:352-359.

[29] Nakayama J, Hoshiko H, Fukuda M, Tanaka H, Sakamoto N, Tanaka S, Ohue K, Sakai K, Sonomoto K. 2007. Molecular monitoring of bacterial community structure in long-aged nukadoko: pickling bed of fermented rice bran dominated by slow-growing lactobacilli. J Biosci Bioeng 104:481-489.

[30] Endo A, Sasaki F, Maeno S, Kanesaki Y, Hamaguchi Y, Torres GA, Tomita S, Nakagawa J. 2018. In vitro and in silico characterisation of Lactobacillus paraplantarum D2-1, a starter culture for soymilk fermentation. Int J Food Sci Nutr 69:857-869.

[31] Yakabe T, Moore EL, Yokota S, Sui H, Nobuta Y, Fukao M, Palmer H, Yajima N. 2009. Safety assessment of Lactobacillus brevis KB290 as a probiotic strain. Food Chem Toxicol 47:2450-2453.

[32] Patra JK, Das G, Paramithiotis S, Shin HS. 2016. Kimchi and Other Widely Consumed Traditional Fermented Foods of Korea: A Review. Front Microbiol 7:1493.

[33] Chao SH, Wu RJ, Watanabe K, Tsai YC. 2009. Diversity of lactic acid bacteria in suan-tsai and fu-tsai, traditional fermented mustard products of Taiwan. Int J Food Microbiol 135:203-210.

[34] Murakami K, Yamanaka N, Ohnishi K, Fukayama M, Yoshino M. 2012. Inhibition of angiotensin I converting enzyme by subtilisin NAT (nattokinase) in natto, a Japanese traditional fermented food. Food Funct 3:674-678.

[35] Fujii T, Kyoui D, Takahashi H, Kuda T, Kimura B, Washizu Y, Emoto E, Hiramoto T. 2016. Pyrosequencing analysis of the microbiota of kusaya gravy obtained from Izu Islands. Int J Food Microbiol 238:320-325.

[36] Dellaglio F, Vancanneyt M, Endo A, Vandamme P, Felis GE, Castioni A, Fujimoto J, Watanabe K, Okada S. 2006. Lactobacillus durianis Leisner et al. 2002 is a later heterotypic synonym of Lactobacillus vaccinostercus Kozaki and Okada 1983, p 1721-1724, Int J Syst Evol Microbiol, vol 56, England.

[37] Kiyohara M, Koyanagi T, Matsui H, Yamamoto K, Take H, Katsuyama Y, Tsuji A, Miyamae H, Kondo T, Nakamura S, Katayama T, Kumagai H. 2012. Changes in microbiota population

during fermentation of narezushi as revealed by pyrosequencing analysis. Biosci Biotechnol Biochem 76:48-52.

[38] Nozue M, Shimazu T, Sasazuki S, Charvat H, Mori N, Mutoh M, Sawada N, Iwasaki M, Yamaji T, Inoue M, Kokubo Y, Yamagishi K, Iso H, Tsugane S. 2017. Fermented Soy Product Intake Is Inversely Associated with the Development of High Blood Pressure: The Japan Public Health Center-Based Prospective Study. J Nutr 147:1749-1756.

[39] Uemura H, Katsuura-Kamano S, Nakamoto M, Yamaguchi M, Fujioka M, Iwasaki Y, Arisawa K. 2018. Inverse association between soy food consumption, especially fermented soy products intake and soy isoflavone, and arterial stiffness in Japanese men. Sci Rep 8:9667.

3

Introducción a la microbiota intestinal: su rol en la salud y la enfermedad

Gonzalo Pérez Marc
gonzaloperezmarc@gmail.com

- *Médico (UBA)*
- *Especialista en Clínica Pediátrica*
- *Especialista en Medicina del Deporte*
- *Magíster en Economía y Gestión de Salud*

Resumen

Las interacciones entre los seres humanos y los microorganismos representan una parte central de una gran variedad de procesos fisiológicos y metabólicos. El intestino está adaptado al intercambio bidireccional entre el huésped y su microbiota, la cual está compuesta por una comunidad de miles de millones de microorganismos. Tan solo la cantidad de bacterias residentes en el intestino ya supera en número a las células somáticas y germinales humanas en más de diez veces, a la vez que representa un genoma microbiano combinado muy superior al genoma humano. En la actualidad, se han utilizado enfoques moleculares de estudio de los microorganismos para examinar en detalle la individualidad y la estabilidad de la microbiota intestinal (MBTi), permitiéndonos avanzar en su conocimiento como nunca antes.

La MBTi comienza a formarse desde el vientre materno, y se fortalece y diversifica principalmente en los primeros 1000 días de vida, durante los cuales la genética, la forma de nacimiento, la lactancia materna y la inclusión de alimentos sólidos cumplen un rol central e insustituible. Esa MBTi irá madurando, modificándose y envejeciendo a lo largo de la vida del huésped, acompañándolo como una "firma personal dinámica" que, más allá de los cambios y agresiones, siempre conservará características establecidas durante los dos primeros años de vida.

La MBTi cumple una variedad de funciones similares a las de un órgano más del cuerpo humano. Esta especie de "órgano difuso" forma una unidad estructural que está encargada del cumplimiento de

determinadas funciones, en el seno de un organismo multicelular; en este caso, cada uno de nosotros. Su actividad genera siempre algún impacto –positivo o negativo– para la salud, pudiendo ser, en caso de disbiosis, causa primaria y secundaria de muchas enfermedades. En ese sentido, la cantidad y diversidad de sus microorganismos son decisivos: una microbiota diversa es una microbiota saludable. Una dieta saludable y variada que incluya alimentos fermentados y fibra, el ejercicio y el contacto con la naturaleza, el parto vaginal y la lactancia materna, así como el uso racional de antibióticos, son las estrategias más favorables para el mantenimiento de una MBTi fuerte, algo esencial para nuestra salud.

I. Introducción

Quizás sea el momento de reivindicar a los gérmenes. Estamos habituados a despreciarlos, porque solo los reconocemos como causantes de infecciones, asociados a una gran variedad de enfermedades o al deterioro de alimentos. Sin embargo, el avance de la ciencia y una mirada contemporánea acerca de la salud y la enfermedad nos han acercado –especialmente durante la última década– a una perspectiva diferente, en la que los gérmenes comenzaron a ser considerados socios de ese huésped que cada uno de nosotros es. Porque a lo largo de nuestro camino evolutivo los seres humanos hemos ido estableciendo y fortaleciendo una relación simbiótica con múltiples microorganismos. Esta relación ha sido beneficiosa para ambos, al punto de que hoy sabemos que una variedad enorme de ellos actúa a diversos niveles, favoreciendo nuestra inmunidad y regulando una variedad previamente impensada de funciones fisiológicas y metabólicas. Hoy existe una abrumadora evidencia científica que permite derrumbar el prejuicio que hemos tenido durante muchísimos años respecto de los microorganismos en general. Prejuicio insostenible cuando verificamos que la convivencia con ellos nos proporciona claros beneficios para la salud. A ese conjunto de microorganismos que se encuentran generalmente asociados a tejidos sanos del cuerpo humano (piel, mucosa, etc.), y que residen en estos lugares en forma más o menos permanente, se los denomina "microbiota". En su mayoría realizan funciones específicas en todos los sitios en los que se distribuyen, pero se encuentran en mayor cantidad y complejidad a nivel del aparato gastrointestinal. Esta es la "microbiota intestinal" (MBTi), la que, al igual que el resto de la microbiota, responde sensiblemente tanto a cambios endógenos como exógenos. Por eso podemos afirmar que somos un ecosistema que incluye millones de gérmenes en equilibrio con el huésped que los alberga. Y esta relación no es de ninguna manera estática, sino que va construyéndose y evolucionando a lo largo del tiempo. Desde el nacimiento hasta la muerte, la microbiota va transformándose, diversificándose y estabilizándose, para finalmente envejecer.

II. La microbiota intestinal, un órgano único

Podríamos pensar, entonces, a la MBTi como a un órgano más de nuestro cuerpo. Al fin y al cabo, es una agrupación de seres vivos que, a nivel de diversos tejidos, conforman una unidad estructural encargada del cumplimiento de determinadas funciones, en el seno de un organismo multicelular; en este caso, cada uno de nosotros. Además, su actividad genera siempre algún impacto –positivo o negativo– para la salud, siendo causa primaria y secundaria de ciertas enfermedades, a la vez que presenta cambios fenotípicos con ontogenia desde el nacimiento hasta la muerte [1, 2]. La MBTi no solo está involucrada en funciones anatómicas y fisiológicas, sino que tiene un funcionamiento característico que evoluciona a lo largo del tiempo. Como todo otro órgano, la MBTi madura, se estabiliza y envejece.

Como todo otro órgano, también actúa en el marco de un aparato (gastrointestinal) y un sistema (digestivo-metabólico-inmunológico). Su actividad colectiva podría representar a la de un órgano virtual dentro de un órgano real, en este caso, el intestino [3, 4]. Una mejor comprensión suya revelaría funciones y características significativas para la salud humana, así como acerca de múltiples procesos de enfermedades infecciosas, inflamatorias y neoplásicas. Este órgano compuesto por microorganismos, en su estructura y composición revela la selección natural tanto a nivel microbiano como del huésped, promoviendo la cooperación mutua y la estabilidad funcional de un complejo ecosistema. Doscientos millones de años de coevolución mamífero-microbiana han llevado a esta interdependencia. Como resultado, la microbiota intestinal hoy juega un papel crítico en la maduración y la modulación continua de la respuesta inmune del huésped. Una amplia variedad de ensayos moleculares ha permitido detectar y clasificar a una gran cantidad de los microorganismos que componen a la MBTi, así como a sus productos génicos y los genes codificados. Los resultados mostraron que los microorganismos rara vez existen de forma aislada. En general lo hacen en comunidades microbianas complejas que interactúan entre sí, que pueden abarcar múltiples especies de gérmenes en interdependencia, y todo en el marco de un mismo hábitat [5].

Hoy es evidente que prácticamente todos los hábitats y todos los organismos del planeta tienen su propia microbiota. Esto incluye al "holobionte" humano, que es el conglomerado compuesto por el ser humano en tanto organismo multicelular y todas las células microbianas que lo habitan, y cuyo contenido genómico está influenciado por la topografía y la individualidad biológica. No hay que confundir a este con el "microbioma", que es, en su definición más sucinta, el conjunto de genomas de la microbiota. Este microbioma supera los 10 millones de genes, aportando una multiplicidad de funciones que no están codificadas en el genoma humano. Esta asociación biológica tan clara entre el huésped y su microbiota abre la puerta a la comprensión del ser humano, no solo en tanto holobionte, sino también como unidad de selección en la evolución, teoría que se basa en cuatro generalizaciones:

1. Todos los animales y plantas establecen relaciones simbióticas (estrechas y de larga duración entre especies) con microorganismos.

2. Los microorganismos simbióticos son transmitidos de una generación a la siguiente.

3. La asociación entre huésped y simbiontes afecta la adecuación biológica del holobionte en su ambiente (por ejemplo, su reproducción).

4. La variación en el hologenoma está ligada tanto a los cambios en el genoma del hospedero como al de la microbiota; bajo condiciones de estrés ambiental, la comunidad microbiana simbiótica puede cambiar rápidamente [6].

Una posición científica de este tipo propicia la aceptación del ser humano como asociación más que como individuo, una especie de "superorganismo" que permite, a su vez, la comprensión de las enfermedades y problemas que lo aquejan desde una perspectiva medioambiental. Al considerar la utilidad e importancia de los antibióticos en el tratamiento de las enfermedades, por ejemplo, advertiremos que la amplitud de la mirada que aquí se propone nos obligaría también a pensarlos como un medio de agresión a la microbiota imposible de soslayar. A su vez, esta perspectiva del ser humano en tanto asociación huésped-microbiota podría ampliar la idea que hoy tenemos acerca de la relación entre herencia y enfermedades crónicas no transmisibles. Si, como veremos a continuación, numerosos microorganismos presentes en el recién nacido son heredados de la madre durante el parto y la lactancia, ¿cuál es la verdadera influencia de esa herencia por parte del genoma humano y cuál por parte del genoma microbiano?

III. Composición y distribución

En función de una lectura ágil de este capítulo, se propone el siguiente glosario de términos más utilizados:

- **Metagenoma:** colección de genomas y genes de los miembros de una microbiota. La metagenómica es el proceso utilizado para caracterizar el metagenoma, a partir del cual se puede obtener información sobre la función potencial de la microbiota.

- **Metataxonómica:** proceso de alto rendimiento utilizado para caracterizar a toda la microbiota, y crear un árbol taxonómico.

- **Microbioma:** se refiere a todo el hábitat, incluidos los microorganismos (bacterias, arqueas, eurcariotas inferiores y superiores y virus), sus genomas (es decir, genes) y las condiciones ambientales circundantes [6].

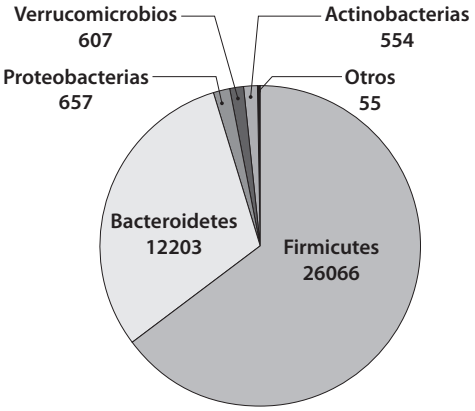
Como vimos, la "microbiota" es el conjunto de microorganismos que comparten nuestro espacio corporal. Estos microorganismos pueden ser comensales, simbiontes o patógenos [1], e incluyen a una enorme variedad de bacterias, arqueas, virus y eucariotas unicelulares. La mayoría de estos microorganismos coexisten pacíficamente con nosotros y colonizan prácticamente todas las superficies del cuerpo humano que están expuestas al entorno externo. Se encuentran en la piel [7], la mucosa [8], el tracto respiratorio [9], el tracto urinario [10], la vagina [11], la glándula mamaria [12] y la placenta [1, 13]. En cada uno de esos sitios podemos encontrar microorganismos que forman ecosistemas complejos y distintos adaptados a las peculiaridades de cada nicho [14, 15, 16]. Entre bacterias, virus, hongos, bacteriófagos y protozoos, se calcula que la microbiota

humana consta de unos 100 trillones de células, con un peso de casi 2 kgs. Pero sin dudas el sitio del cuerpo humano más colonizado de todos en abundancia y diversidad es el tracto gastrointestinal [17]. Tan solo en el colon se estima que se ubican más del 70% de todos los microorganismos que nos habitan. En su conjunto, el número de estos en el intestino es más de diez veces mayor que el número total de células eucariotas presentes en nuestro cuerpo. El tracto gastrointestinal representa, entonces, un verdadero ecosistema microbiano de varios trillones de células. Aunque incluye gran cantidad de anaerobios facultativos y aerobios, la MBTi está compuesta principalmente por anaerobios estrictos. Hasta la fecha se han descrito más de 50 filos bacterianos [18, 19], de los cuales solo dos son claramente dominantes: Bacteroidetes y Firmicutes, mientras que las proteobacterias, las actinobacterias, las fusobacterias y las verrucomicrobias están presentes en proporciones bastante menores [20] (ver Figura 1). Si bien la cantidad varía entre las diferentes publicaciones, hoy se estima que el número de géneros bacterianos presentes en el intestino humano es de aproximadamente 5000 [1], que se corresponden con unas 5000 a 35000 especies diferentes [21, 22].

Los conocimientos acerca de la composición de la microbiota (y, por tanto, también de su microbioma) han avanzado inmensamente en los últimos 25 años. Este avance es el resultado de la evolución de las técnicas de aislamiento de gérmenes y de la introducción de nuevas metodologías de identificación. El Proyecto del Microbioma Humano, iniciado en el año 2007, facilitó la utilización de técnicas de secuenciación de genes y el uso de aproximaciones de metagenómica, permitiendo la conformación de un catálogo del material genético de bacterias, virus y otros microorganismos tomados de distintas partes del cuerpo de hombres y mujeres, entre ellos, del tracto gastrointestinal [23].

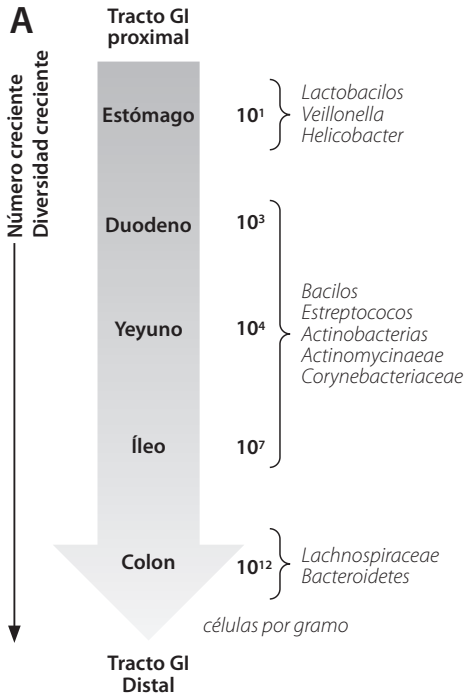
Como ya se dijo, la MBTi autóctona incluye miembros de todos los grupos taxonómicos superiores [17]. El conocimiento acerca de la composición de la MBTi se actualiza en forma creciente año a año, pero esto no nos impide proponer una versión de la misma:

Figura 1. Composición relativa de las bacterias intestinales [24]



Si bien la cantidad y diversidad de la MBTi es la más amplia de todo el organismo, su número difiere en forma notable según el lugar que habiten dentro del intestino. Este número va creciendo a medida que se produce el descenso por el tracto gastrointestinal. Mientras que en el tramo inicial (estómago y duodeno) hay una escasa concentración de microorganismos, esta aumenta gradualmente hasta su máximo a nivel colónico (ver Figura 2).

Figura 2. Predominio de microorganismos a lo largo del tracto gastrointestinal [18]



A pesar de la variabilidad interindividual, el núcleo de la microbiota se mantiene estable en la mayoría de las personas. Este núcleo está compuesto por unas decenas de especies bacterianas, así como de un microbioma de genes conservados, redundantes en diferentes especies y responsables de la funcionalidad general de la MBTi. De hecho, a pesar de la intervariabilidad antedicha, y aunque aún hoy es un tema que genera controversias, se han propuesto tres *enterotipos* distintos, cada uno de ellos determinado por la predominancia de uno o varios géneros bacterianos. Estos enterotipos (enriquecidos para los géneros Bacteroides y Parabacteroides (1), Prevotella y Desulfovibrio (2) y Ruminococcus y Akkermansia (3) –el más frecuente– estarían altamente influenciados por el tipo de dieta y, por lo tanto, también por la regionalidad geográfica y/o situación socio-económico-cultural [25]. Más allá del debate que existe alrededor de este tema, es claro que la homeostasis de la MBTi sufre permanentes alteraciones temporales, geográficas, exógenas (tóxicos, medicamentos) y relacionadas a hábitos (dieta, estrés)

y enfermedades, que le producen cambios importantes en su composición, cantidad y diversidad. Todo esto hace que no sea descabellado, entonces, concebir al ser humano como un superorganismo que actúa como un entero ecosistema en sí mismo, y a la microbiota como una especie de "firma personal" que, si bien se va modificando en forma constante, también conserva ciertas características personales a lo largo de toda la vida del sujeto que actúa como huésped.

Son múltiples y variados los factores que pueden actuar como determinantes en la composición de la MBTi. El microbioma se ve afectado en forma particular según la región geográfica y la dieta, dado que la primacía de ciertos alimentos en cada una de las culturas favorece la multiplicación de determinados microorganismos. Esto se debe a que los diferentes tipos de fibras de los alimentos promoverían el creciemiento en abundancia de ciertos géneros y especies de microorganismos por sobre otros. No son similares las MBTi de sujetos carnívoros que las de sujetos vegetarianos, por ejemplo. Pero tampoco lo son las de sujetos vegetarianos que viven en la Argentina o en la India. El caso es similar para las dietas de las diferentes clases sociales: el acceso a una alimentación equilibrada modifica a la MBTi, ampliando su cantidad y diversidad. Si esto lo extendemos a las variaciones que se pueden producir en la MBTi, frente a la salud y la enfermedad, o en función de la carga genética, o a lo largo del tiempo, podemos notar con claridad la compleja variabilidad de la que depende la composición de la MBTi. Sin embargo, la MBTi es resiliente. A menudo, luego de cambios bruscos, recupera *ad integrum* su estado original natural que se conoce como "eubiosis" [1, 2]. Por el contrario, en otras ocasiones, se puede inducir un fuerte desequilibrio en su composición taxonómica, lo que se conoce como "disbiosis" [26]. La disbiosis puede ocurrir durante unos días [27] o puede adquirirse lentamente durante toda vida.

IV. Conformación y evolución de la microbiota intestinal

Llegados hasta aquí, queda clara la existencia de una bidireccionalidad en la relación huésped-MBTi. La asociación entre ambos es sumamente estrecha: es el fruto de millones de años de coevolución. Y como todo otro órgano del cuerpo, su composición y estructura dependen del estado fisiológico del sujeto que lo porta. Ya se han desarrollado en este libro los aspectos antropológicos más característicos de esa histórica relación entre seres humanos y seres microbianos, por lo que no nos detendremos aquí en ese punto, pero sí destacaremos la vital importancia que el desarrollo de una adecuada interacción entre hospedador y MBTi en etapas tempranas de la vida tiene para la posterior salud del individuo [28]. Porque el establecimiento y desarrollo de la MBTi en el recién nacido se ven afectados por diversos factores pre, peri y postnatales. Ya desde la concepción sabemos que el feto está expuesto a ciertas bacterias del intestino materno que atraviesan la placenta hacia el líquido amniótico. El microbioma fetoplacentario es mucho más abundante que lo que se creía hace no tanto tiempo. Bacterias y sus genes se han aislado de la placenta humana, en el

líquido amniótico, en las membranas fetales y del tracto gastrointestinal fetal en embarazos sanos y normales. Estas bacterias presentan tres rutas de entrada principales: la oro-fetoplacentaria, la gastrointestinal-fetoplacentaria y la genitourinaria-fetoplacentaria [29]. Sin embargo, aunque el feto ya está en contacto con la MBTi desde el útero, la mayor colonización de microorganismos comienza con el parto, cuando el feto atraviesa el canal de parto o nace por cesárea. Cada modo de entrega produce un patrón de colonización diferente. La colonización se ve afectada aún más por la dieta (leche materna contra sucedáneos lácteos) y con el destete y la introducción de alimentos sólidos [30]. De la forma de nacimiento dependerá, entonces, la característica y número de las bacterias pioneras en la colonización del intestino infantil. Esto, a su vez, será crucial en el establecimiento de esa relación de bidireccionalidad que ya mencionamos entre el huésped y los microorganismos comensales [31].

Es entendible entonces la importancia del mantenimiento de la salud de la madre durante toda la concepción. El embarazo se caracteriza por profundos cambios hormonales, inmunológicos y metabólicos destinados a apoyar el crecimiento de la unidad fetoplacentaria. Curiosamente, un embarazo saludable también induce cambios dramáticos en la microbiota intestinal materna durante el transcurso de la gestación, con una gran expansión de la diversidad entre las personas, un aumento general de las proteobacterias y actinobacterias, y una diversidad reducida dentro de cada microbioma [29]. Es por eso que durante el embarazo la madre debería aumentar de peso adecuadamente, continuar haciendo ejercicio y, con suerte, mantenerse libre de infecciones que requieran el uso de antibióticos. Esto abriría el camino para una colonización intestinal equilibrada. El bebé nacido por medios naturales, a partir de la ingestión de los organismos intestinales y vaginales de la madre, se hará acreedor de un sinnúmero de bacterias colonizadoras. Después del nacimiento, ese bebé colonizará rápidamente su intestino bajo la influencia de la leche materna, con suerte administrada exclusivamente durante los primeros cuatro meses de vida [30].

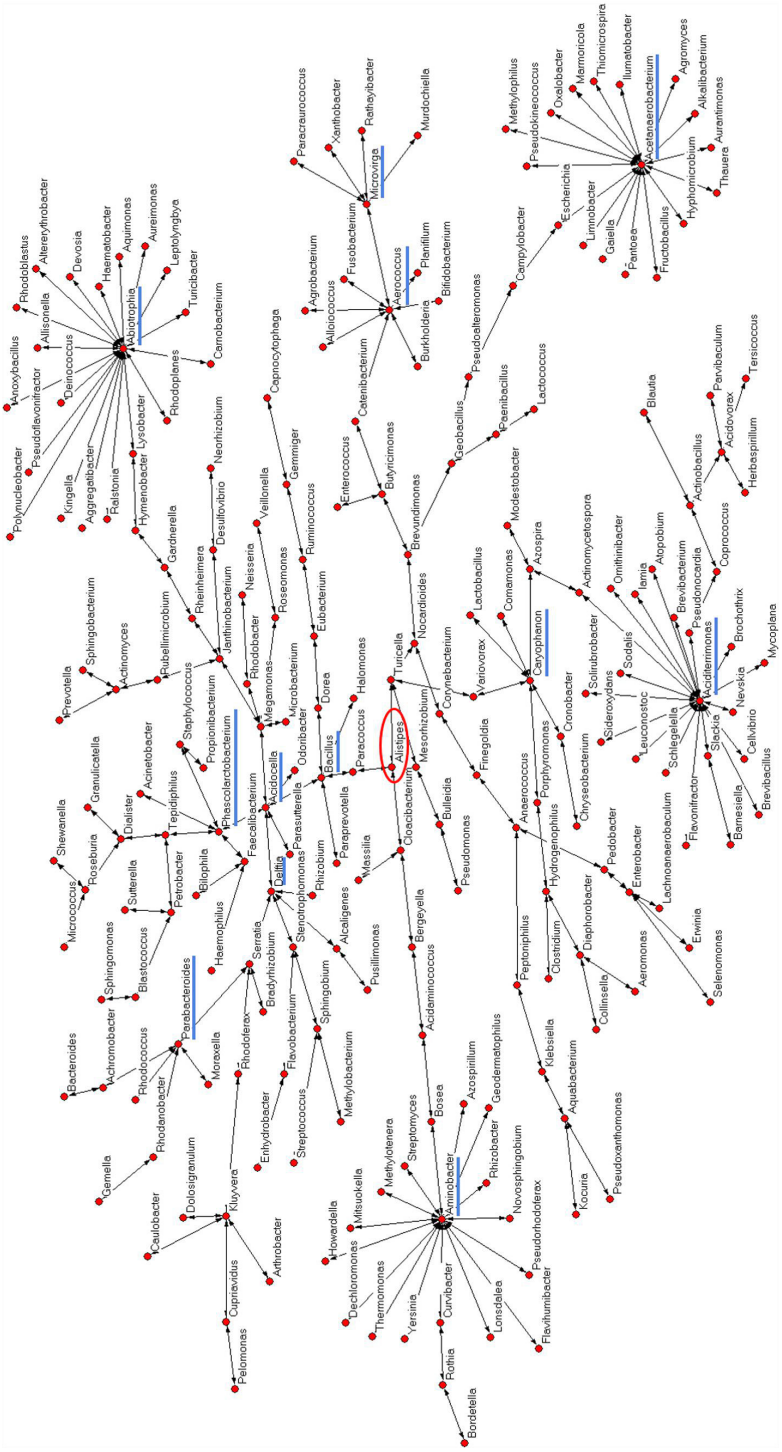
Debido a todo esto es que los pediatras sabemos que los primeros 1000 días de vida de un ser humano (desde su concepción hasta su niñez temprana) representan un período fundamental en la regulación de esos estímulos externos que, a la larga, acabarán determinando la calidad de la MBTi del recién nacido. ¿Y por qué los primeros 1000 días? Porque durante ese tiempo el feto y el recién nacido experimentan importantes cambios en el desarrollo de los órganos de su cuerpo, particularmente del tracto gastrointestinal. Las bacterias colonizadoras (y/o sus metabolitos) interactúan con la fisiología del bebé, estableciendo una base que, a largo plazo, determinará la manera en que ese bebé (y luego el niño, y, más tarde, el adulto) responderá a estímulos ambientales como la dieta, las mascotas y los antígenos provenientes de otras fuentes. Las enterobacterias y las bifidobacterias se encuentran entre los colonizadores tempranos. Se cree que estas bacterias pioneras tienen la capacidad para modular la expresión génica en el huésped, con el objetivo de crear un entorno adecuado para sí mismas y, además, prevenir el crecimiento de otras bacterias introducidas más tarde en el ecosistema [21, 30]. Ya existen estudios, incluso, que hacen

posible suponer que óvulos y espermatozoides interaccionarían antes con bacterias que entre sí mismos, lo que ubicaría a la microbiota en un rol decisivo dentro del proceso de selección del espermatozoide que fecundará al óvulo [32, 33].

Como se verá más adelante, esa gran cantidad de bacterias que coloniza inicialmente el tracto gastrointestinal (miles de millones de microorganismos), contribuye al desarrollo de funciones protectoras y metabólicas de su huésped. Y ese proceso de colonización, maduración y diversificación que se inicia desde antes del nacimiento, alcanza una actividad máxima durante la primera infancia, en conjunto con el desarrollo de los sistemas inmune, metabólico y neurológico.

El contacto con nuevas bacterias continúa con la lactancia. Hace ya años que se desmoronó la creencia de que la leche materna es estéril. Hoy, gracias a la metagenómica, se conoce que la leche y el tejido epitelial mamario de mujeres sanas contienen una amplia cantidad de gérmenes, principalmente de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. También es posible detectar especies pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, así como otros organismos como hongos y/o relacionados a los protozoos y a los virus. Algunas bacterias específicas pueden hallarse en forma simultánea tanto en el intestino materno, como en la leche materna y las heces del recién nacido, lo que sugeriría la existencia de una transmisión vertical de microorganismos maternos al intestino infantil [31, 33, 34, 35].

Figura 3. Representación gráfica de la red de microbiota de leche madura humana [36]



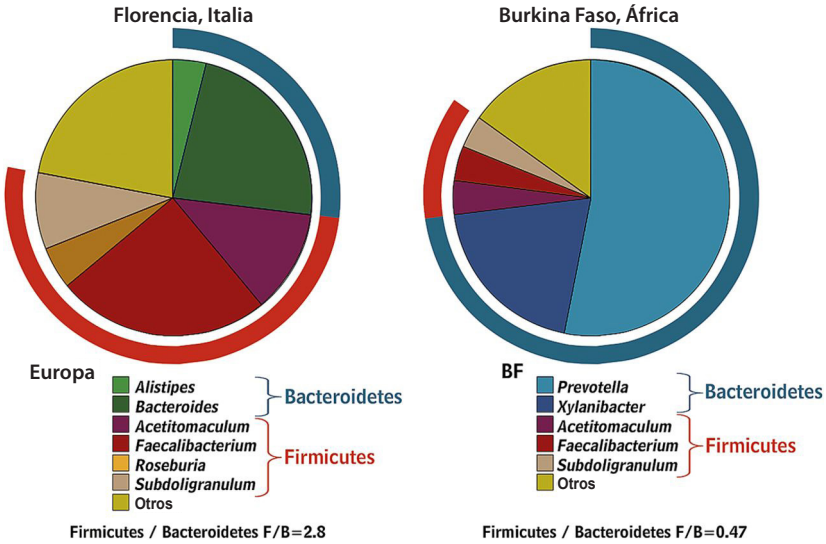
El por qué de la presencia de gérmenes en la leche materna aún no está dilucidado en su totalidad, pero se proponen diferentes mecanismos. Por un lado, cambios hormonales post-embarazo aumentarían la permeabilidad intestinal, facilitando la migración de microorganismos por vía sanguínea hacia la glándula mamaria. En segundo lugar, existiría una captación linfática de bacterias intestinales de la madre, con posterior diseminación hasta la glándula. En tercer lugar, algunas bacterias llevarían a cabo un flujo inverso desde la boca del bebé hacia el epitelio de la glándula mamaria [37].

Como fuere, queda claro en qué medida una MBTi saludable es dependiente de la salud de la madre durante el embarazo, de la elección y posibilidad de un parto vaginal y de la lactancia materna exclusiva. Pero también lo es del grado de agresión que reciba durante todo este período. Factores externos a la madre, como el estrés, el consumo reiterado de antibióticos o el tabaquismo, podrían afectar la composición del primer y valioso inóculo de microorganismos. Por otro lado, la prematurez actuaría como un agravante de esta situación: la inmadurez intestinal del recién nacido, las formas de alimentación enteral y parenteral habituales en estos casos, las infecciones sistémicas, los tratamientos antibióticos reiterados, así como la oxigenoterapia prolongada, tienen todos efectos nocivos para una MBTi aún incipiente [28].

Estas evidencias acrecientan la importancia que obstetras y pediatras tienen en la prevención de la conformación de una MBTi eubiótica durante el embarazo y la primera infancia, momento en donde se acaba de configurar esa "firma personal" compuesta por miles de millones de microorganismos. Y así como caracterizamos a la MBTi como órgano y como firma personal dinámica, también podemos pensarla ahora en tanto huella: la configuración de una MBTi disbiótica en los primeros dos años de vida deja una impresión profunda y duradera, dado que desequilibrios en su composición y función pueden asociarse a futuro con enfermedades que van desde los trastornos gastroenterológicos localizados, hasta enfermedades neurológicas, respiratorias, metabólicas, hepáticas y cardiovasculares [5].

Luego de los primeros dos años de vida, la MBTi continúa con su diversificación y maduración. Los factores que pueden afectarla son todos los relacionados al comienzo de la vida en sociedad. Probablemente el cambio más notorio de la primera etapa sea el que se produce con la inclusión de los alimentos sólidos. La dieta habitual parece ser el principal determinante de la composición de la MBTi y de las diferencias inter especies. No es descabellado pensar que la diferencia entre las dietas pueda representar la principal causa de las variaciones taxonómicas entre poblaciones. Una dieta rica en proteínas y grasas animales, por ejemplo, seleccionará al grupo de microorganismos tolerantes a sales biliares (*Alistipes*, *Bilophila* y *Bacteroides*), mientras que será deficitaria de aquellos que requieren de los vegetales para metabolizar los polisacáridos complejos (*Firmicutes*). Como es de esperar, estos, en cambio, proliferarán en el contexto de dietas ricas en fibras dietéticas, frutas y verduras. Una relación inversa de *Prevotella* y *Bacteroides* ha sido ya descripta con éxito entre poblaciones industrializadas y agrarias [38].

Figura 4. Composición de la MBTi en niños africanos que viven en áreas rurales con una dieta rica en polisacáridos, en comparación con niños de ciudades italianas [39].



El ingreso del bebé a la alimentación familiar de rutina pone en juego todos estos factores en forma brusca. A partir de ese momento se inicia un proceso de modelado y maduración de la MBTi que no se detendrá hasta el fin de su vida. El estándar de higiene, las características socio-económico-culturales, la presencia o ausencia de enfermedades y/o tratamientos médicos, así como el grado de estrés y la genética actuarán en forma conjunta e interrelacionada, favoreciendo la maduración y el envejecimiento de una MBTi en estado de eubiosis o disbiosis.

Luego de los tres años de edad, el mantenimiento de una dieta basada en alimentos sólidos conduce a una composición taxonómica estable de la MBTi, con un claro incremento de *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. Sin embargo, durante la segunda infancia y la adolescencia la revolución hormonal a la que todo huésped se ve expuesto sumará un nuevo y potente factor a todo lo antedicho. Tampoco se debe soslayar la estructura familiar, que es la que aporta el entorno en el que se desarrollará el niño o niña. La presencia de hermanos/as, así como de mascotas en el hogar resultan beneficiosas, dado que ponen en circulación una mayor diversidad de gérmenes. Según la "hipótesis de la higiene", aquellos niños y niñas que conviven en ambientes con un elevado nivel de higiene no adquirirían el estímulo necesario para el desarrollo de una tolerancia inmunitaria plena, debido a su escaso contacto con microorganismos. No es de extrañar, entonces, que exista una relación inversa en la tasa de enfermedades infecciosas y autoinmunes desde la segunda mitad del siglo XX en todo el mundo occidental [40].

Desde la infancia y hasta la vejez, el aumento progresivo de gérmenes -tanto de su concentración como del número de especies- propicia un enriquecimiento de la diversidad microbiana y de la cantidad de genes funcionales de origen microbiano

presentes en el ecosistema intestinal [28]. Si ya entrada la adultez la MBTi es diversa y compleja, entonces ésta estará preparada para hacer frente a todos los cambios que experimentará el adulto durante el resto de su vida, resguardándose la interrelación simbiótica establecida entre ambos [41]. El envejecimiento de la MBTi se expresa a partir de la caída en la diversidad y cantidad de microorganismos, los cuales van decreciendo hasta el final de la vida del huésped. Debido a esto, con el avance de la edad la microbiota pierde diversidad y capacidad de adaptación, aumentado el número de enterobacterias y microorganismos oportunistas, lo que la hace más vulnerable a sufrir y provocar enfermedades locales y sistémicas.

V. Funciones de la microbiota intestinal

Como todo órgano real, las funciones y vías fisiológicas de este órgano virtual que representa la MBTi son múltiples y en continuo desarrollo. A partir del descubrimiento y perfeccionamiento de novedosas tecnologías de cultivo de gérmenes y secuenciación genómica, los conocimientos y estudios acerca de la MBTi sufren hoy un apogeo que puede compararse en amplitud e intensidad al que experimentaran las neurociencias durante la última década. Sin embargo, debemos ser precavidos en el nivel de aseveración que asignamos a cada afirmación. Muchos de estos promisorios estudios no han aún superado las fases iniciales de investigación (fase 0 en animales) o lo han hecho pero con una cantidad de sujetos escasa, por lo que aún resta un largo camino por recorrer, con el diseño de una mayor cantidad de estudios epidemiológicos y, por qué no, también con la realización de protocolos aleatorizados y multicéntricos en seres humanos a nivel global. Lo cierto es que el enfoque acerca de la funcionalidad de la MBTi puede llevarse a cabo desde una infinidad de perspectivas, ya que hoy hay suficiente evidencia científica para correlacionar a la MBTi –y su funcionamiento– con diversas acciones fisiológicas a todos los niveles del huésped. En este capítulo propondremos una clasificación que intenta sintetizar la amplia gama de posibilidades existentes en la literatura de la forma más esquemática posible, pero sin soslayar que, más allá de esta clasificación, cada una se entrelaza y complementa en forma dinámica con las otras. Con tal intención, describiremos cuatro grandes grupos funcionales: inmunológico, estructural, nutricional y metabólico.

V.A. Funciones inmunológicas

V.A.1. Guía del desarrollo del sistema inmunitario del lactante: junto a una introducción pertinente (en tiempo y forma) de los antígenos alimentarios, una MBTi equilibrada es esencial para la homeostasis del sistema inmunológico. La MBTi desempeña una función crucial a la hora de fomentar y dirigir el desarrollo de la inmunidad de mucosa a nivel intestinal, especialemente a partir del establecimiento y regulación de la barrera de superficie [42].

V.A.2. Contribución al desarrollo de una tolerancia oral adecuada: el sistema inmunológico de la mucosa necesita cumplir dos funciones, a veces aparentemente conflictivas. Por un lado, debe ser tolerante con la microbiota supra-yacente para evitar la inducción de una respuesta inmune sistémica excesiva y perjudicial. Por otra parte, debe ser capaz de controlar a la MBTi, con el fin de evitar su sobrecrecimiento y una eventual traslocación a sitios sistémicos. Es decir, debemos diferenciar entre la tolerancia del organismo del huésped a su MBTi recién conformada, de la tolerancia oral que el huésped (gracias a su MBTi) desarrolla frente a la introducción de ciertas sustancias en el intestino. La primera de ellas es la que a ha permitido a la MBTi coevolucionar junto al ser humano a lo largo de los tiempos. Y es la causa de la estabilidad de esa relación simbiótica estable que habitualmente conforma el huésped con los microorganismos. Podemos considerar que a partir de los 3 años el sistema inmune del huésped ya ha aprendido a tolerar a las bacterias comensales (que conformarán la que será la MBTi adulta) y a iniciar la respuesta inmune inflamatoria ante la presencia de bacterias patógenas [41].

El segundo tipo de tolerancia es el proceso que desarrolla el huésped –a partir de su MBTi y su sistema inmunitario– para distinguir entre estímulos potencialmente dañinos y estímulos inofensivos. Este proceso, íntimamente relacionado al anterior, es el que permite la existencia de reacciones muy diversas cuando el intestino se pone en contacto con ciertos antígenos alimentarios o con, por ejemplo, una bacteria enteroinvasiva [30]. Diversos estudios demuestran que la MBTi de los lactantes y los niños de corta edad que padecen alergias intestinales presentan perfiles taxonómicos distintos a aquellos que no las padecen, siendo el *Bifidobacterium* la especie más involucrada [42].

V.A.3. Protección contra el desarrollo de enfermedades inflamatorias, atópicas y autoinmunitarias: al momento del nacimiento, el sistema inmunitario del recién nacido es inmaduro, y está orientado hacia una respuesta dominada por los linfocitos Th2, con el fin de proteger el embarazo durante la gestación. Esto aumenta en forma notable el riesgo de padecer infecciones graves. Por lo tanto, la exposición a distintos componentes microbianos del medioambiente desempeñaría un papel muy relevante en el proceso de maduración del sistema inmunitario. Esa exposición inicial específica del intestino a una variedad de microorganismos podría reducir el riesgo de desarrollar enfermedades inflamatorias, autoinmunitarias y atópicas –como eccema y asma– durante la primera infancia [42].

V.A.4. Regulación de la inmunidad de mucosa y de la cascada inflamatoria: la importancia de la microbiota intestinal en el desarrollo tanto de la mucosa

intestinal como del sistema inmunitario sistémico se puede apreciar fácilmente en los estudios de ratones libres de gérmenes. Al estar desprovistos de MBTi, estos contienen números anormales de varios tipos de células inmunes y presentan claros déficits en las estructuras linfoides locales y sistémicas. Los bazos y los ganglios linfáticos de estos ratones están mal formados, con placas de Peyer hipoplásicas y un número reducido de folículos linfoides maduros. También está disminuida la cantidad de células plasmáticas productoras de IgA y, en consecuencia, los niveles de inmunoglobulinas secretadas (tanto IgA como IgG). También exhiben irregularidades en los niveles y perfiles de citoquinas. El papel central de la MBTi en el desarrollo de la inmunidad de la mucosa no es sorprendente, considerando que la mucosa intestinal representa el área de superficie más grande en contacto con los antígenos del ambiente externo. La densa capa de MBTi que recubre la mucosa normalmente representa la mayor proporción de los antígenos presentados a las células inmunes residentes y de estímulo de los receptores de reconocimiento de patrones (como los TLR y los receptores similares a NOD, cuyas siglas son NLR) de las células epiteliales intestinales [18, 43]. Una microbiota saludable produce señales que activan a las células dendríticas para favorecer la producción de IL-10, colaborando con el mantenimiento y control de la cascada inflamatoria fisiológica [42].

V.A.5. Funciones a distancia (inmunidad sistémica): la microbiota intestinal también desempeña una función muy importante en el desarrollo del sistema inmunitario adaptativo, específicamente en el desarrollo de la vía de señalización de subconjuntos principales de linfocitos intestinales, como los linfocitos B, linfocitos T *helpers* (Th) y linfocitos T reguladores (Treg); y en el establecimiento de la relación entre los linfocitos Th1 y Th2, que determina las respuestas inmunitarias sistémicas [42].

V.B. Funciones estructurales

V.B.1. Participación en el desarrollo del intestino: el tracto gastrointestinal del recién nacido es estructural y funcionalmente inmaduro [18, 44]. Su evolución postnatal está influenciada por diferentes factores, entre los que la exposición a una comunidad microbiana intestinal en desarrollo es uno de los principales [18, 44, 45]. Esto queda evidenciado con claridad en estudios que comparan a ratones convencionales (colonizados) con ratones libres de gérmenes. Estos últimos evidencian el ciego dilatado y una reducción del área total de superficie intestinal [18, 46], lo que a menudo conduce a trastornos gastrointestinales funcionales [18, 47]. En estos ratones también se constata un menor grosor de las vellosidades –como resultado de la reducción de la regeneración celular [18, 48] y el aumento del tiempo del

ciclo celular [18, 49]–, y la disminución de infiltrados de leucocitos en la lámina propia. Diversos aspectos de la función intestinal de los ratones libres de gérmenes están comprometidos: hay reducción severa en la red capilar vellosa [18, 50] –con las consiguientes implicancias para la absorción de nutrientes–; deterioro en la actividad peristáltica del tracto gastrointestinal [18, 51]; y alteraciones en el metabolismo del colesterol y los ácidos biliares, con déficits en la conjugación y mayor acumulación de colesterol hepático [18, 52]. Otros estudios en ratones libres de gérmenes han demostrado que estos son más susceptibles a las infecciones y al cáncer, ya que desarrollan -en ausencia de MBTi- una pared intestinal atrófica y un sistema inmune intestinal inmaduro, con niveles más bajos de péptidos antimicrobianos y menos IELs, con placas de Peyer menos activas y con caída en la producción de IgA [42, 53].

V.B.2. Protección frente a la colonización de gérmenes patógenos: inhibición competitiva y producción de sustancias anti-microbianas. Estímulo para producción de IgA.

V.B.3. Fortalecimiento de las uniones estrechas de los enterocitos: diferentes microorganismos contribuyen al mantenimiento de la integridad de la barrera del epitelio intestinal, a través del mantenimiento de las uniones de célula a célula y del estímulo de la reparación epitelial post lesión. *B. thetaiotaomicron*, por ejemplo, induce la expresión de sprr2a, fundamental para el mantenimiento del desmosoma [18, 54]. Su expresión se ve incrementada en las vellosidades epiteliales, lo que sugiere su papel en el mantenimiento de la barrera. También se ha demostrado que varias cepas probióticas de *Lactobacillus* contribuyen al mantenimiento de uniones estrechas en los epitelios intestinales, proporcionando un efecto protector frente a la agresión por patógenos o lesiones intestinales [18, 54]. Además se demostró que la señalización a través de TLR2, que in vivo es estimulada principalmente por el peptidoglicano de la pared celular microbiana, promueve la integridad del epitelio intestinal a través del mantenimiento de uniones estrechas y una disminución de la apoptosis [18, 55].

V.B.4. Barrera mucoso-epitelial del intestino: la defensa intestinal frente a patógenos se estructura a partir de un sistema complejo, en el que la MBTi desempeña un rol central, dado que compite por espacio y nutrientes con los microrganismos patogénicos [42]. En consonancia con esto, la capa de mucus intestinal constituye, además, una barrera física que contiene productos antimicrobianos e IgA secretora. El sistema se completa con una monocapa de células epiteliales (con uniones estrechas) que proporciona no solo una barrera física, sino que a su vez actúa como un sensor del entorno luminal,

detectando la presencia de patógenos a través de receptores, sintetizando o respondiendo a citoquinas, y sintetizando AMP; así como con una infinidad de células implicadas en la respuesta inmunitaria, ubicadas debajo de -o entre- la capa epitelial, y preparadas para iniciar una respuesta rápida frente a los patógenos que pudiesen penetrar a través de la mucosa intestinal [42, 56].

V.C. Funciones nutricionales

V.C.1. Digestión y biodisponibilidad de nutrientes: la observación de que los ratones libres de gérmenes requieren una ingesta calórica significativamente mayor para mantener el mismo peso corporal que los animales colonizados, impulsó las investigaciones sobre los mecanismos a través de los cuales la MBTi maximiza la disponibilidad calórica de los nutrientes ingeridos. Estos mecanismos generalmente se dividen en una de dos categorías: extracción de calorías adicionales de oligosacáridos no digeribles, y promoción de la absorción y utilización de nutrientes mediante la modulación de la capacidad de absorción del epitelio intestinal y del metabolismo final de los nutrientes. Muchas especies bacterianas han sido implicadas en el metabolismo de la fibra dietética a ácidos grasos de cadena corta (AGCC), lo que representa una parte significativa de la fuente de energía para el huésped, en este caso el ser humano (5 a 10% de los requerimientos diarios). [18, 57, 58]. El butirato, principal AGCC, contribuye al mantenimiento de una adecuada permeabilidad y al desarrollo del aparato inmunológico del tracto gastrointestinal, a la vez que tiene un efecto trófico sobre el epitelio intestinal y de reducción del pH luminal, lo que actúa como un *feedback* positivo, ya que favorece a la MBTi. La producción de butirato no es la única relevante dentro de los AGCC, sino que el propionato, el acetato, y el lactato también cumplen un rol. Ya veremos en otro capítulo, por ejemplo, las vitales implicancias del lactato, habitualmente considerado "la cenicienta de los metabolitos", pero en realidad común a todos los tipos de fermentación y con probadas cualidades antiinflamatorias.

Además de poder descomponer a los polisacáridos no digeribles en monosacáridos absorbibles, la MBTi también modula la absorción y el depósito de lípidos de la dieta. El metabolismo de los nutrientes por parte de los microorganismos comensales, sin embargo, no se lleva a cabo estrictamente para beneficio del huésped: parte de la energía extraída de los nutrientes luminales se destina a la propia microbiota, en función del mantenimiento de su cantidad y calidad. Se ha demostrado que los miembros de la microbiota intestinal pueden adaptar su metabolismo a las condiciones del intestino, respondiendo a la disponibilidad de sustrato. La *E. coli* intestinal, por ejemplo, expresa un conjunto diferente de proteínas involucradas en la utilización

de nutrientes que la *E. coli* cultivada in vitro en condiciones anaeróbicas [18, 59]. Además, se demostró que las bacterias residentes se adaptan a la presencia de otros miembros de la microbiota, esforzándose por maximizar su aptitud en el tracto gastrointestinal mediante la utilización selectiva de nutrientes. [18, 60].

V.C.2. Producción de nutrientes esenciales: como vitamina B12, vitamina K y ácido fólico.

V.D. Funciones metabólicas.

V.D.1. Participación en la regulación de la homeostasis energética y producción de metabolitos: ya es conocida la influencia del tracto gastrointestinal en la regulación del apetito. Hay cada vez mayor evidencia de que la microbiota del colon y su actividad metabólica tienen un papel central en la homeostasis energética. El suministro de sustrato a la microbiota colónica tiene un gran impacto en la población microbiana y los metabolitos producidos, particularmente los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), los que se producen cuando los carbohidratos no digeribles (fibras y almidón) son fermentados por la microbiota. Si bien a la fecha se sigue investigando al respecto, se ha informado en reiteradas ocasiones que tanto el consumo de carbohidratos fermentables como la administración de AGCC producirían una amplia gama de beneficios para la salud, incluidas mejoras en la composición corporal, en la homeostasis de la glucosa, en los perfiles de lípidos en la sangre, en la reducción del peso corporal y en el riesgo de cáncer de colon; todos ellos como consecuencia de una serie de procesos metabólicos en paralelo que tendrían los AGCC, y que afectarían la homeostasis energética y la regulación del apetito.

V.D.2. Contribución al desarrollo y mantenimiento de la función motora y sensorial del intestino: el tracto gastrointestinal de los recién nacidos es estructural y funcionalmente inmaduro. Su desarrollo postnatal está determinado por diferentes factores, dentro de los que se encuentra la exposición a una comunidad microbiana intestinal en desarrollo. Para alcanzar la madurez, ese tracto gastrointestinal necesita desarrollar una motilidad peristáltica eficiente, una superficie de extensión adecuada y una vascularización acorde a esa superficie, con el fin de adquirir los nutrientes esenciales para su desarrollo. En este sentido, se ha observado que ratones libre de gérmenes presentan déficits en la peristalsis y la maduración de la superficie intestinal, como consecuencia de la alteración de su microvasculatura [18].

V.D.3. Participación sistémica. El eje MBTi-cerebro: si bien mucho se ha dicho (y mucho aún resta por conocerse) acerca de la prolífica relación entre el sistema nervioso intestinal y el sistema nervioso central, es probable que una de los ejes de esta relación esté dado por la regulación de los niveles y de la disponibilidad de serotonina que el intestino lleva a cabo gracias a la acción de la MBTi. Llamamos eje cerebro-intestino al sistema de comunicación bidireccional entre el sistema nervioso central y el tracto gastrointestinal. El neurotransmisor central de este eje es la serotonina, que funciona activamente en ambos terminales de la red. De hecho, se considera que casi el 95% de la serotonina total del organismo está ubicada a nivel intestinal. Múltiples investigaciones han evidenciado también la importancia de la MBTi en la regulación del funcionamiento normal de este eje, gracias a su participación en la vía metabólica del aminoácido aromático esencial triptófano (Trp). En el intestino, las tres vías principales del metabolismo de Trp que conducen a 1) la serotonina (5-HT), 2) la quinurenina o ácido quinurénico (Kyn) y 3) los derivados del indol, están todas bajo el control directo o indirecto de la MBTi [61]. Así, los patrones de diferenciación de la MBTi durante su conformación podrían afectar al desarrollo del sistema serotoninérgico, dada la capacidad de la MBTi para controlar el metabolismo del triptófano a lo largo de la ruta del ácido quinurénico, y así reducir su disponibilidad para la síntesis de serotonina. A su vez, se ha descripto la existencia de procesos neurales en el tracto gastrointestinal que podrían verse influenciados por alteraciones locales en las concentraciones de serotonina, con la posterior transmisión de señales a lo largo del eje cerebro-intestino, influyendo de esta manera en la neurotransmisión a nivel del sistema nervioso central (SNC) [62]. Es evidente que las más de 100 millones de neuronas presentes a lo largo de todo el aparato gastrointestinal implican funciones que exceden por mucho a la mera organización de la motilidad de las vísceras huecas. Es por esto que el creciente conocimiento de la relación MBTi-SNC permite imaginar a la MBTi como un posible foco terapéutico dentro del tratamiento más general de los trastornos serotoninérgicos.

V.D.4. Otras funciones metabólicas

- Participación en el perfil de ácidos biliares y en el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (ác. araquidónico): tanto los ácidos biliares como los ácidos grasos de cadena corta pueden modular el metabolismo de la serotonina en los huéspedes al afectar a los intermediarios de la vía de la serotonina. Por lo tanto, la motilidad intestinal puede regularse mediante modificaciones microbianas de la biosíntesis de serotonina del huésped, que también continúa siendo evaluada como un objetivo terapéutico para el tratamiento de los trastornos gastrointestinales funcionales [63].

- Regulación las funciones endocrinas intestinales [5].
- Señalización neurológica y densidad ósea [5].
- Biosíntesis de diversos compuestos con funciones aún hoy desconocidas.
- Reacción o modificación de medicamentos específicos.
- Eliminación de toxinas exógenas [5].

VI. La microbiota intestinal en la salud y en la enfermedad

Dada la enorme multiplicidad de funciones que hemos descripto acerca de la MBTi, así como acerca de su evolución particular y personalísima, y sobre su composición relacionada a nuestro crecimiento y nuestros hábitos, a esta altura queda más que claro que la MBTi presenta una estrecha relación con los estados de salud y enfermedad del huésped. Un huésped sano probablemente tenga una MBTi saludable, y una MBTi saludable colaborará sin dudas con el mantenimiento del estado de salud de su huésped. ¿Pero a qué nos referimos exactamente cuando hablamos de una MBTi "saludable"? Una MBTi saludable es una MBTi sin déficits estructurales, una MBTi que se ha desarrollado de la manera más favorable para el huésped, una que no recibe constantes ataques externos y que, fundamentalmente, una que conserva su diversidad. Si reparamos en la cantidad y variedad de funciones que la MBTi desempeña, comprenderemos que la necesidad de que cada uno de esos gérmenes esté presente es fundamental para la fisiología y el metabolismo del huésped. Así, la calidad y cantidad de microorganismos comensales son la razón por la que podemos afirmar que una MBTi diversa es una MBTi sana. Y una MBTi sana permite la recuperación de energía valiosa y de sustratos absorbibles fundamentales para el huésped, a la vez que previene una gran cantidad de enfermedades. Sin embargo, existen dos momentos específicos en los que la diversidad de la microbiota no está directamente relacionada a su salud: el primer momento es previo al parto vaginal, cuando la microbiota local disminuye su diversidad, en pos de priorizar la abundancia de unas pocas especies del género *Lactobacillus*. En segundo lugar, durante las primeras semanas de colonización intestinal del recién nacido, momento durante el cual las bifidobacterias son dominantes. Luego de estos dos tiempos es que la diversidad de la microbiota comienza a crecer [64, 65].

Ya vimos que el desequilibrio en la composición y la función de los microorganismos intestinales se denomina "disbiosis" de la MBTi. Cada vez con mayor nivel de evidencia sabemos que esta disbiosis conlleva la pérdida de diversidad de los microorganismos que la componen [5]. La vida moderna occidental, con el aumento de la población urbana, favorece el alto número de cesáreas, el uso indiscriminado

de antibióticos (en la madre, en los recién nacidos y en los huépedes en general), la alimentación de los lactantes con sucedáneos de la leche materna, la sanitización excesiva (esterilización, antisepsia, etc.), el uso de antimicrobianos en la producción y conservación de alimentos, y la alimentación pobre en fibras, resultando todo en pérdida de diversidad y abundancia de la MBTi de los huéspedes. Esto, a su vez, favorece el sobrecrecimiento de gérmenes patógenos y el empobrecimiento de sus funciones. Esa "firma personal" a la que hemos configurado a lo largo de nuestra historia como seres humanos sociales, se ve herida en su esencia misma, facilitando la aparición de una amplia gama de patologías, que pueden incluir desde trastornos gastroenterológicos localizados hasta enfermedades neurológicas, respiratorias, metabólicas, hepáticas y cardiovasculares. De hecho, hay múltiples estudios que relacionan a estos cambios anómalos en la estructura de la comunidad microbiana con patologías como la obesidad, la diabetes, la aterosclerosis o diversos trastornos autoinmunes [29], todas muy comunes en la población general de occidente. Dado el repertorio funcional tan diverso de la MBTi, no es sorprendente entonces que ésta sea el foco de investigación de decenas de enfermedades crónicas, que incluyen a muchas enfermedades malignas y con reconocidos componentes inflamatorios, metabólicos, cardiovasculares, autoinmunes, neurológicos y/o psiquiátricos [5]. A continuación, intentaremos sintetizar las que, al día de hoy, presentan mejor nivel de evidencia científica.

VII. Enfermedad y microbiota intestinal

VII.A. Intrusos microbianos en el tracto gastro-intestinal (TGI)

VII.A.1. Efectos mediados por la inflamación de la MBT: la colonización de la mucosa intestinal por parte de patógenos entéricos bacterianos resulta en la inducción de una fuerte respuesta inflamatoria dirigida a controlarlos. Sin embargo, también se ha demostrado que esta respuesta inflamatoria tiene el inesperado efecto de disminuir la viabilidad de la MBTi, permitiendo que el patógeno ocupe los nichos desocupados [18, 66, 67]. A su vez, se demostró que la inflamación en la mucosa intestinal promueve el crecimiento excesivo de *Enterobacteriaceae*, tanto comensal como patógena [18, 68]. Se cree que ciertos patógenos invasores podrían utilizar mejor los nutrientes disponibles en el intestino inflamado que los microorganismos comensales de la MBTi [18, 69]. *S. typhimurium*, por ejemplo, utiliza su motilidad para beneficiarse de las mucinas liberadas durante la inflamación, mejorando de esta manera su crecimiento.

VII.A.2. Infecciones entéricas y complicaciones post-infecciosas: pueden aparecer en simultáneo o por separado. Al daño que un microorganismo puede

ocasionar en función de su particular virulencia, también puede adicionarse la supresión de la MBTi causada por el antibiótico utilizado como tratamiento. En los casos en que las bacterias inapropiadas colonizan los intestinos, incluso los estímulos inofensivos (como los componentes de los alimentos u otras bacterias no patógenas) tienen la capacidad de desencadenar inflamación a nivel del tracto gastrointestinal, pudiendo agravarse con cuadros de alergia alimentaria o, incluso, enfermedad inflamatoria intestinal [30].

VII.B. Alteraciones del TGI

VII.B.1. Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII): en la EII, como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, se encuentran grupos bacterianos poco habituales, acompañados de una caída en la diversidad microbiana [41, 70, 71]. Hace tiempo que se sospecha que la EII implica una respuesta aberrante del huésped a su MBTi. Esta teoría fue apoyada en gran medida por un cierto grado de efectividad de los antibióticos en la prevención y el tratamiento de esta enfermedad, así como por la presencia de microorganismos y componentes microbianos en las lesiones de colon inducidas por inflamación [18, 58]. Muchos aspectos de la participación de la MBTi en la EII han sido revisados por expertos en los últimos años [18, 58, 67, 72, 73, 74, 75]. Si bien se ha observado una MBTi aberrante tanto en pacientes con EII humana [18, 22, 58, 73, 76], como en modelos animales de inflamación intestinal [18, 68], la relación de causa y consecuencia entre una microbiota anormal y el desarrollo de EII siempre ha sido objeto de debate. ¿El daño inmunomediado se debe al reconocimiento de epitopes bacterianos particulares o a una reacción autoinmune mediada por la mímica molecular? ¿La respuesta inmune aberrante se debe a la presencia de una especie inmunogénica particular de microbiota, o a un desequilibrio de microbiota en el que están presentes más miembros colitógenos? ¿Pueden ciertos miembros de la microbiota o componentes bacterianos promover una respuesta tolerogénica del huésped? Recientemente se han dilucidado los mecanismos subyacentes a algunos aspectos de la lesión mediada por la microbiota en el intestino, mejorando la comprensión de la patogénesis de la EII y sentando las bases para el diseño de terapias más específicas y efectivas. Si bien algunos estudios han sugerido un papel para las reacciones autoinmunes resultantes de la mímica bacteriana-huésped en la patogénesis de la EII, la mayoría de los posibles imitadores pertenecen a bacterias patógenas, como *Mycobacterium* spp., *Campylobacter* y *Klebsiella* [18, 58]. También debe señalarse que, si bien la MBTi es sin dudas un participante central en la patogénesis de la EII, también lo es el genotipo del huésped. Numerosos estudios han implicado

múltiples loci genéticos en su fisiopatología [18]. Los anfitriones que portan muchos de estos loci parecen ser más propensos a la inflamación del tracto gastrointestinal debido a la falta de una regulación adecuada de sus comunidades bacterianas intestinales, así como debido a una respuesta inflamatoria excesivamente celosa a sus microbios residentes.

VII.B.2. Enfermedades malignas: si bien la MBTi comensal es casi siempre sinónimo de salud, algunos aspectos particulares podrían relacionarse en alguna medida con procesos cancerígenos. Los mecanismos propuestos de carcinogénesis relacionados a la microbiota generalmente se dividen en tres categorías: 1) la señalización proinflamatoria desproporcionada en la mucosa del tracto gastrointestinal daría como resultado un aumento de desprendimiento y reparación del epitelio intestinal, proceso que podría evolucionar hacia la formación de neoplasia y malignidad. 2) En segundo lugar, ciertas especies microbianas podrían tener efectos citotóxicos directos sobre las células en la mucosa intestinal o causar toxicidad a través de un efecto "espectador" (el tejido huésped es dañado por células huésped activadas por ciertas especies microbianas). 3) Finalmente, el metabolismo de algunos nutrientes por parte de miembros particulares de la microbiota podría resultar en subproductos tóxicos para el epitelio intestinal, pudiendo a posteriori, por la reparación imperfecta del epitelio lesionado, provocarse transformaciones neoplásicas. Quizás el ejemplo más conocido y más estudiado de una neoplasia maligna del tracto gastrointestinal inducida por microbiota sea el carcinoma gástrico mediado por *Helicobacter pylori* [18, 77].

VII.B.3. Alteraciones de órganos anexos: colelitiasis y pancreatitis (como consecuencia de un metabolismo anómalo del colesterol por una MBTi disbiótica) y enfermedades hepáticas (por caída del número de bifidobacterias beneficiosas [18, 78] y alteración de la barrera intestinal con traslocación bacteriana [18, 79].

VII.B.4. Enfermedades multifactoriales: enfermedades en las que la población anaerobia estricta se reduce están normalmente relacionadas con condiciones fisiológicas asociadas a procesos inflamatorios y estrés oxidativo [25]. Muchas de estas patologías tienen una relación indirecta con la MBTi disbiótica. Sin embargo, numerosos estudios han establecido relaciones entre cada una de ellas y alguna característica particular de esa disbiosis.

VII.B.4.i. Obesidad: MBTi con mayor abundancia relativa de *Firmicutes* [80]. Dentro de la amplia literatura que relaciona a la obesidad con ciertas alteraciones de la MBTi, hay tres teorías que parecen destacarse: 1) Mayor extrac-

ción energética de la dieta (ratones libre de gérmenes requieren un 30% más de alimento para lograr el mismo crecimiento); 2) Inflamación crónica (el lipopolisacárido -LPS- de la membrana celular de bacterias Gram (-) actuaría como ligando de los receptores TLR2 y TLR4, activando la síntesis de citoquinas y de mediadores inmunológicos de la inflamación; que en forma crónica favorecerían la resistencia a la insulina); y 3) Efecto incretina (por estímulo de la diferenciación de células enteroendócrinas a nivel colónico) [81].

VII.B.4.ii. Alergias: diversos estudios demuestran que los lactantes y los niños de corta edad que padecen alergias presentan un perfil de MBTi distinto al de aquellos que no las padecen. En particular, albergan diferentes niveles de la especie *Bifidobacterium*. Más allá del carácter hereditario que todo proceso alérgico implica, se ha relacionado a la hipersensibilidad a alergenos en recién nacidos y niños/as con la presencia de MBTi disbióticas. Esto se debe a que, durante los primeros meses y años de vida, el sistema inmunitario de la mucosa intestinal madura de manera progresiva junto con el desarrollo de la MBTi, la cual parecería modular las respuestas inmunitaria e inflamatoria sistémicas, proporcionando así una mayor protección contra los antígenos del entorno, y evitando la activación excesiva de los mastocitos y basófilos por parte de la inmunoglobulina E (IgE) [42].

También se ha asociado al asma al descenso de los géneros *Faecalibacterium*, *Lachnospira*, *Rothia*, *Veillonella* y *Peptostreptococcus*, así como al incremento del género *Oscillospira* [25].

VII.B.4.iii. Diabetes I y II: incremento de *Bacteroides ovatus* y de una especie no definida de *Firmicutes CO19* (DBT 1), e incremento de *Bacteroides*, *E. Coli* y *Desulfovibrio* (DBT 2).

VII.B.4.iv. Trastornos del espectro autista (TEA): hay que ser cuidadosos dado el dispar nivel de evidencia científica que sustenta este tipo de afirmaciones, pero lo cierto es que ya hay una gran cantidad de buenos estudios que describen un aumento de la incidencia de disbiosis en pacientes con TEA. Si bien los síntomas gastrointestinales son una comorbilidad habitual en pacientes con TEA, aún se desconocen con certeza los mecanismos subyacentes [82]. Ya sabemos que la MBTi influye en el desarrollo y la fisiología del SNC, y que lo hace a través de los sistemas neuroendócrino, neuroinmune y autónomo [83]. También hay evidencia derivada de modelos animales que sugieren que ciertos cambios microbianos en el intestino podrían producir cambios consistentes con el cuadro clínico de varios TEA. Dentro de los mecanismos propuestos

se encuentran: la producción de toxinas, las aberraciones en los procesos y productos de fermentación y ciertas anormalidades inmunológicas y metabólicas [84]. Los microorganismos de la MBTi liberarían metabolitos que gatillarían una respuesta de citoquinas del huésped, favoreciendo la inflamación a nivel del SNC, y provocando un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y alteraciones de la fisiología vascular y de la estructura cerebral. Esta fisiopatogenia podría relacionarse a trastornos como la depresión, la ansiedad, enfermedades como el Alzheimer y el Parkinson y los TEA [85]. Sin embargo, hay que aclarar que todas estas hipótesis surgen de estudios en fases iniciales de investigación o con escasa cantidad de sujetos. En un metanálisis reciente, se incluyeron un total de 28 artículos. Los estudios variaron entre 12 y 104 participantes con edades comprendidas entre 2 y 18 años, de diversas áreas geográficas. La mayoría de los estudios incluyeron muestras fecales; y 4 de ellos examinaron biopsias de la mucosa de diferentes sitios del intestino. La heterogeneidad en la metodología de diagnóstico de TEA, el muestreo intestinal y los métodos de laboratorio utilizados hicieron que el metanálisis fuera inapropiado. Las especies que reportaron tener una abundancia significativamente mayor en niños con TEA incluyeron *Clostridium*, *Sutterella*, *Desulfovibrio* y *Lactobacillus*. Sin embargo, los resultados son inconsistentes entre los estudios. Si bien parece claro que la MBTi se encuentra alterada en este tipo de patologías, aún se necesita una mayor exploración acerca de si esto es una causa o un efecto de la condición neurológica correspondiente [86]. La utilización de moduladores terapéuticos de la MBTi en el tratamiento de TEA al día de hoy se ha llevado a cabo tan solo en entornos experimentales, pero con escasos pero prometedores resultados [87]. En este sentido, el trasplante de microbiota fecal (TMF) ha demostrado una eficacia mayor. Su indicación se sustenta en la idea de que la administración de una gran cantidad de microorganismos comensales de un donante sano podría transformar a la MBTi disbiótica en una eubiótica. Los ensayos clínicos de este tipo combinaron antibióticos, una limpieza intestinal, un supresor de ácido estomacal y al TMF mismo, luego de lo cual se ha podido observar en los pacientes mejoras significativas de sus síntomas gastrointestinales, de los síntomas relacionados con el TEA y de la conformación de su MBTi, incluyendo aumentos significativos en la diversidad bacteriana y en la abundancia relativa de *Bifidobacterias* y *Prevotella* [88].

VII.B.4.v. Aterosclerosis: nuevos estudios proponen un papel de la MBTi en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y renales crónicas, como consecuencia del paso de toxinas a través de la barrera mucosa intes-

tinal, siempre en el marco de una MBTi disbiótica. Por otra parte, en el síndrome metabólico se ha descripto el descenso de los niveles de bacterias productoras de butirato.

Muchos de los ejemplos y las referencias antes mencionadas son el resultado de muy novedosos y prometedores estudios realizados en laboratorio con ratones (fase 0 de investigación). Algunos otros implican la introducción de microorganismos comensales humanos o de sus productos en roedores isogénicos en condiciones altamente controladas durante etapas definidas de patogénesis. En función de esto, habría que subrayar que las predicciones de efectos similares en seres humanos con enfermedad preclínica o manifiesta deberían considerarse con precaución. Los ensayos clínicos controlados realizados hasta el momento han demostrado efectos terapéuticos relativamente modestos por parte de los probióticos tradicionales en adultos con diversos trastornos establecidos, lo que podría traspolarse en forma indirecta al efecto que los microorganismos que los componen tienen verdaderamente en los procesos metabólicos, fisiológicos y patológicos del tracto gastrointestinal [5, 89]. Como dijéramos, la investigación del microbioma humano (con la notable excepción del trasplante de materia fecal) aún se encuentra en su mayoría en una fase descriptiva. El traslado de estos sólidos conocimientos obtenidos a las fases clínicas y/o terapéuticas que permitan intervenciones favorables para los pacientes con disbiosis se ve dificultado debido a la profunda complejidad que expresa la composición del microbioma humano. Frente a su estudio, el conjunto de datos obtenidos es tan extenso y variado, que en general requiere de métodos estadísticos muy sofisticados para su análisis, los que, además, explican solo un pequeño porcentaje de la varianza en el microbioma. Parece claro que las interacciones 1:1 entre microorganismos que hoy creemos irrelevantes para el huésped, podrían desempeñar un papel mucho más importante de lo que se ha previsto. Esto conlleva, a su vez, que las aplicaciones industriales de esos resultados aún se mantengan en escalas menores. Una dificultad añadida es la que representan ciertas fallas lógicas en la terminología utilizada, particularmente las relacionadas a la noción de "disbiosis", que en muchas ocasiones permite conclusiones circulares. ¿En qué ocasiones podemos afirmar que hay "disbiosis" y en qué ocasiones podemos considerar que esa MBTi tan solo se aleja de la normalidad, sin implicar patología alguna? ¿Se está en presencia de una MBTi "disbiótica" *porque* hay un proceso fisiopatológico subyacente, o quizás ese proceso existe *como causa* de una "disbiosis" previa? Una gran cantidad de estudios de casos y controles al respecto parecerían tener un bajo nivel de evidencia, requiriéndose al día de hoy más metanálisis que permitan separar a las asociaciones consistentes de disbiosis-enfermedad, de las asociaciones más débiles [64]. Esto no opaca de ninguna manera la evidencia científica que sustenta todo lo antedicho, sino que, por el contrario, pretende reafirmar la base experimental sobre la que se deberían asentar los diseños de estudios por venir.

VIII. ¿Cómo lograr una MBT sana?

Ya mencionamos que una MBTi diversa es una microbiota saludable, así como que una MBTi sana es aquella que colabora -dada la variedad e importabncia de funciones que tiene- con la salud integral del huésped. Una microbiota sana es salud. Ahora bien, ¿qué medidas y recaudos deberían tomarse para lograr un estado de equilibrio y una adecuada diversidad en nuestra MBTi? A continuación se propone una serie de recomendaciones:

1. **Dieta estable y ejercicio.**

2. **Control del peso.**

3. **Dieta saludable:** lactancia materna exclusiva hasta el sexto mes de vida (como mínimo), dieta variada a lo largo de toda la vida, con alto consumo de fibras diversas y rica en alimentos fermentados. La fermentación es un proceso natural a través del cual los microorganismos como levaduras y bacterias convierten los carbohidratos (como el almidón y el azúcar) en alcohol o ácidos, los que a su vez actúan como conservantes naturales y le otorgan a los alimentos fermentados un sabor y una acidez distintos. Dicha fermentación promueve el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos beneficiosos para el huésped. Esta es la razón por la que el agregado de alimentos fermentados a la dieta es una aporte directo a la salud de quien los consume. Como veremos en los capítulos subsiguientes, existe todo tipo de alimentos fermentados: yogures, kéfir, kombucha, alimentos fermentados en base a cereales y granos, hortalizas y legumbres, frutas, encurtidos cárnicos, bebidas alcohólicas, levaduras en panificados y otra infinidad de alimentos producto de la actividad experimental en el marco de la gastronomía profesional.

4. **Suplementos:** prebióticos, probióticos, simbióticos y post-bióticos.

5. **Uso racional de antibióticos.**

6. **Contacto habitual con la naturaleza**, como forma de prevención de la higiene excesiva.

7. **Tratamiento con MBTi:** el trasplantes de materia fecal (TMF) consiste en la infusión de una suspensión fecal de un donante sano a un receptor, con la intención de restaurar alteraciones persistentes de la MBTi [90]. Como ya comentáramos, el TMF representa una opción terapéutica interesante en el tratamiento de infecciones intestinales recurrentes por *Clostridium difficile* (alta evidencia) y de algunas otras patologías como los TEA (baja evidencia).

IX. Conclusiones

Hoy la MBTi está en el centro de la escena. De hecho, la década pasada fue propuesta como "la década de la microbiota" [91, 92]. Por eso es fundamental la continuación de las investigaciones en todas sus fases, la traslación a la práctica clínica, y la divulgación científica del estado actual y de las novedades que van surgiendo. Avanzar en el conocimiento de nuestra MBTi es avanzar en el conocimiento de nuestra salud, porque una MBTi saludable es sinónimo de sanidad gastrointestinal. En este sentido, es esencial el mantenimiento de su diversidad, tanto a partir de la prevención de agresiones, como del estímulo de su desarrollo a partir de la promoción del parto vaginal, de la lactancia materna, y de una dieta rica en fibras en la que los alimentos fermentados tengan un papel protagónico.

X. Declaración de posibles conflictos de interés

Los autores no declaran poseer conflictos de interés.

XI. Bibliografía citada

[1] Rojo D, Méndez-García C, Raczkowska BA, Bargiela R, Moya A, Ferrer M, Barbas C. Exploring the human microbiome from multiple perspectives: factors altering its composition and function. FEMS Microbiol Rev. 2017 Jul;41(4):453-478.

[2] Moya A, Ferrer M. Functional redundancy-induced stability of gut microbiota subjected to disturbance. Trends Microbiol. 2016 May;24(5):402-413.

[3] O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. EMBO Rep. 2006 Jul;7(7):688-693.

[4] Bocci V. (1992) The neglected organ: bacterial flora has a crucial immunostimulatory role. Perspect Biol Med. 1992 Winter;Perspect Biol Med 35: 251-260.

[5] Lynch SV, Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. N Engl J Med. 2016 Dec 15;375(24):2369-79.

[6] Valdespino PM, Ibarra MM, Valdespino VM, Falcón LI. ¿Es una planta, un animal o un holobionte? Ciencia y Desarrollo, 2014 Jul-Ago, pp. 6-11.

[7] EA, Segre JA. The skin microbiome. Nat Rev Microbiol 2011 Apr;9(4):244-53.

[8] Moen AE, Tannæs TM, Vatn S et al. Simultaneous purification of DNA and RNA from microbiota in a single colonic mucosal biopsy. BMC Res Notes. 2016 Jun 28;9:328.

[9] Biesbroek G, Tsivtsivadze E, Sanders EA et al. Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. Am J Resp Crit Care. 2014 Dec 1;190(11):1283-92.

[10] SA, Razvi H, Dave S et al. The microbiome of the urinary tract–a role beyond infection. Nat Rev Urol. 2015 Feb;12(2):81-90.

[11] Martin DH. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. Am J Med Sci. 2012 Jan;343(1):2-9.

[12] Urbaniak C, Cummins J, Brackstone M et al. Microbiota of human breast tissue. Appl Environ Microbiol. 2014 May;80(10):3007-14.

[13] Aagaard K, Ma J, Antony KM et al. The placenta harbors a unique microbiome. Sci Transl Med. 2014;6:237ra265.

[14] Ding T, Schloss PD. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. Nature. 2014 May 15;509(7500):357-60.

[15] Li J, Jia H, Cai X et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. Nat Biotechnol. 2014 Aug;32(8):834-41.

[16] Abreu NA, Taga ME. Decoding molecular interactions in microbial communities. FEMS Microbiol Rev. 2016 Sep;40(5):648-63.

[17] Martín Cueto C et al. Microbiota autóctona. Funciones. Microbioma humano, en Álvarez Calatayud G, Marcos A, Margolles A (eds.), Desarrollo de la microbiota intestinal saludable. CABA, Sciens, 2017, pp. 1-9.

[18] Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. Physiol Rev. 2010 Jul;90(3):859-904.

[19] Schloss PD, Handelsman J. Status of the microbial census. Microbiol Mol Biol Rev. 2014;68:686-691.

[20] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. Science. 2005;308:1635-38.

[21] Xu J, Gordon JI. Inaugural article: honor thy symbionts. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:10452-59.

[22] Frank DN, Pace NR. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. Curr Opin Gastroenterol. 2008;24:4-10.

[23] Caro-Quintero A et al. Estudios del microbioma y su aplicación en el control biológico de fitopatógenos, en Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: agentes de

control biológico (vol. 1). Corporación Colombiana de Investigaciones Agropecuarias, 2018, pp. 256-293.

[24] Yang X, Xie L, Li Y, Wei C. More than 9,000,000 Unique Genes in Human Gut Bacterial Community: Estimating Gene Numbers Inside a Human Body. PloS One. 2009 Jun 29;4(6):e6074.

[25] Sánchez García B et al. La microbiota gastrointestinal, en Álvarez Calatayud G, Marcos A, Margolles A (eds.), Desarrollo de la microbiota intestinal saludable. CABA, Sciens, 2017, pp. 10-14.

[26] Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. Trends Biotechnol. 2015 Sep;33(9):496-503.

[27] Pérez-Cobas AE, Gosalbes MJ, Friedrichs A et al. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. Gut. 2013 Nov;62(11):1591-601.

[28] Arboleya Montes S et al. Factores que influyen en el desarrollo de la microbiota, en Álvarez Calatayud G, Marcos A, Margolles A (eds.), Desarrollo de la microbiota intestinal saludable. CABA, Sciens, 2017, pp. 15-21.

[29] Kuperman, AA, Koren O. Antibiotic use during pregnancy: how bad is it? BMC Med. 2016 Jun 17;14(1):91.

[30] Walker, A. (2019) Microbiome: The first 1000 days. Harvard Health Blog. 2019 May 15. In: https://www.health.harvard.edu/blog/microbiome-the-first-1000-days-2019051516627

[31] Collado MC, Amor KB, Salminen S, Knol J, Martin R. El uso de probióticos durante los primeros 1000 días de vida, en De Paula JA, Vinderola G, Weill R. Probióticos, su impacto en la nutrición y la salud. Una visión desde el Cono Sur. Instituto Danone. 2018. pp. 31-60.

[32] Koedooder R, Singer M, Schoenmakers S et al. The vaginal microbiome as a predictor for outcome of in vitro fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: a prospective study. Hum Reprod. 2019 Jun 4;34(6):1042-1054.

[33] Baud D, Pattaroni C, Vulliemoz N et al. Sperm Microbiota and its Impact on Semen Parameters. Front Microbiol. 2019 Feb 12;10:234.

[33] Jost T, Lacroix C, Braegger CP, Rochat F, Chassard C. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. Environ Microbiol. 2014 Sep;16(9):2891-904.

[34] Duranti S, Lugli GA, Mancabelli L et al. Maternal inheritance of bifidobacterial communities and bifidophages in infants through vertical transmission. Microbiome. 2017;5(1):Art. 66.

[35] Pannaraj PS, Li F, Cerini C et al. Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infnat gut microbiome. JAMA Pediatr.

2017;171(7):647-654.

[37] Jeurink P, et al. Human milk: A source of more life than we imagine. Beneficial Microbes. 2013 Mar 1;4(1):17-30.

[38] Guarner F. Dieta y microbiota, en Álvarez Calatayud G, Marcos A, Margolles A (eds.), Desarrollo de la microbiota intestinal saludable. CABA, Sciens, 2017, pp. 22-26.

[39] Simrén M, Barbara G, Flint HJ, Spiegel BM, Spiller RC, Vanner S, Verdu EF, Whorwell PJ, Zoetendal EG; Rome Foundation Committee. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. Gut. 2013 Jan;62(1):159-76.

[40] Bach J-F. The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases. N Engl J Med. 2002 Sep 19; 347:911-920.

[41] Arroyo del Moral A. Influencia de la microbiota intestinal en la regulación del sistema inmune. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. 2018.

[42] Shamir R, van Elburg R, Knol J, Dupont C et al. La salud intestinal en los primeros años de vida: la importancia de la microbiota intestinal y de la nutrición para el desarrollo y la salud futura. Wiley, Essential Knowledge Briefing. 2016.

[43] Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Innate immune recognition of the indigenous microbial flora. Mucosal Immunol. 2008 Nov;1 Suppl 1:S10-4.

[44] Wagner CL, Taylor SN, Johnson D. Host factors in amniotic fluid and breast milk that contribute to gut maturation. Clin Rev Allergy Immunol. 2008;34:191-204.

[45] Salminen S, Isolauri E. Intestinal colonization, microbiota and probiotics. J Pediatr. 2006;149:S115-20.

[46] Gordon HA, Bruckner-Kardoss E. Effect of normal microbial flora on intestinal surface area. Am J Physiol. 1961;201:175-178.

[47] Wostmann B, Bruckner-Kardoss E. Development of cecal distention in germ-free baby rats. Am J Physiol. 1959;197:1345-1346.

[48] Banasaz M, Norin E, Holma R, Midtvedt T. Increased enterocyte production in gnotobiotic rats mono-associated with Lactobacillus rhamnosus GG. Appl Environ Microbiol. 2002;68:3031-34.

[49] Alam M, Midtvedt T, Uribe A. Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. Scand J Gastroenterol. 1994;29:445-451.

[50] Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. Proc Natl Acad Sci USA.

2002;99:15451-55.

[51] Husebye E, Hellstrom PM, Midtvedt T. Intestinal microflora stimulates myoelectric activity of rat small intestine by promoting cyclic initiation and aboral propagation of migrating myoelectric complex. Dig Dis Sci. 1994;39:946-956.

[52] Gustafsson BE, Einarsson K, Gustafsson J. Influence of cholesterol feeding on liver microsomal metabolism of steroids and bile acids in conventional and germ-free rats. J Biol Chem. 1975;250:8496-8502.

[53] Hooper LV. Bacterial contributions to mammalian gut development. 2004 Mar;12(3):129-34.

[54] Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. Science. 2001;291:881-884.

[54] Lutgendorff F, Akkermans LM, Soderholm JD. The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastrointestinal damage. Curr Mol Med. 2008;8:282-298.

[55] Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. Gastroenterology. 2007;132:1359-74.

[56] Weng M, Walker WA. The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. J Dev Orig Health Dis. 2013 Jun;4(3):203-14.

[57] Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. Proc Nutr Soc. 2003;62:67-72.

[58] Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. Gastroenterology. 2008;134:577-594.

[59] Alpert C, Scheel J, Engst W, Loh G, Blaut M. Adaptation of protein expression by Escherichia coli in the gastrointestinal tract of gnotobiotic mice. Environ Microbiol. 2009;11:751-761.

[60] Mahowald MA, Rey FE, Seedorf H et al. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106: 5859-64.

[61] Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. Cell Host Microbe. 2018 Jun 13;23(6):716-724.

[62] O'Mahony SM, Clarke G et al. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. Behav Brain Res. 2015 Jan 15;277:32-48

[63] Ge X, Pan J, Liu Y et al. Intestinal Crosstalk between Microbiota and Serotonin and its Impact on Gut Motility. Curr Pharm Biotechnol. 2018;19(3):190-195.

[64] Brüssow H. Problems with the concept of gut microbiota dysbiosis. Microb Biotechnol. 2019 Aug 26.

[65] Underwood MA, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. Bifidobacterium longum subspecies infantis: champion colonizer of the infant gut. Pediatr Res. 2015 Jan;77(1-2):229-35.

[66] Pedron T, Sansonetti P. Commensals, bacterial pathogens and intestinal inflammation: an intriguing menage a trois. Cell Host Microbe. 2008;3:344-347.

[67] Srikanth CV, McCormick BA. Interactions of the intestinal epithelium with the pathogen and the indigenous microbiota: a threeway crosstalk. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2008;2008:626-827.

[68] Lupp C, Robertson ML, Wickham ME et al. Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. Cell Host Microbe. 2007;2:119-129.

[69] Stecher B, Barthel M, Schlumberger MC, Haberli L, Rabsch W, Kremer M, Hardt WD. Motility allows S. typhimurium to benefit from the mucosal defence. Cell Microbiol. 2008;10:1166-80.

[70] Zhang M, Sun K, Wu Y, Yang Y, Tso P, Wu Z. Interactions between Intestinal Microbiota and Host Immune Response in Inflammatory Bowel Disease. Front Immunol. 2017;8:942.

[71] Guarner F. Microbiota intestinal y enfermedades inflamatorias del intestino. Gastroenterol Hepatol. 2011;34(3):147-154.

[72] Packey CD, Sartor RB. Commensal bacteria, traditional and opportunistic pathogens, dysbiosis and bacterial killing in inflammatory bowel diseases. Curr Opin Infect Dis. 2009;22:292-301.

[73] Peterson DA, Frank DN, Pace NR, Gordon JI. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. Cell Host Microbe. 2008 Jun 12;3(6):417-27.

[74] Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2006;3:390-407.

[75] RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature. 2007;448:427-434.

[76] Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:13780-85.

[77] Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of Helicobacter pylori. Gastroenterology. 2007;133:659-672.

[78] Zhao HY, Wang HJ, Lu Z, Xu SZ. Intestinal microflora in patients with liver cirrhosis. Chin J Dig Dis. 2004;5:64-67.

[79] Lorenzo-Zuniga V, Rodriguez-Ortigosa CM, Bartoli R et al. Insulin-like growth factor I improves intestinal barrier function in cirrhotic rats. Gut. 2006;55:1306-1312.

[80] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature. 2006 Dec 21;444(7122):1027-31.

[81] Farías N., María Magdalena MM, Silva B. C, Catalina, & Rozowski N, Jaime. J. (2011). Microbiota intestinal: rol en obesidad. Revista Rev. chilena chil. de nutriciónnutr. 2011;38(2):228-233.

[82] Sun H, You Z, Jia L, Wang F. Autism spectrum disorder is associated with gut microbiota disorder in children. BMC Pediatr. 2019 Dec 27;19(1):516.

[83] Li Q, Han Y, Dy ABC, Hagerman RJ. The Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorders. Front Cell Neurosci. 2017 Apr 28;11:120.

[84] Ding HT, Taur Y, Walkup JT. Gut Microbiota and Autism: Key Concepts and Findings. J Autism Dev Disord. 2017 Feb;47(2):480-489.

[85] Zhu S, Jiang Y, Xu K et al. The progress of gut microbiome research related to brain disorders. J Neuroinflammation. 2020 Jan 17;17(1):25.

[86] Bezawada N, Phang TH, Hold GL, Hansen R. Autism Spectrum Disorder and the Gut Microbiota in Children. Ann Nutr Metab. 2020 Jan 24:1-14.

[87] Mangiola F, Ianiro G, Franceschi F et al. Gut microbiota in autism and mood disorders. World J Gastroenterol. 2016 Jan 7;22(1):361-8.

[88] Kang DW, Adams JB, Coleman DM et al. Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. Sci Rep. 2019 Apr 9;9(1):5821.

[89] Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, de Vos WM. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. Genes Nutr. 2011;6:209-40.

[90] Quaranta G, Sanguinetti M, Masucci L. Fecal Microbiota Transplantation: A Potential Tool for Treatment of Human Female Reproductive Tract Diseases. Front Immunol. 2019 Nov 26;10:2653.

[91] Cat LA. The decade of the microbiome. Forbes. 2019 Dec 31. https://www.forbes.com/sites/linhanhcat/2019/12/31/decade-of-the-microbiome/#556d36099961

[92] Pariente N et al. Milestones in human microbiota research. Nature Milestones. 2019 Jun 18. https://www.nature.com/collections/bhciihjhei/editorialcredit

Tamang JP, Cotter A, Endo, NS et al. Fermented foods in a global age: east meets west. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2020;19:184-217.

Toscano M, De Grandi R, Grossi E, Drago L. Role of the Human Breast Milk-Associated Microbiota on the Newborns' Immune System: A Mini Review. Front Microbiol. 2017 Oct 25;8:2100.

4

Consumo de leches fermentadas probióticas y su impacto sobre el sistema inmune

Carolina Maldonado Galdeano
cmaldo@cerela.org.ar

- *Laboratorio de Inmunología, Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET), Argentina.*
- *Catedra de Inmunología, Instituto de Microbiología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.*

Silvia Inés Cazorla
scazorla@cerela.org.ar

- *Laboratorio de Inmunología, Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET), Argentina.*
- *Catedra de Inmunología, Instituto de Microbiología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.*

Florencia Balcells
fbalcells@cerela.org.ar

- *Laboratorio de Inmunología, Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET), Argentina*

María José Martínez Monteros
mjmartinez@cerela.org.ar

- *Laboratorio de Inmunología, Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET), Argentina*

José María Lemme Dumit
jmlemme@gmail.com

- *Laboratorio de Inmunología, Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET), Argentina*

Gabriela Perdigón
perdigon@cerela.org.ar

- *Laboratorio de Inmunología, Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET), Argentina*

Resumen

Los productos fermentados son conocidos desde épocas milenarias por sus beneficios sobre la salud de los consumidores. A partir de allí surge el concepto de probióticos, que según la Organización Mundial de la Salud y el Código Alimentario Argentino son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, ejercen un efecto benéfico sobre el consumidor. Muchos de estos microorganismos han sido aislados de la microbiota del hospedador y son capaces de impactar positivamente en el sistema inmune de mucosa. En los últimos tiempos, los estudios exhaustivos sobre estos microorganismos han permitido conocer algunos de los mecanismos de acción por los cuales ejercen sus efectos. Algunas bacterias probióticas interaccionan directamente con las células epiteliales intestinales, induciendo cambios en las mismas, que llevan a la liberación de sustancias que permiten iniciar un diálogo entre las células y de ese modo orquestar la respuesta inmune en intestino. La mayoría de los probióticos ingresan al organismo a través de los alimentos o suplementos alimenticios y una vez en el intestino, van a reforzar la barrera intestinal y mejorar el balance de la microbiota intestinal. Se ha demostrado de manera científica que el efecto no se limita al ambiente de intestino, sino que también puede tener efecto en otros sitios mucosos y no mucosos distantes. Estudios recientes demostraron que los probióticos pueden actuar a nivel de órganos distantes, como timo.

El timo es de fundamental importancia en la diferenciación y maduración inmune de los linfocitos T, por lo que está íntimamente involucrado en el correcto funcionamiento del sistema inmune. Fisiológicamente, el timo involuciona con la edad, haciendo a estos individuos más vulnerables a infecciones. Los cambios nutricionales y algunas infecciones también pueden afectar al timo. La posibilidad de prolongar el correcto funcionamiento de este órgano mediante el consumo de alimentos fermentados que contengan microorganismos probióticos, resulta en una estrategia atractiva y prometedora. En este capítulo mostramos parte de la evidencia científica que avala el consumo de probióticos y productos fermentados para mantener el balance del sistema inmune y mejorar la calidad de vida.

I. Introducción

El tracto gastrointestinal constituye el sitio donde se completa la digestión de los alimentos y la absorción de los productos finales, que pasan a la circulación para su distribución en el organismo [1]. Debido a que el intestino es una cavidad abierta al medio ambiente externo, recibe constantemente el impacto de antígenos que ingresan con la dieta, como también de agentes microbianos propios de la microbiota intestinal, sin embargo, es muy difícil la infección por estos microorganismos, con los cuales conviven de manera pacífica. Esta convivencia, producto de millones de años de coevolución ha llevado a que esta interacción humano-microorganismo, sea una relación simbiótica, donde las bacterias intestinales contribuyen de manera importante al metabolismo de los nutrientes humanos, al mismo tiempo que ocupan un ambiente rico en sustancias nutritivas que le permiten desarrollarse [2]. Estas interacciones bidireccionales que se establecen entre los microorganismos de la microbiota y el hospedador son fundamentales para la vida.

La microbiota intestinal no solamente cumple un rol importante en la fisiología y en el metabolismo de los alimentos, sino que también es indispensable para el desarrollo y funcionamiento del sistema inmune a nivel intestinal. Estudios realizados en animales libres de gérmenes, mostraron un menor desarrollo del sistema inmune, caracterizado por tejido linfático asociado a intestino (GALT) inmaduros, descenso del número de linfocitos intestinales, disminución de los niveles de péptidos antimicrobianos y de IgA, todo lo cual, es revertido luego de la colonización con bacterias comensales, indicando la importancia de la microbiota en el normal desarrollo del sistema inmune intestinal [3].

Al mismo tiempo el sistema inmune debe ser capaz de tolerar o no responder al gran número de microorganismos que residen en el lumen intestinal [4], sin descuidar o permitir la entrada de microorganismos patógenos que rompen las barreras químicas y físicas (IgA-s, péptidos antimicrobianos y el mucus). En este sentido, la microbiota cumple un rol clave en direccionar muchos aspectos del desarrollo y regulación del sistema inmune del hospedador [5, 6].

Con todo esto, el sistema inmune intestinal ha desarrollado propiedades especializadas que le permiten responder frente a la entrada de antígenos potencialmente dañinos o de microorganismos patógenos [7].

II. Organización del sistema inmune de mucosa intestinal

El tejido linfático asociado a intestino o GALT (por las siglas en inglés de *Gut Associated Lymphoid Tissue*) está organizado en diferentes estructuras como las placas de Peyer (intestino delgado) y los folículos linfoides aislados (intestino grueso), los cuales están distribuidos a lo largo de la pared intestinal.

Las placas de Peyer (PP) son agregados linfocitarios, visibles macroscópicamente,

que están presentes en la submucosa a lo largo del intestino delgado [8]. Las PP están constituidas por centros germinales que contienen linfocitos B rodeadas de áreas interfoliculares de linfocitos T. Estas regiones donde se encuentran las células del sistema inmune, se encuentran separadas del lumen intestinal por una sola capa de células epiteliales que forman lo que se denomina epitelio asociado a folículo o FAE (por las siglas en inglés de *Follicle-Associated Epithelium*). Por debajo de esta capa, se ubica una zona difusa conocida como domo subepitelial, poblada por células presentadoras de antígenos (CPAs) profesionales (ver Figura 1).

Figura 1. Estructura y organización del sistema de mucosa intestinal

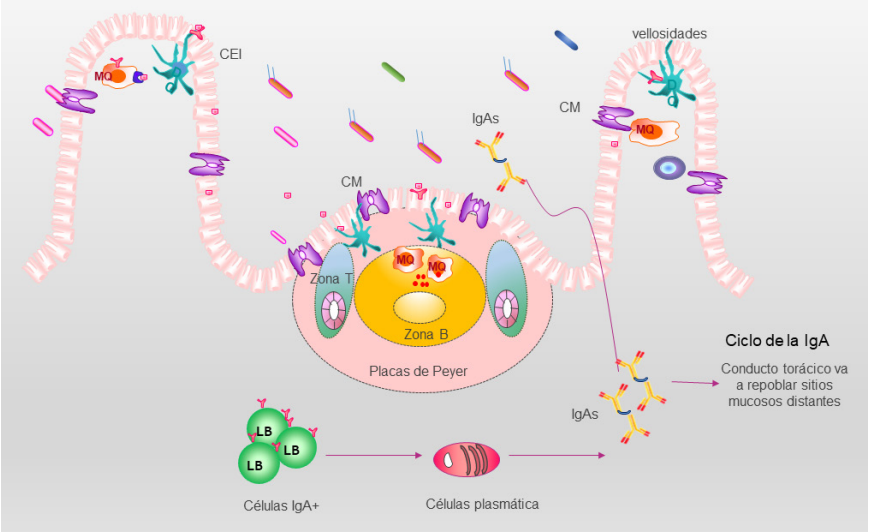


Diagrama esquemático de los componentes celulares del sistema inmune intestinal. *Se ilustra el sitio inductor de la respuesta inmune, las placas de Peyer y el sitio efector, las vellosidades intestinales. Se puede observar el epitelio asociado al folículo, el domo subepitelial que contiene abundantes células presentadoras de antígeno CPAs (células dendríticas y macrófagos), la zona marginal con macrófagos y linfocitos B, el área interfolicular rica en linfocitos T y el centro germinal con presencia de linfocitos B. Las placas de Peyer presentan vasos linfáticos eferentes y, el antígeno llega por la captura luminal por las proyecciones de membrana emitidas por las células dendríticas o macrófagos, o por el pasaje transcelular a través de las células M.*

El FAE es diferente del resto del epitelio intestinal, porque contiene menor concentración de enzimas digestivas asociadas a las vellosidades y menos pronunciado el borde en cepillo. Estas especializaciones únicas del epitelio en dichas regiones, es lo que le permite la captación de antígenos que llegan a luz del intestino. En este proceso de captación intervienen las células M, las cuales carecen de microvellosidades y las recubre una muy delgada capa de mucus, lo que posibilita una mayor superficie de contacto con los antígenos del lumen [9].

II.A. Inducción de la respuesta inmune en el intestino

La defensa inmunitaria innata intestinal esta mediada en parte por barreras físicas, mecánicas y químicas inespecíficas. Entre las barreras físicas, se encuentran las células del epitelio, las cuales forman una única capa de células unidas entre sí mediante uniones estrechas, ubicadas en la porción apical de las mismas, las cuales restringen el paso de sustancias y antígenos del lumen a través de ellas, siendo únicamente permeable al paso de determinados solutos y al agua [10, 11].

Las células epiteliales de intestino tienen una participación importante en la inducción de la respuesta inmune ya que estas, actúan como sensores que detectan componentes microbianos a través de los receptores de reconocimiento de patrón (PRRs, *Pattern-Recognition Receptors*) tales como los receptores tipo *Toll* o TLRs (por las siglas en inglés de *Toll Like Receptors*) [12].

Los movimientos peristálticos forman parte de la barrera mecánica inespecífica ya que impiden la adhesión de los microorganismos al epitelio y ayudan a la expulsión de los mismos con las heces [13].

En el epitelio se encuentran células especializadas que actúan como una barrera protectora de la mucosa. Entre esas células podemos mencionar las células de Paneth. Estas células epiteliales especializadas ubicadas en las criptas de las vellosidades, producen péptidos con actividad antimicrobiana algunos de ellos denominados defensinas que ejercen efectos tóxicos sobre los microorganismos provocando la pérdida de la integridad de su pared o membrana [14]. Las células caliciformes, otro tipo de células epiteliales modificadas, son secretoras de diversas proteínas glicosiladas llamadas mucinas que recubren el epitelio formando una capa de mucus, que mantiene distancia entre los antígenos de la luz intestinal y las células del epitelio [15]. También a lo largo del epitelio del tracto gastrointestinal se encuentran presentes las células enteroendócrinas que secretan hormonas implicadas en los procesos de regulación de fluidos y en la secreción de electrolitos, en la motilidad intestinal, en el flujo sanguíneo y la captación de los alimentos [16].

Por debajo de la monocapa de células epiteliales, se encuentran dispersos abundantes linfocitos y células presentadoras de anticuerpos (células dendríticas y macrófagos); las cuales reciben señales de las células epiteliales y desencadenan mecanismos no específicos innatos, que promueven la respuesta inmune adaptativa [17].

Como se expuso anteriormente, el sistema inmune a nivel de la mucosa intestinal se encuentra en constante estado de alerta, pero está adaptado a la presencia de microorganismos comensales y sus productos.

Para poner en marcha una respuesta inmune a nivel de mucosas, es necesario que el antígeno extraño sea captado por las células M [18] o por las células dendríticas, que tienen la capacidad de emitir prolongaciones de sus membranas entre las células del epitelio para tomar contacto con los antígenos presentes en el lumen intestinal [19].

Luego de producida la captación del antígeno, comienzan las primeras interacciones en los sitios inductores de la respuesta inmunitaria intestinal, donde las CPAs

presentan el antígeno a los linfocitos T o puede ocurrir la presentación entre un linfocito B y T. Este proceso puede suceder en el domo subepitelial de las placas de Peyer, en las regiones interfoliculares de los tejidos linfoides organizados o en los folículos linfoides aislados [20].

La principal forma de respuesta inmunitaria adaptativa de mucosas es la inmunidad humoral, con producción local y secreción de Inmunoglobulina A (IgA) dimérica o multimérica, resistentes a la degradación por proteasas del microambiente intestinal [21]. La IgA forma parte de la barrera intestinal, neutralizando los antígenos, de manera que estos no puedan unirse a los receptores celulares y facilitando de ese modo su expulsión mediante el peristaltismo intestinal [22].

III. Probióticos y salud

Hasta hace relativamente poco tiempo atrás, las bacterias estaban asociadas a enfermedad y eran consideradas nocivas para la salud, sin embargo, estudios posteriores demostraron que existen microorganismos que viven de manera simbiótica en el cuerpo, muchas de ellas con propiedades beneficiosas para la salud. Actualmente, se habla de microorganismos probióticos, los cuales han sido definidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, *Food Agriculture Organization*) junto con la Organización Mundial para la Salud (OMS) como "microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedador" [23, 24]. Teniendo en cuenta esta definición, podríamos considerar "probióticos putativos" o "potenciales probióticos" a todos los microorganismos comensales de las mucosas, con efectos beneficiosos sobre la salud, sin embargo, hasta que estas cepas sean aisladas, caracterizadas y demuestren algún efecto favorable para el hospedador, las mismas no pueden ser consideradas como verdaderos probióticos [24].

Los géneros más utilizados como probióticos en humanos, son *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, o *Saccharomyces*. Los probióticos se encuentran disponibles en dos formas diferentes, como alimentos o como suplementos dietarios.

Una de las preguntas que siempre surgen en el empleo de estos microorganismos probióticos es referente a la dosis recomendada y a la frecuencia con la que deben ser consumidos. La mayor parte de la evidencia científica muestra que las dosis mínimas con las que se observan efectos beneficiosos están entre 10^6-10^9 células vivas por día. Esto es un concepto general, que tiene sus variantes dependiendo de la cepa, donde entraran en juego otros aspectos importantes como la capacidad de las mismas para sobrevivir al pasaje por el medio sumamente ácido del estómago, la capacidad de adherencia al epitelio del intestino o a la capa de mucus, lo cual favorecerá la permanencia y multiplicación de dicha bacteria en el intestino. Todas estas características son específicas de especie y de cepa y estarán íntimamente relacionadas a la dosis necesaria [25, 26].

En la literatura se han descripto una gran cantidad de efectos beneficiosos para la salud tanto a nivel neurológico, endocrinológico e inmunológicos inducidos por el consumo de microorganismos probióticos. Muchos de esos efectos son específicos de cepa. Otros efectos más comunes y que podrían generalizarse a nivel de especie, son la producción de vitaminas, la habilidad para reforzar la barrera intestinal, la actividad enzimática y la neutralización de carcinógenos, entre otros. Hay efectos muy frecuentes y comunes entre los diferentes probióticos, como su capacidad para colonizar temporariamente, producir ácidos orgánicos, promover la diversidad de la microbiota y competir con los patógenos, entre algunos de los ejemplos [24].

Los efectos beneficiosos de los probióticos derivan de un amplio rango de mecanismos los cuales incluyen el contacto directo célula bacteriana-hospedador o, la secreción de diversas moléculas que actúan como mediadores finales de la comunicación probiótica en el organismo. La naturaleza química y molecular de los componentes presentes y liberados al ambiente extracelular por las bacterias probióticas es muy diverso, los cuales incluyen péptidos de bajo peso molecular, aminoácidos, polisacáridos de pared celular, ADN bacteriano, ácidos orgánicos como el ácido láctico o los ácidos grasos de cadena corta [27]. Debido a este repertorio de moléculas efectoras que pueden interactuar con el hospedador, sus mecanismos de acción son muy diversos [28].

III.A. Probióticos en la modulación del sistema inmune intestinal

Entre los diferentes efectos atribuidos a los probióticos, el que ha sido estudiado en nuestro laboratorio es la capacidad de los mismos para estimular/modular el sistema inmune intestinal.

Los probióticos tienen como principal puerta de entrada, la vía oral, a través de los alimentos que los contienen y que forman parte de la dieta diaria. Al llegar al intestino delgado, establecen una comunicación directa con las células del epitelio intestinal [29]. En este punto es donde se pone en marcha la comunicación entre las diferentes células, siendo las células epiteliales claves en la información que van a transmitir a las células inmunes subyacentes [30].

Las interacciones que se establecen entre las células eucariotas (CEI) y procariotas (bacterias) están determinadas mediante receptores. Las células del epitelio intestinal presentan en su superficie los receptores de reconocimiento de patrón (RRP) que van a reconocer estructuras especificas en la pared celular de los microorganismos probióticos, llevando a desencadenar una cascada de señales que culminan en la síntesis de mediadores bioquímicos. Entre ellos, los más importantes son las citoquinas, quienes serán las encargadas de iniciar el diálogo entre las células.

Teniendo en cuenta lo antes mencionado, diferentes moléculas localizadas en la pared celular podrían interaccionar con los PRRs de las células epiteliales intestinales y/o de las células inmunes presentes en la lámina propia, y actuar como potenciales adyuvantes de la mucosa mejorando la respuesta inmune local y sistémica. Existen investigaciones que muestran que la pared celular de microorganismos probióticos tienen

un efecto similar al de la bacteria completa, sobre las células epiteliales de intestino [31].

El epitelio intestinal tiene por tanto una participación clave y activa, siendo estas células las encargadas de comunicar los cambios que se producen en el lumen intestinal e informar a las células inmunes subyacentes.

Existen en el epitelio, células especializadas, como son las células caliciformes, productoras de mucus y las células de Paneth, secretoras de péptidos antimicrobianos. Ambos tipos celulares son importantes en mantener la integridad de la barrera intestinal y en la defensa frente a infecciones [32, 33].

En los últimos años, los estudios llevados a cabo en las células caliciformes, han permitido entender más profundamente el rol de estas células en el intestino, atribuyéndole otras funciones además de la síntesis de mucina. Es así que, se ha demostrado que, éstas células son capaces de endocitar material soluble presente en el lumen intestinal y pasarlo a las células dendríticas subyacentes [34], activando de ese modo al sistema inmune.

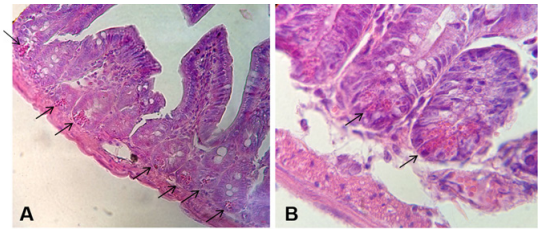
Estudios realizados en modelos animales de experimentación mostraron que la administración oral de diferentes bacterias probióticas o de sus paredes celulares no indujeron cambios en el número de células caliciformes a nivel de intestino delgado [35]. Sin embargo, aun cuando el número de células no varíe, la función de las mismas puede verse activada por acción de los probióticos, induciendo aumento en la secreción de mucinas [36].

Otros estudios realizados recientemente en cerdos mostraron que la administración de una mezcla de *Bacillus licheniformis* y *B. subtilis* produjo cambios en la composición de la microbiota, que afectaron positivamente el número de las células caliciformes y la producción de MUC2 [37]. En la misma línea, estudios realizados en pollo con una cepa de *Lactobacillus reuteri* logró un aumento en la diferenciación de células caliciformes a partir de células madres con aumentos en la producción de MUC2 [38]. También se han reportado cambios en la composición de los carbohidratos de la mucina producida por las células caliciformes [39].

La secreción de péptidos antimicrobianos conjuntamente con la síntesis de IgA y el mucus constituyen una importante herramienta para mantener el balance de la microbiota intestinal y restringir la entrada de microorganismos patógenos [40].

Diferentes cepas de bacterias probióticas han mostrado tener efecto sobre estas células. Así, en estudios *in vivo*, donde los animales reciben por vía oral la cepa probiótica, se observó un aumento en el número de células de Paneth en las bases de las criptas del intestino delgado (Figura 2). En este mismo estudio, se observó en ratones de diferentes edades, que los probióticos aumentaron la actividad antimicrobiana de los fluidos intestinales frente a microorganismos patógenos como *S. typhimurium* and *S. aureus* [41].

Figura 2. Efecto de las bacterias probióticas sobre el número de células de Paneth



Tinción con hematoxilina-eosina en cortes de intestino delgado de ratones alimentados con Lactobacillus paracasei *CNCM I-1518. La eosina tiñe intensamente los gránulos básicos de las células de Paneth. Aumento:(A) × 400, (B) x1000. Las flechas negras indican (A) las células de Paneth en la base de las criptas y (B) los gránulos secretores de las células de Paneth.*

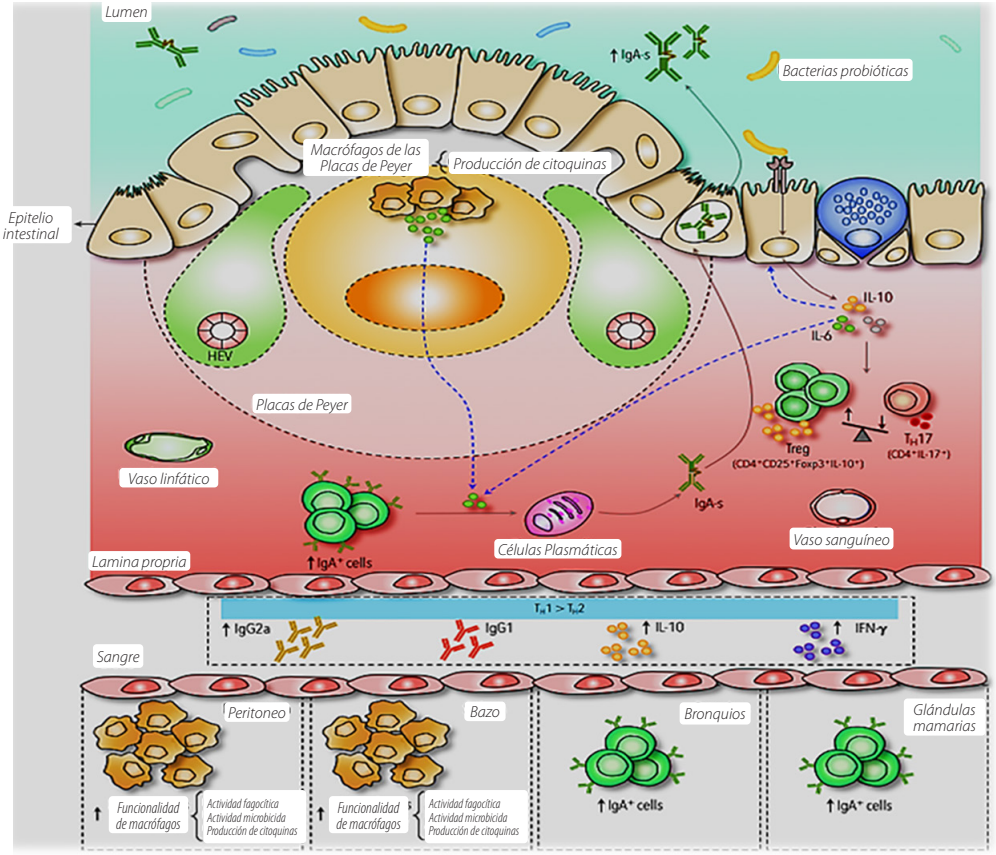
De acuerdo a estos resultados, el consumo de probióticos o de productos fermentados que los contienen serían una alternativa para estimular la secreción de péptidos antimicrobianos en el intestino, posibilitando su acción como antibióticos endógenos para combatir los patógenos y regular la simbiosis entre bacterias comensales y la mucosa del huésped.

La IgA se produce predominantemente en las superficies mucosas, teniendo como principal función servir como barrera inmunológica, previniendo la unión del patógeno a las células epiteliales [22]. Esto es posible, ya que la IgA puede unirse a los patógenos que están entrampados en el mucus y de ese modo ayudar a su expulsión mediante los movimientos peristálticos [42]. También puede tener otra función intracelular, mediante la cual se une al patógeno dentro de compartimentos vesiculares en las células epiteliales para exportarlos luego hacia la luz intestinal [43].

La inducción de la producción de IgA por la administración oral de bacterias probióticas en el intestino, es una de las propiedades inmunológicas más relevantes [44, 45].

En nuestro laboratorio diversos estudios documentaron que luego de la administración oral de las bacterias probióticas, se incrementa el número de células productoras de IgA en el intestino delgado de ratones BALB/c en una manera dosis dependiente y, que el consumo por largos periodos de tiempo de una leche fermentada probiótica incrementa el número de células IgA+ tanto en el intestino delgado como en el grueso [46, 47]. Incluso, en modelos murinos de alergia proteica, estrés o infección por enteropatógenos, la administración de las bacterias probióticas incrementó las células productoras de IgA en la lámina propia intestinal [48, 49, 50]. Un hallazgo muy importante, es que el aumento de IgA no se restringe al microambiente intestinal, sino que también alcanza a otros sitios mucosos y no mucosos distantes, como ser mamas y pulmones, mostrando una acción de los probióticos más allá del intestino [46]. En la Figura 3 se resumen los mecanismos por los cuales los probióticos modulan el sistema inmune de mucosas.

Figura 3. Mecanismos de modulación del sistema inmune de mucosas por bacterias probióticas



Mecanismo de acción de probióticos a nivel de intestino. *Luego de la administración oral, los probióticos y sus paredes celulares alcanzan el epitelio, interactúan con las CEIs activándolas y estimulando la producción de citoquinas. Las citoquinas producidas por las CEIs por la estimulación probiótica o de sus paredes celulares generan el microambiente en la lámina propia intestinal que favorece la producción y liberación de IgA-s. A nivel del sitio inductor de la respuesta inmune de mucosa intestinal (placas de Peyer), los macrófagos mantienen su estado de hiporespuesta luego de la estimulación con los probióticos o sus paredes celulares, manteniendo la capacidad de producir citoquinas. Sin embargo, en sitios no mucosos distantes (peritoneo y bazo) la administración probiótica o sus paredes celulares incrementaron la funcionalidad de los macrófagos. Las señales producidas a nivel intestinal permiten el incremento de IgA en otros sitios mucosos distantes de intestino, como bronquios y glándulas mamarias. Los mecanismos de activación/regulación inmune inducido por las bacterias probióticas o sus paredes celulares son cepa y pared celular dependientes.*

Todas estas evidencias científicas muestran el efecto de los probióticos y los productos fermentados que lo contienen principalmente sobre la respuesta inmune innata y la barrera intestinal, pero sabemos además que la activación de las células inmunes lleva a la producción de citoquinas que van a orquestar una serie de respuestas tanto en las células intestinales como también a nivel sistémico y en otros sitios distantes de intestino.

III.B. Probióticos y sus efectos sobre células del timo

El timo es un órgano linfoide primario, donde ocurren la diferenciación y maduración de los timocitos. Es la principal fuente de linfocitos T inmunocompetentes del organismo y es considerado "el reloj inmunológico del envejecimiento".

La involución del timo y la disminución de la salida de linfocitos T son dos importantes cambios que ocurren en el sistema inmunitario con el envejecimiento. La edad exacta a la cual comienza esta involución no se conoce, pero generalmente se asume que comienza en la pubertad, aunque el tejido tímico funcional se mantiene al menos hasta los 60 años de edad, momento donde la mayoría del tejido parenquimal es reemplazado por grasa. En consecuencia, el proceso de involución del timo relacionado con la edad contribuye a una mayor susceptibilidad a infecciones, cáncer y a un riesgo incrementado de fallas a la vacunación en personas adultas [51].

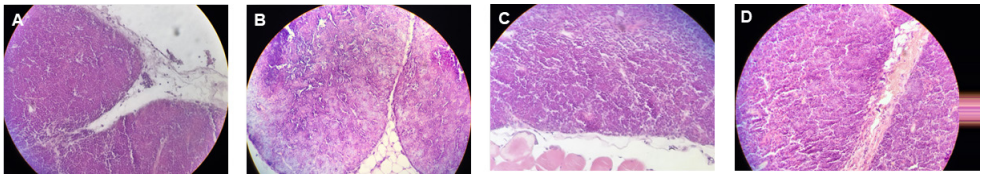
Además de esta involución fisiológica, se ha demostrado que los procesos de malnutrición, tanto obesidad como desnutrición producen atrofia del timo, afectando los compartimentos linfoides del mismo y por ende afectando su función [52, 53].

Estudios previos realizados en modelos animales de malnutrición (obesidad y desnutrición) mostraron una pérdida en la diferenciación corticomedular en los lobulillos del timo, con incremento en el número de linfocitos dobles positivos (CD4+-CD8*) inmaduros y disminución de linfoncitos T CD4+ [54].

Si bien se conocen como afectan la edad y la malnutrición en la funcionalidad del timo, poco se conoce si los probióticos podrían tener una función importante en la restauración de este órgano.

Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio, demostraron la capacidad de una leche fermentada conteniendo la cepa probiótica *L. casei* DN 114001 en restaurar la histología y la funcionalidad del timo, cuando ésta era administrada como suplemento dietario a ratones desnutridos y en ratones obesos (Figura 4) [55, 56].

Figura 4.



Cortes histológicos de timo obtenidos de ratones obesos que fueron sometidos a una dieta rica en grasas. Los animales fueron suplementados con una leche fermentada probiótica (LFP). Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Las muestras Pertenecen a los grupos A) Control normal; B) Control Obeso; C) Control normal suplementado con LFP; D) Control Obeso suplementado con LFP. Aumento de 100 ×. El consumo de la LFP mejora las alteraciones histológicas en timo causadas como consecuencia de la dieta con alta contenido de grasas.

Estudios recientes mostraron que una dieta rica en grasas acelera los cambios que se producen en el timo por el paso del tiempo [57]. Todavía no se conoce el modo en el que una dieta rica en grasas puede inducir cambios en la regulación tímica.

Si bien no existe una clara relación entre el timo y la microbiota intestinal, hay evidencias de que los linfocitos T reguladores (CD4+ Foxp3+) producidos en el timo, son capaces de inducir tolerancia en el intestino frente a la microbiota indígena.

La microbiota intestinal constantemente interacciona con las células del sistema inmune induciendo un repertorio de linfocitos a nivel intestinal. Determinados microorganismos producen un set de linfocitos característicos. Por ejemplo, las bacterias filamentosas presentes en intestino inducen una respuesta Th17, y son estas bacterias las que están relacionadas con los procesos infecciosos oportunistas y de autoinmunidad [58, 59, 60].

La colonización del intestino de ratones con *Bacteroides fragilis*, induce producción de IL-10 y diferenciación de células Treg, así mismo la administración de bacterias probióticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, modifican las condiciones inflamatorias en el intestino, probablemente por un aumento de células T reg [61,62, 63, 64]. Estos resultados muestran la importancia de la composición de la microbiota intestinal en el mantenimiento de la homeostasis y como el desbalance de la misma lleva al establecimiento de enfermedades inflamatorias [65], sugiriendo que la eficiente generación periférica de las poblaciones de células Treg específicas para determinados antígenos en respuesta a la microbiota de un individuo, proporcionan una importante educación post-tímica del sistema inmune frente a antígenos extraños, induciendo de este modo tolerancia a la microbiota comensal.

Esto sugiere una comunicación entre intestino y timo y la posibilidad de generar cambios en uno u otro sentido, teniendo la microbiota un rol fundamental en estas interacciones. Así surge la hipótesis de que el consumo de probióticos y productos fermentados podrían tener relevancia en la regulación tímica y en los cambios que se producen en la histología de este órgano con el paso del tiempo. En este sentido se direccionan futuras investigaciones que permitirán contar con las evidencias científicas necesarias para postular el consumo de alimentos fermentados y/o probióticos como una estrategia para prolongar la funcionalidad del timo, entendiéndose esto, como un modo de mejorar la inmunidad y la calidad de vida durante la senescencia.

IV. Declaración de posibles conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

V. Bibliografía citada

[1] Yu, H., Hasan, N. M., In, J. G., Estes, M. K., Kovbasnjuk, O., Zachos, N. C. y Donowitz, M. (2017)

«The Contributions of Human Mini-Intestines to the Study of Intestinal Physiology and Pathophysiology», Annual Review of Physiology, 79(1), pp. 291-312. doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105211.

[2] Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. Nat Rev Immunol. 2010; 10:159–69

[3] Chinen, T. y Rudensky, A. Y. (2012) «The effects of commensal microbiota on immune cell subsets and inflammatory responses», Immunological Reviews. Blackwell Publishing Ltd, 245(1), pp. 45-55. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01083.x.

[4] Ahluwalia, B., Magnusson, M. K. y Öhman, L. (2017) «Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad», Scandinavian Journal of Gastroenterology. Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, 52(11), pp. 1185-1193. doi: 10.1080/00365521.2017.1349173

[5] Arrieta, M.-C. y Finlay, B. B. (2012) «The commensal microbiota drives immune homeostasis.», Frontiers in Immunology. Frontiers Media SA, 3, p. 33. doi: 10.3389/fimmu.2012.00033.

[6] Hooper, L. V., Littman, D. R. y Macpherson, A. J. (2012) «Interactions Between the Microbiota and the Immune System», Science, 336(6086), pp. 1268-1273. doi: 10.1126/science.1223490.

[7] Konig, J., Wells, J., Cani, P. D., García-Ródenas, C. L., MacDonald, T., Mercenier, A.,Whyte, J., Troost, F. y Brummer, R.-J. (2016) «Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease», Clinical and Translational Gastroenterology, 7(10), p. e196. doi: 10.1038/ctg.2016.54.

[8] Da Silva, C., Wagner, C., Bonnardel, J., Gorvel, J.-P. y Lelouard, H. (2017) «The Peyer's Patch Mononuclear Phagocyte System at Steady State and during Infection», Frontiers in Immunology, 8(OCT), p. 1254. doi: 10.3389/fimmu.2017.01254.

[9] Rios, D., Wood, M. B., Li, J., Chassaing, B., Gewirtz, A. T. y Williams, I. R. (2016) «Antigen sampling by intestinal M cells is the principal pathway initiating mucosal IgA production to commensal enteric bacteria.», Mucosal Immunology. Nature Publishing Group, 9(4), pp. 907-16. doi: 10.1038/mi.2015.121.

[10] Goto, Y. y Ivanov, I. I. (2013) «Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal-host immune crosstalk.», Immunology and Cell Biology. Nature Publishing Group, 91(3), pp. 204-214. doi: 10.1038/icb.2012.80.

[11] Suzuki, T. (2013) «Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions», Cellular and Molecular Life Sciences, 70(4), pp. 631-659. doi: 10.1007/s00018-012-1070-x.

[12] Peterson, L. W. y Artis, D. (2014) «Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis.», Nature Reviews Immunology. Nature Publishing Group, 14(3), pp. 141-53. doi: 10.1038/nri3608.

[13] Cremer, J., Segota, I., Yang, C.-Y., Arnoldini, M., Sauls, J. T., Zhang, Z., Gutierrez, E., Groisman, A. y Hwa, T. (2016) «Effect of flow and peristaltic mixing on bacterial growth in a gut-like channel», Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 113(41), pp. 11414–11419. doi: 10.1073/pnas.1601306113.

[14] Sansonetti, P. J. (2004) «War and peace at mucosal surfaces», Nature Reviews Immunology, 4, pp. 953-964. doi: 10.1038/nri1499

[15] Johansson, M. E. V, Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L. y Hansson, G. C. (2008) «The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria.», Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. National Academy of Sciences, 105(39), pp. 15064-9. doi: 10.1073/pnas.0803124105.

[16] Cingolani, H. E. y Houssay, A. B. (2000) Fisiologia Humana de Houssay. 7a ed. Buenos Aires: El Ateneo.

[17] Izadpanah, A., Dwinell, M. B., Eckmann, L., Varki, N. M. y Kagnoff, M. F. (2001) «Regulated MIP-3alpha/CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity.», American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology. American Physiological Society, 280(4), pp. G710-9. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11254498.

[18] Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E. K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W. W. y Pabst, O. (2009) «Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions», Journal of Experimental Medicine, 206(13). Disponible en: http://jem.rupress.org/content/206/13/3101.short.

[19] Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.-P. y Ricciardi-Castagnoli, P. (2001) «Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria», Nature Immunology. Nature Publishing Group, 2(4), pp. 361-367. doi: 10.1038/86373.

[20] Lycke, N. Y. y Bemark, M. (2012) «The role of Peyer's patches in synchronizing gut Iga responses», Frontiers in Immunology, 3(NOV), pp. 1-9. doi: 10.3389/fimmu.2012.00329.

[21] Honda, K. y Littman, D. R. (2016) «The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease», Nature. Nature Research, 535(7610), pp. 75-84. doi: 10.1038/nature18848.

[22] Sutherland, D. B. y Fagarasan, S. (2012) «IgA synthesis: A form of functional immune adaptation extending beyond gut», Current Opinion in Immunology. Elsevier Ltd, 24(3), pp. 261-268. doi: 10.1016/j.coi.2012.03.005.

[23] FAO/WHO (2001) «Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation», en Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, p. 30. doi: 10.1201/9781420009613.ch16.

[24] Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C. y Sanders, M. E. (2014) «Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic.», Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. Nature Publishing Group, 11, pp. 506-514. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66.

[25] Champagne CP, Ross RP, Saarela M, Hansen KF, Charalampopoulos D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. Int J Food Microbiol 2011; 149:185-193; PMID:21803436; http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.005

[26] Reid, G. The Importance of Guidelines in the Development and Application of Probiotics. Curr Pharm Des 2005; 11:11-16; PMID:15638748; http://dx.doi.org/10.2174/1381612053382395

[27] Lebeer, S., Vanderleyden, J. y De Keersmaecker, S. C. J. (2008) «Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action.», Microbiology and Molecular Biology Reviews, 72(4), pp. 728-764. doi: 10.1128/MMBR.00017-08.

[28] Hevia, A., Delgado, S., Sánchez, B. y Margolles, A. (2015) «Molecular players involved in the interaction between beneficial bacteria and the immune system», Frontiers in Microbiology, 6(NOV), pp. 1-8. doi: 10.3389/fmicb.2015.01285

[29] Galdeano, C. M. y Perdigón, G. (2004) «Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation», Journal of Applied Microbiology, 97(4), pp. 673-681. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02353.x.

[30] Lebeer, S., Vanderleyden, J. y De Keersmaecker, S. C. J. (2010) «Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens.», Nature Reviews Microbiology. Nature Publishing Group, 8(3), pp. 171-184. doi: 10.1038/nrmicro2297.

[31] Lemme-Dumit JM, Polti MA, Perdigón G, Galdeano CM. Probiotic bacteria cell walls stimulate the activity of the intestinal epithelial cells and macrophage functionality. Benef Microbes. 2018 29;9(1):153-164. doi: 10.3920/BM2016.0220

[32] McGuckin, M. A. y Hasnain, S. Z. (2017) «Goblet cells as mucosal sentinels for immunity», Mucosal Immunology. Nature Publishing Group, 10(5), pp. 1118-1121. doi: 10.1038/mi.2016.132.

[33] Armbruster, N. S., Stange, E. F. y Wehkamp, J. (2017) «In the Wnt of Paneth Cells: Immune- Epithelial Crosstalk in Small Intestinal Crohn's Disease», Frontiers in Immunology, 8, p. 1204. doi: 10.3389/fimmu.2017.01204.

[34] McDole, J.R. et al. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103 þ dendritic cells

in the small intestine. Nature 483, 345–349 (2012).

[35] Lemme Dumit JM, Polti MA, Perdigon G and Maldonado-Galdeano C (2018) "Probiotic bacteria cell walls stimulate the activity of the intestinal epithelial cells and macrophage functionality". Beneficial Microbes 9(1):153-164. doi: 10.3920/BM2016.0220.

[36] Dykstra, N. S., Hyde, L., Adawi, D., Kulik, D., Ahrne, S., Molin, G., Jeppsson, B., MacKenzie, A. y Mack, D. R. (2011) «Pulse Probiotic Administration Induces Repeated Small Intestinal Muc3 Expression in Rats», Pediatric Research. Nature Publishing Group, 69(3), pp. 206-211. doi: 10.1203/PDR.0b013e3182096ff0.

[37] Zhang W, Zhu YH, Zhou D, Wu Q, Song D, Dicksved J, Wang JF. Oral Administration of a Select Mixture of Bacillus Probiotics Affects the Gut Microbiota and Goblet Cell Function following Escherichia coli Challenge in Newly Weaned Pigs of Genotype MUC4 That Are Supposed To Be Enterotoxigenic E. coli F4ab/ac Receptor Negative. Appl Environ Microbiol. 2017 17;83(3). pii: e02747-16. doi: 10.1128/AEM.02747-16.

[38] Xie S, Zhao S, Jiang L, Lu L, Yang Q, Yu Q. *Lactobacillus reuteri* Stimulates Intestinal Epithelial Proliferation and Induces Differentiation into Goblet Cells in Young Chickens. J Agric Food Chem. 2019. doi: 10.1021/acs.jafc.9b06256.

[39] Desantis S, Mastrodonato M, Accogli G, Rossi G, Crovace AM. Effects of a probiotic on the morphology and mucin composition of pig intestine. Histol Histopathol. 2019. 34(9):1037-1050. doi: 10.14670/HH-18-106.

[40] Hooper, L. V. y Macpherson, A. J. (2010) «Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota.», Nature Reviews Immunology, 10(3), pp. 159-69. doi:10.1038/nri2710.

[41] Cazorla SI, Maldonado-Galdeano C, Weill R, De Paula J, Perdigón G. (2018). Oral Administration of Probiotics Increases Paneth Cells and Intestinal Antimicrobial Activity. Front Microbiol. 16;9:736. doi: 10.3389/fmicb.2018.00736. eCollection 2018.

[42] Rogier, E., Frantz, A., Bruno, M. y Kaetzel, C. (2014) «Secretory IgA is Concentrated in the Outer Layer of Colonic Mucus along with Gut Bacteria», Pathogens, 3(2), pp. 390-403. doi: 10.3390/pathogens3020390.

[43] Hutchings, A. B., Helander, A., Silvey, K. J., Chandran, K., Lucas, W. T., Nibert, M. L. y Neutra, M. R. (2004) «Secretory immunoglobulin A antibodies against the sigma1 outer capsid protein of reovirus type 1 Lang prevent infection of mouse Peyer's patches.», Journal of Virology. American Society for Microbiology, 78(2), pp. 947-57. doi: 10.1128/JVI.78.2.947-957.2004.

[44] Wang, H., Gao, K., Wen, K., Allen, I. C., Li, G., Zhang, W., Kocher, J., Yang, X., Giri- Rachman, E., Li, G.-H., Clark-Deener, S. y Yuan, L. (2016) «Lactobacillus rhamnosus GG modulates innate signaling pathway and cytokine responses to rotavirus vaccine in intestinal mononuclear cells of gnotobiotic pigs transplanted with human gut microbiota»,BMC Microbiology, 16(1), p. 109. doi: 10.1186/s12866-016-0727-2.

[45] Yan, F., Liu, L., Cao, H., Moore, D. J., Washington, M. K., Wang, B., Peek, R. M., Acra, S.a y Polk, D. B. (2017) «Neonatal colonization of mice with LGG promotes intestinal development and decreases susceptibility to colitis in adulthood», Mucosal Immunology, 10(1), pp. 117-127. doi: 10.1038/mi.2016.43.

[46] de Moreno de LeBlanc, A., Dogi, C. a, Galdeano, C. M., Carmuega, E., Weill, R. y Perdigón, G. (2008) «Effect of the administration of a fermented milk containing Lactobacillus casei DN-114001 on intestinal microbiota and gut associated immune cells of nursing mice and after weaning until immune maturity.», BMC Immunology, 9, p. 27. doi: 10.1186/1471-2172-9-27.

[47] de Moreno de LeBlanc, A., Galdeano, C. M., Chaves, S. y Perdigón, G. (2005) «Oral Administration of L. Casei CRL 431 Increases Immunity in Bronchus and Mammary Glands», European Journal of Inflammation. SAGE PublicationsSage UK: London, England,3(1), pp. 23-28. doi: 10.1177/1721727X0500300105.

[48] de Moreno de LeBlanc, A., Castillo, N. A. y Perdigon Gabriela, G. (2010) «Anti-infective mechanisms induced by a probiotic Lactobacillus strain against Salmonella enterica serovar Typhimurium infection», International Journal of Food Microbiology. Elsevier B.V., 138(3), pp. 223-231. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.020.

[49] Palomar, M. M., Maldonado Galdeano, C. y Perdigon, G. (2014) «Influence of a probiotic lactobacillus strain on the intestinal ecosystem in a stress model mouse», Brain, Behavior, and Immunity, 35, pp. 77-85. doi: 10.1016/j.bbi.2013.08.015.

[50] Velez, E. M. M., Maldonado Galdeano, C., Carmuega, E., Weill, R., Bibas Bonet, M. E. y Perdigon, G. (2015) «Probiotic fermented milk consumption modulates the allergic process induced by ovoalbumin in mice», British Journal of Nutrition, 114(4), pp. 566-76. doi:10.1017/S0007114515001981.

[51] Castle SC (2000) Impact of age-related immune dysfunction on risk of infections. Z Gerontol Geriatr 33:341–349

[52] Savino, W. (2002) The thymus gland is a target in malnutrition. *Eur J Clin Nutr* 56, S46-S49.

[53] Savino, W., and Dardenne, M. (2010) Nutritional imbalances and infections affect the thymus: consequences on T-cell- mediated immune responses. *Proc Nutr Soc* 69, 636-643.

[54] Novotny Nuñez, I, Maldonado Galdeano C, Castillo, N, de Moreno de LeBlanc A y Perdigón G. (2012). "Bacterias probióticas como suplemento dietario promisorio para la salud" ". ISSN: 1666-7948. *Revista* QuímicaViva.11, 3: 199-209.

[55] Ivanna Novotny Núñez, Carolina Maldonado Galdeano, Esteban Carmuega, Ricardo Weill, Alejandra de Moreno de LeBlanc and Gabriela Perdigón. (2013). "Effect of a probiotic fermented milk on the thymus in BALB/c mice under non-severe protein-energy malnutrition". ISSN: 0007-1145. *British Journal of Nutrition*. 110: 500-508. doi: 10.1017/S0007114512005302.

[56] Novotny Núñez I, Maldonado Galdeano C, de Moreno de leblanc A, Perdigón G. (2015). "Lactobacillus casei CRL 431 administration decreases inflammatory cytokines in a diet-induced obese mouse model". Nutrition. 31(7-8):1000-1007. Doi: 10.1016/j.nut.2015.02.006. Epub 2015 Feb ISSN: 0899-9007 (Print); 1873-1244 (Electronic).

[57] Yang H., Youm H., Vandanmagsar B., Rood J., Kumar K. G., Butler A., and Dixit, V.D.(2009). Obesity accelerates thymic aging. Blood. 114, (18): 3803-3812.

[58] Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR.(2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139, 485-498.

[59] Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lécuyer E, Mulder I, Lan A, Bridonneau C, Rochet V, Pisi A, De Paepe M, Brandi G, Eberl G, Snel J, Kelly D, Cerf-Bensussan N. V. (2009). The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 31, 677-689.

[60] Wu HJ, Ivanov II, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y, Littman DR, Benoist C, Mathis D. (2010). Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. Immunity. 25; 32(6):815-827.

[61] Hall JA, Bouladoux N, Sun CM, Wohlfert EA, Blank RB, Zhu Q, Grigg ME, Berzofsky JA, Belkaid Y. (2008). Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses. Immunity, 17; 29(4):637-649.

[62] Di Giacinto C, Marinaro M, Sanchez M, Strober W, Boirivant M. (2005). Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *J. Immunol.* 174, 3237-3246.

[63] Lyons A, O'Mahony D, O'Brien F, MacSharry J, Sheil B, Ceddia M, Russell WM, Forsythe P, Bienenstock J, Kiely B, Shanahan F, O'Mahony L. (2010). Bacterial strain-

specific induction of Foxp3+ T regulatory cells is protective in murine allergy models. Clin Exp Allergy. 40(5):811-819.

[64] Round JL, Mazmanian SK. (2010). Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. Proc Natl Acad Sci U S A. 6;107(27):12204-12209.

[65] Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. (2010). Homeostasis and inflammation in the intestine. Cell. 19;140(6):859-870

5

Leches fermentadas, yogures y probióticos

Gabriel Vinderola
gvinde@fiq.unl.edu.ar

- *Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, CONICET-UNL) y Cátedra de Microbiología, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.*

Ricardo Weill
weillricardo@gmail.com

- *Universidad iSalud-CABA-Argentina*
- *Ex Director de I+D de Danone Argentina*
- *Ex Director Cientifico Danone Latam*
- *Ex Delegado General Instituto Danone del Conosur*

Resumen

La fermentación es un proceso de profunda transformación bioquímica y microbiológica de un sustrato alimenticio. En el caso de que el sustrato de partida sea la leche, el producto de fermentación se denomina leche fermentada, y en el caso de que se utilicen como cultivos controladores de esta fermentación a las bacterias *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, el producto obtenido se denomina yogur. Los probióticos, por su parte, son "microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto benéfico sobre la salud". Los yogures y los probióticos tienen una especial relación, por ser los primeros los alimentos más utilizados para vehiculizar a los segundos. El yogur, a su vez, es un verdadero sobreviviente actual de las prácticas ancestrales de fermentación. La fermentación de la leche transforma profunda y benéficamente la composición de la misma, haciendo a la lactosa más fácilmente digerible, liberando al medio péptidos potencialmente bioactivos, haciendo que el calcio esté más biodisponible y convirtiendo al producto yogur en un alimento estable y seguro debido al contenido de ácido láctico y otros compuestos antimicrobianos. Más allá de sus propiedades nutricionales, los yogures y los yogures con probióticos, constituyen una

verdadera fuente de microorganismos abundantes, seguros y benéficos para la salud intestinal, y más allá.

I. Una introducción a la transformación de la leche en yogur

La fermentación es un proceso de transformación de un sustrato alimenticio para la obtención de los que se denomina un alimento fermentado. En este proceso, ciertos microorganismos, naturalmente presentes en el sustrato o agregados intencionalmente, utilizarán parte de los nutrientes presentes en él para multiplicarse y producir toda una serie de metabolitos que pueden incluir ácidos orgánicos, alcoholes, compuestos volátiles de aroma, exopolisacáridos, péptidos biactivos, bacteriocinas y/o sustancias antimicrobianas, entre otros, llamados productos de la fermentación. En ciertos casos, tal vez menos relevantes, la fermentación no implica el crecimiento o multiplicación de microorganismos (bacterias, levaduras, hongos), sino la acción transformadora de enzimas microbianas. En general el proceso de fermentación enriquece nutricionalmente al alimento, lo hace más seguro microbiológicamente, le confiere una alta carga de microorganismos seguros y benéficos y sus metabolitos, le extienden la vida útil y lo hacen más atractivo sensorialmente. En el otro extremo, la putrefacción es un proceso no controlado de alteración del alimento, donde proliferan microorganismos indeseables, que pueden ser deteriorantes y/o patógenos, y que transforman al sustrato alimenticio en un alimento no seguro y/o desagradable sensorialmente. Lo que diferencia esencialmente la fermentación de la putrefacción es el control del proceso. Este control se logra generando las condiciones propicias para la fermentación, como lo son el tiempo, la temperatura, el agregado (o no) de cultivos microbianos (en el caso del kefir o el yogur) que dominarán la fermentación, o el agregado (o no) de ingredientes (sal, por ejemplo) que direccionarán a la fermentación, evitando que derive en putrefacción. En el caso de que el sustrato de partida sea leche, el producto de fermentación se denominará leche fermentada. En el caso de que se utilicen como cultivos controladores de la fermentación a las bacterias *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, el producto se denominará yogur.

II. ¿Cómo empezó el hombre a consumir leches fermentadas y yogures?

Durante la última era glacial, la leche no era bien tolerada por los adultos porque, a diferencia de los niños, no podían producir la enzima lactasa necesaria para metabolizar la lactosa, el principal azúcar de la leche. Pero a medida que la agricultura comenzó a reemplazar la caza y la recolección en el Medio Oriente hace unos 11.000 años, el hombre aprendió a reducir la lactosa en los productos lácteos a niveles tolerables mediante la fermentación de la leche para hacer queso o yogur. Varios miles de años después, una mutación genética se extendió por Europa que le otorgó al hombre la capacidad de producir lactasa, y en consecuencia consumir leche, durante toda su vida. Esa adaptación abrió una nueva y rica fuente de nutrición que podría

haber sostenido el crecimiento de la población. Esta revolución láctea de dos pasos puede haber sido un factor primordial para permitir que grupos de agricultores y pastores del sur de Europa atravesaran el viejo continente desplazando en su camino a los cazadores.

Los niños producen casi universalmente lactasa y pueden digerir la lactosa de la leche materna. A medida que crecen, en la mayoría se desactiva el gen de la lactasa. Menos del 35-40% de los humanos adultos puede digerir la lactosa más allá de la infancia. La mayoría de las personas que conservan la capacidad de digerir la leche puede rastrear su ascendencia hasta Europa, donde el rasgo parece estar ligado a un solo nucleótido en el que la citosina de la base de ADN cambió a la timina en una región genómica no muy lejos del gen de la lactasa. El rasgo de la persistencia de la lactasa habría surgido hace unos 7.500 años en Hungría. Una vez que el alelo de persistencia de la lactasa apareció, ofrecía un mayor ventaja selectiva desde el punto de vista nutricional. Dado que la producción de leche en el Medio Oriente comenzó miles de años antes de que el alelo de persistencia surgiera en Europa, los antiguos pastores deben haber encontrado formas de reducir las concentraciones de lactosa en la leche, mediante la fermentación. La leche constituía un arma contra el hambre: los productos lácteos fermentados, que podían almacenarse durante más tiempo, proporcionaron fuentes de nutrición para la expansión poblacional o ante malas cosechas [1].

III. El recorrido del yogur desde la antigüedad hasta nuestros días

Las leches fermentadas son una categoría de alimentos que comprenden a los productos obtenidos por la fermentación microbiana de la leche. El yogur es un tipo de leche fermentada, y han sido parte de la dieta humana desde la antigüedad [2]. En 1907 Elie Metchnikoff, discípulo de Louis Pasteur, publicó su libro "La Prolongación de la Vida: Estudios Optimistas", donde estipulaba que el alto consumo de yogur en las poblaciones caucásicas era la razón de su gran longevidad y salud intestinal [3].

Las leches fermentadas se comenzaron a producir en diferentes regiones geográficas y de forma simultánea, adoptando características propias que dependían del tipo de leche (vaca, búfala, cabra, oveja, camello), la temperatura ambiental o los utensilios utilizados para su elaboración (estómagos de animales o cuencos vegetales, que eran la fuente de los microorganismos fermentativos). Esto hizo que las diferentes leches fermentadas tuvieran características y nombres distintivos tales como, kefir, koumiss, täfil, filmjölk, täetmjolk, långofilviili, dahi, eyran, busa, kissel, naja, urgotnic, leban, zabady, mast, dough, roba, mazun o katyk, entre tantos otros [4]. Las leches fermentadas artesanales ancestrales le fueron cediendo paulatinamente lugar al yogur comercial, en un contexto de urbanización y el desarrollo de la ciencia y tecnología de alimentos, lográndose productos de calidad constante, reproducibles, y seguros microbiológicamente, siendo producido industrialmente desde hace

más de 100 años [5]. El yogur es un actual sobreviviente de los alimentos milenarios que contenían bacterias vivas, capaz de proveer en una sola porción una alta tasa de microorganismos benéficos y productos de fermentación también benéficos para la salud (ácido láctico, péptidos, exopolisacáridos, agentes antimicrobianos, etc.). La administración de bacterias vivas al intestino contribuye a mantener funcionando al sistema inmune asociado a la mucosa intestinal, y la disminución del consumo de bacterias vivas conduce a una depresión parcial de la actividad inmune intestinal [6]. Gadotti y colaboradores reportaron en 2018 [7] una correlación inversa entre el consumo de productos lácteos y los perfiles inflamatorios, indicando que el aumento del consumo de yogur podría tener un efecto protector sobre la inflamación, siendo a la vez el consumo de yogur un parámetro indicador de una mayor calidad de vida de las personas [8].

IV. Probióticos: de Argentina al mundo

Los yogures y los probióticos tienen una especial relación que en Argentina comenzó a mediados de los 90, momento en el cual el yogur fue el primer alimento que se utilizó como vehículo de bacterias probióticas. Un panel de especialistas internacionales convocados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) se reunieron en 2001 en Córdoba con el objetivo discutir la evidencia científica que había en ese momento sobre ciertos microorganismos y su efecto en la salud. Es así que nació la definición de probióticos, que fue adoptada progresivamente por investigadores, la industria de alimentos y los entes regulatorios como el ANMAT en la Argentina o la ANVISA en Brasil. Los probióticos fueron entonces definidos como "microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto benéfico sobre la salud". En Argentina, el Instituto Nacional de Alimentos (INAL), dependiente del ANMAT, la incorporó en el Código Alimentario Argentino en 2011. Los microorganismos más comúnmente empleados como probióticos son bacterias como *Lactobacillus casei, Lactobacillus, rhamnosus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus reuteri, Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium bifidum*, bacterias esporulantes como *Bacillus clausii* o *B. coagulans*, o levaduras de la especie *Saccharomyces boulardii*. Estos microorganismos pueden encontrarse en forma de cultivos deshidratados en suplementos alimenticios, o en ciertos alimentos. En Argentina los encontramos mayoritariamente en yogures o, en sentido más amplio, en las leches fermentadas. Si bien el mercado de alimentos probióticos está fuertemente representado por los productos lácteos, yogures en particular, la industria alimentaria internacional ha desarrollado otros alimentos con probióticos, como quesos, jugos de frutas, *smoothies* o bebidas basadas en suero de queso, o alimentos en base a cereales como la avena [9].

V. Leches fermentadas y yogures con probióticos

El yogur es uno de los pocos alimentos que se puede reproducir de forma casera a partir de una unidad adquirida en un supermercado, por ejemplo, en un proceso sencillo y rápido. En la Tabla 1 se resumen algunas características comparativas de la producción de yogur en pequeña y gran escala.

Tabla 1. Características de la producción de yogur en pequeña y gran escala.

Variable	Pequeña escala	Gran escala
Volumen	1-5 litros	Hasta 40.000 litros
Sustrato	Leche hervida	Leche con doble tratamiento térmico
Contenedores	Utensillos de cocina, abiertos y expuestos	Fermentadores cerrados
Operación	Manual	Altamente automatizada
Tiempo	No es una variable crítica	Procesos altamentos sincronizados
Calidad	Variable entre producciones	Estandarizada
Inoculación	Se usa una porción de un producto comprado	Cultivos lácticos de inoculación directa
Conocimiento del cultivo	Relativamente ninguno	Alto grado de conocimiento
Inocuidad	Medidas higiénicas limitadas	Alto grado de control sanitario
Establecimientos	Casero, sin habilitación sanitaria	Bajo control de autoridad sanitaria habilitante
Trazabilidad	Sin trazabilidad	Productos con RNE y RNPA
Distribución	Familiar	Transporte a larga distancia
Vida útil	3-7 días	30-45 días

El Código Alimentario Argentino en su artículo 576 define como "Leches Fermentadas" a los productos, adicionados o no de otras sustancias alimenticias, obtenidos por coagulación y disminución del pH de la leche o leche reconstituida, adicionada o no de otros productos lácteos, por fermentación láctica mediante la acción de cultivos de microorganismos específicos. En particular, el yogur es un tipo de leche fermentada, probablemente la más difundida, cuya fermentación se realiza con dos cultivos: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

El producto yogur puede estar acompañado o no de probióticos, por ejemplo, los cuales en general no participan del proceso fermentativo de la leche, sino que son agregados al producto una vez elaborado el yogur, en la concentración necesaria para lograr los efectos benéficos previamente demostrados en estudios clínicos controlados y publicados en revistas internacionales con revisión de pares.

Para la elaboración de yogures con probióticos la industria láctea fermentativa utiliza cultivos de yogur y cultivos probióticos disponibles como cultivos concentrados congelados o deshidratados [10]. Actualmente ya no se inicia la fermentación con una fracción del producto proveniente de una fabricación anterior, como se hacía en los orígenes de la fermentación industrial del yogur hace ya más de 100. Estos cultivos concentrados congelados o deshidratados presentan niveles de células viables generalmente mayores a $1x10^{10}$ UFC/g ó $1x10^{11}$ UFC/g, respectivamente [11], donde UFC significa Unidades Formadoras de Colonias, lo cual es casi equivalente a la cantidad de células viables que presenta el cultivo. Los cultivos deshidratados se obtienen por un proceso tecnológico denominado liofilización que comprende dos pasos: el congelamiento del cultivo concentrado de células viables a temperaturas inferiores a los -50°C y la remoción del agua bajo vacío por sublimación, es decir, el pasaje de agua del estado sólido al estado gaseoso (vapor de agua).

Considerando la textura del producto, podemos distinguir tres tipos de yogures: los denominados "firmes" o "*set*", caracterizados por estar disponibles en potes y presentar una alta viscosidad, lo que hace que se consuman con la ayuda de una cuchara. Por otro lado, existen también los denominados "bebibles" y "líquidos", los cuales, al ser más fluidos, se pueden beber directamente de la botella. Esto se debe a su formulación y al proceso tecnológico de homogeneización que le sigue a la fermentación. Para la elaboración de un yogur es necesario partir de una leche de buena calidad, libre de antibióticos (caso contrario se impediría la fermentación por inhibición de las bacterias lácticas) y que posea una carga microbiana total moderada, la cual será reducida a niveles inocuos mediante dos tratamientos térmicos. La leche es recibida en la planta industrial y tratada térmicamente para ser estabilizada. Es luego parcial o totalmente descremada por centrifugación y adicionada de sólidos lácteos (leche descremada en polvo, por ejemplo), para elevar el contenido de sólidos totales hasta 10-15 % (p/v). Opcionalmente se pueden agregar otros ingredientes (azúcares, almidón, gelatina, edulcorantes), seguido de un segundo tratamiento térmico para la inactivación de microorganismos patógenos y deteriorantes. Al proceso térmico le sigue otro de homogeneización, para reducir el tamaño de los glóbulos grasos de la leche y obtener un producto con una textura más suave y homogénea [12]. La leche será inoculada en condiciones de extrema asepsia con las bacterias del fermento (liofilizado o congelado) y, si se tratara de un yogur firme, los probióticos se agregan junto a las bacterias del fermento, ya que en este tipo de yogures la fermentación de la leche tendrá lugar dentro del mismo contenedor (no en fermentador). En el caso de los yogures batidos o bebibles, la fermentación se lleva a cabo en fermentadores de acero inoxidable, y luego de la fermentación, el producto sufre un proceso de quiebre de la cuajada y fluidificación mediante el paso por bombas

especializadas. Dependiendo de la intensidad de este tratamiento se obtendrá un producto más o menos bebible (agitación suave) o líquido (agitación vigorosa). Los probióticos pueden ser entonces agregados una vez enfriado parcialmente el producto. La acidificación de la leche es una tarea llevada a cabo por las bacterias del fermento cuando la leche se termostatiza a 42-43 °C. *Streptococcus thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* establecen entre sí una simbiosis. Esta asociación hace que ambos cultivos crezcan en leche a mayor velocidad de que si lo hicieran por separado, debido a que cada uno produce metabolitos que son aprovechados por el otro. Esto permite reducir el pH de la leche hasta un valor cercano a 4,5 en un período generalmente menor a las 6 horas. Los probióticos tienen poca capacidad fermentativa, por lo que deben ser agregados a la leche a la concentración final deseada (aproximadamente 10^{7-8} UFC/mL). Numerosos metabolitos microbianos, no presentes en la leche antes de la fermentación, aparecen en el yogur como resultado de la actividad fermentativa de las bacterias lácticas. Estos productos son el ácido láctico y otros ácidos orgánicos, los péptidos derivados de la acción hidrolítica de las bacterias lácticas principalmente sobre la principal proteína de la leche (la caseína) [13], los exopolisacáridos con efectos tecnológicos espesantes y funcionales sobre la salud [14] y compuestos antimicrobianos (peróxido de hidrógeno, bacteriocinas) los cuales, junto al ácido láctico, contribuyen a la estabilidad y seguridad microbiológica del yogur. Se ha reportado además que durante la fermentación de la leche se pueden originar galactooligosacáridos con propiedades prebióticas, provenientes de reacciones bioquímicas de la lactosa [15]. Todos estos componentes no microbianos contribuyen a la acción benéfica de los yogures.

VI. Recuento de células viables de probióticos en yogures

La definición de probióticos indica que estos microorganismos deben estar viables y en cantidades adecuadas al momento de ser administrados. Si bien no existe un estándar internacional ni una dosis efectiva de probióticos para todas las cepas disponibles, los estudios de revisión sistemática y meta-análisis indican que un consumo de aproximadamente $1x10^9$ células totales de bacterias probióticas por día serían suficiente para garantizar un efecto benéfico en la salud [16]. Esta cantidad de bacterias se logra si la porción de 100 mL de yogur presenta un nivel de células viables cercano a $1x10^7$ UFC/mL, como mínimo.

Si bien existen metodologías de biología molecular o basadas en citometría de flujo independientes del cultivo, el recuento de bacterias probióticas en medios agarizados sigue siendo la metodología de referencia. El recuento de probióticos en un alimento puede resultar un gran desafío, dependiendo de la complejidad microbiológica del producto en cuestión, es decir, de la cantidad de especies/cepas presentes. En el caso del BioQueso Ilolay Vita, primer queso probiótico de Latinoamérica, lanzado al mercado argentino en 1999 [17], el mismo presentaba 3 cepas probióticas (de las especies *L. casei*, *L. acidophilus* y *B. bifidum*) y 2 cepas del fermento (*S. thermophilus* y *Lactococcus lactis*).

Para llevar a cabo el control de calidad microbiológica de este queso se tuvieron que diseñar especialmente un grupo de medios de cultivos selectivos y diferenciales [18, 19]. El término probiótico no engloba una categoría homogénea de microorganismos, como podrían ser los psicrotróficos, termodúricos o microorganismos totales en leche cruda, para los cuales se han desarrollado metodologías estandarizadas de recuento. El término tampoco representa géneros específicos como *Salmonella*, *Escherichia* o *Clostridium* para los cuales existen metodologías estandarizadas y/o medios de cultivos comerciales específicos para hacer un recuento selectivo seguro. Los lactobacilos y bifidobacterias usados como probióticos pueden tener requerimientos metabólicos muy diferentes entre sí, pero a la vez cercanos a las bacterias lácticas del fermento, por lo cual es difícil intentar favorecer el crecimiento de unos mientras se intenta inhibir el desarrollo de otros cuando se diseñan medios de cultivos selectivos o diferenciales. Por el momento no existen metodologías estandarizadas ni medios de cultivos específicos que garanticen un recuento seguro de probióticos, y el recuento termina siendo una solución a medida del producto en cuestión [20].

VII. El yogur y su potencial relevancia en las guías alimentarias.

El aumento en el consumo de yogur, kefir y otros alimentos fermentados ha sido impulsado, en parte, por los beneficios para la salud que estos productos pueden conferir. Los estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de alimentos fermentados está asociado con la reducción de los riesgos de diabetes tipo 2, síndrome metabólico y enfermedad cardíaca, junto con un mejor control del peso. Se sugiere que los microorganismos presentes en estos alimentos contribuyen a estos beneficios para la salud. Entre ellos se encuentran los microorganismos del fermento de yogur *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, así como cepas específicas de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* que se añaden por sus propiedades probióticas. En contraste, para otros alimentos fermentados, como el chucrut, el kimchi y el miso, la fermentación es iniciada por microbios autóctonos presentes en la materia prima. Los métodos independientes del cultivo han demostrado que muchos de estos microbios presentes en los alimentos lácteos y no lácteos fermentados llegan al tracto gastrointestinal de forma viable. Numerosos estudios han demostrado que el consumo de yogur y otros alimentos fermentados puede mejorar la salud intestinal y en sitios distantes, siendo útil para mejorar la malabsorción de la lactosa, tratar la diarrea infecciosa, reducir la duración e incidencia de las infecciones respiratorias y mejorar las respuestas inmunológicas y antiinflamatorias [21].

A lo largo de la historia evolutiva, los seres humanos se encontraron un gran número de microbios en su dieta. Alimentos y agua recolectados del medio ambiente por cazadores-recolectores inevitablemente contenían bacterias, levaduras, mohos y virus. El desarrollo de estrategias de fermentación para la conservación de los alimentos habrían asegurado la ingestión frecuente de un gran número de microbios

seguros. Es probable también que nuestros antecesores no tuvieran demasiada opción a la hora de decidir cuándo la comida estaba demasiado deteriorada microbiológicamente para comer. Podríamos considerar, sin demasiado margen de error, que nuestra exposición diaria ancestral haya estado por encima de los 10^{10} microbios por día. Nuestro sistema inmunológico intestinal evolucionó en presencia de una exposición diaria y abundante de microbios. Nuestro altamente sofisticado sistema inmunológico intestinal ha sido diseñado para encontrar una amplia gama de moléculas microbianas, jugando un papel importante en discernir sustancias beneficiosas o inofensivas de microbios patógenos. Las modernas y eficaces herramientas de procesamiento de alimentos le han otorgado un alto grado de inocuidad, pero ha reducido inevitablemente nuestra exposición a los microbios.

Hay que reconocer y subrayar que la alimentación moderna y las estrategias de tratamiento del agua han reducido ciertamente la morbilidad y la mortalidad asociada a enfermedades transmitidas por los alimentos y el agua y, por lo tanto, desempeñan un papel vital en la protección de la salud humana. No se aboga de ninguna manera a un retorno a la comida y agua antihigiénica, ya que esto sería devastador para la salud humana global.

Solo en los últimos años hemos empezado a apreciar la importancia de nuestra microbiota. Estas bacterias comensales juegan un papel importante en nuestra salud, de muchas maneras. Nuestra microbiota está compuesta principalmente por numerosas bacterias comensales. Es probable que el impacto de los microbios de la dieta sea fugaz en comparación con la carga microbiana indígena. Pero debemos recordar que la mayoría de nuestros estimados 10^{14} microbios intestinales residentes se encuentran en el intestino grueso, mientras que la mayoría de nuestras células inmunes (y aquellas de nuestros sistemas nerviosos entéricos) están localizados en el intestino delgado. Por lo tanto, es totalmente factible que los microbios de la dieta que llegan al tracto gastrointestinal superior tengan un impacto significativo en nuestro sistema inmunológico. Es propicio especular que, en ausencia de esta afluencia diaria de microbios, nuestro sistema inmunológico esté "subentrenado" para reaccionar a los desafíos intestinales. ¿Podría esto jugar un papel, por pequeño que sea, en la creciente incidencia de enfermedades modernas como las intolerancias alimentarias, desórdenes autominmunes, inflamación de bajo grado, sobrepeso y obesidad? Simplemente el consumo de grandes cantidades de bacterias seguras podría conferir una amplia gama de beneficios. Este concepto de beneficios núcleos o básicos del consumo de microorganismos vivos fue desarrollado por Hill y col. (2014) [22]. Esencialmente indica que un gran número de una bacteria segura podría tener una amplia gama de beneficios básicos. Es notable que aceptamos pasivamente la idea de que la ingestión de un número relativamente pequeño de patógenos transmitidos por los alimentos puede tener un efecto negativo en la salud humana, pero somos escépticos ante la idea de que la ingestión de un gran número de microbios seguros podría tener un impacto positivo en la fisiología humana. Entonces, ¿cómo persuadimos a un público que ha sido educado acerca de la importancia de la higiene, la limpieza y la asepsia de que se debería aumentar el número

de microbios en su organismo?. Quizás podríamos adaptar el concepto de Dosis Diaria Recomendada para los microbios, apoyándonos en el hecho de que esta terminología es familiar para los consumidores. Además de las DDR existentes para macronutrientes, vitaminas y oligoelementos, las guías alimentarias podrían aconsejar también sobre el consumo de microbios seguros en nuestra dieta, e indicar sus fuentes. El concepto de DRR microbiana es un concepto novedoso que merece ser debatido en una época de tan altos niveles de enfermedades crónicas y enfermedades gastrointestinales [23]. En este sentido, las Guías Alimentarias para la Población Argentina (GAPA), recomienda la ingesta diaria de tres porciones de productos lácteos, sin hacer distinción entre leche, yogur y queso, sin poner en relevancia la importancia de la fermentación y la presencia de una alta cantidad de bacterias viables, seguras y benéficas que aporta un yogur.

Habiendo reconocido la importancia de una ingesta diaria de microorganismos seguros, es válido preguntarse qué cantidad de microbios tienen nuestras dietas actualmente. Se ha prestado mucha más atención a los microbios en nuestras heces que a los microbios en nuestros alimentos. Lang y col. [24] (2014) caracterizaron la microbiota de tres patrones dietéticos diferentes con el fin de estimar la cantidad total promedio de microbios que se ingieren diariamente a través de los alimentos y las bebidas. Los tres patrones alimenticios analizados fueron: (1) el estadounidense promedio (AMERICANA), centrada en alimentos de supermercado, (2) la dieta recomendada por las guías alimentarias de EE.UU. (USDA), que hace haciendo hincapié en frutas y verduras, carne magra, productos lácteos fermentados y cereales integrales, y (3) una dieta vegana (VEGANA), que excluye productos de origen animal o fermentados. El análisis microbiano de estas dietas incluía recuentos aeróbicos, anaeróbicos, de levaduras y mohos, así como un análisis de secuenciación masiva del 16S rADN. Basado en el recuento en placas en medios agarizados, el plan de comidas USDA es el que aportó la mayor cantidad total de microbios viables (aproximadamente $1{,}3\times10^9$ UFC/día, seguido por el plan de comidas VEGANA y el plan de comidas AMERICANA con 6×10^6 y $1{,}4\times10^6$ UFC/día, respectivamente. No hubo diferencias significativas en la diversidad microbiana entre los tres patrones alimenticios. En este sentido, una dieta que incluye alimentos fermentados es capaz de proveer hasta 1000 veces más de microorganismos seguros que aquellos patrones de alimentación que no lo hacen.

VIII. Concepciones popularizadas entorno al yogur: antibióticos, cadena de frío y riesgo de Síndrome Urémico Hemolítico

En numerosos foros de divulgación o discusión (redes sociales, blogs, sitios de internet, cadenas de emails), incluso entre ciertos profesionales de la salud, se desalienta, o directamente se desaconseja, el consumo de yogures en niños por concepciones tales como que "*la leche puede contener antibióticos"* o por *"el riesgo de contraer Síndrome Urémico Hemolítico"*, y otras veces se sugiere descartarlo *"cuando se interrumpe la cadena de frío"*.

Los antibióticos son drogas que se usan para combatir enfermedades que afectan al ganado lechero tales como la mastitis, la neumonía o las infecciones en las patas. Son administrados a los animales en diferentes formas, siendo las más comunes la intramamaria o la inyección intramuscular. La presencia de residuos de antibióticos en la leche es un problema que afecta potencialmente a toda la industria lechera, debido a que cantidades mínimas de antibióticos en leche representan un problema de salud pública que no debe ser aceptado, además de ser ilegal. Pequeñas cantidades de antibióticos en la leche, como 0,003 UI (unidades internacionales) de penicilina/ml, pueden afectar a una persona que sea alérgica a dicho antibiótico. Además, existe la problemática del desarrollo de resistencia de los microorganismos a los antibióticos, que puede reducir o eliminar por completo su efectividad. Otro problema es la interferencia con los procesos fermentativos como la producción de quesos y yogures. Cantidades mínimas de penicilina como 0,001 UI/mL ya afectan el normal desarrollo de acidez en un yogur [25]. Basados en estos problemas, los residuos de antibióticos en leche han atraído la atención a nivel mundial de los consumidores y de los cuerpos reguladores generando reglas estrictas que controlan el uso de antibióticos en los establecimientos tamberos. En relación a la posible presencia de residuos de antibióticos en leche, el Capítulo VIII del Código Alimentario Argentino (Alimentos Lácteos), estipula a lo largo de todo el capítulo, que la leche o los productos elaborados con ella, no deben tener residuos detectables de antibióticos, los cuales se detectan a niveles de partes por millón (ppm) o por billón (ppb), dependiendo del antibiótico. Estos controles se realizan rutinariamente en las empresas lácteas que reciben leche de los diferentes tambos para su producción, siendo rechazadas y penalizadas aquellas partidas que contengan residuos detectables de antibióticos, lo cual sucede para el 0,02 al 0,03% de los volúmenes utilizados anualmente (comunicación personal). Este relativamente bajo porcentaje de rechazo implica una toma de conciencia a nivel del establecimiento productor de leche para la administración responsable de antibióticos al ganado bovino y una activa tarea de vigilancia y control por parte de las plantas elaboradoras de productos lácteos. La detección de antibióticos se hace al momento de la recepción de la leche en la planta láctea, previo a su descarga. Se utilizan test rápidos de detección que demoran entre 3 y 8 minutos y detectan los tres grupos de antibióticos más frecuentes: betalactámicos, tetraciclinas y sulfamidas, que son los requeridos por las autoridades sanitarias competentes. Aproximadamente el 85% de los casos positivos de antibióticos son detectados con estos métodos rápidos, el 15% restante realizado mediante un test de ELISA donde se detectan antibióticos tipo betalactámicos, tetraciclinas, cloranfenicol, aminoglucósidos, macrólidos y sulfamidas. Los tests de ELISA se realizan 2 veces por mes a cada tambo de acuerdo a un programa de monitoreo establecido por el Ministerio de Agricultura de la Nación. El Código Alimentario Argentino establece como única opción el decomiso de esta leche contaminada y su procesamiento en *landfarmings* (proceso de bio-remediación) o por incineración, para evitar que estos antibioticos reingresen al circuito productivo.

En relación a la cadena de frío, el Código Alimentario Argentino establece que las leches fermentadas deberán conservarse y comercializarse a una temperatura no superior a 10° C. De acuerdo con el Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, el yogur debería desecharse después de dos horas de permanecer a una temperatura de entre 5 y 32°C, y si la temperatura excede los 32°C, el yogur puede permanecer fuera de la heladera por no más de una hora [26]. Estas recomendaciones gubernamentales son, para algunos, demasiado conservadoras, sobre todo si se tiene en cuenta que es un período que puede transcurrir bastante frecuentemente entre el momento en que se compra un yogur en un supermercado y se lo lleva a la heladera del hogar. Existen personas que afirman que llevan yogur, sin abrir, al trabajo o a la escuela y lo dejan hasta 4-6 horas a temperatura ambiente hasta la colación de media mañana o el almuerzo [27]. Muhammad y col. (2009) [28] demostraron que en un período de tiempo de hasta 6 h, la disminución del pH de un yogur a temperatura ambiente es despreciable, siendo también insignificante la pérdida de viabilidad de los probióticos presentes en el producto [29]. Este período tampoco es suficiente para la proliferación de microorganismos de deterioro ocasionalmente presentes, como las levaduras [30].

Finalmente, el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una patología renal grave que puede desencadenar la muerte y que es provocada por una toxina producida por ciertas cepas de la bacteria *Escherichia coli*, denominadas *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC, por las siglas en inglés de la expresión Shiga Toxin–producing *Escherichia coli*: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga). La cepa más renombrada es probablemente *E. coli* O157:H7, pero no es la única [31]. STEC puede alojarse naturalmente en el tracto intestinal del ganado bovino [32], pudiendo pasar del intestino a la materia fecal. La carne vacuna contaminada e insuficientemente cocida (hamburguesas o albóndigas de carne picada que quedan "rojas" en su interior, por ejemplo), la leche no pasteurizada, quesos artesanales elaborados con leche no pasteurizada y cursos de agua contaminada con materia fecal pueden ser agentes de trasmisión de las STEC. También puede transmitirse de persona a persona por contacto físico [33]. *E. coli* se inactiva muy rápidamente cuando la temperatura supera los 65°C [34]. Para la elaboración del yogur en la industria se utiliza leche que es sometida a un doble proceso térmico, seguido luego de una fermentación en condiciones de extrema asepsia. La leche que llega a la planta industrial se pasteuriza a 72°C por 15 segundos para inactivar posibles bacterias deteriorantes o patógenas que puedan venir desde el tambo. Una vez que la leche pasteurizada es adicionada de los ingredientes necesarios para elaborar un yogur, se somete a un segundo tratamiento térmico de 92°C por 4 minutos. Seguido a esto se fermenta mediante *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, quienes se encargarán de producir ácido láctico, y otros compuestos antimicrobianos, y reducir el pH de 6,5 a menos de 4,5. Teniendo en cuenta que *E. coli* es sensible a temperaturas mayores a 65°C, el proceso de elaboración del yogur presenta una doble barrera fisicoquímica (dos tratamientos térmicos) que aseguran la inactivación de cualquier microorganismo potencialmente

deteriorante o patógeno, incluso STEC. No se ha reportado en la bibliografía moderna la presencia de STEC en yogures industriales, y los trabajos de revisión y meta-análisis no incluyen al yogur, pero sí a la leche sin pasteurizar, como vectores de trasmisión de STEC [35].

IX. Conclusiones

Desde que el hombre abandonó su carácter de nómade, descubrió en la fermentación de los alimentos un medio para proporcionar mayor palatabilidad, valor nutritivo, capacidad de conservación y propiedades benéficas para la salud a sustratos como los vegetales, la carne y la leche. El yogur un verdadero sobreviviente actual de las prácticas ancestrales de la fermentación, el cual se elabora en nuestros días prácticamente como antaño. La fermentación de la leche con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus del brueckii* subsp. *bulgaricus* transforma profunda y benéficamente la composición de la misma, haciendo a la lactosa más fácilmente digerible, liberando al medio péptidos potencialmente bioactivos, haciendo que el calcio esté más biodisponible y convirtiendo al producto yogur en un alimento estable y seguro debido al contenido de ácido láctico y otros compuestos antimicrobianos. Actualmente los yogures pueden ser portadores de otros microorganismos benéficos denominados probióticos. Estos microorganismos, bacterias en su mayoría pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, tienen la capacidad de proporcionar efectos positivos sobre la salud cuando son consumidos en cantidades adecuadas y de forma periódica. Más allá de sus propiedades nutricionales, los yogures y los yogures con probióticos, constituyen una verdadera fuente de microorganismos abundantes, seguros y benéficos para el intestino y el sistema inmune asociado a este órgano.

X. Declaración de posibles conflictos de interés

Gabriel Vinderola ha llevado adelante tareas de vinculación tecnológica (servicios a terceros, desarrollos y consultorías) con empresas productoras de alimentos lácteos, no lácteos y probióticos. Actualmente es miembro del cuerpo de directores de la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP).

Ricardo Weill ha desempeñado su actividad profesional en SA Luis Magnasco y Cía, La Serenísima y Danone Argentina en el área de Investigación y Desarrollo.

XI. BIBLIOGRAFÍA CITADA

[1] Curry A. 2013. Archaeology: The milk revolution. Nature, 500(7460):20-2.

[2] Fisberg, M. y Machado, R. (2015). History of yogurt and current patterns of consumption. *Nutrition Reviews, 73*(Suppl 1), 4-7.

[3] Metchnikoff, E. (1907). *The Prolongation of life: Optimistic studies*. Sir Peter Chalmers Mitchell (editor). Paris: Putnam.

[4] Tamime, A.Y y Robinson, R.K. (2000). Tamime and Robinson's Yoghurt 3rd Edition Science and Technology. Londres: Woodhead Publishing.

[5] Aryana, K.J. y Olson, D,W. (2017). A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. *Journal of Dairy Science, 100*(12), 9987-10013.

[6] Olivares M, Paz Díaz-Ropero M, Gómez N, Sierra S, Lara-Villoslada F, Martín R, Miguel Rodríguez J, Xaus J. Dietary deprivation of fermented foods causes a fall in innate immune response. Lactic acid bacteria can counteract the immunological effect of this deprivation. J Dairy Res. 2006 Nov;73(4):492-8.

[7] Gadotti, T.N., Norde, M.M., Rogero, M.M., Fisberg, M., Fisberg, R.M., Oki, E. y Martini, L.A. (2018). Dairy consumption and inflammatory profile: A cross-sectional population-based study, São Paulo, Brazil. *Nutrition, 48*, 1-5.

[8] Babio, N., Mena-Sánchez, G. y Salas-Salvadó, J. (2017). Beyond the nutritional value of yogurt: a diet quality indicator? *Nutrición Hospitalaria, 34*(Suppl 4), 26-30.

[9] Vijaya Kumar, B., Vijayendra, S.V. y Reddy, O.V. (2015). Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. *Journal of Food Science and Technology, 52*(10), 6112–6124.

Colin Hill; RDA for microbes — are you getting your daily dose?. Biochem (Lond) 1 August 2018; 40 (4): 22–25. doi: https://doi.org/10.1042/BIO04004022.

[10] Farnworth, E.R. y Champagne, C.P. (2016). Production of probiotic cultures and their incorporation into foods. En Watson, R.R. y Preedy, V.R. (Editores), *Bioactive Foods in Health Promotion: Probiotics and Prebiotics* (pp. 303-318). New York: Elsevier Inc. Academic Press.

[11] Vinderola, G., Champagne, C.P., Desfossés-Foucault, E. The production of lactic acid bacteria starters and probiotic cultures. An industrial perspective. In : Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects. 2019a. Vinderola G, Salminen, S., Ouwehand A. and Von Wright A (editors). Taylor and Francis, CRC Press.

[12] Champagne, C. (2014). Development of fermented milk products containing probiotics. En Ozer, B. y Akdemir-Evrendilek (Editores), *Dairy Microbiology and Biochemistry. Recent Developments* (pp. 214-244) New YorK: CRC Press, Taylor and Francis.

[13] Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods, 1*, 177–187.

[14] Harutoshi, T. (2013). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria for food and colon health applications. En Kongo, M. (Ed.), *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology: Lactic Acid Bacteria – R&D for Food, Health and Livestock Purposes* (pp. 515–538). Londres: IntechOpen.

[15] Martínez-Villaluenga, C., Cardelle-Cobas, A., Corzo, N. y Olano, A. (2008). Study of galactooligosaccharide composition in commercial fermented milks. *Journal of Food Composition and Analysis, 21*, 540-544.

[16] Ouwehand, A.C. (2017). A review of dose-responses of probiotics in human studies. *Beneficial Microbes, 8*, 143–151.

[17] Vinderola, G., Perdigón, G., Reinheimer, J.A., Médici, M., Prosello, W. y Ghiberto, D. (2003). Bioqueso Ilolay Vita: un nuevo queso probiótico con alta respuesta sobre el sistema inmune. *Industrias Lácteas Españolas (ILE)*, Dic., 34–48.

[18] Vinderola, G. y Reinheimer, J.A. (1999). Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria (1999). *International Dairy Journal, 9*(8), 497-505.

[19] Vinderola, G. y Reinheimer, J.A. (2000). Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal, 10*(4), 271 – 275.

[20] Vinderola, G., Reinheimer, J., Salminen, S. 2019b. The enumeration of probiotic issues: From unavailable standardised culture media to a recommended procedure? International Dairy Journal, 96, 58-65.

[21] Kok, C.R. y Hutkins, R. 2018. Yogurt and other fermented foods as sources of health-promoting bacteria. Nutr Rev. 2018 Dec 1;76(Suppl 1):4-15.

[24] Lang JM, Eisen JA, Zivkovic AM. The microbes we eat: abundance and taxonomy of microbes consumed in a day's worth of meals for three diet types. PeerJ. 20142:e659.

[25] Erdogan, A., Gurses , M., Turkoglu, H., Sert, S., 2001. Some Quality Criteria of Yogurt Made from Milk Added with Antibiotic at Different Levels. Pakistan Journal of Biological Sciences, 4: 886-887.

[26] (https://www.foodsafety.gov/food-safety-charts/food-safety-during-power-outage).

[27] (https://thedairydish.com/long-can-yogurt-sit/).

[28] Muhammad, B. F., Abubakar, M. M. and Adegbola, T. A. (2009). Effect of period and condition of storage on properties of yoghurt produced from cow milk and soymilk

materials. Research Journal of Dairy Science, 3 (2): 18- 24. Research Journal of Dairy Science. 3. 18-24.

[29] Ferdousi R, Rouhi M, Mohammadi R, Mortazavian AM, Khosravi-Darani K, Homayouni Rad A. Evaluation of probiotic survivability in yogurt exposed to cold chain interruption. Iran J Pharm Res. 2013 Winter;12(Suppl):139-44.

[30] Viljoen, B.C., Lourens-Hattingh, A., Ikalafeng, B., Peter, G. Temperature abuse initiating yeast growth in yoghurt, Food Research International, 36 (2), 2003, 193-197.

[31] Bruyand M, Mariani-Kurkdjian P, Gouali M, de Valk H, King LA, Le Hello S, Bonacorsi S, Loirat C. Hemolytic uremic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. Med Mal Infect 2018; 48(3): 167-174.

[32] Hussein HS, Sakuma T. Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. J Dairy Sci 2005; 88(2): 450-65.

[33] Kintz E, Brainard J, Hooper L, Hunter P. Transmission pathways for sporadic Shiga-toxin producing *E. coli* infections: A systematic review and meta-analysis, Int J Hyg Environ Health 2017; 220(1), 57-67.

[34] D'Aoust JY, Park CE, Szabo RA, Todd EC, Emmons DB, McKellar RC. Thermal inactivation of *Campylobacter* species, *Yersinia enterocolitica*, and hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in fluid milk. J Dairy Sci 1988; 71(12): 3230-3236.

[35] Vinderola, G., Rivas, M. (2020). Síndrome Urémico Hemolítico y yogur: entre la creencia popular y la evidencia científica. Revista Chilena de Nutrición (en prensa).

6

El kefir y los alimentos fermentados artesanales

Ana Agustina Bengoa
bengoaagustina@gmail.com

- *Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). CONICET-UNLP –CICPBA*

Graciela Liliana Garrote
ggarrote@biol.unlp.edu.ar

- *Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). CONICET-UNLP –CICPBA*

Analía Graciela Abraham
aga@biol.unlp.edu.ar

- *Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). CONICET-UNLP –CICPBA - Facultad de Ciencias Exactas UNLP 47 y 116 1900, La Plata. Argentina.*
- *Área Bioquímica y Control de Alimentos-Facultad de Ciencias Exactas UNLP.*

Resumen

Los alimentos fermentados han tenido un papel importante en la dieta humana desde el desarrollo de la civilización y siguen siendo importantes en muchos países en donde son una parte integral de la cultura y tradiciones locales. Entre ellos se pueden mencionar aquellos productos que se han revalorizado en los últimos años y se elaboran de manera artesanal como el kefir (bebida láctea fermentada), el sugary kefir o kefir de agua (agua azucarada fermentada) o la kombucha (té azucarado fermentado) entre otros.

El kefir es una bebida fermentada viscosa, de sabor ácido y levemente efervescente que se produce artesanalmente a partir de la fermentación de la leche con gránulos de kefir, estructuras gelatinosas, irregulares, con forma de coliflor, de tamaño variable (0,3 a 3,5 cm de diámetro), de color blanco o ligeramente amarillento y consistencia elástica. Los gránulos están compuestos por una matriz de polisacárido (kefiran) y proteínas, en donde se encuentran inmersas bacterias ácido lácticas, levaduras y bacterias ácido acéticas formando una comunidad simbiótica donde los productos generados por algunos microorganismos durante la

fermentación pueden ser utilizados como fuente de energía o factores de crecimiento por otros microorganismos presentes en la matriz.

El kefir de agua, también conocido como "aquakefir" o "*sugary kefir*", es una bebida de sabor ácido y frutal, levemente efervescente y de bajo contenido alcohólico, que se obtiene por fermentación de agua azucarada adicionada de frutas deshidratadas como higos secos o pasas de uva con una comunidad microbiana multiespecie estable contenida en los gránulos de kefir de agua y se le suele adicionar algún cítrico como limón, para aportar sabor y aroma. Se han utilizado estos gránulos para fermentar jugos de frutas y vegetales, presentándose esta bebida como alternativa para incluir en dietas veganas .Se les asignó el nombre «gránulos de kefir azucarado" (*sugary kefir grain*) para diferenciarlos de los utilizados para fermentar la leche.

La kombucha es una bebida producida por la fermentación aeróbica de té negro azucarado con una combinación simbiótica de levaduras y bacterias inmovilizadas en una película de celulosa. Esta película permanece flotando en el té azucarado y durante la fermentación se genera una nueva película que sirve como iniciador de un nuevo proceso de fermentación. La película conteniendo los microorganismos inmovilizados se denomina SCOBY (*Symbiotic Colony Of Bacteria and Yeast*).

La microbiota del kefir, kefir de agua y kombucha se presenta como una potencial fuente de microorganismos probióticos. Hasta el momento no se ha podido dilucidar completamente las interacciones existentes entre los microorganismos debido a la complejidad y diversidad de cada comunidad. Comprender el papel beneficioso de los microorganismos y sus metabolitos en cada comunidad permitiría el diseño de nuevos productos comerciales "hechos a medida del consumidor" que contengan mezclas definidas de microorganismos con beneficios específicos para la salud.

I. Introducción

Los alimentos fermentados han tenido un rol importante en la dieta humana desde el desarrollo de la civilización, y siguen siendo importantes en muchos países en donde son una parte integral de la cultura y tradiciones locales. Durante la fermentación, los microorganismos transforman los componentes del alimento original produciendo ácidos orgánicos (láctico y acético), dióxido de carbono y alcohol, exopolisacáridos y metabolitos antimicrobianos –como las bacteriocinas, entre otros– dependiendo del fermento utilizado [1].

Si bien el objetivo inicial del proceso de fermentación era prolongar la vida útil de algunos alimentos y bebidas mejorando su seguridad y propiedades organolépticas [2], actualmente los productos fermentados se han vuelto más populares debido a sus beneficios para la salud [3, 4]. Se sabe que algunos alimentos fermentados también promueven la salud humana no solo debido a las propiedades de los materiales alimenticios iniciales. Durante la fermentación, se mejora el valor nutricional de los productos, ya que se ve favorecida la digestibilidad de las proteínas por la proteólisis llevada a cabo por los microorganismos iniciadores o aumenta la producción o biodisponibilidad de vitaminas. Por otro lado, los alimentos fermentados que mantienen los microorganismos viables, si se consumen regularmente, pueden modular la microbiota intestinal [5]. En los últimos años se han publicado evidencias que sugieren que la ingesta de alimentos fermentados es un elemento clave que afecta la relación entre la dieta y la salud mediada por la modulación de la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal [6]. Podemos decir entonces que los alimentos fermentados podrían conducir a estos resultados modificando los componentes de los alimentos, sintetizando metabolitos y proteínas, y/o proporcionando microorganismos vivos al tracto gastrointestinal, dado que el estado de salud no solo depende de la composición de la microbiota, sino también de su diversidad [7]. En ese sentido, los alimentos fermentados artesanales comenzarían a tener un rol importante en nuestra alimentación. Entre ellos, se pueden mencionar aquellos productos que se han revalorizado en los últimos años y se elaboran de manera artesanal como el kefir (bebida láctea fermentada), el *sugary* kefir o kefir de agua (agua azucarada fermentada) o la kombucha (té azucarado fermentado), entre otros.

En este capítulo discutiremos las características fisicoquímicas y microbiológicas del kefir tradicional, sus condiciones de elaboración y sus efectos promotores de la salud. Asimismo, se comparará con el kefir de agua y se discutirán los aspectos generales de la obtención de kombucha.

II. El kefir

El kefir es una bebida fermentada viscosa, de sabor ácido y levemente efervescente, que se produce artesanalmente a partir de la fermentación de la leche con

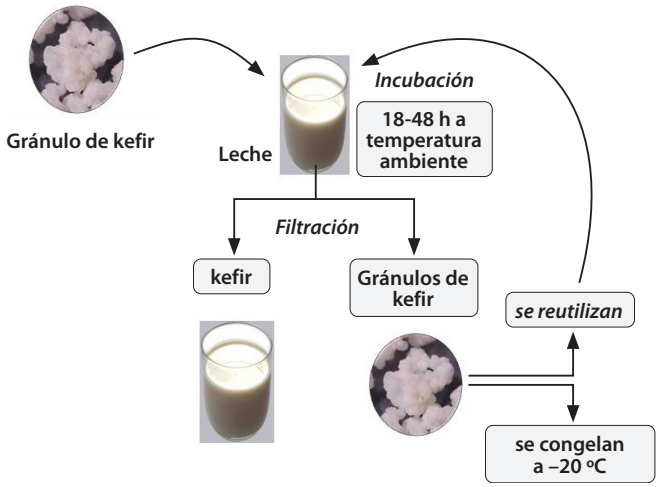
gránulos de kefir [8]. Históricamente, el kefir ha sido asociado con un estado saludable de quienes lo consumen [9, 10]. De hecho, el nombre kefir deriva de la palabra eslava "*keif*" que significa "bienestar" o "vivir bien". Es originario de las montañas del Cáucaso, y los gránulos han sido transmitidos de generación en generación desde hace más de 4.000 años [11, 12]. Se cree que los primeros gránulos de kefir se originaron como consecuencia del almacenamiento de la leche en bolsas hechas de piel o estómago de animales. Sea cual sea el origen, lo más probable es que se hayan originado en distintos lugares a lo largo de la historia y se hayan diseminado de forma tal que hoy en día se encuentran distribuidos en todo el mundo [13].

Los gránulos de kefir son masas gelatinosas, irregulares, con forma de coliflor, de tamaño variable (0,3 a 3,5 cm de diámetro), de color blanco o ligeramente amarillento y consistencia elástica. Contienen aproximadamente un 83% (p/p) de agua, 4-5% (p/p) proteínas y un 10% (p/p) de polisacáridos [14]. Están formados por una matriz de polisacárido (denominado "kefiran") y proteínas, en donde se encuentran inmersas bacterias ácido lácticas (10^8-10^9 UFC/g de gránulo), levaduras (10^7-10^8 UFC/g de gránulo) y bacterias ácido-acéticas (10^5-10^6 UFC/g de gránulo), formando una comunidad simbiótica donde los productos generados por algunos microorganismos durante la fermentación pueden ser utilizados como fuente de energía o factores de crecimiento por otros microorganismos presentes en la matriz [1, 13, 15, 16]. Los gránulos de distintas procedencias presentan distinta estructura y composición microbiana, lo que se debe no solo al origen diferente sino también al empleo de distintas técnicas y condiciones durante el proceso de elaboración de la bebida fermentada [17-20].

El kefir se diferencia de otras leches fermentadas por las características particulares del *starter*, o "cultivo iniciador", utilizado para su producción. Tanto el yogur, viili (leche fermentada nórdica) y otras leches fermentadas tradicionales, se obtienen por inoculación de la leche fresca con una muestra de leche fermentada previamente para obtener una mayor cantidad de producto. Por el contrario, la producción artesanal de kefir requiere directamente la inoculación de la leche fresca con los gránulos de kefir [11, 12]. Esto se debe a que la interacción simbiótica entre los microorganismos del gránulo de kefir es fundamental para dar lugar a una leche fermentada que tiene una diversidad microbiana diferente [21-24]. De esa manera, el uso del mismo kefir como inóculo en lugar de gránulos de kefir dará lugar a un producto con propiedades completamente diferentes. Una vez inoculados los gránulos en la leche y dadas las condiciones de temperatura adecuadas, las bacterias y levaduras presentes en el gránulo comienzan el proceso de fermentación durante el cual algunos de los microorganismos pasan a la leche, dando lugar a un incremento en el número de microorganismos viables en la leche, acompañado de la producción de diferentes metabolitos bioactivos tales como ácido láctico, péptidos bioactivos, exopolisacáridos y bacteriocinas. Al finalizar la fermentación, los gránulos son removidos o separados por filtración de manera tal que pueden ser inmediatamente utilizados para una nueva fermentación o almacenados en condiciones adecuadas [14, 25]. Con cada

fermentación, los gránulos incrementan su tamaño y pueden dar lugar a nuevos gránulos con las mismas características que los originales [15]. Este incremento de su biomasa, que puede llegar a ser de hasta un 2% en cada repique o subcultivo, es consecuencia del aumento en el número de microorganismos y de la producción de kefiran y proteínas que componen la matriz donde se encuentran asociados los microorganismos. Cuando no son utilizados para la elaboración de kefir, los gránulos deben ser conservados de manera adecuada, ya que su actividad depende de la viabilidad de los microorganismos (Figura 1).

Figura 1. Elaboración artesanal de kefir y conservación de gránulos.



Si bien pueden guardarse en heladera a 4°C en leche fresca, en estas condiciones los gránulos se mantendrán activos solo durante un periodo de 8 a 10 días. Se ha evidenciado que los gránulos liofilizados o secados pueden mantener su actividad durante 12 a 18 meses; sin embargo, una mejor preservación se logra al almacenarlos congelados a -20°C en leche fresca [26]. Para reactivarlos, el proceso consiste simplemente en inocular los gránulos en leche y dejarlos fermentar. Los sucesivos repiques en leche permitirán el restablecimiento de la estructura y actividad de los gránulos hasta lograr un kefir con las características deseadas [27]. Por otro lado, el kefir obtenido puede ser consumido inmediatamente o refrigerado a 4°C para su posterior consumo. Esta etapa de refrigeración favorece la fermentación alcohólica con acumulación de CO_2, etanol y vitamina B y, además, conduce a una reducción aun mayor del contenido de lactosa, haciendo el producto más apropiado para personas con intolerancia a este hidrato de carbono [25].

A la hora de preparar el kefir es fundamental tener en cuenta una serie de variables o puntos críticos que pueden modificar las características químicas, microbiológicas, organolépticas, nutricionales y funcionales del producto final [14], entre las cuales se pueden mencionar las siguientes.

- Origen de los gránulos: la composición microbiana de los gránulos puede variar dependiendo de su origen geográfico [15, 27]. Está demostrado, por ejemplo, que la composición de los gránulos tibetanos difiere de los gránulos de origen ruso, irlandés, taiwanés y turco [20, 28], siendo estas diferencias en la comunidad microbiana de los gránulos la responsable de las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de cada kefir en particular [29].

- Tipo de leche: si bien la leche de vaca es la más comúnmente utilizada para la elaboración del kefir, también puede utilizarse leche de cabra o de oveja [11] y esta puede ser entera o descremada. Debe tenerse en cuenta que cuanto mayor sea la cantidad de grasa de la leche, más cremoso y espeso será el producto [30]. Sin embargo, se ha evidenciado que el uso de leche descremada resulta en un mayor incremento de biomasa de los gránulos, ya que la mayor cantidad de grasa podría estar inhibiendo o reduciendo el intercambio de nutrientes entre los microorganismos [14]. El kefir también ha sido preparado usando bebida a base de soja, de nuez y de coco, entre otras; sin embargo, el uso de este tipo de sustratos no lácteos requiere la adición de glucosa, lactosa o sacarosa al 1% para estimular el desarrollo de bacterias lácticas y levaduras, y la consecuente producción de ácido láctico y etanol. Además, si bien se logra obtener un producto fermentado, el uso de estas bebidas vegetales debilita notoriamente al gránulo, por lo que luego de algunos ciclos de fermentación deben volver a colocarse en leche para recuperarlos, indicando que estas bebidas no lácteas no serían apropiadas para obtención de gránulo de kefir [13].

- Relación gránulo/leche: los gránulos se inoculan normalmente al 1-10% (p/v) dependiendo de las características deseadas. En general, una relación del 1% (p/v) dará lugar a una leche fermentada más viscosa y menos ácida, mientras que una relación del 10% (p/v) dará por el contrario un producto ácido poco viscoso y más efervescente [31].

- Temperatura y tiempo de fermentación: habitualmente el kefir se prepara a temperatura ambiente, de manera tal que la fermentación se lleve a cabo entre 18 y 30°C durante 18 a 72 hs. De todas maneras, se considera que la temperatura óptima de elaboración del kefir es 25°C y si bien la fermentación puede ocurrir a temperaturas más elevadas, esto podría aumentar la acidez del producto, así como también afectar la producción de exopolisacárido [14].

El kefir se encuentra descripto en el Código Alimentario Argentino, en el apartado de Leches Fermentadas, Artículo 576 (Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 33/2006 y N° 563/2006). En Sudamérica, el consumo de kefir está limitado a la

producción artesanal. Sin embargo, en otros lugares del mundo, en particular países europeos como Alemania, Austria, Francia, Noruega, Suiza, Polonia y República Checa, el kefir es producido y comercializado a gran escala. El método de producción utilizado a nivel industrial difiere del método tradicional. El uso de gránulos para la fermentación de grandes volúmenes de leche y la recuperación de los mismos resulta muy laborioso y poco práctico para ser aplicado a un proceso industrial [32]. Además, es fundamental que cualquier producto de kefir preparado para ser distribuido y comercializado tenga una composición constante y definida, hecho difícil de lograr a partir los gránulos, que presentan una microbiota diversa y cambiante si se modifican las condiciones de elaboración [13]. Por estos motivos, la producción industrial del kefir se lleva a cabo mediante métodos alternativos. Uno de ellos consiste en el uso de cultivos puros seleccionados, congelados o liofilizados, como *starters* [22, 23], eliminando de esa forma el paso de recuperación de gránulos. El otro método, conocido como método ruso, consiste en una primera etapa de obtención de kefir mediante el uso tradicional con gránulos, seguido de una segunda etapa donde el kefir obtenido es inoculado en un mayor volumen de leche para obtener el producto fermentado a gran escala [33]. Sin embargo, este cultivo madre se debe elaborar en condiciones controladas, ya que el uso sucesivo del producto fermentado para elaborar nuevo kefir produce un desbalance de las poblaciones microbianas [34].

La compleja microbiota del kefir constituye un reservorio natural de cepas seguras y potencialmente probióticas para la salud [14]. Es importante destacar que la composición microbiana del gránulo de kefir difiere de la encontrada en la leche fermentada [20, 25, 35-37]. El género *Lactobacillus* es el más abundante en gránulos de distintos orígenes [20, 38-40], siendo *L. kefiranofaciens, L. kefiri* y *L. parakefiri* las especies más representativas. Otras especies de lactobacilos encontradas en los gránulos incluyen *L. paracasei subsp. paracasei, L. acidophilus, L. delbrueckii subsp. bulgaricus* y *L. plantarum* [41]. Por otro lado, en la leche fermentada se observa una predominancia de la familia Streptococcaceae y los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Acetobacter* [20, 39]. Se ha evidenciado además que la diversidad de especies bacterianas presente en la leche fermentada es menor a la encontrada en el gránulo correspondiente [20]. Por otro lado, debe tenerse en cuenta que las especies que predominan en el kefir pueden verse modificadas por el tiempo de fermentación. En las primeras horas de fermentación predomina *L. kefiranofaciens,* mientras que en etapas tardías se observa una prevalencia del género *Leuconostoc* [42]. En cuanto a las levaduras, más de 23 especies han sido identificadas formando parte de la microbiota del gránulo o de la leche fermentada; siendo *Saccharomyces cerevisiae, S. unisporus, Candida kefyr* y *Kluyveromyces marxianus* las especies predominantes [23, 43, 44]. Otras especies encontradas incluyen *Torulaspora delbrueckii, Pichia fermentans, Kazachastania aerobia, Lachanceae meyersii, Yarrowia lipolytica* y *Kazachstania unispora* [25].

III. Efectos beneficiosos sobre la salud atribuidos al kefir

Se conoce que el kefir ejerce efectos beneficiosos para la salud de quien lo consume, tales como actividad antimicrobiana y antitumoral, inmunomoduladora, antiinflamatoria, cicatrizante, antioxidante, reductora del colesterol y mejora en la tolerancia a la lactosa, el hígado graso y modulación de la microbiota intestinal. Los hallazgos científicos más relevantes sobre las propiedades benéficas para la salud asociadas al consumo de kefir pueden encontrarse en los trabajos de diversos autores, quienes los han resumido adecuadamente [28, 45-47]. Debe tenerse en cuenta que estas propiedades podrían atribuirse tanto a los microorganismos presentes en el producto como a los metabolitos que ellos producen, y están presentes en la leche fermentada.

Dentro de las propiedades probióticas atribuidas a los lactobacilos aislados de kefir, se puede mencionar la capacidad de *L. plantarum* CIDCA 83114 de antagonizar el efecto biológico de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) *in vitro* [48] y los efectos citotóxicos de la toxina Shiga tipo II producida por EHEC O157: H7 [49]. Asimismo, se ha descripto su efecto protector sobre la invasión de *Shigella flexneri* a células epiteliales [50]. Por su parte, cepas de *L. kefiri* pueden inhibir la adhesión y la invasión de *Salmonella enterica* serovar. *Typhimurium* a células Caco-2/TC-7 [51].

En relación con las levaduras, cepas pertenecientes a especies *S. cerevisiae, S. unisporus, I. occidentalis* y *K. marxianus* resisten a las condiciones gastrointestinales y adhieren a células Caco-2 [43]. Romanin y colaboradores [52] demostraron que levaduras específicas presentes en el kefir son capaces de modular la respuesta inducida por distintos agonistas proinflamatorios como flagelina, IL-1β, TNF-α y LPS. Además, se demostró [53] que el pretratamiento de células epiteliales con *K. marxianus* CIDCA 8154, reduce los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno y –en un modelo de *Caenorhabditis elegans*– se comprobó que la levadura protege del estrés oxidativo. En el mismo sentido, Cho y colaboradores [54] describieron recientemente que una combinación de *Kluyveromyces* KU140723-02 aislada de kefir y harina de semilla de uva rica en polifenoles o su extracto tiene actividad antioxidante incrementada. Otros investigadores [55] señalaron que cepas de *S. cerevisiae* aisladas de kefir brasileño presentaron interesantes propiedades probióticas *in vitro*. En un ensayo *in vivo* de colitis inducida químicamente con ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS) se demostró que ratones tratados por vía oral con *K. marxianus* CIDCA 8154 presentaron menor daño histopatológico y niveles más bajos de IL-6 circulante [53]. También se ha descripto que la combinación de dos lactobacilos, un lactococo y dos levaduras aislados de kefir protegen células epiteliales cultivadas *in vitro* de la invasión de *Shigella* [50], así como también, protegen contra la infección por *Clostridium difficile* en un modelo de ratón [56]. Del mismo modo, Londero y colaboradores [57] mostraron las propiedades antagónicas de un cultivo mixto de cepas de kefir contra *Salmonella*. Como estos efectos, muchos otros han sido colectados de la bibliografía científica y publicados por Slattery y colaboradores [58].

Los microorganismos que constituyen los gránulos de kefir producen cambios en la leche durante la fermentación, modificando sus características organolépticas y produciendo metabolitos que contribuyen a las propiedades promotoras de la salud atribuidas al producto. Los microorganismos fermentan la lactosa, hidrolizan proteínas, producen exopolisacáridos (EPS) y ácidos orgánicos, vitaminas, etanol, acetaldehído, diacetilo, dióxido de carbono y bacteriocinas y todos ellos forman parte de la fracción no microbiana del kefir.

Una actividad asociada a esta fracción es la capacidad antimicrobiana atribuida principalmente a los ácidos orgánicos a veces acompañados de otros compuestos inhibidores como las bacteriocinas [45, 59, 60, 61]. El nivel de ácido láctico en el kefir varía entre 0,078 M y 0,255 M [15, 33, 62] y la concentración de ácido acético se encuentra entre 0,015 M y 0,038 M dependiendo de los microorganismos y de las condiciones de fermentación [63].

Se ha demostrado la actividad inhibitoria de la fracción no microbiana, así como del sobrenadante libre de células de leches fermentadas con microorganismos aislados de kefir contra varias bacterias patógenas [59, 60, 64]. Iraporda y colaboradores [60] mostraron que el efecto inhibitorio sobre *Salmonella enterica* serovar. *Enteritidis* es debido a la forma no disociada de los ácidos orgánicos, ya que su efecto se pierde al neutralizar la fracción no microbiana de la leche fermentada. Sin embargo, los mismos autores observaron una disminución en la capacidad invasiva del patógeno a células epiteliales intestinales en cultivo al incubarse con la fracción no microbiana de kefir neutralizada.

Otro beneficio para la salud atribuido a la fracción no microbiana del kefir es su capacidad para modular la respuesta inmune [60] . En este contexto, de Moreno de Le Blanc y colaboradores [65] demostraron que la fracción no microbiana del kefir retrasa el desarrollo del tumor de mama en un modelo animal. El lactato y otros ácidos orgánicos como el acetato, el propionato y el butirato, también regulan negativamente las respuestas proinflamatorias en las células epiteliales y mieloides intestinales [60, 66]. La administración intrarrectal de lactato proporciona una reducción significativa de la inflamación intestinal y el daño epitelial inducido por TNBS. Sin embargo, cuando se administra en el agua de bebida no protege contra la inflamación intestinal aguda, probablemente debido a que el lactato no alcanza los niveles necesarios en el colon porque es absorbido y/o consumido por las bacterias que allí se encuentren [67]. Sin embargo, el lactato puede llegar al intestino a través del consumo de probióticos y alimentos que contienen prebióticos. Los microorganismos probióticos que se adhieren a las células epiteliales pueden producir lactato en el microambiente del epitelio intestinal. En este aspecto, es importante señalar que algunas cepas de *L. paracasei* aisladas de kefir aumentan su capacidad de adhesión a células Caco-2 y a mucina después del paso a través del tracto gastrointestinal simulado [68]. Del mismo modo, el consumo de prebióticos que se fermentan selectivamente en el colon induce el crecimiento de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que producen principalmente lactato. Además, la microbiota intestinal puede usar lactato para la producción de

acetato, propionato y butirato, siendo estos, ácidos grasos de cadena corta altamente asociados a la salud intestinal.

La modulación de la microbiota intestinal mediante la administración de kefir se ha demostrado en ensayos con animales [69, 70] y recientemente en un ensayo en humanos [71]. Este impacto en las comunidades microbianas podría modificar el perfil de metabolitos y también influir en la respuesta inmune.

El kefiran es un heteropolisacárido soluble en agua compuesto por cantidades iguales de D-glucosa y D-galactosa, y es el principal polisacárido presente en el kefir, alcanzando valores de aproximadamente 218 mg/L [72, 73] y ha sido estudiado por sus propiedades tecnológicas y beneficios para la salud. Este polímero es un aditivo interesante para la industria alimentaria, ya que mejora significativamente la viscosidad y las propiedades viscoelásticas de los geles de leche ácidos y es capaz de formar films comestibles [74, 75]. Es un polisacárido no digerible que puede llegar al intestino grueso donde puede ejercer efecto antimicrobiano [76], antiinflamatorio [77] y antialérgico [78]. La administración de kefiran en el agua de bebida aumenta la cantidad de bifidobacterias en el colon [79] y la cantidad de células intestinales productoras de mucus [80]. La actividad benéfica del kefiran podría atribuirse a la capacidad de este polisacárido para interactuar con los enterocitos o indirectamente por el efecto bifidogénico demostrado. Además, este polímero puede antagonizar los factores de virulencia de patógenos *in vitro* [81] y reducir la presión arterial y los niveles de colesterol en suero [82].

Hamet y colaboradores [83] han aislado nueve cepas de *L. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* productoras de EPS de gránulos de kefir de diferentes orígenes observando que el grado de polimerización del EPS producido en la leche depende de la cepa. Sin embargo, ninguno de ellos produce fracciones de un peso molecular superior a 10^5 Da. Jeong y colaboradores [84] demostraron que *L. kefiranofaciens* DN1 produce un EPS diferente del kefiran, compuesto de manosa, arabinosa, glucosa, galactosa y ramnosa, cuando crece en glucosa. Por el contrario, el *L. kefiranofaciens* 1P3 aislado de granos de kefir de Brasil pudo producir un α-glucano en presencia de sacarosa, sin embargo, no informaron si las mismas cepas pueden producir EPS a partir de lactosa [85].

Además de *L. kefiranofaciens*, muchas otras especies BAL productoras de EPS se han aislado del grano de kefir [84, 86]. Gangoitti y colaboradores [87] estudiaron la estructura del EPS sintetizado por *L. plantarum* CIDCA 8327 en la leche, observando que correspondía a un α-glucano. Las cepas de *L. paracasei* subsp. *paracasei* aisladas de gránulos de kefir en Argentina pudieron producir EPS en leche o medios de cultivo [86, 88]. La temperatura de crecimiento afectó la producción de EPS por *L. paracasei* subsp. *paracasei*, evidenciándose los cambios por la presencia de una fracción de alto peso molecular y un aumento en la cantidad total de EPS producido a una temperatura más baja [88]. La leche fermentada obtenida con estas cepas tiene buenas propiedades reológicas [86] y se les atribuye la inhibición de la invasión de *Salmonella* y la modulación de la respuesta proinflamatoria en un modelo animal [88, 89]. Di y colaboradores [90] estudiaron el EPS producido por *L. plantarum* YW11 aislado del

kefir tibetano, evidenciando su actividad antioxidante. Además, demostraron que el consumo de EPS recupera la diversidad de microbiota y los filotipos en un modelo de ratón envejecido.

Dallas y colaboradores [91] describieron la presencia de péptidos en muestras de kefir con actividad biológica, incluidas las funciones antihipertensivas, antimicrobianas, inmunomoduladoras, opioides y antioxidantes. Informes recientes demostraron que la administración de kefir o péptidos comerciales a partir de kefir redujo el aumento de peso en ratones obesos [46, 92]. Santanna y colaboradores [93] mostraron que la administración de la fracción no microbiana causó una reducción significativa en el depósito de lípidos vasculares. Del mismo modo, Brasil y colaboradores [94] evidenciaron que la fracción no microbiana del kefir inhibe la enzima convertidora de angiotensina y reduce la hipertensión, atribuyendo este efecto a la liberación de péptidos bioactivos de las proteínas de la leche por los microorganismos.

El kefir se ha asociado con el estado saludable y la longevidad de los consumidores durante años. Sin embargo, las bases científicas de las propiedades promotoras de la salud del kefir se demostraron en las últimas tres décadas. La leche fermentada es un producto dinámico cuyas propiedades dependen de varios factores, como la fuente de leche, las condiciones de crecimiento y el origen de los gránulos. Dado que las principales variaciones incluyen la microflora y los metabolitos del kefir como ácido láctico y acético, exopolisacárido y péptidos bioactivos, es necesaria una comprensión profunda de la composición microbiológica y química del kefir para entender la compleja interrelación entre sus microorganismos que han permitido el mantenimiento del complejo sistema ecológico a través de los siglos. Además, comprender el papel beneficioso de cada microorganismo aislado de kefir y los componentes de la fracción no microbiana permitiría el diseño de nuevos productos comerciales que contengan mezclas definidas de microorganismos y metabolitos con beneficios específicos para la salud. El desarrollo de kefir comercial con cepas definidas, permite obtener productos controlados y reproducibles y, junto a los estudios clínicos de efectividad que demuestren sus propiedades benéficas, daría lugar a clasificar a este tipo de kefir como un alimento probiótico, según los requerimientos regulatorios actuales, lo que constituye un amplio e innovador campo a desarrollar dentro de la ciencia y tecnología de alimentos.

IV. Kefir de agua

En los últimos años ha aumentado el interés por esta bebida fermentada debido a su sabor agradable y los potenciales efectos benéficos atribuidos a su consumo. Ha surgido la inquietud por conocer el proceso de obtención de esta bebida y los microorganismos responsables de la fermentación, así como de dilucidar las características fisicoquímicas, nutricionales y benéficas para la salud (funcionalidad) del producto. A diferencia de lo que ocurre en algunos países de Europa, Asia o América del

Norte –en los cuales esta bebida se produce de manera industrial y se comercializa [95]–, en nuestro país solo se fabrica de manera artesanal y hasta el momento no está regulada por el Código Alimentario Argentino.

El kefir de agua, también conocido como "aquakefir" o "sugary kefir", es una bebida de sabor ácido y frutal, levemente efervescente y de bajo contenido alcohólico, que se obtiene por fermentación de agua azucarada adicionada de frutas deshidratadas, como higos secos o pasas de uva, con una comunidad microbiana multiespecie estable contenida en los gránulos de kefir de agua [96, 97] y se le suele adicionar algún cítrico como limón, para aportar sabor y aroma [98, 99]. Se han utilizado estos gránulos para fermentar jugos de frutas y vegetales, presentándose esta bebida como alternativa para incluir en dietas veganas [95].

Se les asignó el nombre "gránulos de kefir azucarado" (en inglés, "*sugary kefir grain*") para diferenciarlos de los utilizados para fermentar la leche [98, 100]. Si bien comparten con el kefir tradicional de leche el hecho de ser un sistema microbiológico complejo inmovilizado en una matriz, difieren en la composición química de la matriz y los principales microorganismos que lo conforman.

Los gránulos de kefir de agua son pequeños (1 a 10 milímetros de diámetro), translúcidos y quebradizos (se rompen bajo presión); pueden ser de color blanco o amarillento según la fruta que se añade en el medio de cultivo [98] o el tipo de azúcar usado. Al igual que el kefir de leche, constituyen un sistema microbiológico complejo conformado por bacterias ácido lácticas (10^7-10^8 UFC/g de gránulo), bacterias ácido acéticas (10^6-10^7 UFC/g de gránulo) y levaduras (10^6-10^7 UFC/g de gránulo) que coexisten en asociación simbiótica, inmersas e inmovilizadas en una matriz de polisacárido producido por las propias bacterias [101-103]. La matriz está compuesta por un polisacárido formado por glucosa unida por enlaces α-1,6 con ramificaciones en uniones α-1,3, hecho que lo diferencia de la matriz del gránulo de kefir de leche compuesta por proteínas y kefiran [100, 104, 105].

Estos gránulos de kefir de agua también han recibido diferentes nombres como "tibicos" o "tibi", entre otros, dependiendo del posible origen del gránulo que es aún incierto [106]. Entre las teorías más populares del origen de los gránulos se pueden mencionar que fueron traídos a Europa por los soldados que regresaron de la guerra de Crimea en 1855 y los llamaron "*gingerbeer plants*" [107], mientras que otra teoría propone la formación espontánea de los "tibis" en las hojas planas (nopales) de un cactus mexicano (*Opuntia* ssp.), donde los microorganismos se alimentaban de las excreciones azucaradas [108]. Pero más allá de su origen, lo cierto es que los gránulos se han trasmitido de casa en casa a través de las generaciones, para la elaboración artesanal de esta bebida fermentada.

El proceso de fermentación de kefir de agua se inicia agregando gránulos de kefir de agua (el inóculo) a una mezcla de agua potable, frutas (secas) y azúcar. Por lo general, se realiza a temperatura ambiente (21 a 25 °C) durante 2 a 4 días usando entre 6 y 30% (p/v) de sacarosa y 6–20% (p/v) de gránulos de kefir de agua [96, 99, 103, 109, 110]. Durante este proceso algunos microorganismos pasan al agua, donde se

multiplican y fermentan los azúcares –evidenciándose un descenso del pH– y otros quedan asociados al gránulo y sintetizan el glucano a partir de sacarosa, componente principal de la matriz [104, 105, 110]. Al final de este proceso los gránulos de kefir que han aumentado su masa son recuperados por filtración [102] y el producto resultante es una bebida dulce, ligeramente alcohólica, ácida y espumosa, de color amarillento y de sabor y aroma frutado, que muchos llaman "licor de kefir" y que contiene las bacterias y levaduras viables. Se puede tomar inmediatamente o conservar en la heladera 1 o 2 días, aunque el gas también aumentará, produciendo una bebida más carbonatada. El proceso de fermentación puede ser doble si, luego de las primeras 24 horas, se retiran los gránulos por filtración y se añaden al primer producto obtenido frutas, jugos de frutas y se deja fermentar por 24 horas más en la heladera. Esto da la posibilidad de obtener productos saborizados (suelen añadirse jugos de frutas como manzana, piña, lima, limón, naranja, mango, cerezas, frutillas, etc). También puede realizarse la fermentación sustituyendo el agua azucarada por agua de coco, suficientemente dulce [95]. De esta manera en cada fermentación se obtiene el producto fermentado y un aumento de la cantidad de gránulos que son utilizados nuevamente (proceso denominado *backslopping* en inglés) o son almacenados en heladera para futuras fermentaciones [99, 103].

En algunos países este producto se elabora a escala industrial donde se requieren condiciones controladas de fermentación y tratamiento de las materias primas [95].

La bebida fermentada contiene ácidos láctico y acético, CO_2, alcohol y varios compuestos que contribuyen al aroma y vitaminas del grupo B [95]. También se encuentran presentes polisacáridos que fueron caracterizados como glucanos (polímero de glucosa) y en menor proporción levanos (polímeros de fructosa) producidos por los propios microorganismos [97, 101, 105]. El glucano presente en el producto fermentado difiere del presente en el gránulo en el peso molecular y la posición de las ramificaciones. La composición del kefir de agua, así como sus características organolépticas, pueden ser diferentes debido a factores tales como el origen y almacenamiento de los gránulos, el tipo de azúcar, así como a las condiciones de elaboración del producto siendo relevantes la temperatura, la concentración de gránulos, la capacidad buffer del medio, la concentración de calcio y la temperatura de fermentación [106, 111].

El aumento de biomasa de gránulo es un proceso clave para la continuación y propagación de los gránulos y está influenciado principalmente por las características intrínsecas del gránulo y factores ambientales como los nutrientes disponibles [103, 110]. El bajo crecimiento de gránulo es un problema común durante la fermentación de kefir de agua que limita la continuación exitosa del proceso de producción de esta bebida [103].

Los microorganismos del gránulo de kefir de agua han sido mucho menos estudiados que los del kefir de leche, aunque igualmente constituyen un reservorio importante de microorganismos altamente competitivos. Una particularidad del gránulo de kefir de agua es su capacidad de mantener el balance microbiano durante largos períodos, adaptándose al desarrollo en un hábitat pobre en fuentes de

nitrógeno y factores de crecimiento [96, 112, 113]. En ese aspecto, los microorganismos del gránulo coexisten en una estrecha relación donde cada uno es capaz de crecer en asociación simbiótica y proveerse uno a otros componentes esenciales para su desarrollo. Se ha evidenciado una estrecha relación entre bacterias y levaduras aisladas de kefir de agua. Al crecer en co-cultivo algunas combinaciones resultaron en un beneficio para para ambos microorganismos. Por ejemplo, en el co-cultivo de *Zygotorulaspora (Z.) florentina* y *Lactobacillus nagelii* las levaduras proveyeron vitaminas, aminoácidos esenciales y factores de crecimiento para las bacterias mientras que los productos finales de las bacterias fueron utilizados por las levaduras como fuentes de energía [97]. Por otro lado, la combinación de *L. hilgardii* y *Z. florentina* resulta en el beneficio de una sola de las especies (parasitismo) [112, 113]. De esta manera se puede considerar que en el gránulo se genera una relación única entre los integrantes del consorcio dependiendo de cada bacteria/levadura. Los microorganismos del gránulo además producen metabolitos que controlan el desarrollo de microorganismos ambientales o patógenos, permitiendo que la fermentación se realice bajo condiciones no estériles sin riesgo de contaminación.

Algunos de los microorganismos clave de la fermentación de kefir de agua son *L. hilgardii, L. nagelii, L. paracasei, Bifidobacterium aquikefiri, Saccharomyces cerevisiae,* y *Dekkera bruxellensis* [97, 99, 111, 114]. También están presentes otras bacterias lácticas, levaduras, bacterias ácido acéticas y/o bifidobacterias [96, 109, 110, 114]. Se puede apreciar que, si bien hay coincidencia en algunas especies, los microorganismos más relevantes en este sistema no son los mismos que los descriptos en el kefir de leche. Dentro de la variedad de especies que conviven en los gránulos de kefir de agua, se ha considerado que *L. hilgardii* es el principal microorganismo responsable de la producción del glucano constituyente de la matriz del gránulo [101, 105] y recientemente se ha postulado a *L. hordei* como un posible contribuyente a la formación de gránulo [115].

En el saber popular, el consumo de esta bebida se asocia a una mejora en el estado de salud y se supone que muchos de estos efectos provienen del hecho de relacionar este producto con el kefir de leche. En la Figura 2 se detallan las principales diferencias entre los gránulos de kefir de leche y de agua. Con respecto al efecto benéfico de esta bebida, se ha demostrado que posee capacidad antioxidante *in vitro* y efecto antiinflamatorio en un modelo de edema en pata de rata, asociado a la presencia del polisacárido [116-118]. Algunos autores indican que dada la complejidad de la microbiota presente, sería factible que existan cepas potencialmente probióticas [96], sin embargo, es necesario validar los resultados. Por ejemplo, estudios *in vitro* sobre la capacidad de cepas de *L. paracasei*, aisladas de kefir de leche y de kefir de agua, de proteger el epitelio de la acción de *Salmonella,* demostraron que solo los aislados de leche dieron resultados positivos [89] indicando que el efecto es dependiente de la cepa. Trabajos recientes han demostraron que *L. diolivorans* 1Z, protege *in vivo* de la infección con *Salmonella* [119] y *L. mali* APS1 mejora la esteatosis hepática en modelo animal [120]. Sin embargo, las investigaciones y publicaciones científicas relacionadas con este tema son todavía escasas quedando un largo camino por recorrer.

Figura 2. Gránulo de kefir de leche y gránulos de kefir de agua.

Gránulos de kefir de leche

- Microorganismos: *L kefiri*, *L parakefiri*, *L kefiranofaciens*, *L kefirgranum*, *Sacharomyces*, *Kluyveromyces*, *Dekkera*
- Matriz de proteína y Kefiran
- Color blanco o amarillo
- Tamaño: desde pocos milímetros a 2 a 3 centímetros de diámetro

Gránulos de kefir de agua

- Microorganismos: *L hilgardii*, *L nagelli*, *L hordeii*, *L Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Dekkera*
- Matriz de glucano
- Color blanco o amarillo, translúcidos, mucilaginosos, de estructura elástica pero que se rompen fácilmente
- Tamaño: 1-10 milímetros de diámetro

V. Kombucha

La kombucha es una bebida producida por la fermentación aeróbica de té negro azucarado con una combinación simbiótica de levaduras y bacterias inmovilizadas en una película de celulosa. Esta película permanece flotando en el té azucarado y durante la fermentación se genera una nueva película que sirve como iniciador de un nuevo proceso de fermentación. La película conteniendo los microorganismos inmovilizados se denomina SCOBY (siglas en inglés para *Symbiotic Colony Of Bacteria and Yeast*). La kombucha es también conocida como los "hongos del té" o *Haipao*, y se ha elaborado en China de manera artesanal durante más de 2000 años; de allí fue a Japón, para llegar finalmente a Rusia y el Este Europeo [121].

La kombucha obtenida por fermentación aeróbica de té negro azucarado durante 8 a 10 días tiene un sabor ácido semejante a una sidra burbujeante que por fermentación prolongada desarrolla un sabor a vinagre suave [122. La bebida fermentada contiene microorganismos viables, etanol, dióxido de carbono y ácidos orgánicos (principalmente ácido glucónico y acético, y en menor proporción ácido láctico), entre otros metabolitos responsables de las características organolépticas [123].

En el producto, obtenido durante 10 días, las bacterias y levaduras alcanzan una concentración entre 10^4 y 10^6 UFC/ml, siendo el número de levaduras levemente superior al de bacterias. Se ha demostrado que la viabilidad de los microorganismos disminuye en el transcurso de la fermentación debido a la falta de oxígeno y el pH extremadamente bajo (pH 2,5) [124]. El número de microorganismos viables es inferior en la película con respecto a la bebida fermentada, siendo el microbioma de la película más estable y menos diverso que la bebida [124, 125].

Los microorganismos que se han aislado con mayor frecuencia de este producto son bacterias ácido acéticas correspondientes a los géneros *Gluconocetobacter* y *Acetobacter,* que están acompañados por levaduras representadas en su mayor proporción por el género *Zygosaccharomyces*. En menor proporción se encuentran las bacterias lácticas representadas por el género *Lactobacillus*. La composición microbiológica varía dependiendo del origen del SCOBY, pero los microorganismos predominantes son los mismos en todos los productos y películas [122, 123]. Se ha demostrado que tanto el SCOBY crecido en condiciones estériles como no estériles mantiene una microbiota basal compuesta por bacterias ácido-acéticas y levaduras, acompañadas por otras bacterias que contribuyen a la variabilidad microbiana del fermento. El tiempo de fermentación también afecta las poblaciones microbianas. Al inicio, las bacterias ácido-acéticas son más abundantes en la película que en la bebida llegando a un equilibrio a los 8 días mientras que las levaduras se mantienen estables en ambas fases durante toda la fermentación. El mantenimiento de la proporción del microbioma basal es crítico para que funcione toda la comunidad [125]. Para el mantenimiento del SCOBY, los microorganismos deben realizar la síntesis de celulosa. Una de los géneros más importantes responsables de ello es *Komagataeibacter xylinus*, (anteriormente denominado *Gluconacetobacter xylinus)* y es considerado el microorganismo más eficiente en la producción de celulosa microbiana en la kombucha [126].

En el SCOBY los microorganismos coexisten en una relación simbiótica que se extiende al producto fermentado. A diferencia del kefir y el kefir de agua, las bacterias dominantes de esta fermentación son las bacterias ácido-acéticas, que son capaces de utilizar alcohol para oxidarlo a ácido acético y ácido glucónico. Estos microorganismos llevan a cabo una fermentación aérobica y –por lo tanto– requieren oxígeno para su crecimiento y actividad metabólica. Las levaduras convierten la sacarosa en glucosa y fructosa y producen etanol. Las bacterias acéticas convierten la glucosa a ácido glucónico y la fructosa a ácido acético. Los compuestos derivados de la cafeína del té estimulan la síntesis de celulosa por las bacterias ácido-acéticas. El ácido acético estimula a las levaduras a producir etanol, que a su vez es utilizado para el crecimiento y producción de ácido acético por las bacterias acéticas [127]. Además, la muerte y auto-lisis de las levaduras libera vitaminas y otros nutrientes que son utilizados por las bacterias. Algunos microorganismos crecen en simultáneo, pero otros requieren los productos de fermentación de otros y crecen de manera secuencial, cambiando el predominio de cada microorganismo a lo largo de la fermentación [128]. Por otro lado, los ácidos orgánicos y el etanol actúan como bioconservantes, evitando la colonización del SCOBY y la kombucha por otros microorganismos. Dado que la composición de ácidos orgánicos depende de las variables de proceso mencionadas, es necesario controlar la fermentación para asegurar la calidad del producto desde el punto de vista de la seguridad [121].

Esta bebida se elabora de manera artesanal y la proporción exacta de componentes puede variar según las condiciones de elaboración. La primera etapa es la preparación del té azucarado que se realiza añadiendo hojas u hebras de té a agua

hirviendo y se deja en infusión durante unos 10 minutos antes de separarlas. Luego se agrega sacarosa en una concentración entre 5 a 10 g/100 ml, que se disuelve en el té caliente y se deja enfriar. El té se vierte en un recipiente limpio de boca ancha y se acidifica mediante el agregado de kombucha ya preparada. El SCOBY se coloca sobre la superficie y el frasco se cubre cuidadosamente con un paño limpio de algodón. Se incuba a temperatura ambiente (entre 20 y 30 º C) durante 7 a 60 días. Durante la fermentación, se forma una nueva película (denominada comúnmente hija) en la superficie del té que se retira de la superficie y se guarda en un pequeño volumen de té fermentado. La bebida se pasa a través de un liencillo y es almacenada en botellas tapadas a 4 ºC [122, 123, 129].

La fermentación está influenciada por muchos factores, como la temperatura, la cantidad de oxígeno, el CO_2 disuelto, así como por la naturaleza y composición del medio, el origen del SCOBY, la concentración de azúcar, la variedad de té utilizado, el tiempo de fermentación y la temperatura utilizada [122, 130]. Cualquier variación en estos factores puede afectar la velocidad de fermentación, las propiedades organolépticas, la calidad nutricional y las características fisicoquímicas del producto. Con respecto al sustrato a fermentar, se han utilizado diferentes variedades de té negro y té verde como también otros sustratos entre los que se pueden mencionar agua de coco o jugo de frutas [129, 131].

El tiempo de fermentación es uno de los parámetros de proceso que produce mayor cambio en las características del producto. Este tiempo varía entre 7 y 60 días siendo entre 10 y 15 días el tiempo recomendado para obtener los mejores productos con buenas características organolépticas [123]. Además, después de los 7 días de fermentación se observa un incremento en los polifenoles y una mayor diversidad microbiana [128]. Por otro lado, la acumulación de gas en la interfase entre la película y el producto bloquea la transferencia de nutrientes, creando un entorno desfavorable para los microorganismos y un producto más avinagrado. Estos tiempos varían dependiendo de la temperatura de fermentación siendo la recomendada entre 22 °C y 30 °C [123]. Otra variable importante en la fermentación del té de kombucha es el oxígeno necesario para la fermentación aeróbica llevada a cabo por las bacterias ácido acéticas. En cultivos estáticos la difusión de oxígeno es un factor limitante que podría afectar la producción y calidad de la celulosa. Sin embargo, la agitación no es recomendada por afectar la formación de la película. El conocimiento de la cinética de producción de los metabolitos bacterianos durante la fermentación y el efecto de las variables del proceso, es crucial para comprender las propiedades del té de kombucha preparado en diferentes condiciones, para optimizar su producción industrial.

La popularidad de la kombucha está impulsada por su potencial uso como alimento funcional debido a los supuestos beneficios para la salud que se le atribuyen basados en la apreciación personal. Sin embargo, la evidencia científica que respalde los beneficios de kombucha para la salud humana es limitada [127, 132]. Los pocos estudios existentes hasta el momento incluyen estudios *in vitro* que describen un efecto antimicrobiano, antioxidante y anticancerígeno [127, 130] y estudios in

vivo que demuestran un efecto hipoglucémico en ratas diabéticas, disminución de especies reactivas al oxígeno en hígado y riñón de ratas alimentadas con dieta rica en colesterol (efecto antioxidante), efecto cicatrizante entre otros [133]. Sin embargo no hay estudios en humanos validados [132].

Los estudios *in vitro* sugieren que los efectos benéficos de este producto están asociados al conjunto de metabolitos que se producen durante la fermentación entre los que se pueden mencionar el ácido glucónico, el ácido acético, las vitaminas y los compuestos fenólicos [132, 134]. Si bien el efecto benéfico para la salud ha sido asociado a los microorganismos y los metabolitos producidos durante el proceso de fermentación, no se pueden descartar los efectos asociados al propio té con su aporte de polifenoles y compuestos antioxidantes [122]. Con respecto al rol de los microorganismos se requieren nuevas investigaciones para obtener evidencias sobre su potencial efecto probiótico [134].

El consumo de kombucha fue algunas veces asociado a reacciones adversas (pero no siempre confirmado), incluyendo hiponatremia, reacción alérgica, ictericia y náuseas, vómitos, dolor de cabeza y dolor de cuello; acidosis metabólica, hepatotoxicidad y hepatitis colestásica, trastornos renales [123, 132]. Está contraindicado en embarazadas y durante el periodo de lactancia [132, 134].

En nuestro país la comercialización de este producto está prohibida hasta el momento (B.O. 13/04/05 SALUD PUBLICA Disposición 1829/2005 - ANMAT). Sin embargo, la FDA (siglas en inglés de Food and Drug Administration), indica que controlando las condiciones de elaboración, la kombucha es segura para consumo humano y recomienda que el tiempo de fermentación no supere los 10 días (FDA *Model Food Code Number*, 2013). Nuevos estudios son necesarios para definir el efecto en la salud/toxicidad de la kombucha.

VI. Conclusiones

En este capítulo se han descripto tres alimentos fermentados artesanales que se caracterizan por tener aspectos comunes y diferentes que determinan su identidad. Las diferencias las constituyen principalmente los microorganismos que conforman cada fermento y en consecuencia los metabolitos que se producen durante el desarrollo de cada bebida. Con respecto a los aspectos comunes se puede destacar que todo ellos son productos fermentados por una microbiota compleja inmovilizada en una matriz y se asocia su consumo a un efecto benéfico en la salud. Durante la fermentación los microorganismos sintetizan los componentes de la matriz y se genera nueva biomasa de gránulos o película, siendo la síntesis del/los componentes de la matriz esencial para seguir manteniendo el fermento.

La microbiota del kefir, kefir de agua y kombucha se presenta como una potencial fuente de microorganismos probióticos. Hasta el momento no se ha podido dilucidar completamente las interacciones existentes entre los microorganismos debido a la

complejidad y diversidad de cada comunidad. Comprender el papel beneficioso de cada uno de ellos y sus metabolitos permitiría el diseño de nuevos productos comerciales "hechos a medida del consumidor" que contengan mezclas definidas con beneficios específicos para la salud.

El interés de los consumidores por alimentos artesanales y naturales con propiedades benéficas específicas para la salud los ha llevado a descubrir y revalorizar estos "nuevos 'viejos' alimentos" para incluirlos en su dieta.

VII. Declaración de posibles conflictos de interés

Los autores no declaran poseer conflictos de interés.

VIII. Bibliografía citada

[1] Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in microbiology*. 2016; 7: 377.

[2] Dimidi, E., Cox, S. R., Rossi, M., & Whelan, K. (2019). Fermented Foods: Definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. *Nutrients*, *11*(8), 1806

[3] Sanlier, N., Gökcen, B. B., & Sezgin, A. C. (2017). Health benefits of fermented foods. *Critical reviews in food science and nutrition*. 25, 1–22. doi: 10.1080/10408398.2017. 1383355

[4] González S, Fernández-Navarro T, Arboleya S, de los Reyes-Gavilán CG, Salazar N & Gueimonde M (2019) Fermented Dairy Foods: Impact on Intestinal Microbiota and Health-Linked Biomarkers. *Frontiers in microbiology*. 10:1046. doi: 10.3389/fmicb.2019.01046

[5] Rezac S, Kok CR, Heermann M & Hutkins R (2018) Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms. *Frontiers in microbiology*. 9:1785. doi: 10.3389/fmicb.2018.01785

[6] Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A, Smid, EJ., & Hutkins R. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current opinion in biotechnology*, *44*, 94-102.

[7] Durack, J., & Lynch, S. V. (2019). The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy. *Journal of experimental medicine*, 216(1), 20-40

[8] Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of dairy research*, *68*(4), 639-652

[9] St-Onge, M. P., Farnworth, E. R., Savard, T., Chabot, D., Mafu, A., & Jones, P. J. (2002). Kefir

consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial [ISRCTN10820810]. *BMC complementary and alternative medicine*, 2(1), 1

[10] Farnworth, E. R., & Mainville, I. (2008). Kefir—A fermented milk product. In *Handbook of fermented functional foods* (pp. 89-127). CRC Press.

[11] Otles, S., & Cagindi, O. (2003). Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan journal of nutrition*, 2(2), 54-59

[12] Farnworth, E. R. (2006). Kefir–a complex probiotic. *Food science and technology bulletin: Fu*, *2*(1), 1-17

[13] Nielsen, B., Gürakan, G. C., & Ünlü, G. (2014). Kefir: a multifaceted fermented dairy product. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 6(3-4), 123-135

[14] Bengoa, A. A., Iraporda, C., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2019). Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *Journal of applied microbiology*, 126(3), 686-700

[15] Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2010). Microbial Interactions in Kefir: A natural probiotic drink. *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*, *327*

[16] Plessas, S., Nouska, C., Mantzourani, I., Kourkoutas, Y., Alexopoulos, A., & Bezirtzoglou, E. (2017). Microbiological exploration of different types of kefir grains. *Fermentation*, 3(1), 1

[17] Marshall, V. M., Cole, W. M., & Brooker, B. E. (1984). Observations on the structure of kefir grains and the distribution of the microflora. *Journal of applied bacteriology*, 57(3), 491-497

[18] Pintado, M. E., Da Silva, J. L., Fernandes, P. B., Malcata, F. X., & Hogg, T. A. (1996). Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. *International journal of food science & technology*, 31(1), 15-26

[19] Mayo, B., Ammor, M. S., Delgado, S., & Alegría, A. (2010). Fermented milk products in *Fermented foods and beverages of the world*, 263-288

[20] Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2013). Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources. *PloS one*, *8*(7), e69371

[21] Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G., & Spasov, Z. (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 28(1), 1-6

[22] Beshkova, D. M., Simova, E. D., Simov, Z. I., Frengova, G. I., & Spasov, Z. N. (2002). Pure cultures for making kefir. *Food microbiology*, *19*(5), 537-544

[23] Witthuhn, R. C., Schoeman, T., & Britz, T. J. (2005). Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *International dairy journal*, 15(4), 383-389

[24] Dobson, A., O'Sullivan, O., Cotter, P. D., Ross, P., & Hill, C. (2011). High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain. *FEMS microbiology letters*, *320*(1), 56-62

[25] Rosa, D.D., Dias, M.M., Grześkowiak, Ł.M., Reis, S.A., Conceição, L.L., and Maria do Carmo, G.P. (2017) Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition research reviews* 30(1), 82-96

[26] Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (1997). Preservation of kefir grains, a comparative study. *LWT-food science and technology*, *30*(1), 77-84

[27] Sarkar, S. (2008). Biotechnological innovations in kefir production: a review. *British food journal*, 110(3), 283-295

[28] Prado, M. R., Blandón, L. M., Vandenberghe, L. P., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C.R. (2015). Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in microbiology*, 6, 1177

[29] Dertli, E., & Çon, A.H. (2017) Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. *LWT-food science and technology* 85, 151-157

[30] Santos, J. P. V. (2008). *Avaliação da microbiota de grãos de kefir e atividade inibidora da bebida sobre algumas bactérias patogênicas* (Doctoral dissertation, MSc Thesis]. Viçosa Brazil: Universidade Federal de Viçosa)

[31] Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (1998). Characteristics of kefir prepared with different grain [ratio] milk ratios. *Journal of dairy research*, *65*(1), 149-154

[32] Marshall, V. M. (1987). Fermented milks and their future trends: I. Microbiological aspects. *Journal of dairy research*, 54(4), 559-574

[33] Leite, A. M. D. O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, J. T., & Paschoalin, V. M. F. (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian journal of microbiology*, 44(2), 341-349

[34] Gao, W., Zhang, L., Feng, Z., Liu, H., Shigwedha, N., Han, X., Yi, H., Liu, W. & Zhang, S. (2015). Microbial diversity and stability during primary cultivation and subcultivation processes of Tibetan kefir. *International journal of food science & technology*, 50(6), 1468-1476.

[35] Kotova, I. B., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2016). Russian kefir grains microbial composition and its changes during production process. In *Advances in microbiology, infectious diseases and public health* (pp. 93-121). Springer, Cham.

[36] Londero, A., Hamet, M. F., De Antoni, G. L., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2012). Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterisation. *Journal of dairy research*, 79(3), 262-271

[37] Gao, W., & Zhang, L. (2019). Comparative analysis of the microbial community composition between Tibetan kefir grains and milks. Food Research International. 116:137-144

[38] Nalbantoglu, U., Cakar, A., Dogan, H., Abaci, N., Ustek, D., Sayood, K., & Can, H. (2014). Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. *Food microbiology*, 41, 42-51

[39] Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Aquilanti, L., De Filippis, F., Stellato, G., Di Mauro, S., Turchetti, B., Buzzini, P., Ercolini, D, & Clementi, F. (2015). Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food microbiology*, *49*, 123-133

[40] Korsak, N., Taminiau, B., Leclercq, M., Nezer, C., Crevecoeur, S., Ferauche, C., Detry, E., Delcenserie, V., & Daube, G. (2015). Evaluation of the microbiota of kefir samples using metagenetic analysis targeting the 16S and 26S ribosomal DNA fragments. *Journal of dairy science*, 98(6), 3684-3689

[41] Hallé, C., Leroi, F., Dousset, X., & Pidoux, M. (1994). Les kefirs: des associations bactéries lactiques-levures. *Bactéries lactiques: Aspects fondamentaux et technologiques*, 2, 169-182

[42] Walsh, A. M., Crispie, F., Kilcawley, K., O'Sullivan, O., O'Sullivan, M. G., Claesson, M. J., & Cotter, P. D. (2016). Microbial succession and flavor production in the fermented dairy beverage kefir. *Msystems*, 1(5), e00052-16

[43] 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*(1), 43-53

[44] Zanirati, D. F., Abatemarco Jr, M., de Cicco Sandes, S. H., Nicoli, J. R., Nunes, Á. C., & Neumann, E. (2015). Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. Anaerobe, 32, 70-76

[45] John, S.M., & Deeseenthum, S. (2015) Properties and benefits of kefir] A review. *Songklanakarin journal of science and technol*ogy 37(3), 275-282

[46] Bourrie, B.C.T., Willing, B.P. & Cotter, P.D. (2016) The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. *Frontiers in microbiology* **7**, 647. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00647

[47] Sharifi, M., Moridnia, A., Mortazavi, D., Salehi, M., Bagheri, M., & Sheikhi, A. (2017) Kefir: a powerful probiotic with anticancer properties. *Medical Oncology* 34(11), 183

[48] Hugo, A. A., Kakisu, E., De Antoni, G. L., & Pérez, P. F. (2008). Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic Escherichia coli in vitro. *Letters in applied microbiology*, *46*(6), 613-619

[49] Kakisu, E., Abraham, A.G., Tironi Farinati, C., Ibarra, C., & De Antoni, G.L. (2013) *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir protects vero cells from cytotoxicity by type-II shiga toxin from *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of dairy research* 80, 64–71

[50] Bolla, P.A.; Abraham, A.G.; Perez, P.F., & Serradell, MA. (2016) Kefir-isolated bacteria and yeasts inhibit *Shigella flexneri* invasion and modulate pro-inflammatory response on intestinal epithelial cells. *Beneficial microbes*. 7, 103–110

[51] Golowczyc, M.A., Mobili, P., Garrote G.L., Abraham, A.G., & De Antoni, G.L. (2007) Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International journal of food microbiology* 118, 264–273

[52] Romanin, D., Serradell, M., Maciel, D.G., Lausada, N., Garrote, G.L., & Rumbo, M. (2010) Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. *International journal of food microbiology* 140(2-3), 102-108

[53] Romanin, D.E., Llopis, S., Genovés, S., Martorell, P., Ramón, V.D., Garrote, G.L., & Rumbo, M. (2016) Probiotic yeast *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 shows anti-inflammatory and anti-oxidative stress properties in *in vivo* models. *Beneficial microbes* 7(1), 83-93

[54] Cho, Y.J., Kim, D.H., Jeong, D., Seo, K.H., Jeong, H.S., Lee, H.G., & Kim, H. (2018) Characterization of yeasts isolated from kefir as a probiotic and its synergic interaction with the wine byproduct grape seed flour/extract. *LWT-food Science and technology* 90, 535–539

[55] de Lima, M.D.S.F., de Souza, K.M.S., Albuquerque, W.W.C., Teixeira, J.A.C., Cavalcanti, M.T.H., & Porto, A.L.F. (2017) *Saccharomyces cerevisiae* from Brazilian kefir-fermented milk: An *in vitro* evaluation of probiotic properties. *Microbial pathog*ens110, 670-677

[56] Bolla, P.A., Carasi, P., De Antoni, G.L., & Serradell, M.A (2013) Protective effect of a mixture of kefir-isolated lactic acid bacteria and yeasts in a hamster model of *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe* 21, 28-33

[57] Londero, A., Iraporda, C., Garrote, G.L., & Abraham, A.G. (2015) Cheese whey fermented with kefir micro-organisms: Antagonism against *Salmonella* and immunomodulatory capacity. *International journal of dairy technology* 68(1), 118-126

[58] Slattery, C., Cotter, P. D., & W O'Toole, P. (2019). Analysis of health benefits conferred by Lactobacillus Species from Kefir. *Nutrients*, 11(6), 1252

[59] Garrote, G.L., Abraham, A.G., & De Antoni, G.L. (2000) Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *Journal of food protec*tion 63(3), 364-369

[60] Iraporda, C., Júnior, M. A., Neumann, E., Nunes, Á. C., Nicoli, J.R., Abraham, A.G., & Garrote, G.L. (2017) Biological activity of the non-microbial fraction of kefir: antagonism against intestinal pathogens. *Journal of dairy research* 84(3), 339-345

[61] Powell, J. E., Witthuhn, R. C., Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2007). Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *International dairy journal*, 17(3), 190-198

[62] Magalhães, K.T., Dragone, G., de Melo Pereira, G.V., Oliveira, J.M., Domingues, L., Teixeira, J.A., Almeida e Silva J.B., & Schwan, R.F. (2011) Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. *Food chemistry* 126(1), 249-253

[63] Iraporda, C., Romanin, D.E., Rumbo, M., Garrote, G.L., and Abraham, A.G. (2014) The role of lactate on the immunomodulatory properties of the nonbacterial fraction of kefir. *Food research international* 62, 247-253

[64] Golowczyc, M.A., Gugliada, M.J., Hollmann, A., Delfederico, L., Garrote G.L., Abraham, A.G., Semorile, L., & De Antoni, G. (2008) Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: potential use as probiotic. *Journal of dairy research* 75, 211–217

[65] de Moreno de LeBlanc, A., Matar, C., Farnworth, E., & Perdigon, G. (2006) Study of cytokines involved in the prevention of a murine experimental breast cancer by kefir. *Cytokine* 34(1-2), 1-8.

[66] Iraporda, C., Errea, A., Romanin, D.E., Cayet, D., Pereyra, E., Pignataro, O., Sirard, J.C., Garrote, G.L., Abraham, A.G., & Rumbo, M. (2015) Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells. *Immunobiology* 220(10), 1161-1169

[67] Iraporda, C., Romanin, D.E., Bengoa, A.A., Errea, A.J., Cayet, D., Foligné, B., Sirard, J.C., Garrote, G.L., Abraham, A.G., & Rumbo, M. (2016) Local treatment with lactate prevents intestinal inflammation in the TNBS-induced colitis model. *Frontiers in immunology* 7, 651

[68] Bengoa, A.A., Zavala, L., Carasi, P., Trejo, S.A., Bronsoms, S., Serradell, M.A, Garrote, G.L., & Abraham, A.G. (2018b) Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. *Food research international* 103, 462-467

[69] Kim, D.H., Kim, H., Jeong, D., Kang, I.B., Chon, J.W., Kim, H.S. & Seo, K.H. (2017) Kefir alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut microbiota and mycobiota: targeted and untargeted community analysis with correlation of biomarkers. *Journal of nutritional biochemistry* 44, 35-43

[70] Kim, D.H., Jeong, D., Song, K.Y., Kang, I.B., Kim, H., & Seo, K.H. (2018) Culture supernatant produced by *Lactobacillus kefiri* from kefir inhibits the growth of *Cronobacter sakazakii*. *Journal of dairy research* 85(1), 98-103

[71] Bellikci-Koyu, E., Sarer-Yurekli, B. P., Akyon, Y., Aydin-Kose, F., Karagozlu, C., Ozgen, A. G., Brinkmann A., Nitsche A., Ergunay K., Yilmaz E., & Buyuktuncer, Z. (2019). Effects of Regular

Kefir Consumption on Gut Microbiota in Patients with Metabolic Syndrome: A Parallel-Group, Randomized, Controlled Study. *Nutrients*, 11(9), 2089

[72] Rimada, P.S., & Abraham, A.G. (2003) Comparative study of different methodologies to determine the exopolysaccharide produced by kefir grains in milk and whey. *Le Lait* 83(1), 79-87

[73] Zajsek, K., Kolar, M., & Gorsek, A. (2011) Characterisation of the exopolysaccharide kefiran produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains. *International journal of dairy technology* 64(4), 544-548

[74] Abraham, A.G, Medrano, M., Piermaria, J.A, & Mozzi, F. (2010) Novel Applications of Polysaccharides from Lactic Acid Bacteria: A Focus on Kefiran. In: Food Hydrocolloids: Characteristics, Properties and Structures. Ed Cllarence S. Holllingworth. 253-271 of 323 ISBN: 978-1-60876-222-4. Nova Science Publishers. Hauppauge NY. USA

[75] Piermaria, J., Diosma, G., Aquino, C., Garrote, G.L., & Abraham, A.G. (2015) Edible kefiran films as vehicle for probiotic microorganisms. *Innovative food science and emerging technologies* 32, 193-199

[76] Rodrigues, K.L., Caputo, L.R., Carvalho, J.C., Evangelista, J., & Schneedorf, J.M. (2005) Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. *International journal of antimicrobial agents* 25, 404-408

[77] Vinderola, G., Perdigón, G., Duarte, J., Farnworth, E., & Matar, C. (2006) Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine* 36(5-6), 254-260

[78] Kwon, O.K., Ahn, K.S., Lee, M.Y., Kim, S.Y., Park, B.Y., Kim, M.K., Lee I.Y., Oh, S.R., & Lee, H.K. (2008) Inhibitory effect of kefiran on ovalbumin-induced lung inflammation in a murine model of asthma. *Archives of pharmacal research* 31(12), 1590-1596

[79] Hamet, M.F., Medrano, M., Pérez, P.F., & Abraham, A.G. (2016). Oral administration of kefiran exerts a bifidogenic effect on BALB/c mice intestinal microbiota. *Beneficial microbes*, 7(2), 237-246

[80] Medrano, M., Racedo, S.M., Rolny, I.S., Abraham, A.G., & Pérez, P.F. (2011) Oral administration of kefiran induces changes in the balance of immune cells in a murine model. *Journal of agricultural and food chemistry* 59(10), 5299-5304

[81] Medrano, M., Pérez, P.F., & Abraham, A.G. (2008) Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *International journal of food microbiology* 122, 1-7

[82] Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S., & Kitamura, S. (2004). Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. *Biofactors*, *22*(1-4), 197-200.

[83] Hamet, M. F., Londero, A., Medrano, M., Vercammen, E., Van Hoorde, K., Garrote, G. L., Huys, G., Vandamme, P., & Abraham, A. G. (2013). Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefiranofaciens* in microbial consortia present in kefir grains. *Food microbiology*, 36(2), 327-334

[84] Jeong, D., Kim, D.H., Kang, I.B., Kim, H., Song, K.Y., Kim, H.S., & Seo, K.H. (2017) Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 isolated from kefir. *Food control* 78, 436-442

[85] de Paiva, I.M., da Silva Steinberg, R., Lula, I.S., de Souza-Fagundes, E.M., de Oliveira Mendes, T., Bell, M.J.V., Nicoli, J.R., Cantini Nunes, A., & Neumann, E. (2016) *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Lactobacillus satsumensis* isolated from Brazilian kefir grains produce alpha-glucans that are potentially suitable for food applications. *LWT-food science and technology* 72, 390-398

[86] Hamet, M.F., Piermaria, J.A., & Abraham, A.G. (2015) Selection of EPS-producing Lactobacillus strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks. *LWT] food science and technology* 63(1), 129-135

[87] Gangoiti, M.V., Puertas, A.I., Hamet, M.F., Peruzzo, P.J., Llamas, M.G., Medrano, M., Prieto, A., Dueñas, M.T., & Abraham, A.G. (2017) *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327: An α-glucan producing-strain isolated from kefir grains. *Carbohydrate polymers* 170, 52-59

[88] Bengoa, A.A., Llamas, M.G., Iraporda, C., Dueñas, M.T., Abraham, A.G., & Garrote, G.L. (2018a) Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains. *Food microbiology* 69, 212-218

[89] Zavala, L., Golowczyc, M.A., Van Hoorde, K., Medrano, M., Huys, G., Vandamme, P., & Abraham, A.G. (2016) Selected *Lactobacillus* strains isolated from sugary and milk kefir reduce *Salmonella* infection of epithelial cells *in vitro*. *Beneficial microbes* 7(4), 585-595

[90] Di, W., Zhang, L., Wang, S., Yi, H., Han, X., Fan, R., & Zhang, Y. (2017) Physicochemical characterization and antitumour activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus casei* SB27 from yak milk. *Carbohydrate polymers* 171, 307-315

[91] Dallas, D.C., Citerne, F., Tian, T., Silva, V.L., Kalanetra, K.M., Frese, S.A., Robinson, R.C., Mills, D.A., & Barile, D. (2016) Peptidomic analysis reveals proteolytic activity of kefir microorganisms on bovine milk proteins. *Food chemitry* 197, 273-284

[92] Tung, Y.T., Chen, H.L., Wu, H.S., Ho, M.H., Chong, K.Y., & Chen, C.M. (2018) Kefir Peptides Prevent Hyperlipidemia and Obesity in High-Fat-Diet-Induced Obese Rats via Lipid Metabolism Modulation. *Molecular nutrition & food research* 62(3), 1700505

[93] Santanna, A.F., Filete, P.F., Lima, E.M., Porto, M.L., Meyrelles, S.S., Vasquez, E.C., Endringer, D. C., Lenz, D., Abdalla, D.S.P., Pereira, T.M.C.,.& Andrade, T.U. (2017) Chronic administration

of the soluble, nonbacterial fraction of kefir attenuates lipid deposition in LDLr–/– mice. *Nutrition* 35, 100-105

[94] Brasil, G. A., de Almeida Silva-Cutini, M., Moraes, F.D.S.A., Pereira, T.D.M.C., Vasquez, E.C., Lenz, D., Souza Bissoli, N., Coutinho, D., de Lima, E.M., Campana Biancardi, V., Ferreira Maia, J., Maia, J.F., & Uggere de Andrade, T. (2018) The benefits of soluble non-bacterial fraction of kefir on blood pressure and cardiac hypertrophy in hypertensive rats are mediated by an increase in baroreflex sensitivity and decrease in angiotensin-converting enzyme activity. *Nutrition* 51, 66-72

[95] Fiorda, F. A., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S. K., Pagnoncelli, M. G. B., de Souza Vandenberghe, L. P., & Soccol, C. R. (2017). Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation-A review. *Food microbiology*, *66*, 86-95.

[96] Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2013). Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. *FEMS microbiology letters*, *348*(1), 79-85

[97] Stadie, J., Gulitz, A., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2013). Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food microbiology*, 35(2), 92-98.

[98] Pidoux, M. (1989). The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology*, *5*(2), 223-238.

[99] Laureys, D., & De Vuyst, L. (2014). Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Applied environmental microbiology*, 80(8), 2564-2572

[100] Pidoux, M., De Ruiter, G. A., Brooker, B. E., Colquhoun, I. J., & Morris, V. J. (1990). Microscopic and chemical studies of a gelling polysaccharide from *Lactobacillus hilgardii*. *Carbohydrate polymers*, *13*(4), 351-362.

[101] Pidoux, M., Brillouet, J. M., & Quemener, B. (1988). Characterization of the polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. *Biotechnology letters*, 10, 415–420.

[102] Verce, M., De Vuyst, L., & Weckx, S. (2019). Shotgun Metagenomics of a Water Kefir Fermentation Ecosystem Reveals a Novel *Oenococcus* Species. *Frontiers in microbiology*, *10*, 479.

[103] Laureys, D., Van Jean, A., Dumont, J., & De Vuyst, L. (2017). Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process. *Applied microbiology and biotechnology*, *101*(7), 2811-2819.

[104] Waldherr, F. W., Doll, V. M., Meißner, D., & Vogel, R. F. (2010). Identification and

characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. *Food microbiology*, *27*(5), 672-67

[105] Fels, L., Jakob, F., Vogel, R. F., & Wefers, D. (2018). Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydrate polymers*, *189*, 296-303.

[106] Miguel, M.G.C.P., Cardoso, P.G., Magalhaes, K.T., & Schwan, R.F. (2011). Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian states. *World journal of microbiology and biotechnology*. 27, 1875e1884.

[107] Ward H.M. (1892) The ginger-beer plant, and the organisms composing it: a contribution to the study of fermentation-yeasts and bacteria. *Philosophical transactions of the Royal Society London* B 183: 125–197.

[108] Lutz, ML., (1899) Recherches biologiques sur la constitution du Tibi. *Bulletin de la Societe Mycologique de France* 15: 68–72.

[109] Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2011). The microbial diversity of water kefir. *International journal of food microbiology*, *151*(3), 284-288.

[110] Laureys, D., Aerts, M., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2018). Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. *Food microbiology*, *73*, 351-361

[111] Laureys D, Aerts M, Vandamme P & De Vuyst L (2019). The Buffer Capacity and Calcium Concentration of Water Influence the Microbial Species Diversity, Grain Growth, and Metabolite Production During Water Kefir Fermentation. *Frontiers in microbiology*. 10:2876. doi: 10.3389/fmicb.2019.02876

[112] Leroi, F., & Pidoux, M. (1993). Characterization of interactions between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. *Journal of applied bacteriology*, *74*(1), 54] 60.

[113] Leroi, F., & Pidoux, M. (1993). Detection of interactions between yeasts and lactic acid bacteria isolated from sugary kefir grains. *Journal of applied bacteriology*, *74*(1), 48-53.

[114] Laureys, D., Cnockaert, M., De Vuyst, L., & Vandamme, P. (2016). Bifidobacterium aquikefiri sp. nov., isolated from water kefir *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *66*(3), 1281-1286.

[115] Xu, D., Bechtner, J., Behr, J., Eisenbach, L., Geißler, A. J., & Vogel, R. F. (2019). Lifestyle of *Lactobacillus hordei* isolated from water kefir based on genomic, proteomic and physiological characterization. *International journal of food microbiology*, 290, 141-149

[116] Alsayadi, M., Al Jawfi, Y., Belarbi, M., & Sabri, F. Z. (2013). Antioxidant potency of water kefir. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, *2*(6), 2444.

[117] Diniz, R.O., Garla, L.K., Carvalho, J.C.T., & Schneedorf, J.M., (2003). Study of

antiinflammatory activity of tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix. *Pharmacology research*. 47,49e52

[118] Rodrigues, K.L., Araújo, T.H., Schneedorf, J.M., Ferreira, C.S., Moraes, G.O.I., Coimbra, R.S., & Rodrigues, M.R., 2016. A novel beer fermented by kefir enhances anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents. *Journal of functional foods* 21, 58e69.

[119] Abetamarco J.M., Sandes, S. H. C., Ricci, M. F., Arantes, R. M. E., Nunes, Á. C., Nicoli, J. R., & Neumann, E. (2018). Protective effect of *Lactobacillus diolivorans* 1Z, isolated from Brazilian kefir, against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in experimental murine models. *Frontiers in microbiology*, *9*.

[120] Chen, Y. T., Lin, Y. C., Lin, J. S., Yang, N. S., & Chen, M. J. (2018). Sugary Kefir Strain Lactobacillus *mali* APS1 Ameliorated Hepatic Steatosis by Regulation of SIRT-1/Nrf-2 and Gut Microbiota in Rats. *Molecular nutrition & food research*, *62*(8), 1700903

[121] Liu, C. H., Hsu, W. H., Lee, F. L., & Liao, C. C. (1996). The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. *Food microbiology*, 13(6), 407-415.

[122] Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food microbiology*, *38*, 171-178.

[123] Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., & Taillandier, P. (2018). Understanding kombucha tea fermentation: A review. *Journal of food science*, *83*(3), 580-588.

[124] Chen, C., & Liu, B. Y. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of applied microbiology*, *89*(5), 834-839.

[125] Reva, O. N., Zaets, I. E., Ovcharenko, L. P., Kukharenko, O. E., Shpylova, S. P., Podolich, O. V., .de Vera J.P.. & Kozyrovska, N. O. (2015). Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in different microenvironments. *AMB Express*, *5*(1), 35.

[126] Nguyen, V. T., Flanagan, B., Gidley, M. J., & Dykes, G. A. (2008). Characterization of cellulose production by a Gluconacetobacter xylinus strain from Kombucha. *Current Microbiology*, *57*(5), 449.

[127] Dufresne, C., & Farnworth, E. (2000). Tea, Kombucha, and health: a review. *Food research international*, *33*(6), 409-421.

[128] Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., & Gachhui, R. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, *220*, 63-72

[129] Kaewkod, T., Bovonsombut, S., & Tragoolpua, Y. (2019). Efficacy of Kombucha Obtained

from Green, Oolong, and Black Teas on Inhibition of Pathogenic Bacteria, Antioxidation, and Toxicity on Colorectal Cancer Cell Line. *Microorganisms*, *7*(12), 700.

[130] Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., & Sathishkumar, M. (2014). A review on kombucha tea—microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *13*(4), 538-550.

[131] Ayed, L., Abid, S. B., & Hamdi, M. (2017). Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. *Annals of microbiology*, *67*(1), 111-121.

[132] Kapp, J. M., & Sumner, W. (2019). Kombucha: A systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Annals of epidemiology*, *30*, 66-70.

[133] Watawana, M. I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C. B., & Waisundara, V. Y. (2015). Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. *Journal of chemistry*, *2015 1-11*.

[134] Kozyrovska et al., 2012 Kozyrovska, N. O., Reva, O. M., Goginyan, V. B., & De Vera, J. P. (2012). Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology. *Biopolymers and Cell*.28:103–110

7

Embutidos fermentados cárnicos: contribución de bacterias lácticas en la calidad global

Silvina Fadda
sfaddda@cerela.org.ar

- *Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA -CONICET) Chacabuco 145, 4000 San Miguel de Tucumán, Argentina*

Constanza López

- *Centro Ricerche Biotecnologiche, Università Cattolica del Sacro Cuore, Via Milano 24, 26100 Cremona, Italy*

Graciela Vignolo

- *Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA -CONICET) Chacabuco 145, 4000 San Miguel de Tucumán, Argentina*

Resumen

Los productos cárnicos fermentados y curados forman parte de la alimentación desde tiempos remotos. Estos alimentos poseen propiedades organolépticas únicas y su popularidad es debida, además, a sus cualidades nutricionales y económicas. Por otra parte, forman parte del acervo cultural de los pueblos que los consumen de forma habitual. Existe una amplia variedad según países y regiones e incluso los hay con propiedades singulares, como los elaborados con especies de animales exóticos, que los posicionan como exquisiteces dirigidas a un público selecto. Los embutidos fermentados poseen una microbiota particular, y por su concentración y variedad son una importante reserva de biodiversidad, que impacta positivamente en el microbioma intestinal de sus consumidores. Durante la fermentación y maduración se generan barreras específicas que impiden el crecimiento de ciertos microorganismos mientras que la proliferación de bacterias lácticas (BAL) y cocos gram positivos catalasa positivos (CGC) se ve favorecida competitivamente. De hecho, la fermentación de los azúcares presentes y añadidos y la concomitante producción de ácido, ocurre exclusivamente por la actividad fermentadora de la microbiota láctica. Desde hace más de 30 años se aplican cultivos iniciadores comerciales constituidos por BAL y CGC que

garantizan la fermentación y estandarizan la producción. Actualmente se ha propuesto el uso de cultivos iniciadores autóctonos, aislados de la propia matriz a fermentar, por presentar mayor competitividad respecto a sus pares alóctonos y sobre todo por la capacidad de conferir una impronta única a productos con tecnologías y/o regiones específicas. Entonces, el uso de cultivos iniciadores autóctonos otorgará un valor agregado que impactará positivamente en las economías regionales.

Este capítulo introduce al lector en la temática general mediante una amplia descripción de diferentes aspectos relacionados a los embutidos fermentados. Por otro lado, se presenta el trabajo realizado por nuestro grupo sobre la función de las bacterias lácticas en la calidad global (higiénica y organoléptica) de estos alimentos fermentados. Uno de los principales objetivos fue determinar si microorganismos autóctonos adecuadamente seleccionados impactarían positivamente en el producto final. En primer lugar se evaluó, mediante estudios microbiológicos, bioquímicos y organolépticos, la calidad de embutidos fermentados comerciales argentinos a fin de establecer estándares de calidad. A continuación se estudió la proteólisis *in vitro*, una de las transformaciones bioquímicas más importantes que ocurre durante la maduración y que contribuye a la calidad del producto final. En un sistema modelo se pudo establecer la función de un cultivo iniciador autóctono, previamente seleccionado, en la degradación de proteínas cárnicas y discriminar la proteólisis llevada a cabo por las enzimas propias del músculo. Se identificaron las proteínas degradadas y los péptidos asociados al aroma y al sabor que se generan, gracias a tecnología de vanguardia como la peptidómica y la proteómica. Finalmente, se describen los aspectos más tecnológicos relacionados a la calidad de embutidos elaborados con el cultivo autóctono formulado, en planta piloto. En base a los resultados obtenidos se propone que la transferencia de este cultivo iniciador a los productores beneficiará al sector garantizando la fermentación, evitando pérdidas económicas, reduciendo el tiempo de maduración y a la vez otorgando características únicas al producto final, dando origen a un producto fermentado mejorado típico de la región.

I. Introducción

Tradicionalmente el secado, salado y fermentación de la carne fueron estrategias empíricas utilizadas para prolongar la vida útil de esta matriz alimentaria altamente perecedera. Con la aparición de otras tecnologías de conservación, especialmente de la refrigeración, estos métodos fueron dejados de lado para este fin. Sin embargo, los productos fermentados cárnicos continúan siendo muy populares entre los consumidores y son producidos a gran escala especialmente en Europa, donde existe una importante variedad. Su persistencia como parte de la alimentación actual se debe seguramente a sus propiedades organolépticas únicas, a sus cualidades nutricionales y económicas. De hecho, estos productos tienen un fuerte arraigo en el patrimonio cultural de los pueblos que los consumen en forma habitual [1].

Los productos cárnicos fermentados y curados se incluyen dentro del grupo de alimentos listos para el consumo directo sin necesidad de cocción u otro tipo de transformación (Reglamento CE 2073/2005). La estabilidad y el bajo riesgo sanitario de este tipo de productos se basan fundamentalmente en: (1) el descenso de los valores de pH por la fermentación microbiana de los hidratos de carbono; (2) reducción de la actividad de agua (a_w) a causa de los solutos añadidos y de la deshidratación progresiva durante la maduración; (3) la adición de nitratos y nitritos y especias con actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos y alterantes [2].

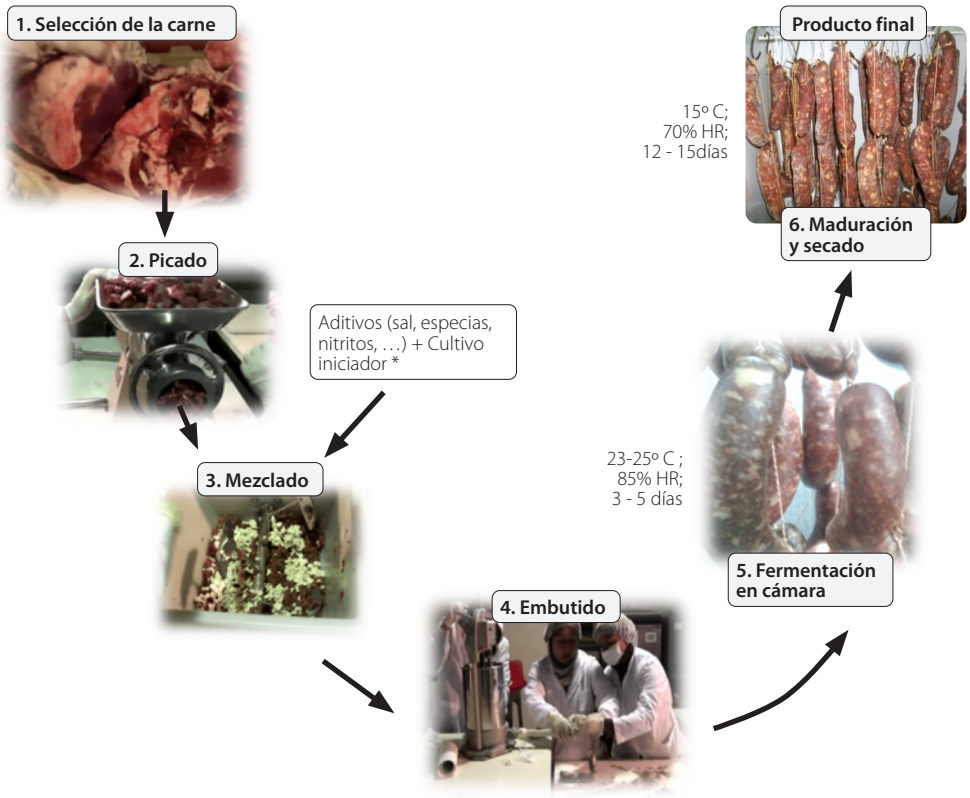
Las características organolépticas (textura, aroma y sabor) únicas de las carnes fermentadas son consecuencia de una serie de transformaciones bioquímicas y fisicoquímicas que ocurren durante la fermentación y la maduración [3]. La producción de ácido que caracteriza a la fermentación es consecuencia del metabolismo de hidratos de carbono por las bacterias ácido lácticas (BAL). El ácido producido reduce el pH, siendo su función principal el aseguramiento de la calidad higiénica, inhibiendo el crecimiento de microorganismos indeseables (patógenos y/o deteriorantes). El ácido producido también contribuye a la textura y sabor característicos de estos productos cárnicos. Por otra parte, se originan transformaciones oxidativas de los ácidos grasos e interacciones entre la mioglobina con el óxido nítrico proveniente de los nitritos y nitratos adicionados, que por acción de la microbiota nitrato-reductora (cocos Gram positivos, catalasa positivos y coagulasa negativos, denominados genéricamente CGC) junto con el ambiente ácido/reductor, intervienen en el desarrollo del color característicos de los embutidos fermentados [4, 5]. Asimismo, la degradación de las proteínas cárnicas es uno de los complejos procesos que ocurren durante la fermentación y maduración, catalizado por enzimas musculares y microbianas cuyos productos de hidrólisis (péptidos de bajo peso molecular y amino ácidos libres) impactarán directa o indirectamente en el "flavor" de estos alimentos, que es la cualidad combinada de sabor, aroma y textura. Como consecuencia, el complejo "*bouquet*" de los embutidos fermentados y curados es una sutil combinación y balance entre compuestos volátiles y no volátiles provenientes de diversos orígenes (músculo, bacterias y sus productos metabólicos, aditivos y especias) [6]. La interacción entre múltiples

factores como tipo de carne, grasa, microorganismos y procesos tecnológicos aplicados generan una amplia variedad de productos fermentados cárnicos en el mundo.

II. Embutidos fermentados y curados

Los embutidos fermentado-curados son productos elaborados con una mezcla de carne y grasa picadas, sal, agentes de curado (nitrato y nitrito), azúcares, especias y aditivos autorizados introducidos en una tripa (natural o artificial) a manera de relleno, luego de lo cual experimentan un proceso de fermentación-maduración acompañado de una etapa de secado y/o de ahumado, según sea la tecnología aplicada. Al finalizar estas etapas, el producto adopta el color rojo típico de curado y simultáneamente se produce la aglutinación de las partículas de carne y tocino, adquiriendo el embutido textura y calidad de corte necesarias. Durante estas etapas se genera aroma y sabor (flavor) y textura típicos de cada embutido (Figura 1) [7].

Figura 1. Esquema general de elaboración de embutidos fermentados y curados.



III. Función de los aditivos en la elaboración de embutidos fermentados

Los diferentes componentes de la mezcla embutida influyen sobre los procesos fisicoquímicos y microbiológicos que ocurren en forma simultánea e interdependiente. La sal (NaCl) actúa como primer obstáculo impidiendo el crecimiento de microorganismos indeseables, provocando un descenso inmediato de la a_w. Además, el NaCl añadido (2-4%), es un componente muy importante desde el punto de vista tecnológico, ya que además de ser potenciador del sabor induce la solubilización y difusión de las proteínas miofibrilares del músculo, englobando a todos los ingredientes en un gel [8]. Los agentes de curado más utilizados son los nitratos/nitritos de sodio y potasio. Cuando los nitratos son reducidos a nitrito por acción de los *CGC*, cumplen un importante rol en la inhibición de *Clostridium* y *Salmonella*, previenen el desarrollo de rancidez y producen el típico aroma y sabor de curado. Por reducción de los nitritos se forma nitroso-mioglobina mediante la inclusión del óxido nítrico (NO) en la molécula de mioglobina, dando lugar a la formación del color rojo típico de los productos cárnicos curados [9]. Los condimentos mejoran, en virtud de su acción sazonante, el aroma y el sabor de los embutidos, satisfaciendo así las distintas preferencias de los consumidores. Su acción como inhibidores de agentes patógenos es secundaria debido a las escasas cantidades que normalmente se utilizan en la elaboración. Los condimentos varían en cada formulación dependiendo en gran medida de las tradiciones y hábitos regionales y/o país, siendo la pimienta el más empleado.

Por otra parte, los diferentes tipos de azúcares, preferentemente glucosa, lactosa, sacarosa o maltosa, adicionados a la formulación como complemento a la baja concentración de glucógeno en la carne, constituyen la fuente de energía utilizada por los microorganismos durante la fermentación para la producción de ácido láctico, con el consiguiente descenso del pH de la masa embutida. Otros aditivos usados como adyuvantes de curado son el ácido ascórbico (vitamina C) y su sal sódica ascorbato de sodio adicionado como agente reductor mejorando el proceso de enrojecimiento y el ácido glutámico y/o glutamato sódico usados como exaltadores del sabor.

IV. Tipos de embutidos fermentados

La elaboración y la clasificación de los embutidos varían entre países. La clasificación propuesta por Roca e Incze (1990) [10] considera el tiempo de fermentación y maduración del embutido como un criterio básico y establece dos tipos, los de maduración corta y aquellos de maduración larga. Lücke (2003) [11] propuso una clasificación desde un punto de vista microbiológico, basado en la a_w y en el tratamiento de superficie (con o sin mohos). Otros criterios de clasificación se basan en la acidez, el grado de picado de los ingredientes, adición o no de cultivos iniciadores,

adición de uno u otros ingredientes, especias y condimentos [12] o en la proporción humedad/proteína [13]. Con respecto a la acidez, estos productos fermentados se han clasificado en:

- Embutidos fermentado-curados de baja acidez, productos típicos del área mediterránea europea. El proceso de fabricación de estos productos de baja acidez prescinde de la etapa de fermentación, realizándose una sola etapa de maduración a baja temperatura (<10-12 ºC) con el fin de evitar una intensa y rápida acidificación [14]. Son productos con un pH final entre 5,3-6,2 [15]. El "fuet", de pequeño calibre (<40 mm), es un ejemplo típico de este tipo de producto, típico de Cataluña, muy apreciado por sus características organolépticas.

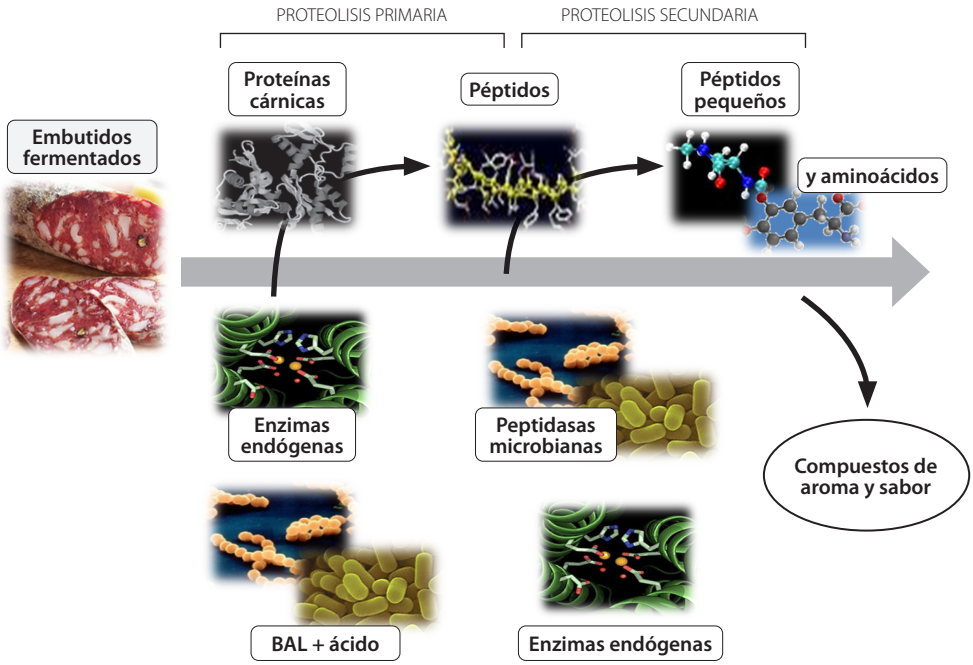
- Embutidos fermentado-curados ácidos (pH final < 5,3), típicos de los países del norte de Europa y de Estados Unidos de América (USA), con la diferencia que los primeros se someten a una temperatura de fermentación media (20-24ºC), mientras que en los segundos se utilizan temperaturas cercanas a 37ºC [16].

V. Maduración de embutidos fermentados; importancia de la proteólisis cárnica

Como se mencionó anteriormente, las características organolépticas (textura, aroma y sabor) únicas de los embutidos fermentados son consecuencia de una serie de transformaciones que ocurren durante la fermentación y la maduración. El desarrollo de la característica conocida como "flavor" (que es una combinación entre aroma, sabor y textura) de los embutidos fermentados no solo depende de las materias primas y condiciones de procesamiento empleadas sino también de cómo éstos influyen en la composición, dinámica y metabolismo de la microbiota presente en el embutido [15]. En este contexto, la degradación de las proteínas cárnicas es uno de los eventos bioquímicos más importantes que acontecen durante la fermentación y maduración y tiene un alto impacto tecnológico en el desarrollo de textura, aroma y sabor. A diferencia de los productos lácteos, durante la fermentación de la carne ocurre una superposición de la actividad de enzimas propias de la carne y de origen bacteriano [16]. En general, diversos autores concuerdan en la función principal de enzimas propias de la carne en la proteólisis durante los primeros días de fermentación, mientras que las enzimas bacterianas se tornan importantes durante las siguientes etapas de la maduración [6]. Hasta hace unos años, el rol de las enzimas bacterianas en estos eventos no era muy conocido. La participación de las BAL en la degradación de oligopéptidos a péptidos más pequeños y aminoácidos ha sido objeto de numerosos estudios usando sistemas modelos,

como embutidos adicionados de antibióticos o inhibidores de proteasas, así como usando medios cárnicos líquidos [17, 18]. Los péptidos de bajo peso molecular y los amino ácidos libres productos de la hidrólisis contribuyen directa o indirectamente a la generación de compuestos (no volátiles y/o volátiles) relacionados al aroma y sabor (Figura 2). Como consecuencia, el bouquet final de los embutidos fermentados es una sutil combinación y balance entre compuestos volátiles y no volátiles provenientes de diversos orígenes (músculo, bacterias y sus productos metabólicos, aditivos y especias) [6].

Figura 2. Modelo propuesto de proteólisis cárnica durante la fermentación de embutidos.



VI. Microbiota de los embutidos fermentado-curados

La microbiota natural de los embutidos fermentados proviene principalmente de la carne y del medio ambiente; los microorganismos psicrótrofos presentes, son denominados core microbiota (del inglés microbiota central o básica) [19]. Aunque en menor medida, las tripas usadas y las especias adicionadas también contribuyen a la carga microbiana inicial [20]. Al inicio de la fermentación, la microbiota está representada por *BAL* (*Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*) y *CGC*, además de *Pseudomonas* spp., miembros de la familia *Enterobactericeae* y en algunos casos ciertos patógenos como *Escherichia coli, Staphylococcus aureus*

y *Listeria monocytogenes* [21]. Durante la maduración, la combinación de factores tales como la disminución de la a_w, el desarrollo de acidez, la presencia de compuestos antimicrobianos así como la competencia entre los microorganismos presentes, constituyen barreras para ciertos microorganismos, mientras que otros resultan favorecidos. En este contexto, adquieren mayor relevancia las *BAL*, en particular los géneros *Lactobacillus, Pediococcus* y *Enterococcus;* los *CGC* principalmente, *Staphylococcus* y *Kocuria*; y en menor medida hongos y levaduras. Los microorganismos presentes al final de la maduración derivan también del ambiente de procesamiento los que son conocidos como house microbiota (del inglés, microbiota de casa); esas cepas están bien adaptadas y por lo tanto son capaces de dominar la fermentación de estos productos [22]. Tal como se discute en otros capítulos de este libro, las carnes y vegetales fermentados así como el yogur, el queso o los encurtidos constituyen una fuente importantísima de bacterias viables, seguras y funcionales que pueden contribuir a la homeostasis del microbioma intestinal. En efecto, existe información sobre la presencia de microorganismos provenientes de alimentos fermentados en el tracto gastrointestinal (*GI*) y evidencias del impacto positivo en la salud de estos consumidores [23, 24].

VI.A. Bacterias lácticas en embutidos fermentados espontáneamente

La presencia de determinantes ecológicos tales como la presencia de NaCl, nitrato/nitrito, azúcares, a_w (0,85 - 0,92), temperatura (24 - 30 ºC hasta 12 - 18 ºC) así como la existencia de gradientes de oxígeno durante la maduración, son responsables de la selección de la microbiota capaz de crecer en este particular nicho cárnico. En general, en embutidos fermentados tradicionales, los microorganismos frecuentemente identificados y adaptados a las rigurosas condiciones imperantes son *Lactobacillus (L.) sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *Enterococcus* y *Pediococcus*. La prevalencia de *L. sakei* y *L. curvatus* ha sido ampliamente informada [25, 26, 27, 28] considerándose ambas especies como parte de la "*core microbiota*" funcional de estos productos [29].

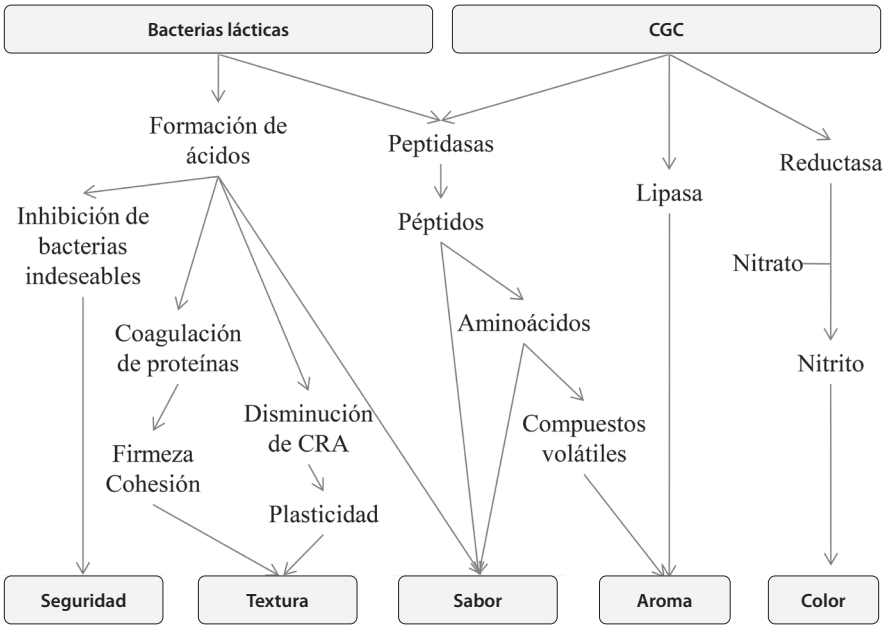
Las BAL son microorganismos fermentativos cuyo producto principal es el ácido láctico, responsable del descenso de pH durante la fermentación de la carne implicando diversos efectos beneficiosos, tales como: i) inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos y causantes de alteraciones; ii) desnaturalización de las proteínas, permitiendo la coagulación proteica con el consecuente desarrollo de la textura características y reducción de la capacidad de retención de agua por parte de las proteínas cárnicas, hecho que acelera el proceso de secado; iii) inducción de las reacciones de reducción de nitratos y nitritos, promoviendo la formación del color típico de producto curado; y iv) modulación de las reacciones enzimáticas que contribuyen al desarrollo del aroma y sabor [7].

VI.B. Cocos Gram positivos, catalasa positivos, en embutidos fermentados espontáneamente

Los microorganismos responsables de las reacciones de reducción de nitratos, que conducen a la formación del rojo típico de curado en los embutidos fermentados pertenecen al género *Staphylococcus* (coagulasa negativos) siendo los más frecuentemente identificados *Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus*, *S. saprophyticus* y *S. equorum*. Entre ellas, *S. xylosus* y *S. carnosus* demostraron ser altamente competitivos durante la fermentación de embutidos sobreviviendo a condiciones de estrés tales como elevadas concentraciones de NaCl y bajas temperaturas. Se conoce también que los *Staphylococcus* contribuyen al sabor de productos cárnicos fermentados mediante sus actividades lipolítica y proteolítica [30]. Entre los compuestos volátiles producidos por *S. xylosus* y *S. carnosus,* los catabolitos generados por la degradación de aminoácidos y metil-cetonas producidas por la β-oxidación incompleta de ácidos grasos, son los más relevantes [31].

En la Figura 3 se esquematizan las principales actividades de la microbiota láctica y *CGC* durante la maduración de embutidos fermentados cárnicos.

Figura 3. Principales actividades de la microbiota láctica y CGC durante la maduración de embutidos fermentados cárnicos.



En la figura se muestran los cambios producidos por Bacterias lácticas (BAL) y Cocos Gram positivos Catalasa positivos (CGC) durante la fermentación y maduración y su relación con las características que describen la calidad de embutidos fermentados.

VII. Cultivos iniciadores para productos cárnicos

Los cultivos iniciadores para productos cárnicos fermentados pueden definirse como preparaciones que contienen microorganismos activos o "*dormant*" (término francés que refiere a microorganismos en estado vegetativo o inactivos temporalmente) que desarrollan una deseada actividad metabólica en la carne[32]. Estos cultivos son utilizados para mejorar la calidad y seguridad, así como para estandarizar el proceso de producción de estos alimentos [33].

El primer cultivo cárnico iniciador en Europa –un cultivo de *Micrococcaceae* puro utilizado para el desarrollo de sabor y color–, comenzó a ser comercializado en 1961 por la compañía alemana Rudolph Müller. Unos años después, los cultivos cárnicos iniciadores se desarrollaron como cultivos mixtos, compuestos por BAL y CGC. En nuestro país existen empresas proveedoras de cultivos iniciadores y/o bioprotectores conteniendo diferentes combinaciones de estos microorganismos.

VII.A. Propiedades de los cultivos iniciadores

Las propiedades tecnológicas tradicionalmente esperadas de un cultivo iniciador son:

- Competitividad. Es la capacidad para colonizar el ambiente y dominar la microbiota nativa en las condiciones generadas durante la maduración y el secado.

- Producción de ácido. El desarrollo de acidez es fundamental durante el proceso, siendo imprescindible para la seguridad y estabilidad del producto[34]. La selección del cultivo iniciador en base a su capacidad acidificante depende de las propiedades organolépticas requeridas o deseadas.

- Producción de catalasa. Tiene por objeto inactivar el peróxido de hidrógeno formado por oxidación de lactato producido por las BAL. Este compuesto oxidante altera las propiedades organolépticas de los embutidos induciendo rancidez y decoloración del producto final[35].

- Reducción de nitratos. Los CGC presentes llevan a cabo la reducción de estas sales. Mediante estos microorganismos es posible reducir y optimizar los niveles de nitrato agregados, cuya adición es controvertida por la probable formación de nitrosaminas carcinogénicas. No obstante, los nitritos y sus derivados actúan como antioxidantes y previenen la oxidación de lípidos y el desarrollo de olores rancios.

Recientemente y en respuesta a las demandas de los consumidores, la selección de cepas requiere de otras propiedades además de las tradicionales. Estos cultivos que cumplen con una o más funciones específicas son denominados "cultivos funcionales" ya que ofrecen un beneficio adicional además de la conducción de la fermentación promoviendo la producción de embutidos fermentados con acentuadas características organolépticas y nutricionales así como más saludables y seguros [36], por ejemplo:

- Producción de compuestos de aroma y sabor. Si bien el aroma y sabor de los embutidos fermentados está altamente influenciado por las materias primas y las condiciones de manufactura, la elección de cepas productoras de compuestos de aroma (compuestos volátiles) y sabor (como péptidos y aminoácidos) conducirá a productos con atributos organolépticos más acentuados y diferenciales.

- Producción de compuestos antimicrobianos. Las cepas con actividad antagónica capaces de inhibir patógenos y/o extender la vida de estante con menores cambios en las propiedades organolépticas fueron definidas como "cultivos bioprotectores" [34]. En este sentido, cobran relevancia las BAL con capacidad bacteriocinogénica. Las bacteriocinas se definen como compuestos inhibitorios de naturaleza proteica, hidrofóbicos, catiónicos con actividad antibacteriana frente a bacterias filogenéticamente relacionadas[37]. Debido a la naturaleza peptídica de las bacteriocinas resultan seguras ya que son digeridas por las proteasas del tracto gastrointestinal y no producen defectos en el sabor [38]. Algunas de las cepas de BAL aisladas de embutidos fermentados producen bacteriocinas activas contra *L. monocytogenes* y *S. aureus*, entre otras [39].

VII.B. Cultivos iniciadores autóctonos

Diversos autores apoyan la hipótesis de la falta de competitividad de cultivos iniciadores comerciales producidos en el norte de Europa por su eventual incapacidad de competir con la microbiota nativa de otras regiones del planeta, debido a las diferentes condiciones ambientales y/o tecnología de fermentación aplicada. Además, el uso de cultivos alóctonos tiende a generar productos con gran homogeneidad, lo que pone en riesgo las características propias de los productos tradicionales de una determinada región o con una determinada tecnología [22].

Sin embargo, las prácticas tradicionales, sin el uso de cultivos iniciadores, conducen a una gran variabilidad en la calidad de los productos y las esporádicas deficiencias higiénicas ocasionan pérdidas económicas que pueden minar la confianza de los consumidores por los productos artesanales. Por esta razón, el desarrollo de cultivos iniciadores formulados con cepas seleccionadas a partir de comunidades

microbianas naturalmente presentes en embutidos tradicionales, evitaría o limitaría la variabilidad en la producción. Más aún, el desarrollo de cultivos "*starters*" (del inglés, iniciadores) autóctonos podría diversificar el mercado generando productos típicos y distintivos de cada región con combinaciones de aroma y sabor específicos [22]. En base a ello, la formulación de un cultivo iniciador que promueva la calidad higiénica y contribuya a mejorar las características organolépticas de los productos tradicionales constituye un gran desafío.

En este sentido, la vasta cantidad de embutidos fermentados tradicionales de diferentes orígenes constituye una importante reserva de biodiversidad que puede ser explotada para diseñar cultivos con características propias de cada tecnología y/o región. En efecto, existen recientes intentos como la formulación de cultivos iniciadores autóctonos compuestos por *P. acidilactici* / *S. vitulinus* para la elaboración de embutidos fermentados ibéricos [40], así como para embutidos regionales a base de carne caprina de Santiago del Estero (Argentina) constituido por *L. sakei* y *S. xylosus* [41]. Asimismo, en el presente capítulo se describirán las propiedades y beneficios de un *starter* constituido por cepas autóctonas aisladas de embutidos argentinos (*L. curvatus* CRL705 y *S. vitulinus* GV318) formulado y estudiado por nuestro grupo de trabajo [42, 43, 44].

VII.B.1. *Lactobacillus curvatus* CRL705, una cepa autóctona argentina

El aislamiento y caracterización de BAL provenientes de embutidos fermentados artesanales argentinos y la evaluación de las propiedades tecnológicas y biopreservantes *in vitro* y en sistemas cárnicos modelos permitió la selección de *L. curvatus* CRL705. La secuenciación del genoma de este microorganismo demostró la presencia de genes codificantes para cinco bacteriocinas [45]. Entre las sustancias inhibitorias fueron caracterizadas **lactocina 705** (clase IIb) activa frente a contaminantes encontrados en carne (*Brochothrix thermosphacta*) y *S. aureus,* así como **lactocina AL705** (clase IIa) con efecto antilisteria [39].

Por otra parte, se evaluó la capacidad de *L. curvatus* CRL705 para degradar proteínas de la carne tanto en sistemas experimentales como en carne fresca envasada bajo vacío [6, 46] así como la influencia de los aditivos de curado en la producción de bacteriocinas y en la actividad proteolítica de *L. curvatus* CRL705 [47, 48]. El efecto de las sales de curado, en particular nitrito mostró una reducción del efecto antimicrobiano frente a *Listeria*. Sin embargo, se determinó un marcado incremento en la producción de péptidos y aminoácidos relacionados al sabor, sugiriendo que estos metabolitos influirían en la calidad del producto final. El conjunto de los conocimientos adquiridos sobre *L. curvatus* CRL705 impulsó el desarrollo de un cultivo iniciador autóctono y el análisis de su acción en aspectos tecnológicos (calidad global de embutidos fermentados regionales producidos con el cultivo iniciador) y fundamentales en la proteólisis cárnica, que serán discutidos en este capítulo.

VIII. Carnes fermentadas en América Latina

La carne de cerdo y la bovina son las que se utilizan más comúnmente en la fabricación de los embutidos fermentados. Sin embargo, en algunos países del Cono Sur también se utilizan otras especies como carne de cordero o cabra. Por ejemplo, en el nordeste de Brasil la producción de carne de cabra representa una economía importante. Los mejores cortes son vendidos a altos precios, mientras que lo restante con menor valor comercial se destina a la producción de embutidos fermentados [49, 50]. De manera similar, en el Centro y Norte de Argentina esta actividad se desarrolla por pequeños productores locales [41]. Por otra parte, en las altas cumbres andinas de Argentina, Chile y Bolivia el consumo y producción de carne de llama y guanaco ha sido una actividad habitual. Debido a la buena calidad nutricional de esta carne, actualmente su consumo trasciende los límites regionales [51, 52]. En este sentido la producción de embutidos fermentados con carne de llama está en expansión contribuyendo al desarrollo de estas economías regionales [26].

En cuanto al tipo de productos cárnicos producidos, en América del Sur y Central se aplican mayormente las clasificaciones europeas con pequeñas diferencias entre países. Por ejemplo en Argentina se producen más de 50 tipos de productos cárnicos procesados y se agrupan en dos categorías principales: chacinados (elaborados con carne picada) y salazones (con piezas enteras saladas) (Cámara Argentina de la Industria del Chacinado y Afines, CAICHA, http://www.caicha.org.ar).

IX. Situación del sector productor de embutidos en Argentina

La mayor parte de la producción ganadera nacional se ubica geográficamente en la región Pampeana [53]. En coincidencia con este hecho, el sector industrial de chacinados cuenta con aproximadamente 340 fábricas habilitadas, radicadas con una alta concentración en la zona centro del país incluyendo las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba (90,5%), la zona del Nordeste (2,1%), Noroeste (1,22%), Oeste (3,55%) y Sur (2,66%) de acuerdo a los registros de RUCA (Registro Único de operadores de la Cadena Agroalimentaria). Un 95% del universo industrial responde a la categoría de PyME mientras que el resto lo constituyen grandes industrias. Una característica del sector reside en que las empresas son elaboradoras multiproducto. La industria chacinera argentina, por la calidad de los insumos que utiliza (carnes porcinas y vacunas) y por la calidad de los productos que con ellos elabora, podría competir en el mercado internacional ya que la capacidad productiva instalada se encuentra en condiciones para realizar exportaciones. No obstante, diversos factores, como por ejemplo la elevada variabilidad en la calidad de los productos obtenidos, en particular de embutidos fermentados conspiran con esta posibilidad. En la actualidad el 95% de la producción de chacinados se destina al consumo interno. A partir del año 2016 se incrementaron las importaciones procedentes de la Unión Europea

(EU), principalmente de España e Italia de Jamón Crudo y menor medida de salames (CAICHA, según [54]).

X. Tendencias de consumo de embutidos fermentados

Recientemente ha surgido un renovado interés de los consumidores por alimentos manufacturados con materias primas tradicionales, usando arraigados métodos de producción en ambientes no industriales, caracterizados por producciones en pequeña escala y con un limitado grado de mecanización [1, 55]. La estandarización y homogenización en la producción de alimentos es percibida, actualmente, como un "aburrimiento organoléptico" que además es responsable de la pérdida gradual de la identidad cultural de los pueblos. Por el contrario, los alimentos tradicionales o artesanales son considerados como "productos auténticos", ligados a la historia y/o cultura del territorio y con un menor impacto sobre el medioambiente [56]. En la Unión Europea (UE), la producción y consumo de productos típicos recibió un fuerte impulso con nuevas reglamentaciones tendientes a revitalizar la diversificación de la producción agropecuaria. Entre los productos típicos, los curados y en particular los embutidos fermentados mostraron en la última década una tendencia positiva de consumo exhibiendo una mayor disposición de los consumidores a pagar precios más elevados por este tipo de productos.

La Indicación Geográfica Protegida (IGP) y Denominación de Origen (DOP) son reconocimientos que constituyen herramientas de creación de valor, a través de los que se logra proteger la calidad del producto y brindar a los consumidores mayor y mejor información sobre los métodos de producción y el origen del producto. En Argentina, el Régimen Legal de las Indicaciones Geográficas y Denominaciones de Origen de Productos Agrícolas y Alimentarios está constituido por Ley. A su vez la Secretaría de Agregado de Valor, es el organismo del Estado Nacional donde se tramitan las solicitudes de reconocimiento y registro de estas herramientas de diferenciación para aquellos productos que presentan cualidades diferenciales debidas al lugar de producción o elaboración (Alimentos Argentinos Nro 69, Ministerio de Agroindustria, Presidencia de la Nación, 2016). Estos reconocimientos resguardan las particularidades de los alimentos tradicionales/artesanales, siendo esenciales para la promoción del desarrollo regional. Un producto que lleve el logotipo IGP ha demostrado una cualidad, reputación u otra característica determinada que puede esencialmente atribuirse a su origen geográfico. Al menos una de sus fases de producción, transformación o elaboración debe haber ocurrido en la zona geográfica definida. Mientras que la DOP certifica que el producto es originario de un lugar determinado y su calidad o características se deben no solo al medio geográfico particular sino a todos aquellos factores naturales y humanos inherentes a él. Este producto debe ser elaborado en la zona geográfica definida en todas sus fases de producción.

Argentina, como consecuencia del impacto de las tradiciones italianas y españolas así como la calidad y disponibilidad de carne, ha sido el país con mayor tradición en embutidos fermentados de Latinoamérica. En este sentido, se elaboran diversos tipos de embutidos fermentados empleando carne vacuna y/o carne de cerdo, entre ellos el Salame de Milán que se produce en diferentes regiones de nuestro país [28]. Sin embargo, existen otros productos, artesanalmente manufacturados en determinadas regiones como los salames "Tandilero" y de "Colonia Caroya". El primero, producido en la región Este de la provincia de Buenos Aires, ha logrado ser reconocido como DOP en el año 2008 por el Ministerio de Agricultura de la Nación. Estos productos cumplen con estrictos procedimientos y sus particulares características surgen de la combinación de los recursos naturales y culturales, transmitidos durante generaciones en la región. Es un sistema socio-productivo integrado localmente, que asocia productores de materias primas, elaboradores de salames y el sector comercial con capacidad de elaborar aproximadamente 1.500 toneladas/año de salames. Por otra parte, los salames de "Colonia Caroya" en el centro de la provincia de Córdoba, con una producción de más de 600 toneladas/año, son productos artesanales naturalmente fermentados, promovidos inicialmente por inmigrantes friulanos constituyendo su manufactura la principal actividad en esta pequeña ciudad. Este producto fue el primer alimento argentino en obtener una IGP (marzo de 2014). Los productos curados de estas dos regiones se caracterizan por la presencia de mezcla de carne vacuna y porcina y una variada microbiota espontánea en su superficie [57, 58]. Con la expansión del sector del mercado relacionado a los productos artesanales y/o tradicionales, existe una creciente preocupación por el estudio de la calidad organoléptica así como los factores que influencian su elección y/o preferencias, conocimiento esencial para orientar las estrategias de *marketing* y las decisiones de política comercial.

XI. Parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y organolépticos como descriptores de calidad en embutidos fermentados argentinos

El objetivo de este estudio fue definir la calidad de embutidos fermentados comerciales (características fisicoquímicas y microbiológicas) y establecer su aceptabilidad para posteriormente determinar las variables que determinan la opinión de los consumidores. Esto permitiría establecer estándares de calidad para embutidos regionales y guías para el procesamiento de los mismos, constituyendo a la vez, las bases para la evaluación de los embutidos fermentados con el *starter* seleccionado en nuestro estudio.

Los embutidos fermentados más comúnmente producidos en Argentina corresponden a los tipos salame y fuet. Aunque las tecnologías de manufactura conservan las tradiciones españolas e italianas, las variaciones debidas a materias primas, condiciones ambientales y diferentes metodologías de procesamiento otorgan características distintivas a estos productos que los diferencian de los europeos.

Con el objeto de diferenciar los embutidos en base a sus características organolépticas, dentro del análisis organoléptico se utilizaron tests de aceptación y/o preferencia por parte de los consumidores. En el trabajo realizado, se aplicaron técnicas instrumentales y análisis organoléptico con consumidores para establecer los estándares de calidad.

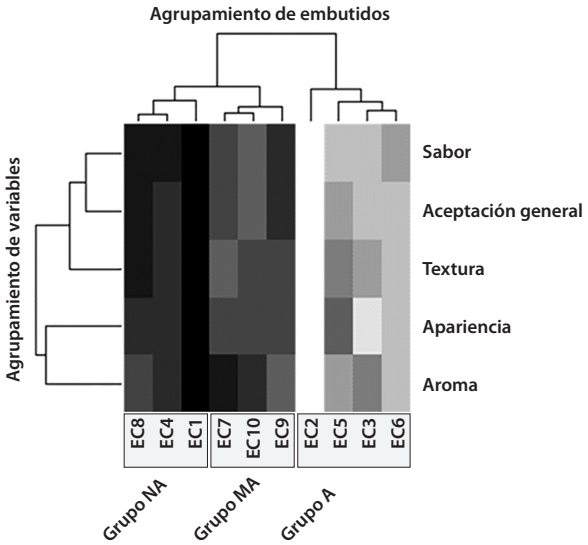
En la Tabla 1 se describen las características declaradas en el etiquetado y origen de los 10 productos fermentados analizados. Se establecieron los factores instrumentales y parámetros organolépticos que afectan la aceptación de embutidos comerciales argentinos por parte de una franja de consumidores de Tucumán. En cuanto a las características organolépticas, los atributos sabor, textura y aceptación global resultaron ser los parámetros más relevantes que determinaron el orden de preferencia de los embutidos fermentados, los que se agruparon como Aceptados (A), Moderadamente Aceptados (MA) y No Aceptados (NA) (Figura 4). Por otra parte, los análisis estadísticos multivariados permitieron definir embutidos con diferente grado de aceptación mediante un número limitado de variables fisicoquímicas y microbiológicas como ser: a_w, luminosidad, contenido de proteínas totales y recuentos microbianos, específicamente de hongos y BAL [59]. En base a los resultados obtenidos se concluye que la preferencia exhibida por los consumidores estuvo asociada con productos de buena calidad higiénica, secos o semisecos ($a_w > 0.78$), alta luminosidad (color rojo brillante), presencia de microbiota láctica y hongos en la superficie (emplumado). Estos parámetros instrumentales podrían aplicarse como estándares de calidad para embutidos fermentados secos argentinos, siendo estos lineamientos de gran importancia ya que hasta el momento no se han establecido parámetros de este tipo para productos elaborados en nuestro país.

Tabla 1. Información extraída del rótulo de los embutidos fermentados comerciales (EC) evaluados

	EC1	EC2	EC3	EC4	EC5	EC6	EC7	EC8	EC9	EC10
Localización de la planta	Santa Fe	Buenos Aires	Córdoba	Tucumán	Santa Fe	Buenos Aires	Santa Fe	Santa Fe	Santa Fe	Santa Fe
Tipo de embutido	Picado fino	Fuet	Picado grueso	Picado grueso	Picado grueso	Fuet	Picado fino	Picado fino	Picado grueso	Picado grueso
Sodio (%)	1,69	1,48	NI	0,45	1,42	1,65	1,45	1,57	1,45	1,69
Grasas totales (%)	36	37,5	NI	27,5	27,5	40	32,5	32,5	27,5	36
Grasas Saturadas (%)	13	13,75	NI	12,25	10	18,25	15	14,25	10,5	13
Proteína (%)	19	24,75	NI	15,5	20,25	25	18	17	19,25	19

EC, significa embutidos comerciales; NI, significa no informado en la etiqueta.

Figura 4. Análisis de conglomerados (AC) basado en el análisis sensorial de embutidos comerciales argentinos.



Se muestran los agrupamientos de variables (izquierda) y de EC (arriba). Los valores promedio de los atributos sensoriales para cada muestra se representan con un código de color desde blanco (alto nivel de aceptación) a negro (bajo nivel de aceptación).

XII. Evolución de la proteólisis durante la fermentación y maduración de embutidos fermentados argentinos

A fin de complementar la caracterización de los embutidos comerciales, y considerando la importancia de los compuestos relacionados con el sabor y aroma en las características finales de los embutidos fermentados se analizó la degradación de proteínas [60]. De manera similar a los resultados obtenidos en sistemas modelos ensayados *in vitro*, en los productos comerciales la fracción sarcoplásmica de la matriz cárnica (constituida por proteínas solubles como mioglobina y enzimas) fue más susceptible a la degradación que la fracción miofibrilar (proteínas menos solubles como actina y miosina). Los resultados mostraron un aumento de péptidos y aminoácidos que contribuyen directa o indirectamente en el desarrollo del aroma y sabor del producto final, en coincidencia con lo descripto por Fadda y colaboradores [6]. Mediante técnicas de separación como la electroforesis (SDS-PAGE), se observaron perfiles de degradación distintivos entre los productos diferentes como por ejemplo entre salames y fuets. Además, cuando se analizó la proteólisis secundaria, es decir la degradación de péptidos grandes y medianos para generar péptidos pequeños y amino ácidos libres, se encontraron diferencias sustanciales entre los productos analizados en especial en los perfiles aminoacídicos. Los

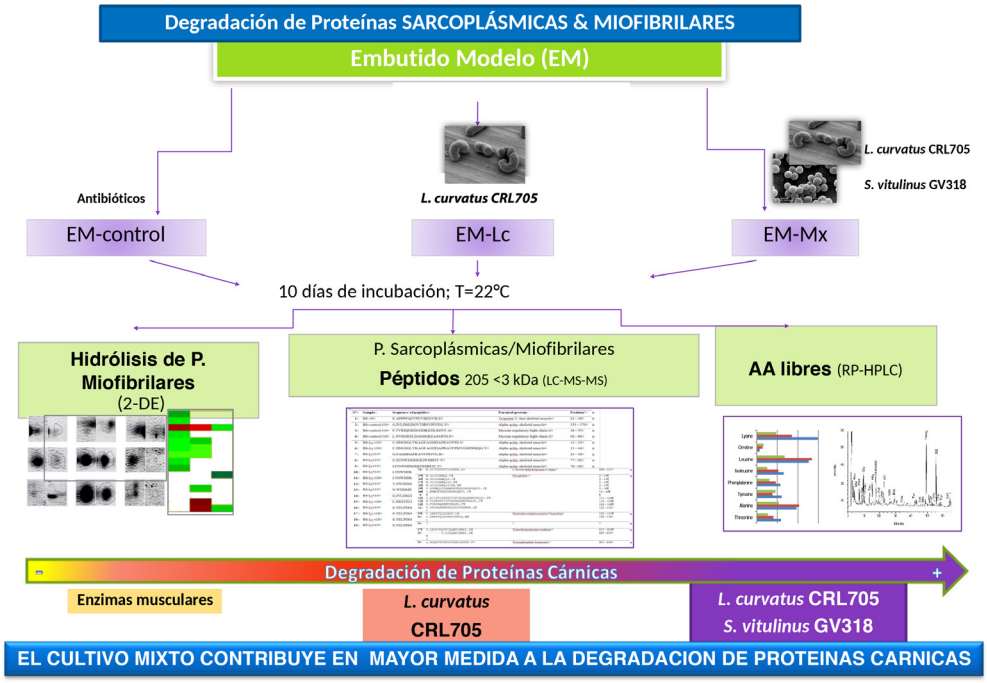
péptidos pequeños generados fueron separados por *HPLC* (del inglés, cromatografía líquida de alto rendimiento) e identificados mediante espectrometría de masa. Se observó mayor cantidad de péptidos pequeños en los embutidos fermentados respecto a la carne sin fermentar, siendo posible distinguir el aporte de la microbiota presente. Estos resultados significan una contribución inédita a los cambios ocurridos durante la fermentación de estos alimentos. La peptidómica (disciplina que permite la caracterización de la totalidad de péptidos presentes en un sistema o matriz analizada) enfocada a péptidos pequeños (menores a 3 kDa) permitió diferenciar la carne fermentada de la no fermentada, aunque no se pudo establecer biomarcadores específicos relacionados a calidad o a marcas comerciales. Esto confirma que el bouquet característico de un embutido fermentado es un descriptor muy complejo que involucra numerosas variables difíciles de definir desde un solo enfoque [60].

La caracterización de los perfiles proteolíticos, peptídicos y aminoacídicos de embutidos comerciales podría ser una herramienta útil para el control de la homogeneidad de la producción y el sostén de los rasgos propios de estos productos.

XIII. Contribución de un cultivo iniciador autóctono a la proteólisis cárnica, estudios in vitro

A continuación, se evaluó la contribución en la proteólisis de un cultivo iniciador autóctono, seleccionado por nuestro grupo en base a sus características tecnológicas, bioprotectoras y de compatibilidad [42]. Este cultivo mixto está constituido por *L. curvatus* CRL705 y *S. vitulinus* GV318, cepas aisladas de embutidos fermentados artesanales de Argentina [61]. Se utilizó un embutido modelo (EM) formulado con carne picada y aditivos de curado el que fue luego inoculado con el cultivo autóctono mixto o con cada microorganismo puro. Como control se utilizó el EM sin inóculo microbiano, suplementado con antibióticos para evaluar la proteólisis debida solamente a las enzimas cárnicas. Estos ensayos permitieron describir e identificar los productos de la proteólisis cárnica y discriminar la contribución del cultivo autóctono mediante técnicas tradicionales (microbiológicas y físico químicas) pero fundamentalmente mediante nuevas tecnologías como la proteómica y la peptidómica (Figura 5). [43, 44].

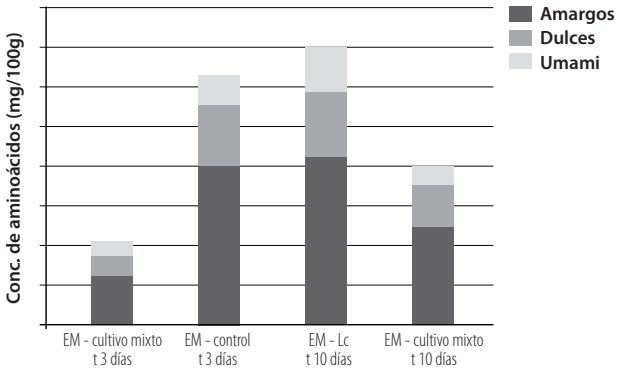
Figura 5. Estudios proteómicos y peptidómicos aplicados a la evaluación del rol de L. curvatus CRL705 y S. vitulinus GV318 en la proteólisis de un embutido fermentado modelo.



Entre los resultados más relevantes se puede mencionar que *L. curvatus* CRL705 y *S. vitulinus* GV318, inoculados individualmente así como en el cultivo mixto, exhibieron buen crecimiento y buena adaptación al embutido modelo durante todo el periodo evaluado (15 días). Asimismo, el adecuado descenso del pH (pH final entre 5,1 y 4,66) similar a lo obtenido en embutidos comerciales garantizará la calidad higiénica del producto final elaborado con este cultivo autóctono. También se analizó el contenido de aminoácidos libres y se observó un claro incremento en todos los lotes a los 10 días. En el EM-control se produjo una importante liberación de aminoácidos como consecuencia de la acción de las enzimas de la carne sobre las proteínas mientras que el EM inoculado con L. curvat*us,* mostró un aumento neto similar al control. En este modelo, la proteólisis endógena sería estimulada por la acidificación llevada a cabo por *L. curvatus* CRL705 produciendo aumento de aminoácidos libres [6]. Esta cepa utilizaría para su crecimiento, simultáneamente, los azúcares presentes y los aminoácidos. El balance entre consumo y liberación de aminoácidos explicaría que el contenido final de aminoácidos sea similar al del modelo sin inocular. En el *EM* inoculado con el cultivo mixto se obtuvo menor contenido de aminoácidos libres respecto a los demás lotes. En este caso, el crecimiento *S. vitulinus* GV318 produciría mayor consumo y/o metabolización de aminoácidos respecto a su liberación, por lo tanto una reducción neta en

el contenido de los mismos [15]. Esto también sugiere que los aminoácidos liberados por *S. vitulinus* pueden haberse metabolizado produciendo compuestos aromáticos, poniendo de relieve la conocida habilidad de los CGC para producir compuestos de aroma derivados de aminoácidos ramificados y aromáticos. En la Figura 6 se puede observar el contenido de aminoácidos agrupados por sabores amargo (arginina, tirosina, treonina, fenilalanina y leucina), dulce (glicina y alanina) y umami (que es, en realidad, más que un sabor, una sensación) (glutamato) para cada lote estudiado.

Figura 6. Concentraciones de aminoácidos libres en los diferentes Embutidos Modelo durante 10 días de fermentación/maduración.



Cuando se evaluó, mediante electroforesis bidimensional, la degradación de proteínas miofibrilares (que son las mayoritarias en la carne), se observó degradación de algunas en el lote control, confirmando la actividad de las proteasas musculares en el primer paso de la proteólisis (proteólisis primaria). Sin embargo este fenómeno se vio incrementado en presencia de *L. curtvatus* CRL705 y más aun con el cultivo autóctono completo (*L. curvatus* + *S. vitulinus*), registrándose degradación de proteínas adicionales como la tropomisosina. En la Tabla 2 se esquematiza el aporte de cada sistema enzimático en la degradación de las principales proteínas hidrolizadas.

Tabla 2. Degradación de proteínas miofibrilares cárnicas durante la fermentación y maduración en el embutido modelo.

Proteínas	Actividad endógena *EM-control*	Aporte de *BAL* *EM-Lc*	Aporte *CGC+BAL* *EM-Mixto*
Actina	+	++	++
MLC	+	++	++
MHC	+	++	++
MRLC	+	++	++
Tropomiosina	–	–	++

(+) hidrolizada; (++) moderadamente hidrolizada; (-) no hidrolizada. MLC: cadena ligera de la miosina. MHC: cadena pesada de la miosina. MRLC: proteína regulatoria de la cadena ligera de la miosina.

Por otra parte, se obtuvieron resultados muy interesantes al analizar el peptidoma menor a 3 kDa. La mayoría de los péptidos identificados fueron específicos para cada modelo es decir que el perfil obtenido fue único para cada lote que según su composición podía contener: i) solo enzimas musculares (EM-control), ii) enzimas musculares más las microbianas de la cepa láctica (EM - Lc) o iii) todos los sistemas enzimáticos en el cultivo mixto (EM-mixto) (Figura 7). Las proteínas sarcoplásmicas dieron origen a la mayoría de péptidos pequeños (87%) mientras que las miofibrilares originaron solo un 13% de estos péptidos. Estos datos ratifican que las proteínas sarcoplásmicas son más susceptibles a la degradación por acción microbiana [6]. Además, la cantidad de péptidos generados fue dependiente del pH, del tiempo de fermentación y de los sistemas proteolíticos presentes en cada modelo, demostrando la real contribución del cultivo iniciador a la diversidad peptídica (Tabla 3). Estos resultados corroboran y expanden el conocimiento sobre el aporte microbiano a la proteólisis secundaria, y a la producción de péptidos relacionados al aroma y sabor de los productos cárnicos.

Figura 7. Cantidad de péptidos de bajo peso molecular identificados en los embutidos modelo.

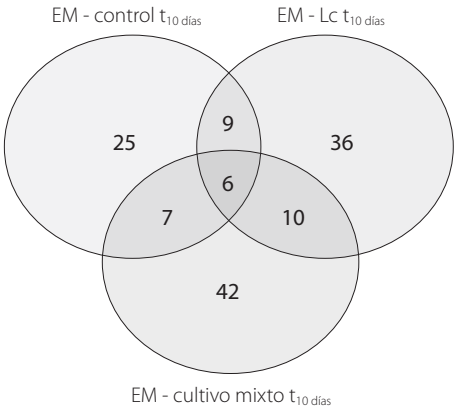


Diagrama de Venn con el número de péptidos identificados en EM- control t10 días (azul), EM-Lc t10 días (amarillo) y EM-cultivo mixto t10 días (rojo). En las intersecciones se muestra el número de péptidos compartidos.

Tabla 3. Cantidad de péptidos pequeños producidos durante la fermentación del Embutido Modelo durante 10 días a 25ºC en función del tiempo, pH y presencia de los diferentes sistemas proteolíticos y del cultivo iniciador autóctono.

Modelo	Tiempo	pH	Nº de péptidos	Actividad proteolítica
EM	0	5,5	32	Muscular
EM-control	10 días	5,7	47	Muscular
EM-Lc	10 días	4,65	61	Muscular + *BAL*
EM-cultivo mixto	10 días	4,65	65	Muscular + *BAL* + *CGC*

XIV. Rol del cultivo iniciador autóctono en la calidad de embutidos fermentados elaborados en planta piloto

Se examinaron tanto los embutidos obtenidos por fermentación espontánea (SI, sin cultivo iniciador) como aquellos inoculados con el cultivo iniciador autóctono (CI). Se analizó y cuantificó la microbiota tecnológica (BAL y CGC), la microbiota acompañante (mesófilos totales, coliformes y patógenos como *S. aureus*). También, se evaluaron parámetros fisicoquímicos como pH, a_w, proteína, humedad, contenido peptídico y amino ácidos libres. Y finalmente, se llevó a cabo el análisis organoléptico de los productos obtenidos.

Los resultados evidenciaron que el cultivo autóctono contribuyó a la seguridad de los embutidos limitando el crecimiento de patógenos, como *E. coli* presuntivas (Tabla 4). Este hecho estaría relacionado con la acidez desarrollada por *L. curvatus* CRL705 que controlaría el crecimiento de estos microorganismos contaminantes. También se observó un período de maduración más corto en los embutidos con el CI, estabilizando los valores de a_w y pH a los 10 días de procesamiento e impactando positivamente en las características fisicoquímicas y microbiológicas del producto fermentado obtenido. Estas características se relacionan con la buena aceptación de los consumidores según los resultados del análisis organoléptico. Además, se analizó la calidad global de estos embutidos fermentados en planta piloto (EPP) en función de los estándares de calidad determinados para los productos comerciales (EC) analizados anteriormente (análisis discriminante estándar, SDA). En base a la posibilidad del SDA de clasificar nuevas muestras entre los grupos preestablecidos (A, MA, NA), los datos obtenidos para EPP con y sin el cultivo iniciador, fueron introducidos a efectos de inferir la aceptación de los consumidores en base a sus características fisicoquímicas y microbiológicas. De acuerdo a los resultados de este análisis todas las observaciones realizadas para los EPP del lote CI se agruparon con los Embutidos Comerciales Aceptados (A). En cambio, en los EPP del lote SI, solo algunas determinaciones se clasificaron dentro del Grupo A mientras que las restantes lo hicieron dentro del Grupo NA. Esto sugiere que el cultivo iniciador autóctono formulado mejora algunas variables fisicoquímicas y microbiológicas claves para la aceptación de estos productos por parte de los consumidores [42].

En base a los resultados obtenidos se propone que este cultivo iniciador autóctono posee gran potencial tecnológico y su uso por parte de los productores regionales resultaría en productos seguros microbiológicamente, una producción homogénea evitando pérdidas económicas, tiempo de maduración más cortos y productos adaptados a la preferencia y demanda de los consumidores.

Tabla 4. Recuento de células viables en embutidos fermentados elaborados con y sin cultivo iniciador autóctono en planta piloto.

Grupos microbianos	*CI*		*SI*	
	t_0	t_f	t_0	t_f
Aerobios mesófilos totales	7,08 ±0,14[b]	8,68 ±0,08[a]	6,58 ±0,16[a]	8,41 ±0,31[a]
Enterococcus	2,24 ±0,28[a]	3,96 ±0,02[a]	2,77 ±0,54[a]	3,68 ±0,24[a]
Levaduras	3,47 ±0,03[b]	5,51 ±0,02[a]	2,74 ±0,05[a]	5,83 ±0,08[b]
Hongos	ND	4,17 ±0,07	ND	3,12 ±0,19
E. coli	3,67 ±0,10[a]	0,00 ±0,00[a]	3,61 ±0,26[a]	1,24 ±1,43[a]
S.aureus	ND	ND	ND	ND

Los valores se expresan como log UFC/g. Tiempo inicial (t0) y final (tf). SI: lote sin cultivo iniciador; CI: lote con cultivo iniciador. E. coli*:* E. coli *presuntivas. Las letras en superíndice indican las diferencias significativas entre lotes para un mismo tiempo evaluados mediante el test de Student (p<0,05). ND: no detectado en 10g de muestra.*

XV. Conclusiones

En este capítulo se abarcó de manera amplia diferentes aspectos relacionados a los embutidos fermentados para introducir al lector en la temática general. Por otro lado, describimos cómo se aborda desde la ciencia el estudio de las bacterias lácticas relacionadas a la calidad de estos alimentos. A continuación, se destacan las conclusiones más importantes emanadas de este trabajo:

- Se establecieron variables fisicoquímicas (a_w, luminosidad, proteínas totales) y microbiológicas (hongos, enterococos y LAB) que agruparon a los embutidos fermentados comerciales de mayor aceptación. Estos estándares adquieren relevancia para la evaluación de los embutidos elaborados en planta piloto y de aquellos artesanales o industriales destinados al público local.

- El cultivo autóctono seleccionado impactó positivamente en la calidad higiénica y organoléptica de los embutidos elaborados en planta piloto. Por lo tanto, su aplicación en producciones locales permitiría garantizar la fermentación evitando pérdidas económicas, reduciendo el tiempo de retorno económico y a la vez otorgaría características únicas al producto final, generando un producto fermentado mejorado, típico de la región.

- Las BAL contribuyeron en la proteólisis primaria a través de la producción de ácido láctico, mientras que el rol más importante, se asocia a la proteólisis secundaria, produciendo péptidos pequeños relacionados al aroma y sabor. Estos metabolitos fueron exclusivos para cada sistema y asociados a cada uno de los microorganismos presentes.

- Tecnologías de vanguardia como la peptidómica y la proteómica permitieron identificar las proteínas degradadas y caracterizar molecularmente los péptidos generados durante la fermentación.

- La caracterización del peptidoma es la base para identificar péptidos claves en los productos fermentados que podrían usarse como marcadores de calidad y/o de procesamiento de los mismos.

XVI. Declaración de posibles conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

XVII. Bibliografía citada

[1] Conter, C., Zanardi, E., Ghidini, S., Pennisi, L., Vergara, A., Campanini, G., Ianieri, A. 2008. Consumers' behaviour toward typical Italian dry sausages. Food Control 19, 609-615.

[2] Ordóñez, J.A., Hierro, E.M., Bruna, J.M., Hoz, L.d.L. 1999. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 39, 329-367.

[3] Vignolo, G, Castellano P., Fontana, C., Fadda, S. Lactic acid bacteria in meat fermentations. Role of autochthonous starter cultures on quality, safety and health. Chapter 14. In: Eds Vinderola, G.; Ouwehand, A.; Salminen, S.; von Wright, A. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, *Fifh Edition*. Taylor and Francis Group, L.L.C. (2019), pp215-234. ISBN 9780815366485

[4] Casaburi, A., Di Monaco, R., Cavella, S., Toldrá, F., Ercolini, D., Villani, F. 2008. Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. Food Microbiology 25, 335–347.

[5] Ravyts, F., Steen, L., Goemaere, O., Paelinck, H., De Vuyst, L., Leroy, F. 2010. The application of staphylococci with flavour-generating potential is affected by acidification in fermented dry sausages. Food Microbiology 27, 945-954.

[6] Fadda, S., López, C., Vignolo, G. 2010. Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. Meat Science 86, 66–79.

[7] Hugas, M., Monfort, J.M. 1997. Bacterial starter cultures for meat fermentation. Food Chemistry 59, 547-554.

[8] Lücke, F.-K. 1998. Fermented sausages. En *Microbiology of fermented foods*, ed. B. J. B. Wood, pp. 441-483. Blackie Academic and Professional, Glasgow, UK.

[9] Verluyten, J., Messens, W., De Vuyst, L. 2003. The curing agent sodium nitrite, used in the production of fermented sausages, is less inhibiting to the bacteriocin-producing meat starter culture *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 under anaerobic conditions. Applied and Environmental Microbiology 69, 3833-3839.

[10] Roca M. & Incze K. (1990) Fermented sausages, Food Reviews International, 6:1, 91-118, DOI: 10.1080/87559129009540862

[11] Lücke FK. 2003. Fermented meat products. In: Caballero, B., Trugo, L. C. & Finglas, P. M., editors. Encyclopedia of food science and nutrition. Oxford: Academic Press. p. 2338- 2344.

[12] Zeuthen, P. (1995). Historical aspects of meat fermentations. En: *Fermented meats*, Campbell-Platt, G. y Cook, P.E (Ed.), pp. 53-68. Blackie Academic & Professional. Glasgow, Reino Unido

[13] Sanz, Y., Vila, R., Toldrá, F. y Flores, J. (1998). Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of non-fermented sausages. International Journal of Food Microbiology 42(3), 213-217.

[14] Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M., Vidal-Carou, M.C., Bover-Cid, S. y Hugas, M. (2006). Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* 100(1), 40-49.

[15] Casaburi, A., Di Monaco, R., Cavella, S., Toldrá, F., Ercolini, D., y Villani, F. 2008. Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. Food Microbiology 25(2): 335-347.

[16] Sanz, Y., Toldrá, F. 2002. Purification and characterization of an arginine aminopeptidase from *Lactobacillus sakei*. Applied and Environmental Microbiology 68, 1980-1987.

[17] Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M.C., Oliver, G., Toldra, F. 1999a. Characterization of muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysis caused by *Lactobacillus plantarum*. Applied and Environmental Microbiology 65, 3540-3546.

[18] Demeyer, D., Raemaekers, M., Rizzo, A., Holck, A., De Smedt, A., Ten Brink, B., Hagen, B., Montel, C., Zanardi, E., Murbrekk, E., Leroy, F., Vandendriessche, F., Lorentsen, K., Venema, K., Sunesen, L., Stahnke, L., De Vuyst, L., Talon, R., Chizzolini, R., Eerola, S. 2000. Control of bioflavour and safety in fermented sausages: First results of a European project. Food Research International 33, 171-180.

[19] Chaillou, S., Chaulot-Talmon, A., Caekebeke, H. et al. (2014) Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. *ISME J*, 9:1105–1118.

[20] Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., Bosch-Fusté, J., Vidal-Carou, M.C. 2012. Influence of technological conditions of sausage fermentation on the aminogenic activity of *L. curvatus* CTC273. Food Microbiology 29, 43-48.

[21] Casaburi, A., Nasi, A., Ferrocino, I., Di Monaco, R., Mauriello, G., Villani, F., Ercolini, D. (2011) Spoilage-related activity of *Carnobacterium maltaromaticum* strains in air-stored and vacuum-packed meat. *Appl Environ Microbiol*, 77:7382–7393.

[22] Talon, R., Leroy, S., Lebert, I. (2007) Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: The importance of indigenous starters. *Meat Sci*, 77:55–62.

[23] Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., Ganzle, M., Kort, R, Pasin, G , Pihlanto, A , Smid, E. & Smid, E. J. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. Current opinion in biotechnology, 44, 94-102.

[24] Rezac S, Kok CR, Heermann M and Hutkins R (2018) Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms. Front. Microbiol. 9:1785. doi: 10.3389/fmicb.2018.01785

[25] Fontana, C., Cocconcelli, P.S., Vignolo, G. (2005) Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. Int J Food Microbiol, 103:131–142.

[26] Fontana, C., Bassi, D., López, C. et al. (2016) Microbial ecology involved in the ripening of naturally fermented llama meat sausages. A focus on lactobacilli diversity. Int J Food Microbiol, 236:17–25.

[27] Vignolo, G., Fontana, C., Cocconcelli, P.S. (2010a) New approaches for the study of lactic acid bacteria biodiversity: A focus on meat ecosystems. In *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Novel Applications*, eds. F. Mozzi, R. Raya, G. Vignolo, pp. 251–271. Ames, IA: Willey-Blackwell.

[28] Vignolo, G., Fontana, C., Fadda, S. (2010b) Semidry and dry fermented sausages. In *Handbook of Meat Processing*, ed. F. Toldrá, pp. 379–398. Ames, IA: Willey-Blackwell.

[29] Astudillo-García, C., Bell, J.J., Webster, N.S. et al. (2017) Evaluating the core microbiota in complex communities: A systematic investigation. *Environ Microbiol*, 19:1450–1462.

[30] Casaburi, A., Aristoy, M. C., Cavella, S., Di Monaco, R., Ercolini, D., Toldrá, F., y Villani, F. 2007. Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. Meat Science, 76(2): 295-307.

[31] Stahnke, L.H. 2002. Flavour formation in fermented sausage. En: *Research Advances in the* Quality of Meat and Meat Products, ed. F. Toldrá, Research Signpost, Trivandrum, India. pp. 193-223.

[32] Hammes, W.P., Bantleon, A., Min, S. 1990. Lactic acid bacteria in meat fermentation. FEMS

Microbiology Letters 87, 165-173.

[33] Hüfner, E., Hertel, C. 2008. Improvement of Raw Sausage Fermentation by Stress-Conditioning of the Starter Organism *Lactobacillus sakei*. Current Microbiology 57, 490-496.

[34] Lücke, F.K. 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. Meat Science 56, 105-115.

[35] Ammor, M.S., Mayo, B. (2007) Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Sci*, 76:138–146.

[36] Leroy, F., Verluyten, J., De Vuyst, L. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. International Journal of Food Microbiology 106, 270-285.

[37] Chen, H., Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and their Food Applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2, 82-100.

[38] Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T., Monfort, J.M. 2002. Bacterial cultures and metabolites for the enhancement of safety and quality in meat products. En: Research advances in the quality of meat and meat products, ed. F. Todrá, pp. 225-247. Research Signpost, Trivandrum, India.

[39] Vignolo G., Castellano, P., Fadda, S. Starter cultures: Bioprotective cultures. 2015. In Handbook of Fermented Meat and Poultry. Second Edition. Part III Chapter 15. Pgs:129-137 Ed. F. Toldrá and R. Talon. Blackwell Publishing Inc, Malden, MA, USA, ISBN-978-1-118-52269-1.

[40] Casquete, R., Benito, M.J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Pérez-Nevado, F., Córdoba, M.G. 2012. Comparison of the effects of a commercial and an autochthonous Pediococcus acidilactici and Staphylococcus vitulus starter culture on the sensory and safety properties of a traditional Iberian dry-fermented sausage "salchichón". International Journal of Food Science & Technology 47, 1011-1019.

[41] Nediani T. 2015. Desarrollo de productos cárnicos no tradicionales fermentados con el uso de cultivos iniciadores. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Santiago del Estero

[42] López, C., 2013. Optimización de la calidad global de embutidos fermentados argentinos mediante el uso de microorganismos seleccionados. Estudios bioquímicos y proteómicos. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Tucumán

[43] López, C.M., Sentandreu, M.A., Vignolo, G.M., Fadda, S.G. (2015b) Low molecular weight peptides derived from sarcoplasmic proteins produced by an autochthonous starter culture in a beaker sausage model. EuPA Open Proteomics, 7:54–63.

[44] López, C.M., Sentandreu, M.A., Vignolo, G.M., Fadda, S.G. (2015c) Proteomic and peptidomic insights on myofibrillar protein hydrolysis in a sausage model during fermentation with autochthonous starter cultures. *Food Research International*, 78:41–49.

[45] Hebert, E.M., Saavedra, L., Taranto, M.P., Mozzi, F., Magni, C., Nader, M.E.F., de Valdez, G.F., Sesma, F., Vignolo, G., Raya, R.R. 2012. Genome sequence of the bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* strain CRL705. Journal of Bacteriology 194, 538-539.

[46] Fadda S., C. Chambon, M-C. Champomier-Vergès, R. Talon, G. Vignolo. Lactobacillus role during conditioning of refrigerated and vacuum-packaged argentinean meat. Meat Science (Special Issue: Beef up your tango. Meat Research in Argentina) 2008. 79:603-610.

[47] Vignolo, G., Fadda, S., Kairuz, M.N., R. Holgado, A.P., Oliver, G. 1998. Effects of curing additives on the control of Listeria monocytogenes by lactocin 705 in meat slurry. Food Microbiology 15, 259-264

[48] Fadda, S., Vignolo, G., Aristoy, M.C., Oliver, G., Toldrá, F. 2001. Effect of curing conditions

and Lactobacillus casei CRL705 on the hydrolysis of meat proteins. Journal of Applied Microbiology 91, 478-487

[49] Beserra FJ, Rabelo Melo LR, Passos Rodrigues MC, Cunha da Silva EM,Tieko Nassu R. 2003. Development and physico-chemical and sensorycharacterization of a ham-like cooked product of goat meat. Ciência Rural, Santa Maria, 33, 1141–1147.

[50] Nassu, R. T., Gonçalves, L. A. G., Beserra, F. J., y Feitosa, T. 2001. Estudo das características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de embutidos fermentados tipo salame formulados com diferentes proporçöes de carne caprina e suína. Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment. 19(2): 243-256.

[51] Cristofanelli S, Antonini M, Torres D, Polidori P, Renieri C,Mamani-Linares LW, Gallo CB. 2004. Meat and carcass quality from Peruvian llama (Lama glama) and alpaca (Lama pacos). Meat Science, 66, 589–593.

[52] Mamani-Linares LW, Gallo CB. 2013. Meat quality attributes of the Longissimus lumborum muscle of the Kh'ara genotype of llama (Lama glama) reared extensively in northern Chile. Meat Science, 94,89–94.

[53] Champredonde, M. 2008. The source and market development of a premium product – Beef from the Argentine Pampas. Meat Science 79, 534-540.

[54] (CAICHA https://www.caicha.org.ar/wp-content/uploads/INDUSTRIA-DE-CHACINADOS-Y-AFINES-2017.pdf)

[55] Euromonitor, 2019

[56] Mattiacci, A., y Vignali, C. 2004. The typical products within food -globalization". British Food Journal 106: 703-713

[57] Castellari, C., Quadrelli, A.M., Laich, F. 2010. Surface mycobiota on Argentinean dry

fermented sausages. International Journal of Food Microbiology 142, 149-155.

[58] Canel, R., Wagner, J.R., Stenglein, S.A., Ludemann, V. 2013. Indigenous filamentous fungi on the surface of Argentinean dry fermented sausages produced in Colonia Caroya (Córdoba). International Journal of Food Microbiology 164, 81-86.

[59] López, C. M., Bru, E., Vignolo, G. M. and Fadda, S. (2012) Main Factors Affecting the Consumer Acceptance of Argentinean Fermented Sausages. Journal of Sensory Studies 27 (5) , pp. 304-313.

[60] López, C.M., Bru, E., Vignolo, G.M., Fadda, S.G. (2015a) Identification of small peptides arising from hydrolysis of meat proteins in dry fermented sausages. Meat Sci, 104:20–29.

[61] Vignolo, G.M., de Ruiz Holgado, A.A.P., Oliver, G. 1986. Isolation and identification of the lactic acid bacteria involved in the ripening of cured meat products. Microbiologie, Aliments, Nutrition 4, 87-94.

8

Fermentación láctica de cereales y granos ancestrales andinos

Graciela C. Rollán
rollan@cerela.org.ar

• *Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA) – CONICET*

Resumen

Los cereales son la fuente de energía dietética más importante en todo el mundo; el trigo, el arroz y el maíz actualmente proporcionan aproximadamente la mitad de la fuente de energía alimentaria de la humanidad. Por otro lado, el aumento de pacientes celíacos en todo el mundo ha motivado el desarrollo de alimentos sin gluten utilizando tipos de harina alternativas al trigo, como arroz, maíz, y pseudocereales (amaranto, quinoa y trigo sarraceno). La importancia de explotar los cereales y pseudocereales para la elaboración de alimentos saludables y nutritivos ha estimulado a los productores de alimentos a desarrollar diferentes estrategias adecuadas para su procesamiento. La fermentación con bacterias lácticas (BAL) es uno de los métodos más antiguos, sencillo y económico para producir, conservar, mejorar propiedades sensoriales, calidad nutricional y funcional de alimentos en general. Esta revisión proporciona una visión general sobre la fermentación de cereales y pseudocereales por BAL destacando la capacidad de estas bacterias para interactuar con los componentes de estos granos durante la elaboración de panificados y pastas.

Alimentos fermentados tradicionales preparados a partir de cereales como el maíz, arroz, mijo o el sorgo, son comunes en África. Estos alimentos tienen un gran impacto en la nutrición, la salud y la economía social de los pueblos del continente, a menudo plagados de sequía, hambre y enfermedades. El maíz es económicamente uno de los cultivos más importantes en Latinoamérica y tiene un papel importante en la identidad cultural y social de los pueblos. En este capítulo se describirán algunos alimentos y bebidas fermentadas indígenas tradicionales

de África y Latinoamérica, y se detallarán los modos de preparación y la microbiota dominante de la fermentación.

Los numerosos efectos beneficiosos de la fermentación láctica de los cereales y pseudocereales pueden explotarse para diseñar alimentos o ingredientes de granos novedosos y más saludables. El suministro de nuevos productos bio-enriquecidos obtenidos por fermentación de estos cultivos representaría un avance significativo para asegurar una adecuada nutrición a la población en general y especialmente a una franja importante de individuos con necesidades diferentes.

I. Introducción

Los cereales y los alimentos a base de cereales tienen gran importancia en el progreso de la humanidad a nivel mundial debido a su impacto en la agricultura, economía y nutrición. Las dietas en todo el mundo se basan en más de 20 cultivos con una proporción dominante de los "tres grandes" cereales: trigo (*Triticum aestivum*), maíz (*Zea mays*) y arroz (*Oryza sativa*), que contribuyen aproximadamente al 60% del total de la ingesta calórica [1]. Sin embargo, estos cultivos pueden no ser intrínsecamente las especies más adecuadas para enfrentar los fenómenos meteorológicos extremos que se presentan en los últimos tiempos debido al cambio climático. Debido a este problema, se espera que la producción mundial de granos per cápita disminuya al menos un 14% entre 2008 y 2030 [2]. El suministro de alimentos debe duplicarse para 2050 para contrarrestar los efectos del cambio climático y la presión demográfica sobre sistemas de alimentos mundial. La FAO insta a ampliar la respuesta al cambio climático en la agricultura, principalmente en la diversificación de cultivos más resistentes para garantizar la seguridad alimentaria y apoyar el desarrollo rural en un contexto de cambio climático. La necesidad de diversificar los granos para consumo humano y las demandas del consumidor de productos sin gluten y más nutritivos causaron el resurgimiento y la valoración de cultivos ancestrales andinos, los pseudocereales (quinoa, amaranto y trigo sarraceno) a través del mundo durante las últimas décadas. Además, el nuevo desafío para las industrias alimentarias y las áreas científicas como la química, la biología, la medicina, la farmacología y la tecnología alimentaria es obtener alimentos con un mayor valor nutricional que también posean características funcionales, propiedades que van más allá de satisfacer requisitos nutricionales, sino que tengan además un impacto positivo en la salud.

La importancia de explotar y transformar estos granos en alimentos saludables y nutritivos, nos obliga a repensar y desarrollar estrategias adecuadas para su procesamiento. La fermentación es uno de los métodos más antiguos de producción y conservación de alimentos [3]. Los alimentos y bebidas fermentados se definen como aquellos que han sido sometidos a la acción de microorganismos y de sus enzimas, particularmente amilasas, proteasas y lipasas que causan la transformación bioquímica de polisacáridos, proteínas y lípidos en productos deseables con sabores, aromas y texturas atractivos para el consumidor [4, 5]. Las bacterias lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos heterogéneo de carácter GRAS (siglas en inglés para "Generalmente Reconocido Como Seguro") que tradicionalmente se ha asociado con la fermentación de alimentos [6]. Las BAL generalmente están relacionados con hábitats ricos en nutrientes, por ejemplo, diferentes alimentos (leche, bebidas, verduras, carne, cereales); sin embargo, algunas BAL también son miembros de la microbiota normal del intestino, la boca y la vagina de mamíferos [7, 8]. Los cereales y pseudocereales son, en general, un buen medio para fermentaciones microbianas [9]. Son ricos en polisacáridos, que pueden usarse como fuente de carbono y energía por los microorganismos durante la fermentación. Además, también contienen minerales,

vitaminas, esteroles y otros factores de crecimiento [10]. Durante varios miles de años, el pan ha sido uno de los principales componentes de la dieta humana, por lo cual la cocción y horneado del producto a base de levadura y masa ácida (en inglés, *sourdough*) es uno de los procesos biotecnológicos más antiguos. Durante la fermentación de la masa, los productos metabólicos de las BAL mejoran las propiedades organolépticas del pan, así como su vida útil, valor nutricional [11, 12] y funcional [13, 14, 15].

Asimismo, los alimentos y bebidas fermentados indígenas representan un valioso patrimonio cultural en África y Latinoamérica. Muchos de estos alimentos y bebidas autóctonos basados en cereales son fermentados espontáneamente y algunos de ellos combinan cereales con legumbres, mejorando así la calidad proteica general del producto fermentado [16].

Los numerosos efectos beneficiosos de la fermentación láctica de cereales y pseudocereales pueden explotarse para diseñar alimentos novedosos y/o ingredientes de granos destinados a la salud humana y, lo que es más interesante, dirigidos a poblaciones con necesidades específicas.

II. Cereales

El 73% del área total cosechada mundial corresponde a cultivos de cereales y contribuye a más del 60% de la producción mundial de alimentos, proporcionando proteínas, minerales, fibra dietética y vitaminas necesarias para la salud humana [17]. Entre las especies de cereales se destacan: trigo, avena, arroz, centeno, cebada, sorgo, mijo y maíz. Su cultivo se remonta a 7000 a.C. para trigo y cebada; 4500 a.C. para arroz y maíz; 4000 a.C. para mijo y sorgo; 400 a.C. para centeno y 100 a.C. para avena. En los países desarrollados, hasta el 70% de la cosecha de cereales se usa como alimento para animales, mientras que en los países en desarrollo se utiliza principalmente para la nutrición humana [18]. Los cereales aportan alrededor del 50% de la ingesta diaria promedio de energía en la mayoría de las poblaciones, y el 70% en algunos países en desarrollo, convirtiéndolos en una de las fuentes de energía más importantes del mundo [19]. Nutricionalmente, los cereales son una fuente importante de proteínas dietéticas, carbohidratos, grasas y fibra (macronutrientes). También suministran minerales importantes (hierro), vitaminas (complejo E y B) y otros micronutrientes, esenciales para una salud óptima. En números, para ser más precisos, el trigo contiene: 58 al 72 % de almidón, 8 a 14% de proteínas, 2 a 5 % de lípidos, 1% sales minerales y entre 2 y 5 % de fibras (ver Figura 1).

Figura 1. Composición química aproximada (% materia seca) de la quinoa, maíz, arroz y trigo.

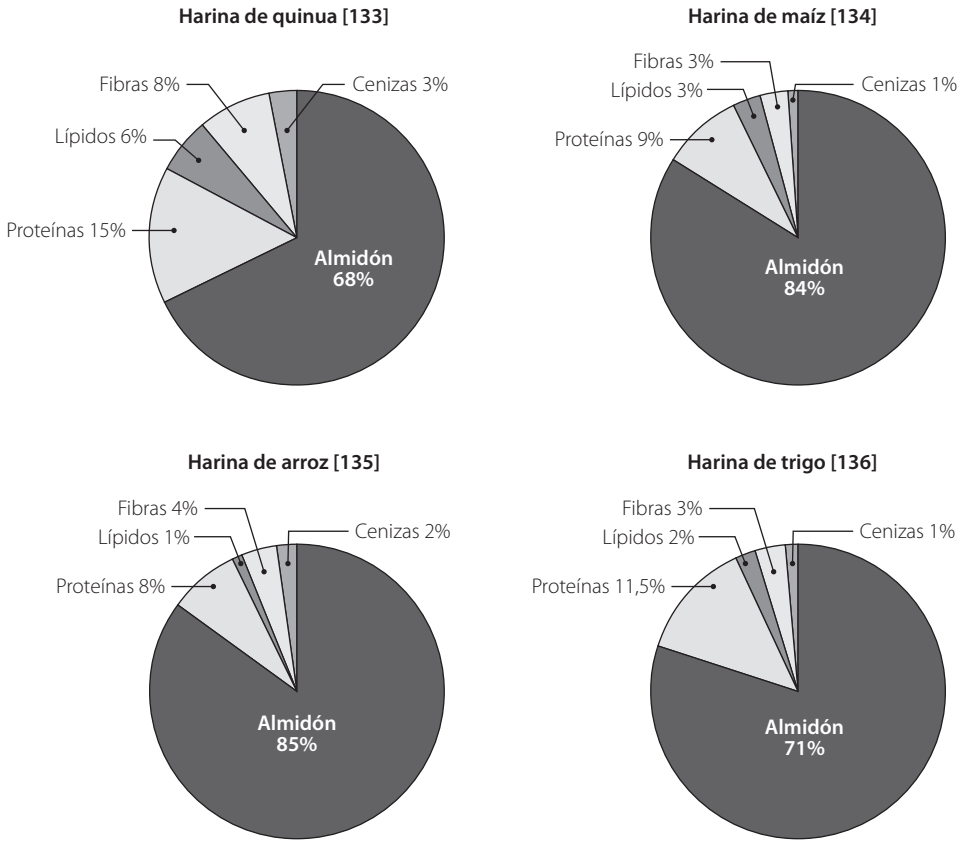


Figura adaptada de [133-136]

Gran variedad de cereales son cultivados, pero a nivel mundial, el trigo, maíz y el arroz son los cultivos más importantes y representan más del 50% de la producción mundial. A pesar de la gran cantidad producida, el trigo no es un cereal típico en países en desarrollo o emergentes, donde otros cultivos como el sorgo, mijo, teff, maíz y arroz constituyen la dieta básica para el consumo humano y tienen un papel esencial en proporcionar alimentos saludables a las poblaciones de regiones más pobres [20].

En comparación con su gran diversidad, solo unos pocos estudios han tratado granos diferentes al trigo. En los últimos años, la investigación y desarrollo sobre granos ancestrales como los pseudocereales (trigo sarraceno, quinoa, amaranto) han captado un renovado interés a nivel mundial para la producción de alimentos saludables y usos dietéticos especiales por su alto valor nutricional, funcional y sus numerosas propiedades benéficas para la salud.

III. Pseudocereales

Los pseudocereales, quinoa (*Chenopodium quínoa* Willd.) amaranto o kiwicha (*Amaranthus caudatus*) y *buckwheat* o trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) son semillas comestibles pertenecientes a especies de plantas dicotiledóneas. Se las conoce como pseudocereales debido a que sus semillas se parecen en función y composición a las de los cereales verdaderos, que son especies monocotiledóneas [21]. La quinoa es uno de los cultivos más antiguos de la Región Andina, con aproximadamente 7.000 años de cultivo; fue cultivada y utilizada por las civilizaciones prehispánicas [22]. El cultivo de quinoa era sagrado para los Incas, quienes la llamaban "chisoya mama", o "semilla madre". Durante la conquista de los españoles, hace más de 500 años, se suprimió el cultivo de quinoa por el uso que se le daba en los rituales religiosos. En su lugar, los conquistadores impusieron el cultivo de trigo. Sin embargo, cinco siglos después, la FAO declaró que la quinoa posee el balance de proteínas y nutrientes más cercano al alimento ideal para el ser humano. Por su parte la NASA eligió a la quinoa como el alimento nutritivo por excelencia para los viajes espaciales, teniendo en cuenta que por sí sola puede proveer una dieta balanceada. La importancia de la quinoa ha llevado a que el año 2013 fuera declarado "El Año Internacional de la quinoa" por las Naciones Unidas. La mayoría de los pseudocereales se adaptan a variables condiciones agroecológicas, son resistentes a sequías y cambios climáticos, son eco-sustentables ya que crecen perfectamente en la región sin necesidad de agregar fertilizantes o agentes químicos para su producción evitando daños ambientales; suministran rendimientos de cultivos relevantes y tienen un importante potencial nutricional y funcional. Asimismo, se estima que este pseudocereal contribuirá a la seguridad alimentaria en el siglo XXI [23]. Dichos cultivos tienen un gran potencial de transformación en productos procesados. En los últimos 30 años a partir de su difusión a nivel mundial, el área de cultivo se encuentra nuevamente en expansión.

Actualmente existe una revalorización de estos cultivos milenarios por sus propiedades benéficas para la salud y su gran potencial proteico y la ausencia de gluten (GF, de las siglas en inglés de Gluten Free), que pueden ser utilizados como fuentes alternativas para la formulación de nuevos alimentos y/o bioingredientes destinados a la población y, muy especialmente, a una franja vulnerable de la misma (diabéticos, celíacos, niños, adolescentes, ancianos y convalecientes). Por otra parte, las tendencias actuales indican un interés acentuado de los consumidores hacia alimentos funcionales que, además del valor nutritivo, aportan beneficios a las funciones fisiológicas del organismo. La quinoa y el amaranto tienen mejor perfil nutricional respecto a los cereales. En la Figura 1 se observa la composición química de quinoa respecto a maíz, arroz y trigo. Numerosos estudios de la última década mostraron que las semillas de quinoa y amaranto no solo contienen elevada concentración de proteína, sino también un balance sobresaliente de aminoácidos esenciales [24, 25]. Otros estudios han revelado que contienen lípidos (principalmente insaturados) de buena calidad, almidón, ácidos grasos, fibras, antioxidantes, minerales y son ricas en saponinas [26,

27]. Además de minerales, las semillas de quinoa y amaranto son ricas en vitaminas como las vitaminas B, C y E [28]. Su contenido de fitoquímicos como esteroides, terpenoides, betaninas, fenoles y flavonoides, y sus posibles efectos beneficiosos para la salud han llevado a realizar muchos estudios durante la última década [29].

A pesar de la importancia de los compuestos nutricionales presentes en cereales y pseudocereales, su biodisponibilidad es baja debido a la presencia de ciertos factores antinutricionales como los fitatos o ácido fítico (AF). El AF es un potente agente quelante de cationes, minerales y grupos básicos de proteínas de interés nutricional dando lugar a complejos insolubles y difícilmente digeribles disminuyendo así la biodisponibilidad de los mismos en la dieta [30].

La importancia de explotar y transformar estos granos en alimentos saludables y nutritivos, obliga a repensar y desarrollar estrategias adecuadas para su procesamiento como la fermentación.

IV. Fermentación

Los alimentos y bebidas fermentados se definen como aquellos que han sido sometidos al efecto de microorganismos y sus enzimas, particularmente amilasas, proteasas y lipasas que causan la transformación bioquímica de polisacáridos, proteínas y lípidos en productos deseables con sabores, aromas y texturas atractivos para el consumidor [4, 5]. La fermentación es uno de los métodos más antiguos de producción y conservación de alimentos. Desde los albores de la civilización, métodos para la fermentación de leches, carnes, verduras y cereales han sido descriptos. Los primeros registros aparecen en Medio Oriente y datan de 6000 a.C. [31]. La preparación de estos alimentos y bebidas fermentadas eran artesanales y sin ningún tipo de conocimiento del papel de los microorganismos involucrados. Sin embargo, el progreso de la Microbiología como ciencia en la década de 1850 y trabajos de Louis Pasteur contribuyeron significativamente a la comprensión del proceso de fermentación en sí. Se estableció el papel de los microorganismos, se formó la base biológica de la fermentación; además se demostró que existen diferentes tipos de fermentación [32, 33].

Los microorganismos transforman los componentes químicos de las materias primas de plantas/animales durante la fermentación de alimentos, mejorando así la biodisponibilidad de nutrientes, enriqueciendo la calidad sensorial, imparte efectos bioconservantes y mejora la seguridad alimentaria, degradando componentes tóxicos y factores antinutricionales. Además, la producción de compuestos antioxidantes y antimicrobianos, la estimulación de las funciones probióticas y la fortificación con compuestos bioactivos, promueven la salud del consumidor [34, 35]. Entre las bacterias asociadas a la fermentación, las bacterias lácticas (BAL) principalmente especies de *Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Weissella* están ampliamente involucradas en la fermentación de alimentos y bebidas alcohólicas [8]. Las BAL y los hongos, principalmente levaduras, pero también en menor medida,

ciertos mohos, pueden compartir un nicho ecológico común, pueden crecer en condiciones de bajo pH y reducida actividad del agua. El propósito original de la fermentación como proceso tecnológico, fue el de preservar el alimento. Posteriormente, con el desarrollo de numerosas tecnologías de preservación disponibles, los alimentos fermentados se elaboraron debido a sus sabores, aromas y texturas únicos, que son muy apreciados por el consumidor [32]. Los microorganismos responsables del proceso de fermentación pueden presentarse naturalmente en el sustrato, o pueden agregarse como iniciador y cultivos adjuntos [18]. Aproximadamente el 25% de la dieta europea y el 60% de países del tercer mundo consisten en alimentos fermentados. El concepto beneficioso de los alimentos fermentados para la salud se ha desarrollado rápidamente a través del incremento de las investigaciones científicas a lo largo de los años, lo que despertó al consumidor conciencia de la base funcional para consumir tales alimentos tradicionales en relación a la promoción de la salud y la prevención de enfermedades [36].

IV.A. Fermentación de cereales y pseudocereales

La fermentación de cereales es uno de los procesos biotecnológicos más antiguos, que se remonta al antiguo Egipto, donde la cerveza y el pan fueron producidos con la ayuda de levaduras y BAL. El empleo de BAL como iniciadores naturales (por ejemplo, masa madre) o seleccionadas, tienen la capacidad de conjugar las actividades funcionales, las propiedades sensoriales y la seguridad microbiológica deseadas [37]. La importancia y el empleo de la masa madre en la fermentación de cereales/pseudocereales se incrementaron en los últimos años.

IV.A.1. Masa madre

Tradicionalmente, el término masa madre o masa ácida (en inglés *sourdough*) se usó para describir a la mezcla de harina y agua que es fermentada en forma natural o espontánea por BAL y levaduras [38, 39]. La técnica más tradicional para la fermentación de cereales es el *backslopping*: es la inoculación de la materia prima con un pequeña cantidad de masa de una fermentación exitosa previa. La fermentación espontánea fue utilizada en los primeros días, simplemente activando los microorganismos naturales presentes en la harina; pero ésta no permite garantizar la misma calidad del producto final. Sin embargo, los productos fermentados espontáneamente representan una fuente de BAL con potenciales propiedades funcionales y tecnológicas interesantes. La elección de cultivos iniciadores tiene un impacto crítico en la palatabilidad, propiedades sensoriales, nutricionales y funcionales, sostenibilidad y seguridad de los alimentos.

La primera evidencia de producción de panificados empleando masa madre data de alrededor de 1500 a.C. de acuerdo a pinturas Egipcias. Sin embargo, los panes de masa ácida formaron parte de la dieta Europea hace aproximadamente 5000 años [40]. La masa madre fue el principal agente leudante usado en panificación hasta principios

del siglo XX, cuando fue reemplazada por la levadura de panadería; a partir de entonces, el uso del masa madre se redujo a la producción de panes artesanales y panes de centeno. En este último caso la acidificación era necesaria para inhibir las amilasas endógenas que degradaban excesivamente el almidón durante la panificación, afectando el volumen del pan [41]. Por lo tanto, en países como Alemania y Austria donde por tradición se consume abundante cantidad de pan de centeno, nunca se dejó de usar la masa ácida. Actualmente el *sourdough* se emplea en varios países europeos para producir una variedad de exquisiteces en pastelería y panificados, alcanzando hasta un 30% de la producción en varias regiones de Italia [42]. La masa ácida ha resurgido en la actualidad en la Argentina debido a las ventajas que ofrece el uso combinado de BAL y levaduras.

Según la tecnología aplicada, la masa ácida puede dividirse en tres tipos [39]: a) tipo I, que es producida por técnicas tradicionales (masa ácida por definición) y se caracteriza por pasajes diarios en harina y agua fresca (*backslopping*) que permiten mantener a los microorganismos en un estado metabólicamente activo. Generalmente las cepas que dominan la masa ácida son las que mejor se adaptan a las condiciones del proceso y son las que van a permanecer y dominar en los sucesivos pasajes; b) tipo II, que son las que se usan como suplementos para acidificar la masa al momento de la panificación; son preparaciones semi-líquidas con largos períodos de fermentación (2 a 5 días) que en algunos casos se mantiene a temperaturas mayores de 30°C para acelerar el proceso; c) finalmente, las de tipo III, cuya diferencia con la anterior es que las masas ácidas están deshidratadas y contienen microorganismos resistentes al proceso de desecación.

Los Tipos II y III son innovaciones con aplicación industrial que, a diferencia de la tipo I, contienen cepas de BAL previamente seleccionadas (cultivo iniciador).

La formación de masas madre de tipo I ha sido ampliamente estudiada en el laboratorio, en particular los procesos de fermentación de masa madre de trigo y centeno por *backslopping*. Cuando la harina funciona como el único componente no estéril y, por lo tanto, como la principal fuente de inoculación de la mezcla de harina y agua, las comunidades microbianas evolucionan durante el curso de la fermentación hacia una masa madre estabilizada, madura y activa [44]. En una semana, generalmente se obtiene la estabilidad del ecosistema de la masa madre. Sin embargo, esto puede variar, dependiendo del tipo y la calidad de la harina de cereal y los parámetros del proceso, valor del pH, la actividad del agua, la concentración de sal, temperatura, etc. La demostración de cómo la fermentación de masa madre mejora el procesamiento convencional de varios cereales se ha vuelto incuestionable durante la última década [45].

En relación con la microbiota presente en las masas madre, se sabe que los granos de cereales y pseudocereales normalmente presentan una microbiota indígena compuesta por bacterias, levaduras y hongos que compiten por nutrientes [46]. Un paso de pasteurización no es posible debido a la gelatinización del almidón y la inactivación de enzimas endógenas de cereales que son necesarias para la fermentación.

El origen de la microbiota de la masa madre depende del uso de ciertas materias primas básicas, así como los procedimientos tecnológicos y las prácticas de panadería

aplicadas que determinan la estabilidad y la persistencia de las comunidades de levaduras y BAL involucradas en los procesos de fermentación de masa madre (específicos de la región). Desde una perspectiva microbiológica, la masa madre debe considerarse como un ecosistema específico y estresante, que contiene concentraciones variables de carbohidratos y caracterizado por un ambiente ácido, disponibilidad limitada de oxígeno y recuentos más elevados de BAL (108 unidades formadoras de colonias por gramo, UFC/g) que de levaduras (10^7 UFC/g), que representa una relación BAL:levaduras de aproximadamente de 10:1 a 100:1 [47]. Típicas especies de BAL de masa madre son *Lactobacillus (L.) fermentum, L. paralimentarius, L. plantarum,* y *L. sanfranciscensis*. Típicas especies de levaduras son *Candida humilis, Kazachstania exigua*, y *Saccharomyces cerevisiae* [44].

Las BAL son un grupo filogenéticamente diverso de microorganismos Gram (+) de carácter GRAS que desempeñan un papel importante en la industria de los alimentos fermentados. La fermentación por BAL modifica la composición fisicoquímica y funcional de sustratos vegetales modificando la relación de componentes anti-nutritivos/nutritivos, lo que modifica la calidad del producto. Estas bacterias producen una amplia variedad de metabolitos y compuestos durante la fermentación tales como ácidos orgánicos, compuestos aromáticos, sustancias antimicrobianas, exopolisacáridos, péptidos bioactivos, vitaminas e importantes enzimas [48]. Estas propiedades permiten el uso de BAL como cultivos iniciadores para mejorar el sabor, aroma, vida útil, textura, valor nutricional, funcional de una variedad de alimentos fermentados y productos derivados de origen animal y vegetal [49, 50].

La levadura es un ingrediente fundamental en el proceso de elaboración del pan ya que realiza la fermentación donde los azúcares fermentables presentes en la masa (procedentes del almidón) se convierten en dióxido de carbono (CO_2) y etanol produciendo el levado del pan. Junto con las BAL, las levaduras juegan un papel clave en el proceso de producción de masa madre, donde están presentes de forma natural o se agregan como cultivo iniciador. Desde un punto de vista tecnológico, el metabolismo de las levaduras contribuye principalmente al levado y al sabor de los productos de masa madre. Además del etanol y el dióxido de carbono, las levaduras pueden producir metabolitos que afectan específicamente el sabor, como ácidos orgánicos, diacetilo, alcoholes superiores de aminoácidos de cadena ramificada y ésteres derivados de los mismos. Además, varias cepas de levaduras poseen propiedades que pueden conducir a ventajas nutricionales y de vida de estante del producto. Estas propiedades abarcan la producción de vitaminas, una mejora de la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos, la degradación del ácido fítico y la inhibición de hongos y su producción de micotoxinas. Las cepas de diversas especies son nuevos candidatos de cultivos iniciadores funcionales, que ofrecen oportunidades más allá del uso convencional de la levadura de panadería [51].

La mayor parte de la investigación científica sobre biotecnología de masa madre se inició aproximadamente en 1990. Inicialmente, la atención se centró en los efectos tecnológicos: sabor, reología y vida útil (retraso del envejecimiento, prevención de

deterioro) e interacciones microbianas en un ecosistema tan complejo [39, 52, 53]. Más recientemente, la investigación científica se ha centrado en las características funcionales/nutricionales de la fermentación de masa madre, cuyos efectos positivos han sido probados casi definitivamente [34, 54, 55, 56, 57].

Las propiedades inherentes a las BAL durante la fermentación se deben a su actividad metabólica que se traducen en mejores atributos organolépticos, texturales, nutricionales y funcionales.

Durante la **fermentación** de la masa madre, las BAL fermentan los hidratos de carbono presentes en la masa produciendo ácido láctico y acético, etanol y dióxido de carbono según su carácter homofermentativo o heterofermentativo (facultativo o estricto). Los carbohidratos fermentables (sacarosa, maltosa, glucosa, fructosa y oligosacáridos) se encuentran en muy bajas concentraciones en la harina (1,5-1,8%). Sin embargo, durante la fermentación de la masa, el almidón es degradado por las enzimas endógenas de la harina que libera maltodextrinas, maltosa y sacarosa, según el tipo de harina incrementando los niveles de maltosa inicial de 10 a 15 veces [58]. Los azúcares son utilizados por las BAL como fuente de energía y la concentración de ácidos orgánicos obtenidos de la fermentación, y por ende la acidificación de la masa, depende de la concentración y tipo de azúcar disponible, de la presencia de aceptores de electrones en la masa, temperatura de fermentación, el tiempo y el rendimiento de la masa (abreviado en inglés como DY, que refiere a la relación entre el peso de masa y el peso de harina empleado, multiplicado por 100]. Las BAL producen ácidos láctico/acético en relación 4/1, disminuyendo el pH de la masa típicamente por debajo del pH 5.

Los productos de panadería son contaminados frecuentemente por hongos ambientales pertenecientes a los géneros *Penicillium, Aspergillus, Mucor, Endomyces, Cladosporium, Fusarium y Rhizopus.* Datos obtenidos en panaderías de fabricación propia (PyME) indican que las pérdidas por **contaminación fúngica** de panes envasados oscilan entre el 25% en invierno y el 40% en verano. Este problema tiene implicancias económicas evidentes, tanto para los fabricantes (deterioro de materias primas y productos elaborados antes de su comercialización, pérdida de la imagen de marca, etc.), como para distribuidores y consumidores (deterioro de productos después de su adquisición y antes de su consumo). La biopreservación se refiere a la utilización de una microbiota, natural o controlada, o de sus productos antimicrobianos para extender la vida útil y mejorar la seguridad de los alimentos. Las BAL pueden proteger a los alimentos de la descomposición microbiana por crecimiento competitivo, producción de compuestos metabólicos antagonistas, producción de compuestos antimicrobianos. Los compuestos antifúngicos producidos por diferentes BAL son: ácido láctico y acético, dióxido de carbono, diacetilo, peróxido de hidrógeno, ácido caproico, ácido fenil láctico, dipéptidos, reuterina y fungicinas [59]. Actualmente, la creciente preocupación por los efectos tóxicos de los conservantes químicos sobre el medio ambiente y la salud humana plantea la necesidad de desarrollar nuevas alternativas biológicas para conservar los alimentos. Investigaciones

realizadas empleando un fermento de BAL bioconservante permitió reducir 50% la concentración de propionato, conservante químico frecuentemente usado en panificación [60, 61].

Los **exopolisacáridos** producidos por las BAL tienen un gran potencial para ser incluidos como aditivos o ingredientes en alimentos para reemplazar los espesantes químicos o producidos por bacterias de grado no-alimentario. La aplicación más novedosa de las BAL EPS+ recae en los productos de panificación. Los EPS más conocidos son los dextranos, xantanos y levanos. El empleo de BAL EPS+ y la producción *in situ* de estos biopolímeros en masa panaria permite una mayor retención de agua, le otorga mayor elasticidad y genera un producto final más blando con mejor calidad de conservación [62].

Se ha demostrado que la fermentación de cereales desempeña un papel crucial para la reducción de oligosacáridos (fructanos y galactanos), disacáridos (lactosa), monosacáridos (fructosa) y los polioles (sorbitol y manitol) fermentables (abreviado *FODMAP*, por sus siglas en inglés). Los **FODMAPs** son un grupo heterogéneo de compuestos que son pobremente digeridos y pueden tener una variedad de efectos sobre los procesos gastrointestinales. Estas moléculas pequeñas y osmóticamente activas son pobremente absorbidas en el intestino delgado y luego son fermentadas rápidamente por bacterias en el intestino grueso. La ingestión de FODMAP induce síntomas abdominales en personas que sufren de síndrome de intestino irritable (SII). Se han llevado a cabo una serie de estudios y la posible aplicación de la fermentación por levaduras en la reducción de fructanos y otros FODMAPs ha sido demostrada [63]. BAL y levaduras, microorganismos dominantes en la masa madre, son herramientas prometedoras para degradar los FODMAPs y modular su concentración en el pan, lo que afectaría positivamente a la salud de los consumidores [64, 65].

Las **proteínas** del gluten constituyen 80-85% del total de las proteínas del trigo y son responsables de las propiedades viscoelásticas y cohesivas de la masa. Tales propiedades reológicas confieren a la masa la capacidad de retener gas durante la fermentación y dan un producto que, después de su cocción en el horno, es esponjoso con una corteza elástica. La degradación de proteínas durante la fermentación depende de la acción combinada de enzimas de origen del cereal y microbiano. Esta degradación influye en la calidad final del pan debido a la pérdida de la red de gluten y sus propiedades viscoelásticas. Las BAL aisladas de masa madre generalmente muestran un activo sistema proteolítico, cuya actividad es dependiente de la cepa.

En general, la fermentación de masa madre con BAL resultó en un aumento de la concentración de **aminoácidos** durante la fermentación, mientras que la fermentación de masa con levaduras solo redujo la concentración de aminoácidos libres [52]. La proteólisis de gluten por BAL libera pequeños péptidos y aminoácidos, importantes desde el punto de vista nutricional y tecnológico [66]. La actividad proteolítica de las BAL durante la fermentación de masa madre también produce compuestos bioactivos como péptidos y derivados de aminoácidos (por ejemplo, ácido δ aminobutírico) con diversas funcionalidades. El potencial de las BAL de masa madre para liberar lunasina, un

péptido antitumoral, durante la fermentación de masas de cereales, fue determinado [67]. Asimismo, la capacidad de BAL seleccionadas para liberar péptidos antioxidantes y antihipertensivos se evidenció durante la fermentación de varias harinas de cereales [68, 69].

Las proteínas de cereales son causas frecuentes de **alergias alimentarias**; la enfermedad celíaca (EC) es una de las intolerancias alimentarias más comunes que ocurren en 1 de cada 130-300 personas de las poblaciones europea y estadounidense y 1 de cada 100 personas en Argentina. La EC es un trastorno inflamatorio crónico caracterizado por daño de la pequeña mucosa intestinal causada por la fracción de gliadina del gluten de trigo y proteínas similares solubles en alcohol (prolaminas) de cebada y centeno en sujetos genéticamente susceptibles [70]. Esta enfermedad, cada vez más diagnosticada en todo el mundo, puede sólo ser controlada manteniendo una dieta estrictamente libre de gluten. Se sabe que varios fragmentos de la estructura primaria de la α-gliadina son alergénicos, por ejemplo, los fragmentos 31-43, 62-75 y 57-89 (33-mer, el más significativo en EC) han sido identificados. Estos fragmentos son difíciles de hidrolizar porque contienen altas cantidades de residuos de prolina dentro de su secuencia. Dado que las BAL tienen un sistema proteolítico activo sobre gluten [71], se ha propuesto que algunos de los fragmentos alergénicos podrían desintoxicarse mejorando su hidrólisis durante el procesamiento de alimentos. Diferentes estudios revelaron el efecto positivo del uso de cultivos de masa madre seleccionados para eliminar los riesgos de contaminación por gluten [72, 73, 74, 75]. Recientemente, un nuevo proceso biotecnológico para hidrolizar completamente el gluten en harina de trigo fue optimizado, patentado e industrializado, y los productos horneados hechos con harina de trigo GF ahora están disponibles en el mercado global, proporcionando nuevas opciones para la industria alimentaria y los consumidores [76].

El **ácido fítico** (AF) o mio-inositol dihidrógeno hexafosfato, es una molécula cargada con 6 grupos fosfato ligados a un anillo central mio-inositol. El AF constituye el 1 al 4% del peso de los granos de cereales, pseudocereales y leguminosas, y representa la mayor forma de almacenamiento de fósforo. El AF es un potente agente quelante de cationes, minerales y grupos básicos de proteínas de interés nutricional dando lugar a complejos insolubles y difícilmente digeribles disminuyendo así la biodisponibilidad de los mismos en la dieta. Por esta propiedad, el AF es considerado un factor antinutricional para humanos y animales especialmente para pacientes celíacos que sufren deficiencias en micronutrientes [77]. Este compuesto es degradado durante la fermentación de la masa madre por la acción combinada de fitasas de la harina, de levaduras y de BAL. Las BAL contribuyen mediante la acidificación de la masa a la activación de fitasas endógenas de la harina y también produciendo fitasas microbianas [57, 78, 79, 80].

Los **fitoquímicos** como los compuestos fenólicos (CF), polifenoles, flavonoides, ácidos fenólicos son componentes importantes de productos alimenticios de origen vegetal. Estos compuestos están directamente relacionados con las características sensoriales de los alimentos, como el sabor, la astringencia y el color. Además, la presencia de CF en la dieta es beneficiosa para la salud debido a sus actividades

quimiopreventivas contra la carcinogénesis y mutagénesis, principalmente debido a sus actividades antioxidantes; prevención de enfermedades degenerativas, incluyendo enfermedades cardiovasculares. Cereales y pseudocereales son fuentes abundantes de flavonoides, que consisten principalmente en glucósidos de los flavonoles kaempferol y quercetina [21]. Los efectos benéficos de estos compuestos sobre la salud dependen de su bioaccesibilidad y biodisponibilidad. Los CF naturales suelen presentarse como glucósidos, ésteres o polímeros que no poseen actividad biológica [81]. Los bioprocesos alimentarios, como la fermentación o la hidrólisis enzimática de las fuentes vegetales y sus productos, son un medio atractivo para aumentar la actividad funcional de tales CF [82]. Algunos lactobacilos de la masa madre catalizan la liberación de ácidos fenólicos unidos que luego son sometidos a conversiones microbianas en compuestos bioactivos y precursores de sabor [80, 83]. Cepas de *L. plantarum* fueron capaces de degradar algunos CF de los alimentos dando compuestos que influyen en el aroma de los alimentos, así como compuestos que presentan una mayor actividad antioxidante [82].

Aunque la mayoría de las **vitaminas** están presentes en una gran variedad de alimentos, las deficiencias de éstas todavía existen en muchos países, no solo como resultado de una ingesta insuficiente de alimentos, sino también debido a dietas desequilibradas o estados fisiológicos como el embarazo o la vejez. Los humanos no pueden sintetizar la mayoría de las vitaminas, por lo cual ellas deben proporcionarse de manera exógena a través de la dieta o productos farmacéuticos. Ciertas BAL tienen la capacidad de producir niveles elevados de vitaminas, por lo tanto son las candidatas ideales para administrar vitaminas, entre otros compuestos específicos en los alimentos o producirlos *in situ* en el intestino. Una estrategia de la biotecnología es utilizar estas BAL como alternativa a la fortificación obligatoria en muchos países para reducir deficiencias, disminuyendo los efectos secundarios de las vitaminas sintetizadas químicamente que se usan normalmente. Los productos de cereales/pseudocereales contienen solo cantidades bajas de vitaminas del grupo B debido a su pérdida durante los métodos de procesamiento, lo que afecta el valor nutricional de los productos. Se han aplicado diferentes estrategias para mejorar la producción microbiana de vitaminas durante la fermentación. La producción de riboflavina (B_2) y folato (B_9) por BAL aisladas de quinoa y amaranto fue demostrada [84, 85]. La producción de B_2 y B_9 fue dependiente de cepa, *L. plantarum* CRL 2106 y CRL 2107 y *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CRL 2131, cepas aisladas de masas ácidas y granos de amaranto sintetizaron las concentraciones más elevadas de vitamina B_2 y B_9 (140-250 ng/ml). Asimismo, *L. plantarum* CRL 1973 y CRL 1970, *L. rhamnosus* CRL 1972 y *L. sakei* CRL 1978, cepas aisladas de quinoa produjeron altas concentraciones de B_9, siendo *L. plantarum* CRL 1973 la cepa que produjo la mayor concentración de vitamina (143 ± 8 ng/ml). Mientras que *L. rhamnosus*, aislado de masas ácidas de quinoa, fue la especie de BAL que produjo las concentraciones más elevadas de riboflavina total (> 270 ng/ml), siendo *L. rhamnosus* CRL 1963 la que produjo la mayor concentración de B_2 (360 ± 10 ng/ml). Algunas cepas pudieron producir ambas vitaminas, lo cual es importante para desarrollar nuevos alimentos fermentados a base de pseudocereales biofortificados en folatos y riboflavina. Estos productos podrían usarse

como parte de una dieta normal para prevenir las deficiencias vitamínicas que existen en todo el mundo. Asimismo, se aislaron varias BAL productores de vitamina B_2 de harina de trigo [86]. La cepa *L. fermentum* PBCC11, aislada de masa madre, fue capaz de producir riboflavina y su empleo junto con la levadura de panificación en la preparación de pan produjo un importante incremento en el contenido final de vitamina B_2 [87].

V. Alimentos fermentados derivados de cereales

V.A. Panificados

Dentro de los alimentos fermentados derivados de cereales, el de mayor consumo en el mundo es el pan. El Código Alimentario Argentino, define el producto alimenticio conocido como Pan en su Capítulo IX: (Alimentos Farináceos - cereales, harinas y derivados). Con la denominación genérica de "pan", se entiende el producto obtenido por la cocción en hornos y a temperatura conveniente de una masa fermentada o no, hecha con harina y agua potable, con o sin el agregado de levadura, con o sin la adición de sal, con o sin la adición de otras substancias permitidas para esta clase de productos alimenticios. Entre los cereales, solo el trigo y el centeno son adecuados para la elaboración de pan debido a la presencia de cantidades adecuadas (8-14%) de la proteína compleja gluten.

En la década de 1990 aparecieron en Europa panaderías artesanales dirigidas a una clientela deseosa del sabor clásico del pan. Desde comienzos del siglo XXI, el 70% del pan consumido en el mundo es de harina de trigo. La introducción de los denominados panes integrales cobró fuerza debido a los beneficios de la fibra que contienen, lo que produjo un paulatino retorno al pan elaborado con harinas poco refinadas.

Respecto a la producción de trigo, según el Ministerio de Hacienda de la Nación la producción de trigo en Argentina ocupa el 3° lugar entre los granos, después de la soja y el maíz. En Argentina se produce casi exclusivamente trigo de tipo duro o trigo pan, en tanto que el candeal o trigo-fideo representa entre el 1 y 1,5% de la producción nacional, y el blando o "galletitero", directamente no se cultiva. En Argentina funcionan más de 180 molinos harineros. El principal destino industrial de la harina es el pan tradicional, representando un 70% del total. El resto se distribuye entre harina fraccionada para consumo familiar, pastas alimenticias, galletitas y pan industrial.

Cabe destacar que la Ley Nacional 25630 del Poder Ejecutivo Nacional sancionada en julio del 2002 establece que la harina de trigo destinada al consumo que se comercializa en el mercado nacional, debe ser fortificada con hierro (30 mg/kg), ácido fólico (2,2 mg/kg), tiamina (B1) (6,3 mg/kg), riboflavina (1,3 mg/kg) y niacina (13 mg/kg) a fin de prevenir las anemias y las malformaciones del tubo neural, tales como la anencefalia y la espina bífida.

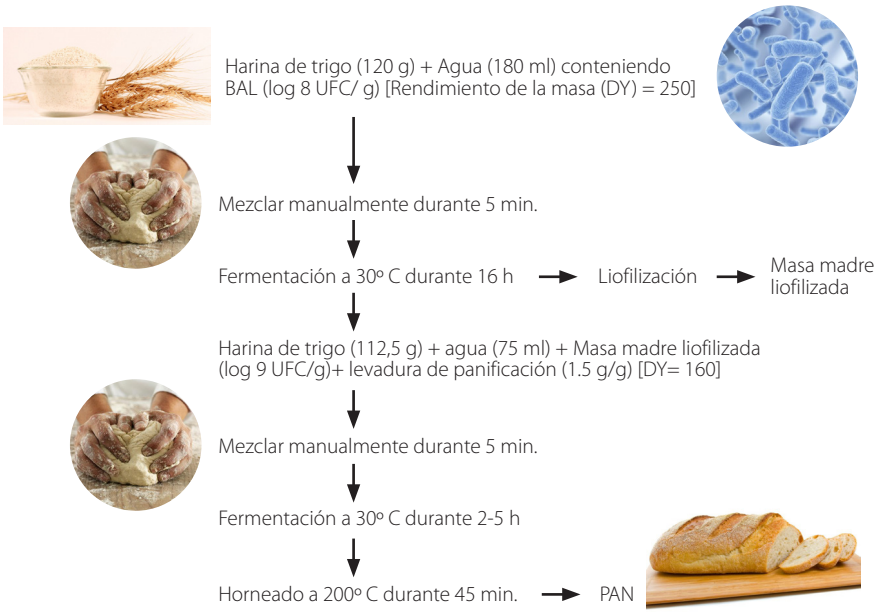
A diferencia de nuestro país, en Alemania, los productos de panificación se basan en harina de centeno debido a que este cultivo prevalece en esta región y las condiciones

climáticas en Alemania, especialmente en las regiones norte y este, dificultan el crecimiento trigo [41].

El pan tradicional de panadería se obtiene a través de un proceso no automatizado, con bajos niveles de tecnificación y es intensivo en mano de obra. Por otro lado, el pan industrial incluye variedades de pan de molde y panes de bollería (pan para pancho, hamburguesas y otros), elaborados en plantas industriales que cuentan con líneas de producción automatizadas o semi automatizadas, y utilizan tecnologías de producción intensivas en capital.

El proceso de elaboración de pan de masa madre empleando harina de trigo y cultivos iniciadores se presenta en la Figura 2.

Figura 2. Protocolo de fermentación para la preparación de panes de masa madre de harina de trigo fermentada con cultivos iniciadores.



Rendimiento de la masa (DY)= [(peso masa / peso de harina) x 100].

V.B. Pastas

Las pastas son uno de los alimentos que se consumen en grandes cantidades en todo el mundo debido a su importancia nutritiva, contiene cantidades significativas de carbohidratos complejos, proteínas, hierro y vitaminas B. Las proteínas que forman el gluten son fundamentales para la fabricación de pasta, la más adecuada es de trigo duro [88]. En las tendencias actuales, un importante campo de aplicación de la biotecnología basada en BAL es el creciente mercado de productos sin gluten (GF). Este interesante nicho requiere

aportes innovadores, también en el segmento de pastas dado que la fabricación estándar de pasta no incluye una etapa de fermentación. Hay dos rutas principales para lograr este propósito: (i) el uso de BAL seleccionadas para degradar el gluten y (ii) el empleo de una BAL particular para aumentar la calidad de los productos GF [86]. La primera estrategia fue aplicada en la fabricación de pasta. Un nuevo protocolo fue aplicado para la fabricación de pasta sin gluten que utiliza harina de trigo completamente hidrolizada que mejora las propiedades sensoriales, digestibilidad y calidad nutricional y también harina de arroz pregelatinizada, necesaria para conferir al producto características tecnológicas y comerciales satisfactorias [89]. El segundo enfoque considera a las BAL como "fábricas generadoras de bio-moléculas funcionales e ingredientes alimenticios para la elaboración de productos de cereales GF de alta calidad", con el objetivo de mejorar la textura, aroma, propiedades nutricionales, vida útil y beneficios para la salud [90]. Dentro de este segundo enfoque se reportó la elaboración de una pasta bio-enriquecida en riboflavina (B_2), ácido fólico (B_9) y minerales utilizando harina de quinoa y BAL seleccionadas. La pasta bio-enriquecida fermentada por BAL fue capaz de prevenir deficiencias nutricionales en un modelo animal (*in vivo*) (ver Figura 3). Este nuevo proceso biotecnológico empleando BAL autóctonas en el diseño de alimentos funcionales derivados de granos andinos podría ser una estrategia novedosa para prevenir deficiencias de vitaminas y minerales y podría ser una alternativa a la fortificación química respondiendo a la demanda de los consumidores por productos más naturales y saludables [57].

Figura 3. Preparación de pastas bioenriquecidas.

La figura muestra un ejemplo de cómo se pueden usar BAL autóctonas seleccionadas para obtener nuevos alimentos fermentados (la pasta hecha con harina de quinoa) con efectos beneficiosos comprobados para prevenir las deficiencias de vitaminas.

V.C. Alimentos y bebidas africanos tradicionales derivados de cereales fermentados

El pan es el alimento fermentado a base de cereal más popular, sin embargo, muchos otros alimentos indígenas fermentados a base de granos se preparan en todo el mundo. En África se consumen gran cantidad de alimentos fermentados que incluyen leches fermentadas, papillas agrias y bebidas alcohólicas y no alcohólicas y representan un valioso patrimonio cultural que cuenta con una de las selecciones más ricas de productos alimenticios fermentados en el mundo. Los cereales fermentados naturalmente representan hasta el 80% del consumo total de calorías en muchos países africanos [91]. De los diversos tipos de fermentaciones utilizadas para obtener alimentos y bebidas fermentadas, las fermentaciones ácido láctico y alcohólicas son las más populares. Las BAL se utilizan en comunidades africanas para producir una variedad de alimentos fermentados que incluyen papillas a base de cereal, bebidas, frutas y verduras fermentadas (incluyendo raíces o tubérculos), leches fermentadas y carnes fermentadas [92, 93]. Por lo general, en África los procesos de fermentación de alimentos son en su mayoría espontáneos, por lo tanto, la fermentación no depende de cultivos iniciadores bien definidos y el tiempo de fermentación y las temperaturas son escasamente controladas, lo que lleva a variaciones en la calidad de los productos. Asimismo, en África, la deficiencia de folato está relacionada con la baja diversidad de las dietas y concentraciones de nutrientes en alimentos complementarios para bebés [94]. Para contrarrestar este problema, se sugirió que las papillas también se pueden consumir después de la fermentación con BAL seleccionadas que pueden mejorar su calidad nutricional general, especialmente al aumentar las concentraciones de vitaminas B_9 y B_2. Algunos alimentos fermentados son preparados con cereales en combinación con legumbres, mejorando así la calidad proteica general del producto fermentado [95]. La mayoría de estos productos fermentados se producen en pequeña escala en pequeñas y medianas empresas (PyMEs) o en el hogar por fermentación espontánea, a veces incluida la inoculación mediante *backslopping* o el uso repetido del mismo contenedor de fermentación [96].

Los productos alimenticios a base de cereales fermentados producidos en países africanos pueden clasificarse en función de los ingredientes de cereales crudos utilizados en su preparación o en función de la textura. En la primera clasificación se considera a) alimentos a base de trigo: bouza, kishk; b) de arroz: busa; c) de maíz: ogi, pan, kenkey; d) de mijo: kunuzaki; e) de sorgo: pito, ogi, bogobe, kisra, burukutu, kisra, injera. Respecto a su textura, se clasifican como a) líquidos (papillas): ogi, mahewu, burukutu, pito, uji; b) sólidos (masa) y albóndigas: kenkey, agidi; c) secos (pan): kisra, injera [5]. A continuación, se describen algunos de estos alimentos tradicionales.

El **Ogi** es una papilla de cereal fermentada procesada de maíz, aunque el sorgo o el mijo también se emplean como sustrato para fermentación. Es considerado el alimento más importante en África occidental y típico de Nigeria [97, 98]. A lo largo de la región de la costa de África occidental al producto se le dan otros nombres como eko, agidi, kamu, akamu, koko y furah dependiendo del sustrato utilizado y la forma en que se

come. Para la preparación de ogi (ver Figura 4), se humedecen los granos de cereal en macetas durante 2 a 3 días. Los granos son molidos en húmedo y mojados para producir una suspensión; luego son tamizados, la mezcla se deja sedimentar para que se produzca la fermentación durante 2 a 3 días para obtener el ogi [99]. Las BAL, levaduras y mohos son responsables de la fermentación, aunque *L. plantarum* es el microorganismo predominante. Otras bacterias como *Corynebacterium* hidrolizan el almidón de maíz y luego las levaduras de las especies de *Saccharomyces* y *Candida* también contribuyen para desarrollar el sabor [32]. El valor nutricional del ogi ha sido determinado; durante la fermentación aumenta el contenido de fósforo por hidrólisis del fitato [100] y la concentración de niacina y riboflavina [101]. Sin embargo, aproximadamente del 20 al 50% de los nutrientes disponibles en los granos de cereales originales se pierden a través del procesamiento debido a la pérdida de la capa de aleurona y germen de los granos durante la molienda y tamizado en húmedo [102]. Específicamente, el análisis de aminoácidos del ogi y sus materias primas indica sustanciales pérdidas de lisina y triptófano [103]. Para evitar estas pérdidas, cepas mutantes de *Lactobacillus* y levaduras productoras de lisina y metionina se han utilizado para fortificar ogi [104].

Figura 4. Diagrama de flujo para la preparación de Ogi, Kenkey y Mawe

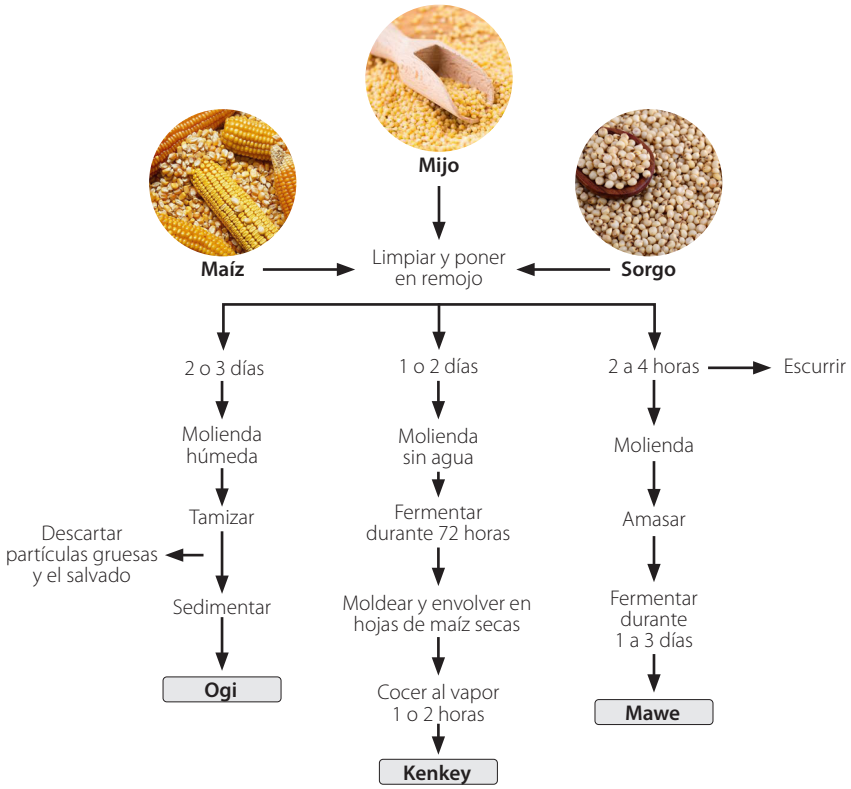


Figura adaptada de [109].

El licor de ogi fermentado se considera un alimento preventivo en enfermedades comunes relacionadas con diarrea y molestias abdominales. Se reportó que muchas madres lactantes en diferentes lugares de Nigeria les dan a sus bebés licor de ogi (agua de la pulpa de cereal fermentada), lo cual soluciona problemas como las diarreas y molestias abdominales [105]. Se evaluaron las actividades antibacterianas del licor de ogi de diferentes granos contra algunas bacterias diarreicas comunes en el suroeste de Nigeria. Se puso en evidencia la inhibición de los patógenos por el licor de ogi que contiene una gran variedad de organismos, incluidas ciertas especies de *Lactobacillus* [106].

El color del ogi depende del grano de cereal utilizado: blanco crema para maíz, marrón rojizo para sorgo, y gris oscuro para el mijo [107]. Ogi tiene un sabor agrio similar al del yogur y un aroma distintivo, que lo hace diferente de otros productos fermentados a base de cereales [108].

Por su parte, el **kenkey** es una masa de maíz fermentada que se come en Ghana. Para su preparación, los granos de maíz se sumergen en agua a temperatura ambiente durante 1 a 2 días, después el agua es escurrida antes de moler en húmedo el grano hidrolizado. Luego la harina de maíz se deja fermentar espontáneamente durante 72 h. La masa del kenkey se puede dividir en porciones, darle forma de bolitas y colocarlas en hojas de maíz secas. Las hojas se deben atar con una cuerda para evitar que se abran por el calor [109] (ver Figura 4). La fermentación está dominada por una variedad de BAL, particularmente *L. fermentum* y *L. reuteri* [110], aunque levaduras y mohos (*Candida*, *Saccharomyces*, *Penicillium, Aspergillus* y especies de *Fusarium*) también contribuyen al desarrollo del sabor [111].

El **mawè** es una masa a base de cereal fermentado espontáneamente y constituye una parte importante de la ingesta diaria de alimentos de África occidental. Existen diferentes tipos de mawè de acuerdo al tipo de cereal y/o condiciones de producción, con fermentaciones que duran 24-72 h. Se prepara con cereales (maíz, sorgo, mijo o arroz) descascarados (ver Figura 4). El mawè se utiliza para la preparación de una variedad de platos cocinados tradicionales de África occidental, incluida la pasta (makumè, akassa y come), papillas (koko y aklui) y bebidas (akpan). BAL y levaduras son los microorganismos predominantes que participan en la fermentación espontánea de mawè, siendo *L. fermentum* y *P. kudriavzevii* las especies más importantes, cuya diversidad de cepas fue influenciada por el tipo de cereal y el sitio de producción [112].

El **hussuwa** es un alimento semisólido, parecido a una masa. Tradicionalmente, la producción se basa en la fermentación espontánea por la microbiota autóctona. Es producido a partir de una pasta semisólida de harina y malta de sorgo en una proporción de 2:1. La pasta se deja fermentar durante 12 h, después se cocina ligeramente en forma de masa o como panqueques, se deja enfriar y se añade otra parte (mitad) de malta de sorgo a la masa, se amasa y se deja fermentar durante otras 24 a 48 h. Luego se cocina en un plato caliente hasta que expulse toda la humedad, se forman bolitas del tamaño de un puño y se fermenta en una olla de barro enterrada debajo de la chimenea hasta dos meses, lo que garantiza una temperatura cálida continua durante todo el período para promover la fermentación láctica y alcohólica

mixta [113], lo que finalmente produce un producto agridulce. El hussuwa, al igual que muchos otros alimentos africanos fermentados, se prepara de forma tradicional, a pequeña escala y a nivel de producción casera. Debido a lo cual, los alimentos indígenas a menudo sufren problemas como calidad inconsistente, riesgos higiénicos y corta vida útil [114]. La combinación de pruebas fenotípicas y métodos genotípicos como ARDRA, rep-PCR y RAPD-PCR, así como la secuenciación del gen 16S rRNA pusieron en evidencia que los aislamientos predominantes de hussuwa consistieron en cepas heterofermentativas de *L. fermentum*, mientras que *Pediococcus*, especialmente las cepas de *P. acidilactici*, constituyeron la segunda especie de BAL más comunes presentes en este alimento fermentado [115].

Injera (Enjera) es la comida nacional indiscutible de Etíopes [108]. Se puede hacer de diferentes cereales, como sorgo, tef, maíz, mijo y cebada; aunque el tef (*Eragrostis tef*) es el principal cereal en la injera etíope, seguido por el sorgo. Para hacer injera los granos se descascaran manualmente o mecánicamente y son molidos en harina, la cual se mezcla con agua para formar una masa, se agrega el iniciador (ersho) y se fermenta durante 2 o 3 días. El cultivo iniciador es un fluido proveniente de la masa fermentada previamente. Después de la fermentación, la masa se diluye y se vierte en una sartén ligeramente engrasada, que luego es cubierta con una tapa bien ajustada para retener el vapor [116]. A los 2-3 minutos es retirado de la sartén y colocado en una canasta. El período de almacenamiento no suele exceder 3 días a temperatura ambiente. Los microorganismos implicados en la fermentación de las injeras son principalmente levaduras, algunos hongos como *Pullaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhodotorula* sp., *Hormodendrum* sp., *Candida* sp. y un número no identificados de bacterias [117]. Una injera normal y típica es redonda, suave, esponjosa y resistente, de aproximadamente 6 mm de espesor, 60 cm de diámetro con "ojos" en forma de panal uniformemente espaciados en la parte superior. El principal atributo de calidad de una buena injera es su sabor ligeramente agrio; además posee elevado valor nutricional, ya que es rico en calcio e hierro [118].

La bebida mahewu (amahewu) es una bebida no alcohólica agria elaborada con harina de maíz, consumida en África y algunos países del Golfo Arábigo [108]. Se prepara a partir de papillas de maíz, que se mezcla con agua. Luego se añade harina de sorgo, malta de mijo o trigo y se deja fermentar. La fermentación es un proceso espontáneo llevado a cabo por la flora natural de la malta a temperatura ambiente. El microorganismo predominante en la fermentación espontánea del mahewu africano es *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* [99]. *L. bulgaricus* y *L. brevis* también fueron aislados de mahewu. La produccion industrial de mahewu se lleva a cabo con éxito en Zimbawe.

A pesar de la popularidad de todos estos alimentos tradicionales africanos, la falta de control del proceso de fermentación inevitablemente resulta en una variación significativa en la calidad y seguridad microbiológica de los mismos. También se presenta el problema de limitación de nutrientes en alimentos a base de cereales por lo cual se añaden legumbres, caupí y maní para mejorar la composición nutricional. El uso de cultivos iniciadores apropiados capaces de conducir la fermentación hacia alimentos con características funcionales deseables, tales como mayor biodisponibilidad de

minerales, vitaminas y aminoácidos esenciales, tiene gran potencial para su aplicación en estos alimentos indígenas africanos.

Algunas de las bebidas de cereales se consumen en un estado activo de fermentación. El número de cultivos vivos en estos alimentos puede tener enorme potencial como candidatos para la producción de alimentos probióticos. La selección cuidadosa de estas bacterias brindará la oportunidad de desarrollar alimentos que no solo cumplan requisitos comerciales, sino también les otorguen funcionalidad a los mismos [119, 120, 121]. Actualmente, los probióticos populares se encuentran mayormente en productos lácteos fermentados. Sin embargo, con el creciente número de consumidores con intolerancia a la lactosa o que se ven afectados por el colesterol de los productos lácteos, existe un creciente interés mundial en los probióticos de otras fuentes alimentarias. Hay algunos nuevos alimentos fermentados a base de cereales que se consideran productos probióticos (por ejemplo, yosa) [122].

En África, los esfuerzos destinados a aprovechar el potencial alimentario y de salud de productos fermentados podría ayudar a controlar algunos desafíos como la deficiencia de nutrientes esenciales (proteínas, vitaminas, minerales), seguridad alimentaria y doble carga de enfermedades crónicas e infecciosas que enfrentan muchos países de la región. El establecimiento y la financiación de las colaboraciones científicas entre Europa y África deberían ser una prioridad para abordar los problemas de desnutrición, enfermedades y mortalidad infantil.

V.D. Alimentos y bebidas latinoamericanos tradicionales derivados de cereales fermentados

V.D.1. El **pozol** es una masa de maíz fermentada con diferentes formas y tamaños. Se consume en Sudeste de México por indios y grupos mestizos, para quienes suele ser un componente principal de la dieta diaria. Para prepararlo, los granos de maíz se hierven en agua con cal durante aproximadamente dos horas hasta que se hinchan los granos y se desprenden las cáscaras. Se muelen y la masa resultante se amasa y se forman bolas compactas que se envuelven en hojas de plátano, se dejan a temperatura ambiente desde unas pocas horas hasta varios días e incluso más de un mes. Una compleja comunidad microbiana que se incorpora principalmente durante el procedimiento de molienda fermenta la masa [123]. *Lactococcus lactis, Streptococcus suis, L. plantarum, L. casei, L. alimentarium, L. delbruekii* y *Clostridium* sp. han sido los microorganismos más abundantes identificados en el pozol [124].

V.D.2. Los productos fermentados de cereales, en particular los derivados del maíz como la **chicha**, son muy importantes en América Latina y se han consumido como alimento básico principal durante siglos. La chicha es la bebida fermentada tradicional más importante que se produce desde

tiempos prehispánicos en regiones del noroeste de Argentina y regiones andinas de Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú, siendo consumidos principalmente por la población nativa durante las festividades religiosas y agrícolas y durante eventos familiares y sociales [125]. La preparación de chicha es un proceso de fermentación único en el que, tradicionalmente, la saliva sirve como fuente de amilasa para la conversión de almidón en azúcares fermentables [126]. Levaduras, particularmente *S. cerevisiae,* y bacterias del género *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Acetobacter* sp. con varios mohos como *Aspergillus* sp. son los principales microorganismos de la fermentación de la chicha [127]. Se determinó la evolución de las comunidades microbianas durante la fabricación de chicha. Entre las 46 especies de BAL identificadas, las de *Lactobacillus* fueron dominantes, exhibiendo la mayor diversidad, mientras que *Enterococcus* y *Leuconostoc* se registraron como los segundos géneros dominantes. La identificación a nivel de especie mostró el predominio de *L. plantarum, L. rossiae, Lc. lactis, W. viridescens, Enterococcus hirae, E. faecium, Lc. mesenteroides* y *Weissella confusa* [128].

Los alimentos a base de maíz, como el **atole agrio,** pertenecen a la dieta tradicional de las poblaciones indígenas de Mesoamérica [129]. El atole agrio es una bebida mexicana, no alcohólica, ácida, derivada del maíz fermentado; se consume en el sureste de México y es utilizado por grupos indígenas y mestizos con fines nutricionales, medicinales y ceremoniales [130]. Se prepara tradicionalmente por fermentación espontánea en los hogares, y las materias primas, los equipos y los procesos de fabricación difieren notablemente entre lotes y productores que conducen a productos finales altamente variables. El atole agrio se puede preparar por fermentación en estado líquido o sólido. El producto final es aromatizado con azúcar, canela o cacao o se consume como tal. En comparación con otros productos similares, producidos a través de fermentación en estado líquido (ogi) o sólido (pozol, chorote, poto-poto), el proceso de elaboración de atole agrio tiene solo unos pocos pasos, el maíz no se hierve ni se empapa antes de la fermentación, la duración de la fermentación es sólo horas en lugar de días, y el producto final se hierve antes del consumo [131]. El proceso de fermentación de atole agrio fue variable y se observó abundante *Enterobacteriaceae* durante la fermentación. Basado en métodos RAPD PCR, se determinó que los géneros de BAL más abundantes fueron *Weissella* (29.2%), *Pediococcus* (24.0%), *Lactococcus* (17.8%) y *Lactobacillus* (16.4%). Asimismo, esta microbiota determinada en el atole agrio mostró importantes propiedades: producción de folatos, degradación de fitatos, producción de EPS, actividad amilolítica y la mayoría de las cepas fueron resistentes al menos a 2 de los 9 antibióticos seleccionados. La gran variabilidad de las densidades microbianas en las fermentaciones de atole agrio, donde *Enterobacteriaceae* estaban presentes en los productos finales independientemente del procedimiento de ebullición, establece la necesidad del empleo de un cultivo iniciador bien definido para controlar el proceso de fermentación [132].

VI. Conclusiones

La fermentación láctica es un proceso ancestral de conservación de alimentos pero con renovado interés en la actualidad. Numerosos reportes muestran la versatilidad de las características funcional/nutricional de la fermentación de masa madre. Los esfuerzos futuros deben centrarse en procesos específicos y BAL/levaduras de masa madre seleccionadas óptimamente, dependiendo de las características funcionales/nutricionales de la materia prima y las deseadas en el alimento fermentado. La perspectiva intermedia sería probablemente considerar la masa madre como una fábrica de células para modificar el sustrato (cereales/pseudocereales). La formación o modificación de compuestos bioactivos durante la fermentación de masa madre permitiría desarrollar productos horneados con funcionalidad nutricional específica.

Asimismo, las BAL y levaduras contribuyen significativamente a la fermentación de muchos alimentos y bebidas tradicionales producidos en África y Latinoamérica. Sin embargo, aún se requiere conocimiento académico, determinar las variaciones de cepas, actualizar métodos de producción de cultivos iniciadores, evaluar las interacciones microbianas y los procesos de elaboración. Solo profundizando en estos temas se podrá garantizar la sostenibilidad de estos productos fermentados autóctonos; siendo muy importantes no sólo para la generación de ingresos sino también podrían ayudar a controlar algunos desafíos alimentarios y de salud que enfrentan muchos países de estas regiones.

VII. Declaración de posibles conflictos de interés

Los autores no declaran poseer conflictos de interés.

VIII. Bibliografía citada

[1] Hermann M. (2009) The impact of the European Novel Food Regulation on trade and food innovation based on traditional plant foods from developing coutries. Food Policy. 34:499–507.

[2] Funk C., Brown M.E. (2009) Declining Global Per Capita Agricultural Production and Warming Oceans Threaten Food Security. Lincoln, NE: NASA Publications; University of Nebraska.

[3] Stiles M.E. (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. 70:331–45.

[4] Steinkraus H K. (1997) Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. Food Control. 8:311–317.

[5] Blandino A., Al-Aseeri M.E., Pandiella S.S., Cantero D., Webb C. (2003) Cereal-based fermented foods and beverages. Food Research International. 36:527–543.

[6] Carr F.J., Chill D., Maida N. (2002) The lactic acid bacteria: a literatura survey. Crit Rev Microbiol. 28:281–370.

[7] Axelsson L. (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology in lactic acid bacteria. In: Salminen S, Ouwehand A, editors. Microbiological and Functional Aspects, 3rd ed. New York, NY: Marcel Dekker Inc.. p. 1–66.

[8] Holzapfel W.H., Wood B.J.B. editors. Introduction to the lactic acid bacteria. In: Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy.West Sussex: JohnWiley & Sons, Ltd. (2014) p. 1–12.

[9] Kocková M., Mendel J., Medvedová A., Šturdík E., Valík L. (2013) Cereals and ppseudocereals as substrates for growth and metabolism of a probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. J Food Nutr Res. 52:25–36.

[10] Gobbetti M., Minervini F., Pontonio E., Di Cagno R., De Angelis M. (2016) Drivers for the establishment and composition of the sourdoug lactic acid bacteria biota. Int J Food Microbiol. 239:3–18.

[11] Salovaara H. Lactic acid bacteria in cereal-based products. In: Salminen S, von Wright A, ed. Lactic acid bacteria—Microbiology and functional aspects. New York, NY: Marcel Dekker; (1988):115-137.

[12] Hammes W.P., Gänzle M.G. Sourdough breads and related products. In: Woods BJB, ed. Microbiology of Fermented Foods Vol. 1. London: Blackie Academic/Professional; (1998): 199-216.

[13] Di Cagno R., De Angelis M., Auricchio S., Greco L., Clarke C., De Vincenzi M., Giovannini C., D'Archivio M., Landolfo F., Parrilli G., Minervini F., Arendt E., Gobbetti M. (2004) Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. Applied and Environmental Microbiology. 70:1088 -1096.

[14] Gerez C.L., Font de Valdez G., Rollán G. (2008) Functionality of lactic acid bacteria peptidase activities in the hydrolysis of gliadin-like fragments. Letters in Applied Microbiology. 47:427-432.

[15] De Angelis M., Cassone A., Rizzello C.G., Gagliardi F., Minervini .F, Calasso M., Di Cagno R., Francavilla R., Gobbetti M. (2010) Mechanism of degradation of immunogenic gluten epitopes from Triticum turgidum L. var. durum by sourdough lactobacilli and fungal proteases. Applied and Environmental Microbiology. 76: 508-518.

[16] Vytaute S., Elena B., Vadims B., Janis R., Daiva Z. (2016) Amino acids profile and antioxidant activity of different Lupinusangustifolius seeds after solid state and submerged fermentations. J Food Sci Technol 53(12): 4141-4148.

[17] Charalampopoulos D.,Wang R., Pandiella S.S.,Webb C. (2002) Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. Int J Food Microbiol. 79:131–41.

[18] Hammes W.P., Brandt M.J., Francis K.L., Rosenheim J., Seitter M.F.H., Vogelmann S.A. (2005) Microbial ecology of cereal fermentation. Trends Food Sci Technol 16: 4-11.

[19] De Anton Migliorati M., Bell M., Grace P.R., Scheer C., Rowlings D.W., Liu S. (2015) Legume pastures can reduce N2O emissions intensity in subtropical cereal cropping systems. Agric Ecosyst Environ. 204:27–39.

[20] Jideani I.A., Jideani V.A. (2011). Developments on the cereal grains *Digitaria exilis* (acha) and *Digitaria iburua* (iburu). Journal of Food Science and Technology 48: 251-259.

[21] Alvarez-Jubete, L., Arendt, E. K., Gallagher, E. (2010) Nutritive value of ppseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. Trends. Food Sci. Technol. 21: 106–113.

[22] Jacobsen S. E. (2003): The Worldwide Potential for Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Food Reviews International 19: 167-177.

[23] Jacobsen S. E., Mujica A. and Jensen C. R. (2003) The resistance of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to adverse abiotic factors. Food Reviews International 19 (1–2):99–109.

[24] Mota C., Santos M., Mauro, R., Samman N., Matos A.S., Torres D., Castanheira I. (2016) Protein content and amino acids profile of ppseudocereals. Food Chem. 19: 55–61.

[25] Graf B. L., Rojas-Silva P., Rojo L. E., Delatorre-Herrera J., Baldeón M.E., Raskin I. (2015) Innovations in health value and functional food development of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 14: 431–445.

[26] Jahaniaval F., Kakuda Y., Marcone M. F. (2000) Fatty acid and triacylglycerol compositions of seed oils of five Amaranthus accessions and their comparison to other oils. J. Am. Oil Chem. Soc. 77: 847–852.

[27] Vega-Gálvez A., Miranda M., Vergara J., Uribe E., Puente L., Martínez E.A. (2010) Nutrition facts and functional potential of quinoa (Chenopodium quinoa willd.), an ancient Andean grain: a review. Journal of the Science of Food and Agriculture 90: 2541-2547.

[28] Repo-Carrasco R., Espinoza C., Jacobsen S. E. (2003) Nutritional value and use of the andean crops Quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). Food Rev. Internat. 19:179–189.

[29] Tang Y., Li X., Zhang B., Chen P. X., Liu R., Tsao R. (2015) Characterisation of phenolics, betanins and antioxidant activities in seeds of three Chenopodium quinoa Willd. genotypes. Food Chem. 166: 380–388.

[30] Lopez H.W., Leenhardt F., Coudray C., Remesy C. (2002) Minerals and phytic acid interactions:is it a real problem for human nutrition? Int J Food Sci Technol 37(7):727– 739.

[31] Rivera-Espinoza Y., Gallardo-Navaro Y. (2010) Non-dairy probiotic products. Food Microbiology. 27:1–11.

[32] Caplice E:, Fitzgerald G:F. (1999) Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology. 50:131–149.

[33] Prajapati J.B., Nair B.M. The history of fermented foods. In: Farnworth ER, editor. Handbook of Fermented Functional Foods. 2nd ed. London: CRC Press; 2008. p. 1–24.

[34] Bourdichon F., Casaregola S., Farrokh C., Frisvad J. C., Gerds M. L., Hammes W. P., Harnett J., Huys G., Laulund S., Ouwehand A., Powell I.B., Prajapati J.B, Seto Y., Ter Schure E., Van Boven A., Zgoda A., Tuijtelaars S., Hansen E.B. (2012) Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. Int. J. Food Microbiol. 154, 87–97.

[35] Thapa N., Tamang J. P. Functionality and therapeutic values of fermented foods, in Health Benefits of Fermented Foods, ed. J. P. Tamang (New York: CRC Press) (2015). 111–168.

[36] Ray M.K., Singh G.S., Mondal K.C. (2016) Folk to functional: an explorative overview of rice based fermented foods and beverages in India. J Ethn Foods 3:5–18

[37] Juodeikiene G., Bartkiene E., Viskelis, P, Urbonaviciene D., Eidukonyte D., Bobinas C. (2012). Fermentation processes using lactic acid bacteria producing bacteriocins for preservation and improving functional properties of food products. In Biochemistry, genetics and molecular biology: Advances in applied biotechnology, ed. M. Petre, 63–100. Rijeka, Croatia: InTech.

[38] De Vuyst L., Neysens P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. Trends in Food Science and Technology 16: 43-56.

[39] Corsetti A., Settanni L. (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation. Food Research International 40: 539–558.

[40] Währen M. (1985). Die entwicklungsstationen vom korn zum brot in 5. und 4. jahrtausend. Neueste untersuchungsergebnisse von ausgrabungsfunden. Getreide Mehl und Brot. 39: 373–379.

[41] Brandt M.K. (2007) Sourdough products for convenient use in baking. Food Microbiol 24: 161-164.

[42] De Vuyst L., Gänzle, M. (2005). Special Issue Second International Symposium on Sourdough: From Fundamentals to Applications. Trends in Food Science and Technology. 16: 1-124.

[43] Scheirlinck I., Van der Meulen R., De Vuyst L., Vandamme P., Huys G. (2009). Molecular source tracking of predominant lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs and their production environments. Journal of Applied Microbiology 106: 1081-1092.

[44] De Vuyst L., Van Kerrebroeck S., Harth H., Huys G., Daniel H.-M., Weckx, S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? Food Microbiology 37: 11- 29.

[45] Gobbetti M., De Angelis M., Di Cagno R., CalassoM., Archetti, G., Rizzello C. G. (2018) Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation. International Journal of Food Microbiology 302: 103-113.

[46] Salovaara H. Lactic acid bacteria in cereal-based products, lactic acid bacteria. In: Salminen S, von Wright A, Ouwehand A, editors. Microbiological and Functional Aspects. 3rd ed. New York, NY: Marcel Dekker, Inc. (2004). p. 431–52.

[47] Gobbetti M. (1998). The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. Trends in Food Science and Technology 9: 267- 274.

[48] Hugenholtz J (2008) The lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredient production. Int Dairy J. 18: 466-475.

[49] Leroy F., De Vuyst, L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science & Technology 15: 67–78.

[50] Balarabe M.M., Mohammed S., Sambo D., Shehu I. (2017) The Role of Biotechnology in Food Production and Processing. Industrial Engineering 1(1): 24-35.

[51] De Vuyst L., Harth H., Van Kerrebroeck S., Leroy F. (2016) Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. International Journal of Food Microbiology 239: 26-34.

[52] Gänzle M. G., Loponen J., Gobbetti M. (2008) Proteolysis in sourdough fermentations: Mechanisms and potential for improved bread quality. Trends in Food Science and Technology, 19: 513-521..

[53] De Vuyst L., Van Kerrebroeck S., Leroy F. (2017) Microbial ecology and process Technology of Sourdough Fermentation. Adv. Appl. Microbiol. 100: 49–160

[54] Gobbetti M., Rizzello C.G., Di Cagno R., De Angelis M. (2014) How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. Food Microbiol. 37: 30–40.

[55] Zannini E., Pontonio E., Waters D.M., Arendt E.K. (2012) Applications of microbial fermentations for production of gluten-free products and perspectives. Appl. Microbiol. Biotechnol. 93: 473–485.

[56] Filannino P., Di Cagno R., Gobbetti M. (2018) Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth. Current Opinion in Biotechnology 49:64–72.

[57] Carrizo S.L., de Moreno de LeBlanc A., LeBlanc J.G., Rollán G.C. (2020) Quinoa pasta fermented with lactic acid bacteria prevents nutritional deficiencies in mice. Food Research International 127, 108735.

[58] Gänzle M. G. (2014). Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. Food Microbiology, 37: 2-10.

[59] Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., Gobbetti M. (2000) Purification and characterization of novel antifungal compounds by sourdough *Lactobacillus plantarum* 21B. Applied and Environmental Microbiology, 66: 4084-4090.

[60] Gerez C.L., Torino M.I., Rollán G., Font de Valdez G. (2009) Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. Food Control 20: 144-148.

[61] Dallagnol A.M., Pescuma M., Rollán G., Torino M.I., Font de Valdez G. (2015) Optimization of lactic ferment with quinoa flour as bio-preservative alternative for packed bread. Applied Microbiology and Biotechnology 99: 3839–3849.

[62] Tieking M., Korakli M., Ehrmann M.E., Gänzle M.G., Vogel R.F. (2003) In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology 69: 945–952.

[63] Montemurro M., Pontonio E., Gobbetti M., Rizzello C.G. (2019) Investigation of the nutritional, functional and technological efects of the sourdough fermentation of sprouted flours. Int. J. Food Microbiol. 302: 47-58.

[64] Menezes L.A.A., Minervini F., Filannino P., Sardaro M.L.S., Gatti M., Lindner J.D.D. (2018) Efects of Sourdough on FODMAPs in Bread and Potential Outcomes on Irritable Bowel Syndrome Patients and Healthy Subjects. Front. Microbiol. 9, 1972.

[65] Melini F., Melini V., Luziatelli F., Ficca A.G., Ruzzi M. (2019) Health-Promoting Components in Fermented Foods: An Up-to-Date Systematic Review. Nutrients 11, 1189.

[66] Rollán G, Font de Valdez G. (2001) The peptide hydrolase system of *Lactobacillus reuteri*. International Journal of Food Microbiology 70 (3): 303-307.

[67] Rizzello C.G., Nionelli L., Coda R., Gobbetti M. (2012) Synthesis of the cancer preventive peptide lunasin by lactic acid bacteria during sourdough fermentation. Nutr. Cancer 64: 111–120.

[68] Coda R., Rizzello C.G., Pinto D., Gobbetti, M. (2012) Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. Appl. Environ. Microbiol. 78: 1087–1096.

[69] Rizzello C.G., Cassone A., Di Cagno R., Gobbetti M. (2008) Synthesis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides and gamma-aminobutyric acid (GABA)

during sourdough fermentation by selected lactic acid bacteria. J. Agric. Food Chem. 56: 6936–6943.

[70] Maki M., Mustalahti K., Korhonen J., Kulmala P., Haapalahti M., Karttunen,T. (2003) Prevalence of celiac disease among children in Finland. N. Engl. J. Med. 348: 2517–2524.

[71] Gerez L.C., Rollán G.C., Font de Valdez G. (2006) Gluten breakdown by lactobacilli and pediococci strains isolated from sourdough. Letters in Applied Microbiology 4:459-464.

[72] Rollán G, De Angelis M, Gobbetti M, Font de Valdez G. (2005) Proteolytic activity and reduction of gliadin-like fractions by sourdough lactobacilli. Journal of Applied Microbiology 99:1495–1502.

[73] De Angelis M., Coda R., Silano M., Minervini F., Rizzello C.G., Di Cagno R., Vicentini O., De Vincenzi M., Gobbetti M. (2006) Fermentation by selected sourdough lactic acid bacteria to decrease coeliac intolerance to rye flour. Journal of Cereal Science 43:301-314.

[74] Rizzello C.G., De Angelis M., Di Cagno R., Camarca A., Silano M., Losito I., De Vincenzi M., De Bari M.D., Palmisano F., Maurano F., Gianfrani C., Gobbetti M. (2007) Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. Applied and Environmental Microbiology 3:4499–4507.

[75] Di Cagno R., Rizzello C.G., Gagliardi F., Ricciuti P., Ndagijimana M., Francavilla R., Guerzoni M.E., Crecchio C., Gobbetti M., De Angelis M. (2009) Different fecal microbiotas and volatile organic compounds in treated and untreated children with celiac disease. Applied and Environmental Microbiology 75:3963-3971.

[76] Rizzello C.G., Montemurro M., Gobbetti M. (2016) Characterization of the bread made with durum wheat semolina rendered gluten-free by sourdough biotechnology in comparison with commercial gluten-free products. J. Food Sci. 81, H2263-H2272.

[77] Poutanen K., Flander L., Katina K. (2009). Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. Food Microbiology 26: 693-699.

[78] De Angelis M., Gallo G., Corbo M.R., Mc Sweeney P.L., Faccia M., Giovine M., Gobbetti M. (2003) Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. Int J Food Microbiol 87(3): 259–270.

[79] Lopez H.W., Ouvry A., Bervas E., Guy C.,Messager A., Demigne C., Remesy C. (2000) Strains of lactic acid bacteria isolated from sour doughs degrade phytic acid and improve calcium and magne- sium solubility from whole wheat flour. J Agric Food Chem. 48: 2281–5.

[80] Rollán G. C., Gerez C. L., LeBlanc J. G. (2019) Lactic fermentation as a strategy to improve the nutritional and functional values of ppseudocereals. Frontiers Nutrition 6:98.

[81] Hur S.J., Lee S.Y., Kim Y.C., Choi I., Kim G.B. (2014) Effect of fermentation on the antioxidant

activity in plant-based foods. Food Chemistry 160: 346–356.

[82] Rodríguez H., Curiel J.A., Landete J.M., de las Rivas B., López de Felipe F, Gómez-Cordovés C., Mancheño J.M., Muñoz R. (2009) Food phenolics and lactic acid bacteria International Journal of Food Microbiology 132: 79–90.

[83] Rocchetti G., Miragoli F., Zacconi C., Lucini L., Rebecchi A. (2019) Impact of cooking and fermentation by lactic acid bacteria on phenolic profile of quinoa and buckwheat sedes. Food Research International 119: 886-894.

[84] Carrizo S.L., Montes de Oca C.E., Laiño J.E., Suarez N.E., Vignolo G., LeBlanc J.G., Rollán G. (2016) Ancestral Andean grain quinoa as source of lactic acid bacteria capable to degrade phytate and produce B-group vitamins. Food Research International 89: 488-494.

[85] Carrizo S.L., Montes de Oca C.E., Hébert M.E., Saavedra L., Vignolo G., LeBlanc J.G., Rollán G. (2017) Vitamins and high nutritional and functional value enzymes production by lactic acid bacteria from the ancestral grain amaranth. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 27: 289–298.

[86] Capozzi V:, Russo P., Dueñas M.T., López P., Spano G. (2012) Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. Appl Microbiol Biotechnol. 96:1383–94.

[87] Russo P., Capozzi V., Arena M.P., Spadaccino G., Dueñas M.T., López P., Fiocco D., Spano G. (2014) Riboflavin-overproducing strains of *Lactobacillus fermentum* for riboflavin-enriched bread. Appl Microbiol Biotechnol. 98:3691–700.

[88] Mariotti M., Iametti S., Cappa C., Rasmussen P., Lucisano M. (2011). Characterization of gluten-free pasta through conventional and innovative methods: evaluation of the uncooked products. J. Cereal Sci. 53 (3): 319-327.

[89] Curiel J.A., Coda R., Limitone A., Katina K., Raulio M., Giuliani G., Rizzello C.G., Gobbetti M. (2014) Manufacture and characterization of pasta made with wheat flour rendered gluten-free using fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria. Journal of Cereal Science 59: 79-87.

[90] Arendt E., Moroni A., Zannini E. (2011) Medical nutrition therapy: use of sourdough lactic acid bacteria as a cell factory for delivering functional biomolecules and food ingredients in gluten free bread. Microb. Cell Fact. 10, S15

[91] Peyer L.C., Zannini E., Arendt E.K. (2016) Lactic acid bacteria as sensory biomodulators for fermented cereal beverages. Trends Food Sci Technol 54:17–25

[92] Nout M.J.R., Motarjemi Y. (1997) Assessment of fermentation as a household technology for improving food safety: a joint FAO/WHO workshop. Food Control, 8: 221-6.

[93] Steinkraus K. H. (1998) Bio-enrichment: production of vitamins in fermented foods. In J. B. Wood (Ed.), Microbiology of fermented foods (pp. 603–619). London: Blackie Academic and Professional.

[94] Dewey K.G., Brown K.H. (2003) Update on technical issues concerning complementary feeding of young children in developing countries and implications for intervention programs. Food Nutr Bull. 24:5–28.

[95] Campbell-Platt G. (1994) Fermented foods: a world perspective. Food Research International 27: 253.

[96] Holzapfel W. H. (2002) Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. Int. J. Food Microbiol. 75: 197–212.

[97] Moss M. O., Mpuchane S. F., Murphy, O. M. Nigerian ogi. In K. H. Steinkraus (Ed.), Handbook of indigenous fermented foods (1993) (pp. 212–222). New York: Marcel Dekker.

[98] Onyekwere O. O., Akinrele I. A., Koleoso O. A. O. In K. H. Steinkraus (Ed.), Handbook of indigenous fermented foods (1993) (pp. 212–222). New York: Marcel Dekker.

[99] Steinkraus K. H., Ayres R., Olek A., Farr, D. Biochemistry of Saccharomyces. In K. H. Steinkraus (Ed.), Handbook of indigenous fermented foods (1993) (pp. 517–519). New York: Marcel Dekker.

[100] Lopez Y., Gordon D. T., Field M. L. (1983) Release of phosphorous from phytate by natural lactic acid fermentation. Journal of Food Science. 48: 953–954.

[101] Kuboye A. O. (1985) Traditional fermented foods and beverages of Nigeria. In Proceedings of the International Foundation for Science (IFS)/United Nations University (UNU). Workshop on Development of indigenous fermented foods and Food technology in Africa (pp. 225–236), Douala, Cameroon.

[102] Adeyemi I. A. (1983) Dry milling of sorghum for ogi manufacture. Journal of Cereal Science 1: 221–227.

[103] Adeniji A. O., Potter N. N. (1978) Properties of ogi powders madefrom normal, fortified and opaque-2 corn. Journal of Food Science 43: 1571–1574.

[104] Odunfa S. A., Oyewole O. B. African fermented foods. In J. B. Woods (Ed.), Microbiology of fermented foods (1998) (pp. 713–752). London: Blackie Academic and Professional.

[105] Michodjèhoun-Mestres L., Joseph H., Joseph D., Christian M. (2005) Physical, chemical and microbiological changes during natural fermentation of "gowé", a sprouted or non-sprouted sorghum beverage from West-Africa. Afr. J. Biotechnol. 4:487–496.

[106] Adebolu T.T., Olodun A.O., Ihunweze B.C. (2007) Evaluation of ogi liquor from different

grains for antibacterial activities against some common diarrhoeal bacteria in south-west Nigeria. African J. Biotechnol. 6:1140–1143.

[107] Banigo E. O. I. Nigerian ogi. In K. H. Steinkraus (Ed.), Handbook of indigenous fermented foods (1993) (pp. 212–222). New York: Marcel Dekker.

[108] Chavan J. K., Kadam S. S. (1989). Critical reviews in food science and nutrition. Food Science 28: 348–400.

[109] Achi O.K., Asamudo N.U. (2019) Cereal-Based Fermented Foods of Africa as Functional Foods. In: Mérillon JM., Ramawat K. (eds) Bioactive Molecules in Food. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham

[110] Halm M., Amoa-Awua W.K., Jakobsen M. (2004) Kenkey: an African fermented maize product. Handbook of food and beverage fermentation technology. pp 799-816.

[111] Jespersen L., Halm M., Kpodo K., Jacobson M. (1994) Significance of yeasts and moulds occurring in maise dough fermentation for kenkey production. International Journal of Food Microbiology 24: 239–248.

[112] Houngbédji M., Johansen P., Padonou S.W., Akissoé N., Arneborg N., Nielsen D. S.. Hounhouigan D. J., Jespersen L. (2018) Occurrence of lactic acid bacteria and yeasts at species and strain level during spontaneous fermentation of mawè, a cereal dough produced in West Africa. Food Microbiology 76: 267-278.

[113] Yousif N.M.K., Dawyndt P., Abriouel H., Wijaya A., Schillinger U., Vancanneyt M., Swings J., Dirar H.A., Holzapfel W.H., Franz C.M.A.P. (2005) Molecular characterization, technological properties and safety aspects of enterococci from 'Hussuwa', an African fermented sorghum product. Journal of Applied Microbiology 98: 216–228.

[114] Onyekwere O., Akinrele I.A., Koleoso O.A. (1989) Industrialization of indigenous knowledge. In Food Processing Technologies for Africa, ed. Dirar, H.A. pp. 103–120. Vienna: UNIDO.

[115] Yousif N.M.K., Huch M., Schuster T., Cho G.S., Dirar H.A., Holzapfel W.H., Franz C.M.A.P. (2010) Diversity of lactic acid bacteria from Hussuwa, a traditional African fermented sorghum food. Food Microbiology 27: 757-768.

[116] Parker M. L., Melaku U., Faulks R. M. (1989). The contributionof flour components to the structure of injera, an Ethiopian fermented bread made from tef (Eragrostis tef). Journal of Cereal Science 10: 93–104.

[117] Vogel S., Gobezie A., Gifawesen C. Ethiopian enjera. In K. H. Steinkraus (Ed.), Handbook of indigenous fermented foods (1993) (pp. 182–194). New York: Marcel Dekker.

[118] Zegeye A. (1997). Acceptability if injera with stewed chicken. Food Quality and

Preference 8: 293–295.

[119] Mokoena M.P., Mutanda T., Olaniran A.O. (2016) Perspectives on the probiotic potential of lactic acid bacteria from African traditional fermented foods and beverages. Food Nutr. Res. 60, 29630.

[120] Di Stefano E., White J., Seney S., Hekmat S., McDowell T., Sumarah M., Reid, G. (2017) A novel millet-based probiotic fermented food for the developing world. Nutrients 9: 529

[121] Franz C. M.A.P., Huch M., Mathara J.M., Abriouel H., Benomar N., Reid G., Galvez A., Holzapfel W.H. (2014) African fermented foods and probiotics. International Journal of Food Microbiology 190: 84–96.

[122] Wood P. J. (1997). Functional foods for health: opportunities for novel cereal processes and products. Cereal 8: 233–238.

[123] Wacher C. (1993) Alimentos y bebidas fermentados tradicionales. In M. García-Garibay, R. Quintero-Ramírez, & A. López Munguía (Eds.), Biotecnología alimentaria (pp. 313–349). Mexico, D.F: LIMUSA.

[124] Escalante A., Wacher C., Farres A. (2001). Lactic acid bacteria diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. International Journal of Food Microbiology 64: 21–31.

[125] Delibes R., Barragan A. (2008). "El consumo ritual de chicha en San José de moro," in Arqueología Mochica: Nuevos Enfoques, eds L. J. Castillo, H. Bernier, G. Lockard, and J. Rucabado (Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú), 105–118.

[126] Escobar A., Gardner A., Steinkraus K. H. South American fermented maise chicha. In K. H. Steinkraus (Ed.), Handbook of indigenous fermented foods (1993) (pp. 402–406). New York: Marcel Dekker.

[127] Haard N. F., Odunfa S. A., Lee C.-H., Quintero-Ramírez R., Lorence- Quiñones A., Wacher-Radarte C. (1999) Fermented cereals. A global perspective. FAO Agricultural Services Bulletin, 138.

[128] Elizaquível P., Pérez-Cataluña A., Yépez A., Aristimuño C., Jiménes E, Cocconcelli P.S., Vignolo G., Aznar R. (2015) Pyrosequencing vs. culture-dependent approaches to analyze lactic acid bacteria associated to chicha, a traditional maize-based fermented beverage from Northwestern Argentina. Int. J Food Microbiol. 198:9-18.

[129] Lorence-Quiñones A., Wacher-Rodarte C. M., Quintero-Ramírez R. (1999) Cereal fermentations in latin american countries. Fermented cereals (pp. 99-114). Rome: FAO Agricultural Services Bulletin.

[130] Valderrama A. (2012). Diversidad de bacterias lácticas del atole agrio de Villahermosa

tabasco. (Unpublished Bachelor´s thesis). Faculty of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, Mexico.

[131] Ampe F., Miambi, E. (2000) Cluster analysis, richness and biodiversity indexes derived from denaturing gradient gel electrophoresis fingerprints of bacterial communities demonstrate that traditional maize fermentations are driven by the transformation process. International Journal of Food Microbiology 60 (1): 91-97.

[132] Väkeväinen K., Valderrama A., Espinosa J., Centurión D., Rizo J., Reyes-Duarte D., Díaz-Ruiz G., von Wright A., Elizaquível P., Esquivel K., Simontaival A., Aznar R., Wacher C., Plumed-Ferrer C. (2018) Characterization of lactic acid bacteria recovered from atole agrio, a traditional Mexican fermented beverage. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie (LWT) 88: 109-118.

[133] Wright K., Pike O., Fairbanks D., Huber C. (2002). Composition of Atriplex hortensis, sweet and bitter Chenopodium quinoa seeds. Journal of Food Science 67(4): 1383-1385.

[134] Núcleo de Estudos e Pesquisa em Alimentos (NEPA) (2006). Tabela brasileira de composição de alimento (versão 2). Campinas, NEPA-UNICAMP, pp. 114.

[135] Repo-Carrasco R. (1992) Cultivos andinos y la alimentación infantil. Comisión de Coordinación de Tecnología Andina (CCTA). Serie Investigaciones N° 1, Lima, Perú.

[136] Calaveras J. (2004). Materias primas en panificación. En: Nuevo tratado de panificación y bollería. Eds. Calaveras, J. Madrid, España. Cap 4, pp. 53.

9

Hortalizas y legumbres fermentadas

Jesica E. Blajman
blajman.jesica@inta.gob.ar

• *Investigadora Asistente del CONICET, Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (IDICAL). CONICET - INTA EEA Rafaela.*

Gabriela Zárate
gzarate@cerela.org.ar

• *Investigadora Independiente del CONICET, Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET), Tucumán, Argentina.*
• *Profesora Adjunta de Microbiología de los Alimentos, Universidad de San Pablo Tucumán, Argentina.*

Resumen

Para el correcto funcionamiento del organismo, es indispensable incrementar en nuestra dieta habitual, el consumo de hortalizas y legumbres, ya que aportan nutrientes esenciales y numerosos compuestos bioactivos con efectos beneficiosos para la salud. Sin embargo, su contenido de agua y riqueza nutricional los torna altamente perecederos, por lo que son necesarias estrategias para incrementar su vida útil además de su consumo. En este contexto, la fermentación representa una manera simple y atractiva de biotransformar positivamente estas materias primas mejorando sus características organolépticas, nutricionales y funcionales. En este capítulo, abordamos la fermentación de los vegetales desde un punto de vista microbiológico y tecnológico, con particular énfasis en el potencial de las bacterias lácticas para llevar a cabo estas transformaciones, y recorremos el espectro de alimentos vegetales fermentados tradicionales y emergentes. El conocimiento del proceso con fundamento científico puede contribuir a mejorar la calidad de los productos ya existentes y a innovar en el desarrollo de Alimentos Funcionales de base vegetal, diversificando la oferta y abriendo nuevos mercados.

I. Introducción

Las plantas representan la fuente más importante de alimentos para la humanidad. En particular, las hortalizas y las legumbres aportan a la dieta diferentes vitaminas, minerales, fibras y fitoquímicos como polifenoles y péptidos bioactivos [1]. A sus beneficios nutricionales se suma su potencial para prevenir enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) como patologías cardiovasculares, obesidad, diabetes, cáncer colorrectal, entre otras [2]. Al respecto, la OMS y la FAO recomiendan el consumo diario de un mínimo de 400 g de frutas y verduras (excluidas papas y otros tubérculos feculentos) para evitar las ECNT y mitigar varias carencias de micronutrientes, sobre todo en los países menos desarrollados. Desafortunadamente, se estima que la ingesta de vegetales es inferior a las porciones recomendadas, lo que hace necesaria la búsqueda de estrategias para incrementarla. En general, los vegetales se consumen frescos o mínimamente procesados (enlatados, deshidratados, en pasta, jugos) pero su naturaleza extremadamente perecedera condiciona su vida útil debido al rápido deterioro microbiano. Para evitar esto, se suele recurrir a métodos de conservación como tratamientos térmicos, preservantes químicos, alta presión hidrostática, radiación ionizante o campos pulsados, aunque algunos de estos procesamientos pueden afectar las características físicas, químicas y sensoriales del alimento [3, 4]. Por el contrario, la fermentación es una técnica de preservación biológica que modifica favorablemente a los alimentos, y que ha sido usada por el hombre desde épocas ancestrales, ya que se encuentra presente en todas las culturas del mundo. Este tipo de procesamiento implica el crecimiento y la actividad de microrganismos a expensas de los nutrientes presentes en la matriz alimentaria, con la producción de metabolitos que inhiben el desarrollo de potenciales patógenos y deteriorantes. Actualmente, la fermentación es considerada mucho más que un método de conservación y prolongación de la vida útil y seguridad de los alimentos: se trata de una estrategia biotecnológica atractiva, que permite incrementar las propiedades nutricionales y nutracéuticas de los mismos, transformándolos en Alimentos Funcionales, como así también mejorar sus propiedades reológicas y sensoriales [5].

La mayoría de los vegetales son susceptibles de ser fermentados. Los productos típicos más investigados y con mayor difusión en el mercado internacional son las aceitunas, pepinos y coles (repollo y coliflor) [6, 7]. Otros vegetales fermentados de consumo mundial son los encurtidos o pickles elaborados con zanahorias, pimientos, remolachas, cebollas, calabazas, tomates, rábanos, espárragos, lechuga, brócoli, brotes de bambú, nabos y alcaparras [8, 9]; y también los purés/pastas untables y bebidas fermentados obtenidos a partir de legumbres como la soja [10, 11].

Si bien los actores biológicos que llevan a cabo las transformaciones pueden pertenecer a cualquiera de los 3 dominios biológicos, en general las fermentaciones vegetales en Europa y América están asociadas a bacterias lácticas (BAL) y levaduras, mientras que en los países asiáticos la mayoría de los alimentos vegetales son fermentados por hongos [12]. Cada uno de estos tipos microbianos está asociado a

productos metabólicos diferentes que se generan a partir de los carbohidratos presentes, confiriendo al alimento características organolépticas particulares, propias del gusto de cada cultura. En general, la fermentación láctica es la más buscada y la preferida, por cuanto las BAL son reconocidas por su seguridad (*GRAS status*, siglas en inglés para "Generalmente Reconocido como Seguro" de la Administración de Alimentos y Medicamentos, y *QPS*, sigla en inglés para "Presunción Cualificada de Seguridad" de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, EFSA) y por sus beneficios a la salud como probióticos y productores de prebióticos y postbióticos [13, 14].

En años recientes, los alimentos vegetales fermentados han ganado un renovado interés debido a sus múltiples ventajas: 1) extensión de su vida de estante; 2) mejoramiento nutricional/funcional; 3) modificación organoléptica (sabor, aroma, textura); 4) mayor seguridad/inocuidad; 5) producción de compuestos bioactivos; 6) simplicidad en su preparación; 7) valorización de subproductos de la industria agroalimentaria; 8) proceso económico y energéticamente compatible con el desarrollo sustentable [2, 15]. A esto se suma su potencial como vehículo de probióticos, alternativa de consumo para intolerantes a la lactosa, alérgicos a las proteínas lácteas, población celíaca, vegetarianos y veganos [16].

Es importante destacar que, en comparación con las fermentaciones de base láctea, las que usan vegetales como materia prima se encuentran aún subexploradas y representan nichos ecológicos muy valiosos para el aislamiento de microorganismos con potencial tecnológico y probiótico [17].

Por lo expuesto y considerando el creciente interés de los consumidores por alimentos que promuevan su bienestar y el de la industria por satisfacer esa demanda, en este capítulo presentamos la fermentación de los vegetales desde un enfoque microbiológico, tecnológico y de la salud, abordando factores relevantes para su elaboración como así también un relevamiento sobre los alimentos vegetales tradicionales existentes y los emergentes.

El conocimiento del proceso con fundamento científico puede mejorar la calidad de los productos ya existentes valorizando el patrimonio cultural regional; como así también contribuir a diversificar la oferta de alimentos fermentados, abriendo nuevos mercados e incrementando el consumo de vegetales.

II. El laberinto metabólico de la fermentación de vegetales

La fermentación es un proceso biológico de conversión de sustratos complejos en compuestos más simples. Desde el punto de vista bioquímico es un metabolismo catabólico anaeróbico en el que los carbohidratos (y otros compuestos) son oxidados parcialmente en ausencia de aceptores externos de electrones. Los aceptores finales de electrones son los compuestos orgánicos producidos en el desdoblamiento de la molécula inicial con liberación de una pequeña cantidad de energía [18]. Este proceso es característico del metabolismo de microorganismos, como bacterias y

hongos (levaduras y mohos), que tienen la facultad de llevar a cabo estas reacciones en las matrices alimentarias, produciendo su modificación fisicoquímica. En el curso de esta degradación metabólica, los microorganismos también liberan numerosos compuestos adicionales o metabolitos secundarios, muchos de los cuales poseen actividad biológica y afectan a quien los consume, por lo que reciben el nombre de compuestos bioactivos [2].

Para que la fermentación tenga lugar se necesitan tres componentes: 1) un sustrato; 2) microorganismos; y 3) las condiciones ambientales apropiadas. Los vegetales representan un nicho ecológico particular cuya riqueza en nutrientes fermentables (fibras, azúcares simples) y carga microbiana dependen de sus características intrínsecas (especie, variedad, características del tegumento, etc.) y extrínsecas (clima, prácticas agrícolas, etc.). La microbiota presente suele provenir del ambiente (suelo, aire, agua, animales que contactan con ellos) y es el resultado de los factores antes mencionados. En general, la carga microbiana endofítica de los vegetales varía entre 5,0 y 7,0 log UFC/g y está conformada por bacterias aerobias (pseudomonas, enterobacterias, corineformes) y levaduras (ya que suelen desarrollar antes que los mohos) [11]. Las bacterias lácticas son solo una pequeña fracción (2,0-4,0 log UFC/g) de la microbiota autóctona [12] y están representadas por especies homofermentativas y heterofermentativas de los géneros *Leuconostoc, Lactobacillus, Weissella, Enterococcus* y *Pediococcus*. Entre estos, *L. plantarum* es particularmente la especie más frecuente en estos alimentos [11].

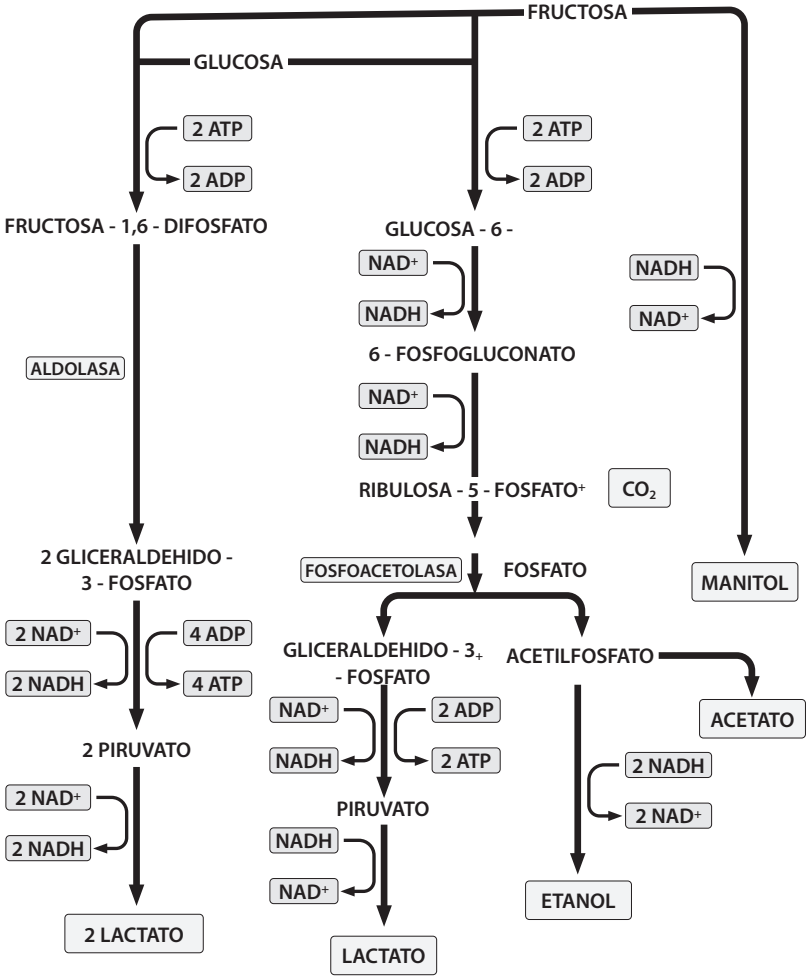
Cuando se dan las condiciones favorables de anaerobiosis, actividad de agua, concentración de sal y temperatura, los microorganismos naturalmente presentes en la materia prima desarrollan su actividad fermentativa con el fin de proveerse nutrientes y energía para crecer. Esto lleva a la transformación física de los vegetales, la modificación de su composición química y de sus propiedades promotoras de la salud [19]. El curso del proceso tiende, en general, a seleccionar a las BAL en detrimento de los otros microorganismos presentes menos tolerantes a las condiciones de estrés ácido y osmótico que se generan.

Los principales carbohidratos existentes en la mayoría de los vegetales son la glucosa, fructosa y sacarosa. Las BAL que intervienen en las fermentaciones vegetales pueden metabolizar estos azúcares siguiendo dos rutas importantes: la ruta glucolítica y la del 6-fosfogluconato. Las bacterias homofermentativas metabolizan las hexosas a través de la ruta glucolítica o vía de Embden-Meyerhof, dando ácido láctico como producto final. Por cada mol de glucosa fermentada se producen 2 moles de ácido láctico y 2 de ATP. Las bacterias heterofermentativas carecen de la enzima aldolasa (EC 4.1.2.13), por lo que usan la vía del 6-fosfogluconato para producir a partir de 1 mol de glucosa, 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol (o ácido acético), 1 mol de CO_2 y 1 mol de ATP. La fructosa puede ser metabolizada a través de la ruta heterofermentativa de forma análoga a la glucosa, o puede funcionar como un aceptor de electrones reduciéndose a manitol (ver Figura 1). El ácido láctico producido por reducción del piruvato corresponderá a los isómeros L, D o ambos según

la BAL fermentadora: *L. mesenteroides* produce solo el isómero D (isómero no fisiológico), mientras que *L. plantarum, L. brevis y P. pentosaceus* forman mezclas de ambos isómeros.

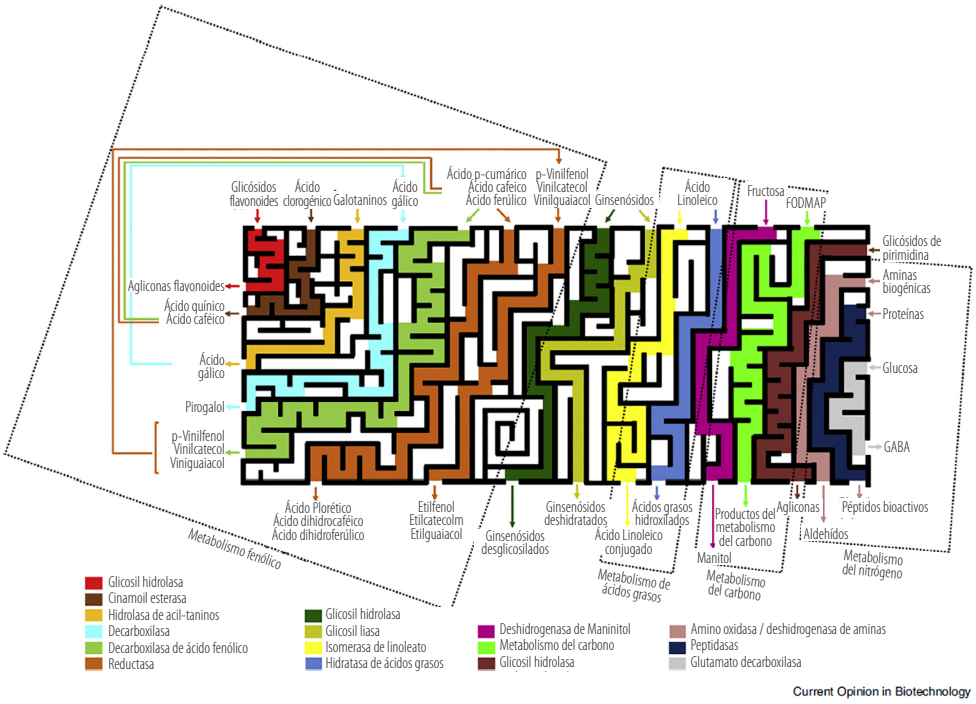
Existen otros grupos de bacterias además de las BAL, que pueden llevar adelante fermentaciones vegetales siguiendo la ruta glucolítica, diferenciándose únicamente en los productos finales que originan a partir del ácido pirúvico como por ejemplo, la fermentación propiónica llevada a cabo por *Propionibacterium* en aceitunas, u otras fermentaciones como la ácido-mixta, butanodiólica o butírica que desarrollan enterobacterias o clostridios. Las levaduras también metabolizan glucosa por glucólisis pero poseen la enzima piruvato descarboxilasa, que actúa sobre el piruvato para dar CO_2 y acetaldehído que luego se reduce a etanol dando como resultado 2 moles de ATP por mol de hexosa fermentada.

Figura 1. Rutas metabólicas que intervienen en la fermentación de carbohidratos por BAL.



La riqueza de las plantas como sustrato y el amplio arsenal de enzimas que poseen las BAL les permite ingresar durante la fermentación en un complejo laberinto de rutas metabólicas, que dará como resultado alimentos vegetales fermentados enriquecidos en compuestos bioactivos y/o escasa cantidad de factores antinutricionales (FAN) [19] (Figura 2). El primer cambio y más evidente en la matriz vegetal causado por la fermentación es el incremento en la densidad de nutrientes como consecuencia de la disminución en los carbohidratos que son transformados a ácido láctico. El catabolismo de di, oligo y polisacáridos por glucosidasas ha sido caracterizado en diferentes BAL que contribuyen así, a la liberación de monómeros utilizables por el consumidor.

Figura 2. Laberinto metabólico y funcional de las BAL durante la fermentación de plantas comestibles.



Adaptado de [19]

La fermentación láctica también puede ser útil para reducir los FODMAP (oligo, di, monosacáridos y polioles fermentables) que acceden al intestino grueso, reduciendo su incidencia en el desarrollo de síntomas del síndrome del intestino irritable (IBS) [20].

El ácido láctico, principal producto del metabolismo de carbohidratos, cumple no solo un rol tecnológico en las características organolépticas y de seguridad del alimento, sino también en salud, ya que se ha demostrado que reduce la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por macrófagos y células dendríticas de medula ósea

activadas por receptores tipo Toll [21].

La fermentación contribuye también al incremento de péptidos y aminoácidos en diferentes vegetales (como las legumbres). Numerosos estudios han demostrado la capacidad de las BAL de liberar y acumular en la matriz vegetal, péptidos bioactivos y derivados de aminoácidos como el ácido γ-aminobutírico (GABA) mediante proteasas específicas e inespecíficas a partir de proteínas sin bioactividad. Su impacto en salud incluye la modulación del sistema inmune, disminución de procesos inflamatorios, efectos antioxidantes y antihipertensivos [22, 23].

Uno de los metabolismos más relevantes de las BAL en las matrices vegetales es el de los compuestos fenólicos [24]. Bajas concentraciones de polifenoles estimulan el desarrollo de las BAL mientras que concentraciones elevadas afectan a la viabilidad y retardan el metabolismo de los carbohidratos; por lo que las cepas que fermentan los vegetales deben ser tolerantes a altas concentraciones de fenoles para poder alcanzar un desarrollo y actividad óptima. En este sentido, las especies prevalentes en matrices vegetales tales como *L. plantarum, L. brevis, L. fermentum, L. mesenteroides* y *Weissella* spp., han desarrollado el metabolismo de los polifenoles como mecanismo de detoxificación y mantenimiento del balance energético alcanzando una alta tolerancia a estos compuestos [25, 26].

El metabolismo de los polifenoles durante la fermentación de los vegetales tiene una función fisiológica para las BAL, pero sus efectos en el consumidor dependen de esta conversión microbiana ya que son los productos metabólicos finales los que ejercen un beneficio en la salud como su reconocida actividad antioxidante e inmunomodulante [19].

Durante la fermentación de los vegetales, los compuestos fenólicos como los glucósidos de flavonoides, ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos, y los taninos son convertidos por las enzimas microbianas glicosilhidrolasa, esterasa, decarboxilasa y reductasa de los ácidos fenólicos, en metabolitos biológicamente activos [19]. Así, las feruloil-esterasas (E.C. 3.1.1.73) liberan ácidos cinámicos esterificados en la pared celular de los vegetales y la enzima beta-glucosidasa hidroliza los flavonoides durante la fermentación poniendo los productos disponibles para su absorción intestinal [27, 28]. Un ejemplo paradigmático del laberinto metabólico "vegetales-BAL" es el de los taninos hidrolizables. Estos compuestos son considerados antinutricionales por lo que su degradación por la actividad tanino-acilhidrolasa (EC 3.1.1.20) de las BAL lleva a la liberación de ácido gálico el cual puede ingresar nuevamente al laberinto para ser degradado por la enzima galato decarboxilasa a pirogalol. El resultado final es la disminución de un FAN y la generación de 2 compuestos bioactivos con elevada actividad antioxidante. Esta actividad ha sido descripta en *L. plantarum, Leuconostoc* spp. *y Weisella* spp. [25, 29].

Las BAL pueden también enriquecer en ácido linoleico conjugado diferentes sustratos vegetales fermentados mediante su actividad linoleato-isomerasa [30] y degradar aminas durante la fermentación evitando la acumulación de aminas biogénicas [31].

Por otra parte, la fermentación con BAL es un eficiente método de detoxificación

de los alimentos. Se ha observado que mediante su arsenal enzimático, las BAL contribuyen a eliminar otros FAN tales como fitatos, saponinas, cianógenos e inhibidores de proteasas [29, 32].

Es importante destacar que las BAL que llevan adelante la fermentación pueden además de biotransformar los componentes de los vegetales, producir otros metabolitos secundarios endógenos con efectos positivos en la salud como ácidos grasos de cadena corta, síntesis de vitaminas (B y K), o compuestos prebióticos [17]. Los prebióticos son sustratos no digeribles fermentados selectivamente en el colon por microorganismos beneficiosos como bifidobacterias y lactobacilos. Las BAL pueden producir durante la fermentación, *exopolisacáridos* (EPS) u oligosacáridos por transglicosilación (p. ej. isomaltooligosacáridos en el kimchi) que pueden modular positivamente la microbiota colónica favoreciendo indirectamente la salud [33] o ejercer efectos directos, tales como inmunomodulación, actividad antioxidante y anticarcinogénica [34]. Se ha reportado que los géneros fermentadores de vegetales *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus* y *Weissella*, producen diferentes tipos de EPS [35].

Finalmente, cabe mencionar que los microorganismos fermentadores pueden ser potenciales probióticos (microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas benefician a la salud; FAO/WHO, 2001) y, el alimento vegetal fermentado, el vehículo apropiado para su administración al consumidor, ofreciendo una alternativa a los productos probióticos de base láctea [16]. Alimentos vegetales fermentados como el chucrut, kimchi y miso contienen una elevada carga de BAL viables (10^6 a 10^9 microorganismos/g o mL) que pueden sobrevivir al pasaje gastrointestinal [36] y que pertenecen a especies para las cuales se han demostrado efectos probióticos (p. ej. *L. plantarum*); por lo que estos alimentos podrían aportar beneficios a la salud similares a los ejercidos por BAL de las mismas especies [15].

Lo expuesto pone en evidencia que las BAL son protagonistas de la bioconversión de los compuestos endógenos de las plantas a través de numerosas rutas metabólicas que transcurren durante la fermentación, dando como resultado alimentos con mejores propiedades nutricionales y funcionales. Dado que no todas las BAL poseen las enzimas necesarias para la transformación de todas las matrices vegetales, resulta clave favorecer el desarrollo de los microorganismos apropiados o adicionar los mismos en forma intencional, lo que plantea la disyuntiva de llevar a cabo una fermentación espontánea o una controlada.

III. El arte o la ciencia de fermentar vegetales

Los alimentos vegetales fermentados pueden obtenerse a través de una fermentación espontánea realizada por la microbiota epifítica de la matriz alimentaria; o controlada mediante la inoculación de cultivos iniciadores previamente seleccionados por sus características tecnológicas y funcionales, proporcionando consistencia y mayor fiabilidad al proceso [11].

En cualquiera de los casos, el proceso comienza con un acondicionamiento de los vegetales que puede implicar o no, el lavado de los mismos, pelado (zanahorias, remolachas, etc.), blanqueado (legumbres), tratamiento alcalino (en aceitunas para remover la oleuropeína), cortado y su ubicación en recipientes apropiados con medio salino, donde ocurre la fermentación. El salado se puede realizar añadiendo la sal en forma sólida, o en forma de salmuera. La concentración de sal utilizada varía ampliamente (desde 1% hasta 12% de NaCl según el producto) y dependerá de la necesidad de mantener la textura, evitando el ablandamiento por enzimas pectinolíticas vegetales y microbianas. Los recipientes se llenan y sellan de manera tal que el material vegetal quede completamente sumergido para favorecer la anaerobiosis. Bajo estas condiciones la fermentación comienza inmediatamente.

III.A. Fermentación espontánea

Como se mencionó, los vegetales frescos pueden contener una alta carga microbiana después de la cosecha (hasta 10^9 microorganismos/g), representada por bacterias Gram (-) y Gram (+), levaduras y mohos. Las BAL son menos prevalentes en comparación con otros microorganismos mesófilos, y conforman menos del 1% de la población microbiana endógena (entre 0,15% a 1,5%) debido a sus altos requerimientos nutricionales de aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y minerales [12]. Si bien el entorno de la planta no es adecuado para su desarrollo, el medio vegetal puede enriquecerse mediante la salazón o la adición de ingredientes proteicos para su crecimiento [37]. Aunque se trata de una población pequeña, las plantas son el hábitat natural de las siguientes BAL [11, 38]:

- ***Lactobacillus* spp.:** *L. brevis, L. buchneri, L. casei, L. curvatus, L. fermentum, L. plantarum, L. paraplantarum, L. pentosus, L. sakei.*
- ***Leuconostoc* spp.:** *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides.*
- ***Pediococcus* spp.:** *P. acidilactici, P. pentosaceus.*
- ***Enterococcus* spp.:** *E. faecalis, E. faecalis* var. *liquefaciens, E. faecium.*
- ***Lactococcus* spp.:** *L. lactis.*
- ***Weisella* spp.:** *W. confusa, W. cibaria, W. paramesenteroides, W. soli.*

Dadas las condiciones apropiadas (disponibilidad de nutrientes, concentración de sal, anaerobiosis y temperatura), los vegetales inician una fermentación espontánea que suele transcurrir en 4 etapas bien definidas en las que se observa una sucesión microbiana determinada por el cambio en las condiciones ambientales que rodean al sustrato en fermentación:

- **Iniciación:** en esta etapa desarrollan los microorganismos Gram (-) y Gram (+) presentes originalmente en la planta. La utilización del O_2 por la respiración de las células vegetales y los anaerobios facultativos como enterobacterias incrementan la anaerobiosis durante los primeros 2 o 3 días inhibiendo a los aerobios como *Pseudomonas* y *Flavobacterium*. Junto a la disminución del O_2 lo hace el pH debido a la producción de ácidos láctico, acético, fórmico y succínico. Puede generarse espuma por producción de CO_2.

- **Fermentación primaria:** implica el crecimiento sucesivo de BAL heterofermentativas y homofermentativas como resultado del incremento en la anaerobiosis y la salinidad; y la reducción del pH. Las BAL que dominan la fermentación primaria incluyen *L. mesenteroides*, *P. pentosaceus, L. brevis* y *L. plantarum*. Las dos primeras especies no resisten altas concentraciones de sal o acidificación y disminuyen rápidamente, mientras que los lactobacilos completan la mayoría de las fermentaciones vegetales. La mayor parte de los carbohidratos disponibles (glucosa, fructosa y sacarosa) son convertidos a ácidos orgánicos (láctico principalmente) hasta un nivel de 1,5 a 2,0% con un pH inferior a 4,0. Puede o no haber crecimiento de levaduras [39].

- **Fermentación secundaria:** se caracteriza por el crecimiento de levaduras a partir de la materia fermentable que permanece después de que el desarrollo de las BAL resulta inhibido por los bajos valores de pH.

- **Post-fermentación:** tiene lugar después de consumirse la materia fermentable y se caracteriza, en general, por el crecimiento de microorganismos oxidantes en la superficie de la salmuera si está expuesta al aire [40].

Las BAL comienzan a proliferar durante la fase de iniciación pero rápidamente dominan la fermentación primaria la cual se desarrolla de la siguiente manera: *L. mesenteroides* inicia la fermentación ya que crece más rápidamente que otras BAL en un rango amplio de temperaturas (5 a 35 °C) y con concentraciones de NaCl de 0 a 5%. *L. mesenteroides* produce una fermentación heteroláctica de los azúcares vegetales (fructosa y glucosa), y produce ácidos láctico, acético y CO_2. La producción de ácidos reduce rápidamente el pH, inhibiendo así el desarrollo de microorganismos indeseables y la actividad de sus enzimas. El CO_2 producido reemplaza el aire y proporciona condiciones anaeróbicas favorables para la estabilización del ácido ascórbico y el color natural de los vegetales. La bioconservación se debe además a la síntesis de una amplia variedad de metabolitos antagonistas primarios y secundarios que incluyen etanol, H_2O_2 y diacetilo, compuestos antifúngicos y bacteriocinas [41]. La alta acidez producida por *L. mesenteroides* y otras BAL (como *P. pentosaceus*) inhibe posteriormente el crecimiento de estos microorganismos heterofermentativos a

favor de BAL más tolerantes a los ácidos (como *L. brevis* y *L. plantarum)*. En la mayoría de las fermentaciones vegetales, *L. plantarum,* que produce solo ácido láctico a partir de los azúcares restantes, supera a las otras BAL debido a su tolerancia ácida superior [42]. No obstante, en vegetales en salmuera con concentraciones iniciales de NaCl de 6 a 12%, como pepinos y aceitunas, os lactobacilos como *L. plantarum* dominan la fermentación desde el principio, con poca o ninguna evidencia de otras especies heterolácticas presente.

En general, las fermentaciones vegetales espontáneas son sensibles a la contaminación por microorganismos alterantes y patógenos, lo que puede representar un riesgo para la salud pública. Además, pueden conducir a variaciones en las propiedades sensoriales de los productos, según la calidad de la materia prima, la temperatura y las condiciones de cosecha [44]. Sin embargo, a pesar de sus limitaciones, la microbiota de los vegetales responsable de la fermentación espontánea merece atención como herramienta para aumentar la seguridad e inocuidad de estos alimentos, por lo que las estrategias metagenómicas y metabolómicas son de interés para caracterizar a las comunidades microbianas que allí se establecen [45].

III.B. Fermentación controlada

Muchas de las fermentaciones aplicadas a la elaboración de alimentos han dejado de ser prácticas artesanales para transformarse en procesos biotecnológicos estandarizados que permiten la elaboración de productos de alta calidad con mejores propiedades organolépticas, más estables y homogéneos; y con menor probabilidad de presentar alteraciones y contaminaciones por patógenos. En los alimentos fermentados producidos industrialmente, generalmente se aplican "Buenas Prácticas de Manufactura" (BPM) y "Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control" (HACCP); la implementación de tales sistemas mejora los estándares de higiene y reduce significativamente el riesgo de eventos adversos para la salud pública [46].

Desde el punto de vista tecnológico, el desarrollo de cultivos iniciadores proporciona una alternativa de relevancia económica dentro de la cadena alimentaria, aumentando la competitividad de la producción, y abriendo nuevas fronteras en el mercado de alimentos.

Los cultivos iniciadores son microorganismos inoculados en una matriz alimentaria para reemplazar a su microbiota endógena y mejorar la fermentación al impactar sobre las propiedades nutricionales y funcionales, las características organolépticas y la seguridad [47].

Las BAL son los microorganismos más utilizados para la elaboración controlada de alimentos. Al respecto, se han publicado listas autorizadas de microorganismos con uso certificado en fermentaciones de alimentos, que cubren una amplia gama de matrices, incluidos los vegetales [48].

La función principal de los cultivos iniciadores es la producción de ácido, principalmente láctico, como resultado de su metabolismo. Sin embargo, la contribución

de los cultivos a las características finales del producto no se limita al proceso de acidificación, sino que se completa con otras funciones como son la actividad proteolítica y lipolítica, la síntesis de compuestos aromáticos mediante la producción de alcoholes, cetonas o ésteres, la producción de CO_2, la generación de EPS que contribuyen a mejorar la textura y viscosidad del producto fermentado, la producción de compuestos inhibidores como bacteriocinas y la presencia de actividades enzimáticas involucradas en la eliminación de FAN [15, 49].

La fermentación controlada de vegetales puede realizarse empleando dos tipos de cultivos iniciadores: autóctonos o alóctonos. Los iniciadores autóctonos son aislados y reutilizados en la misma matriz de la cual provienen, mientras que los iniciadores alóctonos son aislados de una matriz alimentaria pero utilizados para fermentar diferentes productos [11]. En general, el uso de cultivos autóctonos resulta más recomendable ya que proporcionan propiedades nutricionales, reológicas y sensoriales más deseables y una vida útil más prolongada al producto. Al respecto, Di Cagno y colaboradores (2008) [50], compararon la fermentación de jugo de tomate con cultivos iniciadores formulados con cepas de *L. plantarum* autóctonas o alóctonas (aisladas de aceitunas verdes), observando que el iniciador alóctono presentaba menor crecimiento y acidificación y la producción de aldehídos (butanal, pentanal y 2,4-hexadienal) causantes de *off-flavours*. Por el contrario, Ortíz Serrano y Gil (2007) demostraron que el iniciador autóctono acidificaba más rápidamente la matriz vegetal previniendo el desarrollo de levaduras, sintetizaba compuestos volátiles positivos para el flavour (3-metil-3-butan-1-ol, 2-3 butanodiona, 3-hydroxy-2-butanona) y mantenía elevados los niveles de ácido ascórbico, glutatión y actividad antioxidante durante el almacenamiento [51].

La Tabla 1 resume algunas de las características más relevantes de los cultivos alóctonos y autóctonos.

Tabla 1. Características de los cultivos iniciadores alóctonos y autóctonos usados para la fermentación de vegetales.

Cultivos alóctonos	Cultivos autóctonos
• Aislados de una matriz y usados en otra. • Son de uso general. • Se seleccionan por poder acidificante. • Baja adaptación y flexibilidad metabólica. • Crecimiento lento y menor biomasa. • Escaso aporte a las propiedades sensoriales y funcionales.	• Aislados y usados en la misma matriz. • Son de uso específico. • Actividad acidificante y propiedades tecnológicas y funcionales. • Adaptados a la matriz alimentaria y muy competitivos. • Crecimiento rápido y mayor biomasa final. • Aseguran propiedades nutricionales, reológicas y sensoriales apropiadas. • Acidificación y fermentación más rápida. • Inhibición de enterobacterias y levaduras. • Larga vida de estante al producto.

Dependiendo del material a fermentar y de las características deseadas para el producto final, los cultivos iniciadores tanto autóctonos como alóctonos deben reunir una serie de propiedades. Algunos de los criterios de selección para iniciadores aplicables a la fermentación de chucrut, pickles, aceitunas y jugos vegetales son:

- Mínimos requerimientos nutricionales.
- Crecimiento rápido y dominante en la matriz vegetal (aproximadamente 8,0-9,0 log UFC/mL garantiza seguridad higiénica y eventuales efectos probióticos).
- Capacidad de crecer en un amplio rango de NaCl, pH y temperatura.
- Máximo agotamiento de los azúcares fermentables en el menor tiempo posible.
- Rápida acidificación de la salmuera.
- Capacidad de producir solo L(+) ácido láctico.
- Tolerancia a la sal y al pH bajo.
- Sobrevida durante la fermentación y el almacenamiento.
- Tolerancia a altas concentraciones de fenoles, abundantes en algunos materiales vegetales.
- Baja o nula producción de productos químicos tóxicos (por ejemplo, aminas biógenas).
- Ausencia de actividad pectinolítica.
- Síntesis de compuestos antimicrobianos (por ejemplo, bacteriocinas).
- Resistencia a bacteriófagos de cepas naturales.
- Disminución de la concentración de nitratos (nitrato reductasa +)
- Estabilidad genética.
- Potencial conservación por secado, congelación o liofilización.
- Producción económica al acortar el tiempo de fermentación.

Al presente, la mayoría de las fermentaciones vegetales recurren a la fermentación espontánea reinoculando (*backslopping*) la salmuera madre o masa madre ácida (*sourdough*) para favorecer la selección de las BAL mejor adaptadas. Sin embargo, las demandas actuales de los consumidores y de la industria por acceder a certificaciones de calidad, exponen la necesidad de desarrollar procesos de fermentación controlados que permitan obtener productos seguros y reproducibles. En consecuencia, es de esperarse que el uso de cultivos iniciadores para la manufactura de productos vegetales fermentados gane importancia en el futuro. Actualmente, pueden encontrarse en el mercado cultivos iniciadores de BAL con cepas de *L. plantarum, L. xylosus, L. celobiosus* y *L. sakei* para productos vegetales fermentados [12].

IV. Modalidades de fermentación de los vegetales

La transformación de la fermentación artesanal y/o experimental hacia una de tipo industrial implica la amplificación del proceso desde una técnica doméstica y/o de laboratorio a otra a gran escala. El desarrollo de fermentaciones controladas permite no solo la obtención de alimentos mejorados nutricional y sensorialmente, sino también la síntesis industrial de metabolitos secundarios (enzimas, compuestos bioactivos, etc.) [52]. Para ello se han desarrollado dos modalidades de proceso: la *fermentación sumergida o líquida* (FSm) que se basa en el cultivo de los microorganismos en un medio líquido conteniendo nutrientes y la *fermentación en sustrato sólido* (FSS) que consiste en el crecimiento microbiano y formación de productos sobre un soporte sólido en presencia de la mínima disponibilidad de agua para permitir su desarrollo y metabolismo [53]. Estos sistemas se definen y optimizan en base a parámetros tales como el tipo de sustrato, organismo fermentador y condiciones ambientales (pH, temperatura, aireación, humedad, etc). La Tabla 2 resume en forma comparativa las características más relevantes de cada proceso. Ambos sistemas de fermentación se aplican a la obtención de alimentos fermentados y a la síntesis a granel de compuestos de interés a partir de matrices vegetales.

IV.A. Fermentación sumergida (FSm)/ Fermentación Líquida (FL)

Este tipo de fermentación es las más practicada en el hemisferio occidental. La FSm emplea sustratos solubles que fluyen libre y homogéneamente en un medio líquido, por lo que resulta adecuada para el empleo de bacterias como organismos fermentadores debido a su elevada demanda de agua ($a_w \geq 0{,}8$). Los sustratos suelen agotarse rápidamente y deben ser constantemente reemplazados o suplementados, y los productos de interés se secretan en el medio de fermentación. Como ventajas operativas pueden destacarse la relativa facilidad del monitoreo (pH, oxígeno disuelto, temperatura, concentración de solutos), separación de la biomasa después de la fermentación, mezclado, aireación y escalado. La FSm se ha empleado con éxito para

la obtención de diferentes compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de diferentes matrices vegetales y con diferentes microorganismos [54]. Por ejemplo, la FSm de pomaza de manzana por *Phanerochaete chrysosporium* ha sido usada para producir enzimas ligninolíticas, incrementando su contenido de polifenoles y antioxidantes [50]. De igual manera, se ha logrado la síntesis de importantes antioxidantes como los ácidos gálico, elágico y ferúlico empleando *Aspergillus* spp., *Bacillus* y BAL a partir de salvado de arroz, y de desechos agroindustriales [55, 56, 57].

En el caso de alimentos vegetales, la FSm aplicada a la elaboración de bebida de soja empleando una cepa de *L. rhamnosus* productora de β-glucosidasa resultó en un producto con mayor contenido de agliconas de isoflavonas con actividad antioxidante [10].

Por su parte, los encurtidos, son cuerpos sólidos inmersos en un medio líquido; en los que el crecimiento microbiano está determinado por la salida de los nutrientes desde el vegetal hacia el líquido que lo rodea. La fermentación tiene lugar principalmente en la salmuera aunque se ha comprobado por microscopía electrónica que las BAL también se desarrollan en el interior de los vegetales [38]. Esta fermentación puede realizarse en tres modalidades [58], que se describen a continuación.

IV.A.1. Salado en seco

En este proceso, el NaCl se agrega a los vegetales, (2% con respecto al peso seco generalmente) extrayendo el jugo de los mismos y creando la salmuera. El chucrut, por ejemplo, es un vegetal fermentado salado en seco. El vegetal se corta, se lava con agua potable y se coloca en el recipiente de fermentación el NaCl. Se agrega otra capa de vegetales y se repite el proceso hasta que el contenedor esté lleno tres cuartos, colocando peso para comprimir los vegetales y contribuir a la formación de la salmuera. A las 24 h aproximadamente se ha constituido la salmuera, y comienza la fermentación con aparición de burbujas de CO_2. La fermentación culmina cuando no hay más burbujas, transcurridas entre 1 y 4 semanas dependiendo de la temperatura ambiente. En climas cálidos, solo requiere de 8 a 10 días; mientras que en climas frescos pueden ser necesarias de 2 a 4 semanas [59, 60].

IV.A.2. Salado en salmuera

En este proceso, se prepara una salmuera disolviendo NaCl en agua. La salmuera se emplea para vegetales que contienen inherentemente un menor contenido de agua. Las aceitunas en salmuera son un ejemplo de ello. El NaCl ayuda a que los alimentos pierdan agua por presión osmótica favoreciendo su conservación e inhibiendo el desarrollo de microorganismos indeseables. El NaCl penetra en los tejidos vegetales y salen carbohidratos, compuestos nitrogenados, minerales y otras sustancias que son utilizadas durante la fermentación. En la salmuera se desarrolla una microbiota mixta en la que predominan las BAL. Estas acidifican el medio y bajan el pH lo suficiente para prevenir el desarrollo de microorganismos patógenos y

alteradores sin descomponer celulosa o proteínas. Es crucial que la concentración de NaCl no caiga por debajo del 10%; de lo contrario, las condiciones no permitirán la fermentación. Para alcanzar este nivel, se agrega NaCl adicional periódicamente a la salmuera. Una vez que se produce la salmuera y el sellado del recipiente, el desarrollo de los microorganismos es rápido. Durante la fermentación, la difusión de ácidos orgánicos en la salmuera y el bajo pH resultante, influyen en el crecimiento microbiano. A medida que los azúcares se difunden de los vegetales a la salmuera, las BAL crecen rápidamente. Si se preparan y almacenan adecuadamente, los productos fermentados se conservarán durante mucho tiempo. Prácticamente todos los problemas pueden atribuirse al descuido en la protección de la superficie de la salmuera. A veces es necesario eliminar las levaduras y los mohos que han crecido en la superficie. *Debaryomyces hansenii* y *Pichia membranaefaciens* se encuentran entre las levaduras de descomposición más comunes en salmuera. Para evitar el deterioro microbiano y especialmente el crecimiento de levaduras y mohos en la superficie de la salmuera o dentro del producto, se permite la adición de conservantes químicos como ácido sórbico, ácido tartárico, ácido acético y/o ácido benzoico en varios países [61].

IV.A.3. Vegetales fermentados no salados

Algunos vegetales pueden ser fermentados por BAL, sin adición previa de NaCl o generación de salmuera. Los ejemplos de productos sin sal incluyen gundruk (consumido en Nepal), sinki y otras hojas fermentadas marchitas [62, 63]. El proceso de fermentación se basa en la rápida colonización de los alimentos por lactobacilos que favorecen una atmósfera anaeróbica, asegurando la restricción de oxígeno e inhibiendo de esta manera el crecimiento de levaduras.

IV.B. Fermentación en Sustrato Sólido (FSS)

Este modelo de fermentación se encuentra profundamente arraigado en la cultura oriental y ha sido usado por siglos en países asiáticos para la elaboración de alimentos. Sin embargo, en las últimas décadas la FSS ha recibido creciente atención por parte de los investigadores de todo el mundo y ha comenzado a utilizarse con mayor frecuencia en occidente para obtener enzimas, compuestos de aroma y sabor, colorantes, ácidos orgánicos, antibióticos, polifenoles, biosurfactantes y otras sustancias de interés para la industria de los alimentos [53]. Esto se debe a que el proceso presenta numerosas ventajas con respecto a la FSm. Por una parte, es más eficiente, ya que proporciona altos rendimientos de conversión de sustrato a producto, con menores costos de inversión y operación: el bajo volumen de líquido que precisa la FSS tiene impacto en la economía del proceso al requerir fermentadores de menor tamaño, extracción y purificación del producto más simples (menor *downstream*), fácil aireación y menor demanda de esterilidad [64, 65]. La utilización de residuos agroindustriales como sustratos en muchas FSS es, además, una alternativa ecológica

para el aprovechamiento y agregado de valor a estos subproductos solucionando el problema de su disposición final como contaminantes ambientales. La principal desventaja de la FSS se relaciona con el escalado del proceso debido a problemas de transferencia de calor y masa y homogeneidad del cultivo por lo que los esfuerzos se han dirigido al desarrollo de biorreactores adecuados [66, 67].

La FSS es un proceso fermentativo ejecutado sobre un medio no sumergido, en ausencia de agua libre, donde se usan sustratos sólidos que sirven como fuente de nutrientes y soporte físico para los microorganismos (aunque también se puede usar superficies inertes impregnadas con soluciones nutritivas). El bajo contenido de humedad favorece el empleo de hongos y levaduras como organismos fermentadores debido a su capacidad de crecer con menor disponibilidad de agua (a_w 0,5-0,6), aunque se ha demostrado que las bacterias también pueden desarrollarse. El fundamento de la FSS es proveer al microorganismo cultivado un ambiente semejante a su ambiente natural ya que ésta sería la razón de su mejor desempeño y mayor productividad en comparación con la FSm. La optimización del proceso de FSS (independientemente de la aplicación) suele enfocarse inicialmente en la selección del microorganismo y el sustrato seguido de la evaluación de los parámetros necesarios para alcanzar el máximo crecimiento y actividad. Estos factores incluyen temperatura, pH, aireación, actividad de agua y humedad, naturaleza y propiedades del sustrato sólido como tamaño de partículas, etc. y suelen analizarse aplicando diseños factoriales y metodología de superficie de respuesta [68, 69] o herramientas biotecnológicas modernas que involucran algoritmos de aprendizaje de máquinas (*machine learning*) como las redes neuronales artificiales (ANN, por sus siglas en inglés) para identificar los factores críticos y sus interacciones.

Numerosos alimentos vegetales fermentados asociados a culturas locales, pero que han trascendido fronteras, son producidos alrededor del mundo empleando FSS con hongos y bacterias, como por ejemplo, el kimchi (Corea); miso (Japón, China); tempeh (Indonesia); tofu (China), pozole (México) y torani (India). Durante la FSS de estos alimentos, diferentes enzimas, particularmente amilasas, proteasas, lipasas producidas por los microorganismos fermentadores hidrolizan los polisacáridos, proteínas y lípidos a compuestos de sabor, aroma y textura placenteros y disminuyen el contenido de FAN como inhibidores de proteasas, ácido fítico, taninos y oligosacáridos no digeribles [53]. El ejemplo más emblemático y antiguo de aplicación alimentaria de la FSS es la utilización de hongos del género *Aspergillus* para elaborar *koji,* un preparado enzimático de amilasas y proteasas obtenido del crecimiento del hongo sobre arroz cocido que se usa para elaborar bebidas, o para preparar alimentos fermentados tradicionales de la cocina asiática, como el kimchi, el sake y el miso, estos dos últimos a partir de arroz y soja, respectivamente.

También se ha demostrado empleando FSS y diferentes microorganismos (*B. subtilis, L. plantarum, L. sakei, W. paramesenteroides, P. pentosaceus, P. acidilactici, Cordyceps militaris*) el incremento en el valor nutritivo (proteínas y lípidos), enriquecimiento en compuestos fenólicos y mayor actividad antioxidante de garbanzos, habas, soja, arvejas, poroto negro y otras variedades de legumbres sub-explotadas [68, 70, 71, 72–74].

La FSS es usada también para la producción de enzimas relevantes para la industria alimentaria como α-amilasa, inulinasa, α-galactosidasa, proteasas, levansacarasas, invertasa, etc. [52, 53]. Varios estudios *in vitro* han demostrado que la FSS es una tecnología promisoria para el enriquecimiento nutricional y de las propiedades antioxidantes de alimentos vegetales elaborados con cereales y legumbres y forrajes animales. Sin embargo, estudios *in vivo* y toxicológicos son esenciales antes de su aplicación como alimentos ricos en antioxidantes para beneficiar la salud humana. Por lo expuesto, la FSS se proyecta actualmente como un excelente proceso para el mejoramiento de la calidad nutricional y las propiedades promotoras de la salud de vegetales como las legumbres.

Tabla 2. Características comparativas de la fermentación en estado líquido y sólido.

Fermentación sumergida/líquida	Fermentación en sustrato sólido
• Agua altamente disponible. El medio fluye libremente. • Más apropiada para bacterias. • Nutrientes provenientes de fuentes diversas. • Distribución uniforme en el medio. • El medio está constituido por dos fases: una líquida y una gaseosa (O_2 disuelto). • Inóculo pequeño para iniciar el cultivo. • Producto final diluido, requiere etapas de extracción y concentración.	• Agua escasa. El medio no fluye porque es sólido. • Más apropiada para hongos. • La fuente de nutrientes es el sustrato sólido (fuentes naturales o soporte impregnado). • Existe gradiente de nutrientes. • El medio tiene 3 fases: líquida, gaseosa y sólida. El oxígeno está en la fase gaseosa. • Inóculo grande para iniciar el cultivo. • Alta productividad (sustrato → producto). • Se obtiene el producto ya concentrado. • Menor requerimiento de agua y energía. • Bajo costo. • Usa subproductos de la agroindustria. • Ambientalmente amigable (escaso volumen de efluentes).

V. Las estrellas del mercado: vegetales fermentados tradicionales y emergentes

Las materias primas utilizadas en la fermentación de vegetales, deben ser frescas, sanas, limpias, con adecuada madurez, sin alteraciones, textura firme y de tamaño uniforme (enteras o fraccionadas) dentro de un mismo envase (Capítulo 11, Código Alimentario Argentino). El producto fermentado final puede distribuirse fresco o pasteurizado. Si los vegetales fermentados se van a distribuir sin pasteurizar, es esencial que se hayan metabolizado todos los carbohidratos fermentables. De lo contrario, puede ocurrir una fermentación secundaria causada por levaduras y que da como resultado el deterioro gaseoso, la turbidez de la salmuera y probablemente una

fermentación alcohólica. Entre los alimentos vegetales fermentados más reconocidos podemos mencionar los siguientes:

V.A. Pepinos chicos o pepinillos

Los pepinos chicos o pepinillos fermentados se encuentran entre los pickles de mayor difusión a nivel mundial. En su fermentación participan distintos microorganismos que se van sucediendo conforme sus resistencias a la salinidad y acidez del medio. Los recuentos de BAL oscilan entre niveles indetectables ($<10^1$) a 10^8 UFC/g [75]). Su desarrollo libera ácidos orgánicos, CO_2, aldehídos, ésteres, entre otros, que causan el descenso del pH, el *bouquet*, y las condiciones óptimas de conservación. Los pepinos maduros y de calidad adecuada, se sumergen durante 1 a 4 h en recipientes abiertos con agua corriente fría y limpia a fin de eliminar todos los contaminantes y restaurar la firmeza perdida durante el transporte y el almacenamiento. Luego de la inmersión, se lavan para reducir el recuento microbiano inicial y favorecer el desarrollo de las BAL [76]. La fermentación se realiza en salmuera con aproximadamente 5-7% de NaCl. Este alto nivel de sal inhibe el crecimiento de microorganismos indeseables, selecciona las BAL y ayuda a retener la textura firme [77]. Además, inhibe las enzimas pectinolíticas y proteolíticas que pueden causar ablandamiento vegetal y putrefacción adicional. *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. y *Pediococcus* spp. son las principales BAL naturalmente presentes en la superficie del pepino y responsables de la fermentación. Si bien la fermentación espontánea todavía se usa ampliamente en la producción tradicional doméstica, el uso de cultivos iniciadores como *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri* y *L. acidophilus,* proporcionaría reproducibilidad en la elaboración a escala industrial [78]. El tiempo de fermentación depende de la temperatura. Se ha informado un rango de temperatura óptimo de 15 °C a 18 °C pero se pueden aplicar temperaturas más bajas (7-8 °C) y períodos más largos [79] hasta alcanzar un pH final entre 3,1 y 3,5. Para mejorar el sabor, frecuentemente se añaden especies o hierbas aromáticas [79] y puede usarse a nivel industrial conservantes químicos, como las sales de ácido ascórbico o benzoico [80]. Desde el punto de vista tecnológico y de la salud, se ha informado que los pepinos fermentados pueden ser una fuente de BAL con capacidad para producir bacteriocinas, oligosacáridos y polisacáridos. Halami y col. (2005) [81] y Singh y Ramesh (2008) [82], aislaron BAL productoras de bacteriocinas tipo pediocina, plantaricina A, mesentericina, enterocina A y nisina con actividad antilisteria de pepinos fermentados. Además, polímeros de dextrano, α-glucanos y β-glucanos y oligosacáridos prebióticos sintetizados por las BAL de pepinos fermentados han mostrado potencial inmunomodulador y anticancerígeno [79, 83].

V.B. Chucrut

Se entiende por chucrut (del francés *choucroute*), sauerkraut (del alemán *sauer*: agrio, *kraut*: repollo), repollo ácido, col ácida, col agria, el producto preparado por

fermentación láctica de las hojas finamente picadas de las diversas variedades hortícolas de repollo blanco y duro (*Brassica oleracea*), limpios, sanos, con o sin condimentos (art. 976, C.A.A.).

El chucrut es un vegetal fermentado salado en seco consumido mundialmente [59, 84]. Dado que el núcleo de la col contiene sacarosa, que puede conducir a la formación de dextrano por *L. mesenteroides* dando una textura viscosa o fibrosa, las hojas externas y el núcleo leñoso del repollo se eliminan antes de triturarlo o picarlo. La adición de sal es necesaria para inhibir el crecimiento de microorganismos alterantes (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, coliformes, y varios hongos) y la actividad de las enzimas pectinolíticas endógenas responsables del ablandamiento, favoreciendo la selección de las BAL [46, 84]. Después de la salazón, el repollo finamente triturado se coloca en recipientes de fermentación bajo presión para excluir el aire, se cubren con una tapa para permitir el desarrollo de la anaerobiosis y se deja fermentar desde una semana a varios meses. Para aumentar el aroma y sabor del chucrut, se pueden agregar especias, vinos y otros ingredientes [43]. Después de la fermentación, el chucrut se conserva en latas de metal o frascos de vidrio [84]. El producto final se puede envasar y pasteurizar, o distribuir de manera fresca. Solo este último formato contiene microorganismos vivos [46].

Según el Código Alimentario Argentino, este producto debe ser de color blanco amarillento, con un contenido de NaCl no menor de 2% ni mayor de 3,5%; con una acidez expresada en ácido láctico no inferior de 1%, y un pH no mayor de 4,1. Si la concentración de NaCl se ajusta al 2% y la temperatura se mantiene a 18 °C, se puede producir sin un cultivo iniciador. Se estima que los recuentos de BAL del chucrut oscilan entre 10^3 y 10^8 UFC/g [75] y que la acidez desarrollada puede inhibir el desarrollo de *Clostridium botulinum* y la liberación de sus neurotoxinas [85]. La fermentación espontánea es iniciada por *L. mesenteroides*, seguida por lactobacilos heterofermentativos, y finalmente por lactobacilos homofermentativos [86]. A pesar de que las especies involucradas en la fermentación varían según la ubicación, *L. mesenteroides* y *L. plantarum* se encuentran generalmente entre las principales [46]. En años recientes, se ha propuesto el uso de cultivos iniciadores para garantizar la uniformidad del producto pero faltan iniciadores comerciales adecuados para la fermentación de repollo, por lo que su desarrollo sigue siendo un desafío [84].

Desde el punto de vista de la salud se han informado efectos benéficos del consumo de chucrut, debido a su contenido de glucosinolatos y su hidrólisis durante la fermentación a derivados con propiedades anticancerígenas [85]. Además, el chucrut contiene altos niveles de vitaminas C y E, y compuestos fenólicos que actúan como potentes antioxidantes [87].

V.C. Aceitunas

De acuerdo al Código Alimentario Argentino, se entiende por aceitunas en salmuera, el producto obtenido por la fermentación láctica de los frutos de las distintas variedades del olivo (*Olea europaea* L.), envasadas con una solución de cloruro de

sodio; con o sin la adición de ácidos (art. 950, C.A.A.).

Existen 2 modalidades generales de fermentación: en la producción de las aceitunas verdes, los frutos inmaduros son tratados durante 10 h con NaOH (1 a 3%) para hidrolizar la oleuropeína que da sabor amargo e inhibe el desarrollo de las BAL. Luego se lavan con agua por varias horas y se colocan en salmuera 5-8% con el agregado de azúcares fermentables. La fermentación dura varias semanas y es llevada cabo principalmente por *L. plantarum* [88]. Otras BAL encontradas en las aceitunas pertenecen a especies como *L. casei*, *L. mesenteroides* y *P. pentosaceus*, mientras que las levaduras suelen estar representadas por *Pichia membranaefaciens*, *P. fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida oleophila*, *Candida silvae* y *Cystofilobasidium capitatum* [89]. El pH inicial de la fermentación puede ser superior a 7 y la microbiota puede incluir también a *Bacillus* spp. y enterobacterias (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Escherichia* spp.).

A medida que los ácidos orgánicos se acumulan y el pH disminuye por debajo de 6, las BAL, principalmente *L. plantarum*, dominan la fermentación. El producto final deberá tener un pH aproximadamente de 3,8-4,2, una acidez titulable de 0,4-0,7% de ácido láctico, y una concentración de sal que varía de 4 a 8% (p/v) [90].

Las aceitunas negras no reciben un tratamiento con NaOH antes de la salmuera por lo que la fermentación es un proceso mucho más lento debido a la presencia de la oleuropeína [43]. En este sistema, las aceitunas se ponen directamente en salmuera a 6-10% NaCl. La eliminación de compuestos amargos se debe a las actividades enzimáticas (principalmente β-glucosidasa y esterasa) de los microorganismos indígenas y a la difusión de polifenoles. El proceso de fermentación puede durar 8 a 12 meses y se realiza por una población mixta de levaduras (*Saccharomyces, Hansenula, Candida, Torulopsis, Debaryomyces, Pichia, Kluyveromyces,* y *Cryptococcus*) y BAL, aunque estas son menos significativas y por lo tanto el contenido de ácido es menor [91]. El producto final tiene un pH de 4,5-4,8 y acidez total de 0,4-0,7% de ácido láctico. Esto no es suficiente para la estabilidad del producto por lo que el contenido de sal debe superar el 10% en el almacenamiento. Para mejorar la fermentación y producir productos finales consistentes es recomendable el uso de cultivos iniciadores[7, 92]. Debido a su contenido de ácidos grasos monoinsaturados (omega-9), el consumo de aceitunas y su aceite pueden prevenir el riesgo de enfermedades cardiovasculares [93]. Además, otros componentes menores, como los tocoferoles y compuestos fenólicos, tienen propiedades antioxidantes y antimicrobianas [94].

V.D. Salsa de soja

La salsa de soja es un condimento fermentado oriental cada vez más popular producido a través de un proceso de fermentación de dos pasos llamados *koji* (fermentación en sustrato sólido) y *moromi* (fermentación en salmuera) [95]. En su elaboración más típica se emplean cuatro ingredientes: soja, trigo, sal y agua. Las proteínas de la soja son las que dan origen al sabor característico mientras que los hidratos de carbono del trigo son los componentes responsables del aroma y del dulzor. Se han

identificado casi 300 compuestos aromáticos en la salsa de soja: alcoholes, ácidos, ésteres y aldehídos son los compuestos aromáticos más abundantes [96].

La soja se sumerge en agua y luego se cuece al vapor. El trigo se tuesta a altas temperaturas y luego se tritura a fin de facilitar su posterior fermentación. Una vez acondicionados los ingredientes, se mezclan cantidades iguales de soja hervida y de trigo tostado a los que se añade un cultivo de esporas del hongo *Aspergillus*. Esta preparación se conoce como *shoyu koji*. Se utilizan tres especies, caracterizadas por su actividad proteolítica, para la elaboración de la salsa de soja: *A. oryzae*, *A. sojae* y *A. tamari*. El *shoyu koji* se traslada hasta un tanque donde se sumerge en una solución de salmuera que contiene NaCl al 18-22% [97], y se la deja fermentar. A la mezcla de *shoyu koji* y salmuera se la denomina *moromi*. En la fermentación del *moromi* se distinguen una fermentación láctica y una fermentación alcohólica. En la producción moderna, se utilizan también cultivos mixtos de la BAL *Tetragenococcus halophilus*, la levadura *Zygosaccharomyces rouxii* y especies de *Candida* para lograr una calidad de producto consistente [97]. El proceso de fermentación puede durar hasta tres meses y luego el *moromi* se somete a un proceso de refinación, que incluye prensado, filtración, pasteurización y envasado [98]. La salsa de soja cruda se pasteuriza a 70-80 °C durante 30 minutos [99] para prolongar su vida útil inactivando microorganismos y enzimas residuales. Además, durante el proceso de calentamiento se generan varios compuestos aromáticos [100]. Dos de los compuestos aromáticos más importantes en la salsa de soja, 4-hidroxi-2, 5 dimetil-3 (2H) -furanona (4-HDMF) y 4-hidroxi-2-etil-5-metil- 3 (2H) -furanona (4-HEMF), se producen a partir de pentosas a través de la reacción de Maillard durante el calentamiento [101]. La salsa de soja envasada en recipientes de plástico y vidrio tiene una vida útil de 1,5 y 3 años, respectivamente. En el mercado puede encontrarse un sucedáneo de la salsa tradicional, conocida como salsa de soja química, la cual se produce sin ninguna fermentación, por hidrólisis química de harina de soja desgrasada, con agregado de colorante caramelo, jarabe de maíz u otros endulzantes, extracto de malta y en ocasiones glutamato monosódico.

Los estudios muestran que la salsa de soja contiene componentes bioactivos y presenta varias funciones biológicas, que incluyen actividades anticancerígenas, antimicrobianas, antioxidantes y antiplaquetarias, disminución de la presión arterial e inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I [102]. Además, los polisacáridos que se originan en la pared celular de la soja mejoran la absorción de hierro y reducen los niveles elevados de triacilglicerol, tienen actividades antialérgicas y efectos reguladores sobre el sistema inmune [103].

V.E. Kimchi

De acuerdo con el *Codex Alimentarius*, el kimchi, declarado patrimonio cultural inmaterial por la Unesco, es un producto fermentado preparado con variedades de col china (*Brassica rapa pekinensis*) y otros vegetales a manera de condimento como pimentón rojo, ajo, pimienta, mostaza, jengibre, pepino y rábano, emblemático de la

cultura coreana [45]. Para su preparación las coles deben ser cortadas, saladas, lavadas con agua potable y escurridas. Luego se colocan en solución salina (5-7%) por 12 h y se lavan y escurren nuevamente.

La fermentación es principalmente una fermentación espontánea de BAL [12], en la que intervienen los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactococcus* y *Pediococcus* [104, 105], aunque también se observa un cierto crecimiento de bacterias aeróbicas, levaduras y mohos. El kimchi resultante generalmente contiene alrededor de 10^8-10^9 UFC/g de BAL. Típicamente, *L. mesenteroides* inicia la fermentación pero se inhibe rápidamente por la concentración creciente de ácido láctico siendo reemplazado por especies más tolerantes como *L. brevis* en una etapa intermedia y luego por *L. plantarum* en el final de la fermentación. De todas formas se considera que el kimchi de mayor sabor se obtiene antes del crecimiento masivo de *L. plantarum* y *L. brevis*, a un pH de 4,5. Finalizada la fermentación, el kimchi se madura durante varias semanas bajo refrigeración [104].

Las BAL presentes en el kimchi producen varios compuestos además de ácidos orgánicos, incluyendo CO_2, etanol, manitol, bacteriocinas, ácido γ-amino butírico, ornitina, ácido linoleico conjugado y oligosacáridos que contribuyen a sus características nutricionales y funcionales. Se ha informado que el kimchi tiene efectos anticancerígenos, antioxidantes, antiateroscleróticos, antidiabéticos y antiobesidad adjudicables a sus compuestos bioactivos [106, 107]. Además, este producto fermentado contiene niveles despreciables o nulos de NO_3, NO_2, nitrosaminas y aminas biogénicas.

Hasta la fecha, no se ha establecido un enfoque racional para controlar la comunidad microbiana durante la fermentación de kimchi, lo que dificulta la obtención de productos comerciales y de alta calidad. Desde comienzos del siglo 21, la industria del kimchi ha probado cepas de *L. mesenteroides, L. citreum o L. plantarum* como cultivos starter para lograr una mejor y más estable calidad organoléptica [108], demostrando una mayor aceptación general en base al sabor, y potenciales beneficios a la salud en comparación con el kimchi fermentado naturalmente [109]. Sin embargo, se ha sugerido que el uso diario de cultivos puros puede promover el desarrollo de bacteriófagos y defectos en la fermentación, al influenciar el crecimiento, viabilidad y dinámica poblacional de las BAL [110].

V.F. Silos para consumo animal

El ensilaje es una técnica de preservación de forrajes destinados a consumo animal, que se logra por medio de una fermentación láctica bajo condiciones anaeróbicas. La elaboración de silos permite obtener un alimento de alta calidad nutricional (mejorando la performance productiva de los bovinos) y mayor palatabilidad a un costo relativamente bajo, estabilizar la oferta de nutrientes durante todo el año manteniendo cargas más elevadas y disminuir el riesgo climático de la producción de pasturas.

Las BAL naturalmente presentes, o agregadas *ex profeso*, pueden fermentar vegetales usados para alimentación animal tales como maíz, sorgo, alfalfa, avena, *rye-grass*,

trigo, cebada, soja o malta [111], produciendo ácido láctico y en menor cantidad ácido acético que disminuyen el pH del ensilado a un nivel que inhibe a microorganismos que causan putrefacción. Una vez que el material fresco ha sido almacenado, compactado y cubierto para excluir el aire, el proceso se puede dividir en cuatro etapas [112]: en la fase aeróbica, que dura pocas horas, el oxígeno disminuye rápidamente debido a la respiración de los materiales vegetales y a microorganismos aeróbicos/aeróbicos facultativos como levaduras y enterobacterias. Además, hay una actividad importante de varias enzimas vegetales, como las proteasas y las carbohidrasas. La fase de fermentación comienza al producirse un ambiente anaeróbico, y se extiende por varios días a semanas. Si se desarrolla con éxito, las BAL se convierten en la población predominante y el pH desciende a valores entre 3,8 a 5,0. Luego se desarrolla una fase estable en la que se reducen la mayoría de las poblaciones microbianas. Solo algunas proteasas, carbohidrasas y microorganismos heterofermentativos como *L. buchneri*, continúan activos. Finalmente, con la apertura del silo y la exposición del ensilaje al aire, comienza la fase de deterioro aeróbico.

Si bien la fermentación láctica puede tener lugar por la actividad espontánea de la microbiota naturalmente presente en el material utilizado, también puede inducirse, controlarse y estandarizarse mediante el empleo de inoculantes para silos, formulados principalmente con lactobacilos [113], lográndose así beneficios nutricionales y económicos en comparación con la fermentación espontánea [114]. En general, los inoculantes compuestos por bacterias homofermentativas son usados para reducir las pérdidas de energía, nutrientes y materia seca asociadas a fermentaciones secundarias, mientras que los inoculantes con bacterias heterofermentativas, son útiles para inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables y, de este modo, mejorar la estabilidad aeróbica. El rol complementario de las bacterias homofermentativas y heterofermentativas en la fermentación del silo ha llevado al desarrollo de inoculantes que combinan ambos tipos de bacterias [115]. El empleo apropiado de estos productos, permite controlar y dirigir la fermentación microbiana favoreciendo la rápida disminución del pH, evitando la proliferación de clostridios, enterobacterias, *Listeria* spp., hongos y levaduras, la producción de nitrógeno amoniacal, ácido butírico y micotoxinas. Esto redunda en una mayor calidad del alimento, mayor estabilidad aeróbica una vez abierto el silo y una mayor receptibilidad por parte del ganado.

Es importante destacar que las micotoxinas representan un peligro sanitario de especial relevancia, ya que sus efectos tóxicos son de curso crónico, e incluyen carcinogenicidad, inmunosupresión y disrupciones endocrinas [116]. Si consideramos las pérdidas económicas que originan estos compuestos y el potencial impacto sobre la salud, tanto de los animales como de los seres humanos, es evidente el interés que puede suscitar la aplicación de BAL a las materias primas destinadas a la alimentación del ganado, como una estrategia para aminorar los peligros microbiológicos más comúnmente implicados y de esta manera, fomentar la sanidad animal, favorecer el rendimiento productivo y promover la salud pública [117].

V.G. Legumbres fermentadas

Las legumbres representan, por su importancia a nivel mundial, la segunda fuente de alimentos vegetales para la alimentación humana y animal, después de los cereales. Las legumbres más reconocidas como el poroto, garbanzo, lenteja y oleaginosas como la soja, son ampliamente producidas y consumidas en países de América Latina, Asia y África en los que existe acceso limitado a la proteína de origen animal, o su ingesta se encuentra restringida por hábitos culturales o religiosos [114]. Su valor biológico está dado por su elevado contenido de proteínas (20-40 % de su peso seco), carbohidratos complejos, lípidos insaturados, fibra dietaria, vitaminas (B y E), minerales (calcio, hierro, potasio, magnesio y fósforo) y fitoquímicos (péptidos, isoflavonas, ácidos fenólicos, etc.) con efectos beneficiosos [119] [120]. Al respecto, se ha demostrado el potencial de las legumbres para prevenir el estrés oxidativo, enfermedades cardiovasculares, diabetes, síndrome metabólico, osteoporosis, y varios tipos de cáncer entre otras patologías crónicas, permitiendo considerarlas por sí mismas como excelentes alimentos funcionales o como ingredientes para el desarrollo de nuevos productos [120]. De igual manera, el creciente diagnóstico de pacientes con celiaquía ha llevado a considerar a las harinas de legumbres como una alternativa atractiva para la manufactura de productos libres de gluten [121]. Estos beneficios llevaron a la Asamblea General de las Naciones Unidas, a proclamar al 2016 como el Año Internacional de las Legumbres (A/RES/68/231, FAO-OMS, 2015) y al 19 de febrero de cada año como Día Mundial de Las Legumbres con el fin de incrementar la producción mundial, mejorar su aprovechamiento y fomentar el consumo. En respuesta, el cultivo de legumbres en Argentina se ha incrementado en los últimos años con una producción en 2017/2018 de 686.488 Tn, de las cuales más del 50% corresponde a diferentes variedades de poroto que son producidos en el noroeste del país (http://www.clera.com.ar).

Sin embargo, la utilización directa de las legumbres o sus harinas como materia prima, requiere un procesamiento que aumente la digestibilidad y biodisponibilidad de sus nutrientes debido a la presencia de FAN como inhibidores de amilasa y proteasas, ácido fítico, saponinas, taninos, lectinas y α-galactósidos, los cuales reducen la absorción de nutrientes y son responsables de malestares gastrointestinales [122]. Para la inactivación/remoción de los FAN suele recurrirse a métodos físicos (calor, presión), químicos (enzimas, soluciones ácidas y salinas) y biológicos (germinación, fermentación), aunque algunos de ellos pueden degradar nutrientes, vitaminas y fitoquímicos relevantes y no remover completamente los compuestos indeseables [123].

En este sentido, la fermentación resulta la estrategia más atractiva para remover FAN mejorando en simultáneo las propiedades nutricionales, nutracéuticas, reológicas y sensoriales de las legumbres [23, 124]. Este proceso puede producirse espontáneamente por acción de la microbiota endógena que portan los granos [125, 126] o ser controlada por la inoculación de cultivos iniciadores [124, 126, 127, 128]. Microorganismos pertenecientes a varios géneros, han demostrado ser efectivos

en el proceso de fermentación de harinas de diferentes leguminosas como *Bacillus, Lactobacillus, Aspergillus* o *Cordyceps* [72, 73, 74, 126, 127].

Sin embargo, los cultivos iniciadores formulados exclusivamente con BAL revisten particular interés debido a su carácter inocuo, su aporte de metabolitos bioactivos, actividades enzimáticas que aumentan la digestibilidad de azúcares complejos y proteínas y por su potencial probiótico [23, 129].

Numerosos estudios han evaluado el efecto de la fermentación en los FAN de diferentes legumbres [29, 71, 130]. Así, se ha obtenido la eliminación parcial o total de α-galactósidos, taninos, fitatos e inhibidores de tripsina de harinas de legumbres mediante fermentación espontánea [131] o por fermentación láctica con cepas seleccionadas de *Lactobacillus* [29, 130]. Esto se debe a la presencia en los microorganismos de proteasas, glicosidasas, tanasas, fitasas, y la capacidad microbiana de ligar lectinas y bloquear su unión al epitelio intestinal. Investigaciones recientes han demostrado que las BAL, por acción de sus sistemas proteolíticos, pueden hidrolizar proteínas alergénicas y liberar péptidos tipo lunasina y AA no proteicos como el GABA con propiedades hipotensoras, antimicrobianas, inmunomoduladoras, hipoalergénicas, sedantes, anticariogénicas, antioxidantes, fijadoras de calcio, entre otras [132, 133, 134]. También su actividad β-glucosidasa puede degradar glucósidos tóxicos como vicina y convicina en habas [130] y convertir a las isoflavonas de la soja a genisteina y daidzeina que contrarrestan la deficiencia de estrógenos en la menopausia [135]. Sus actividades metabólicas también contribuyen a liberar durante la fermentación polifenoles bioactivos y otros metabolitos relevantes para la prevención del síndrome metabólico [136].

Entre las principales aplicaciones de las legumbres fermentadas se puede destacar el uso de las harinas para elaborar panes y crackers [137, 138], bebidas [10], productos fermentados semisólidos [139] o pastas tipo miso o hummus obtenidos a partir de soja y garbanzo respectivamente.

Desde el punto de vista tecnológico se ha demostrado que la fermentación ácida (*sourdough*) de harinas de leguminosas con BAL, contribuye a mejorar las características sensoriales y funcionales de los productos de panadería, tales como la textura, el flavour, la digestibilidad y poder antioxidante [133, 140, 141]. Panes libres de gluten elaborados con harinas fermentadas de habas resultaron mejores que los no fermentados mostrando mayor volumen y porosidad, como así también un incremento en la digestibilidad proteica, AA esenciales e índices nutricionales y de valor biológico [138].

La fermentación de legumbres puede llevarse a cabo como FSm o FSS, aunque ésta última es una estrategia emergente para la producción de alimentos de mejor calidad nutricional, funcional y sensorial y se ha empleado para fermentar harinas de soja, poroto y garbanzo [29, 68, 69, 72, 73].

Actualmente, existe una clara tendencia en los consumidores a elegir alimentos que, además de cubrir necesidades nutricionales promuevan su salud y bienestar. En este contexto, la suplementación de la dieta con legumbres fermentadas ha demostrado efectos beneficiosos como la modulación positiva de parámetros relacionados

con el desarrollo de diabetes [10, 142], por lo que el agregado de valor a materias primas mediante estrategias biotecnológicas como la fermentación que permitan obtener nuevos ingredientes alimentarios con mejores propiedades resulta un desafío para la ciencia y la industria alimentaria.

V.H. Vegetales fermentados de América Latina

Los vegetales fermentados también representan un componente importante de la dieta de los pueblos originarios de Latinoamérica. Estos alimentos son elaborados principalmente usando cereales (arroz, maíz), tubérculos (mandioca, yacón), frutos (ágave, tuna, palma) y leguminosas (maní, frijoles) como sustrato mediante fermentaciones espontáneas llevadas a cabo por levaduras, bacterias y hongos que permiten obtener productos palatables y nutricionalmente seguros de naturaleza alcohólica y no alcohólica. Entre los numerosos ejemplos de alimentos y bebidas fermentadas latinoamericanas pueden mencionarse: *calugi, cauim, caxiri, chicha, masa agria, pozol, pulque, polvillo, tarubá, tejuino y yakupa* [143]. Las comunidades microbianas presentes en ellos están compuestas por BAL, Bacillus sp., y levaduras como *S. cerevisiae*, Pichia sp., Candida sp., *Hanseniaspora uvarum* y *Torulaspora delbrueckii*. Los alimentos no-alcohólicos están dominados por BAL mientras que las fermentaciones alcohólicas por *S. cerevisiae*. En general, el conocimiento necesario para su elaboración es empírico, transmitido de generación en generación, por lo que permanece a nivel artesanal en los hogares y pueblos. Muchos de estos alimentos son ingeridos por la población nativa con fines medicinales y religiosos además de nutricionales, y son solo conocidos y consumidos en la región que los produce; por lo que han sido poco estudiados científicamente. Esto alienta futuras investigaciones tendientes a seleccionar microorganismos a partir de los mismos, para lograr fermentaciones controladas con cepas que aporten beneficios tecnológicos al alimento y de salud para los consumidores.

VI. Conclusión

La fermentación con BAL representa una estrategia fácil y adecuada para aumentar el consumo diario de legumbres y hortalizas. A menudo, la fermentación láctica se lleva a cabo espontáneamente siguiendo protocolos que están fuertemente arraigados en la cultura y las tradiciones de los diferentes países alrededor del mundo. Los productos vegetales fermentados son microbiológicamente seguros, nutritivos y tienen características sensoriales agradables; y algunos de ellos pueden almacenarse por períodos prolongados sin refrigeración. La fermentación controlada con BAL seleccionadas es una alternativa promisoria para garantizar productos de alta calidad desde el punto de vista nutricional, organoléptico y con beneficios para la salud del consumidor. Los avances recientes en genómica y ecología microbiana molecular

auguran un futuro brillante para su aplicación en la fermentación vegetal. Sin embargo, es necesario alentar enfoques moleculares para estudiar la composición de la microbiota y seleccionar iniciadores dirigidos a diferentes legumbres y hortalizas, generar productos con propiedades nutricionales superiores a los actuales, e incorporar vegetales no tradicionales.

VII. Declaración de posibles conflictos de interés

Los autores no declaran poseer conflictos de interés.

VIII. Bibliografía citada

[1] Tiwari, U. & Cummins, E. (2013). Factors influencing levels of phytochemicals in selected fruit and vegetables during pre- and post-harvest food processing operations. Food Research International, 50(2), 497-506.

[2] Septembre-Malaterre, A., Remize, F., & Pouchereta, P. (2018). Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. Food Research International, 104, 86-99.

[3] Devlieghere, F., Vermeiren, L., & Debevere, J. (2004). New preservation technologies: possibilities and limitations. International Dairy Journal, 14, 273-285.

[4] Elmnasser, N., Guillou, S., Leroi, F., Orange, N., Bakhrouf, A., & Federighi, M. (2007). Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: a review. Canadian Journal of Microbiology, 58, 813-821.

[5] Leroy, F., & De Vuyst, L. (2014). Fermented food in the context of a healthy diet: how to produce novel functional foods? Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 17, 574-581.

[6] Kusznierewicz, B., Bartoszek, A., Wolska, L., Drzewiecki, J., Gorinstein, S., & Namieśnik, J. (2008). Partial characterization of white cabbages (Brassica oleracea var. capitata f. alba) from different regions by glucosinolates, bioactive compounds, total antioxidant activities and proteins. LWT-Food Science and Technology, 41(1), 1-9.

[7] Bonatsou, S., Tassou, C.C., Panagou, E., & Nychas, G.J. (2017) Table Olive Fermentation Using Starter Cultures with Multifunctional Potential Microorganisms, 5, 30; doi:10.3390/microorganisms5020030

[8] Nguyen, D.T.L., Van Hoorde, K., Cnockaert, M., De Brandt, E., Aerts, M., Binh Thanh, L., & Vandamme, P. (2013). A description of the lactic acid bacteria microbiota associated with the

production of traditional fermented vegetables in Vietnam. International Journal of Food Microbiology,163, 19-27.

[9] Saeedi, M., Shahidi, F., Mortazavi, S.A., Milani, E., & Yazdi, F.T. (2015). Isolation and identification of lactic acid bacteria in winter salad (local pickle) during fermentation using 16S rRNA gene sequence analysis. Journal of Food Safety, 35(3), 287-294.

[10] Marazza J.A., Nazareno, M.A., Savoy de Giori G., & Garro M.S. (2012). Enhancement of the antioxidant capacity of soymilk by fermentation with Lactobacillus rhamnosus. Journal of Functional Foods. 4, 594-601.

[11] Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. Food Microbiology, 33, 1-10.

[12] Buckenhueskes, H.J. (2015). Quality improvement and fermentation control in vegetables. Capítulo de libro en: Advances in Fermented Foods and beverages. Ed.: Holzapfel, W. Woodhead Publishing, Cambridge. pp. 515-539.

[13] Novik, G., & Savich, V. (2019). Beneficial microbiota. Probiotics and pharmaceutical products in functional nutrition and medicine. Microbes and Infection, https://doi.org/10.1016/j.micinf.2019.06.004

[14] Collado, M.C., Vinderola, C.G., & Salminen, S. (2019). Postbiotics: facts and open questions. A position paper on the need for a consensus definition. Beneficial Microbes 10, 711-719.

[15] Marco, M.L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C.J., Cotter, P.D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E.J., Hutkins, R. (2017). Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond. Current Opinion in Biotechnology, 44, 94-102.

[16] Furtado Martins E.M., Mota Ramos, A., Lago Vanzela, E.S., 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, 764-770.

[17] Yu, J., Gao, W., Qing, M., Sun, Z., Wang, W., Liu, W., Pan, L., Sun, T., Wang, H., Bai, N., & Zhang, H. (2012). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles in Sichuan, China. The Journal of General and Applied Microbiology, 58, 163-72.

[18] Jay, J.M. (2000). Fermentation and fermented dairy products. Modern food microbiology. 6th edition. Aspen Publishers Inc. Gaithersburg, USA. 113-30.

[19] Filannino, P., Di Cagno, R., & Gobbetti, M. (2018). Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth. Current Opinion in Biotechnology, 49, 64-72.

[20] Menezes, L.A.A., Minervini, F., Filannino, P., Sardaro, M.L.S., Gatti, M., & De Dea Lindner, J. (2018). Effects of sourdough on FODMAPs in bread and potential outcomes on irritable

bowel syndrome patients and healthy subjects. Frontiers in Microbiology, 9:1972.doi: 10.3389/fmicb.2018.01972

[21] Iraporda, C., Errea, A., Romanin, D.E., Cayet, D., Pereyra, E., Pignataro, O, Sirard, J.C., Garrote, G.L., Abraham, A.G., & Rumbo, M. (2015). Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells. Immunobiology, 220, 1161-1169.

[22] Rizzello, C.G., Tagliazucchi, D., Babini, E., Sefora Rutella, G., Taneyo Saa, D.L., & Gianotti, A. (2016). Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. Journal of Functional Foods, 27, 549-569.

[23] Verni, M., Verardo, V., & Rizzello, C.G. (2019). How fermentation affects the antioxidant properties of cereals and legumes. Foods, 8, 362; doi:10.3390/foods8090362

[24] Rodriguez, H., Curiel, J.A., Landete, J.M., de las Rivas, B., Lopez de Felipe, F., Gomez-Cordoves, C., & Munoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 132, 79-90.

[25] Jiménez, N., Esteban-Torres, M., Mancheño, J.M., de las Rivas, B., Muñoz, R. (2014) Tannin degradation by a novel tannase enzyme present in some Lactobacillus plantarum strains. Applied Environmental Microbiology. 80, 2991-2997.

[26] Filannino, P., Bai, Y., Di Cagno, R., Gobbetti, M., & Ganzle, M.G. (2015) Metabolism of phenolic compounds by Lactobacillus spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. Food Microbiology. 46, 272-279.

[27] Michlmayr, H., & Kneifel, W. (2014). β-Glucosidase activities of lactic acid bacteria: Mechanisms, impact on fermented food and human health. FEMS Microbiology Letters, 352(1), 1-10.

[28] Russo, M.I., Fabersani, E., Abeijon Mukdsi, M.C., Ross, R., Fontana, C., Benítez-Páez, A.; Gauffin-Cano, P., & Medina, R. (2016). Lactobacillus fermentum CRL1446 ameliorates oxidative and metabolic parameters by increasing intestinal feruloyl esterase activity and modulating microbiota in caloric-restricted mice. Nutrients. 8, 415-428.

[29] Sáez, G.D., Hébert, E.M., Saavedra, L. & Zárate, G. (2017). Molecular identification and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented kidney beans flours (Phaseolus vulgaris L. and P. coccineus) in northwestern Argentina. Food Research International, 102, 605-615.

[30] Hosseini, E.S., Kermanshahi, R.K., Hosseinkhani, S., Shojaosadati, S.A., & Nazari, M. (2015). Conjugated linoleic acid production from various substrates by probiotic Lactobacillus plantarum. Annals of Microbiology, 65, 27-32.

[31] Barbieri, F., Montanari, C., Gardini, F., & Tabanelli, G. Biogenic amine production by lactic

acid bacteria: A Review. Foods 2019, 8, 17; doi:10.3390/foods8010017

[32] Lai, L.-R., Hsieh, S.-C., Huang, H.-Y., & Chou, C.-C. (2013). Effect of lactic fermentation on the total phenolic, saponin and phytic acid contents as well as anti-colon cancer cell proliferation activity of soymilk. Journal of Bioscience and Bioengineering, 115(5), 552–556.

[33] Salazar, N., Gueimonde, M., De Los Reyes-Gavilan, C.G., & Ruas-Madiedo, P. (2015). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and bifidobacteria as fermentable substrates by the intestinal microbiota. Critical Reviews of Food Science and Nutrition, 56(9),1440-1453.

[34] Saadat Y.R., Khosroushahib, A.Y., & Gargarid B.P. (2019). A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. Carbohydrate Polymers, 217, 79-89.

[35] Xu, Y., Cui, Y., Yue, F.; Liu, L., Shan, Y., Liu, B., Zhou, Y., & Lü, X. (2019). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and Bifidobacteria: Structures, physiochemical functions and applications in the food industry. Food Hydrocolloids, 94, 475-499.

[36] Derrien, M., & van Hylckama Vlieg, J.E. (2015). Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. Trends in Microbiology, 23(6), 354-366.

[37] Rao, M.S., Pintado, J., Stevens W.F., & Guyot, J.P. (2004). Kinetic growth parameters of different amylolytic and non-amylolytic Lactobacillus strains under various salt and pH conditions. Bioresource Technology, 94, 331-337.

[38] Daeschel, M.A., Andersson, R.E., & Fleming, H.P. (1987). Microbial ecology of fermenting plant material. FEMS Microbilogy Letters, 46, 357-367.

[39] Savitri, M., Kumar, V., Kumari, A., Angmo, K., & Bhalla, T.C. (2017). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional pickles of Himachal Pradesh, India. Journal of Food Science and Technology, 54, 1945-1952.

[40] Fleming, H.P. (1982). Fermented vegetables. En Economic Microbiology.Fermented Foods. Vol. 7, p. 227. A.H. Rose (Ed.), Academic Press Inc., New York.

[41] Fan, L., & Truelstrup Hansen, L. (2012). Fermentation and biopreservation of plant-based foods with lactic acid bacteria. En: Handbook of Plant-based Fermented Food and Beverage Technology, second ed. Ed.: Hui, Y.H. Editorial: CRC Press, Boca Raton, USA. Pp. 35-48.

[42] McDonald, I.C., Fleming, H.P., & Hassan, H.M. (1990). Acid tolerance of Leuconostoc mesenteroides and Lactobacillus plantarum. Applied and Environmental Microbiology, 56, 2120-2124.

[43] Breidt, F., McFeeters, R.F., Perez-Diaz, I., & Lee, C.H. (2013). Fermented fruits and vegetables: a global perspective. Capítulo de libro en: Food Microbiology: Fundamentals and

Frontiers. Ed.: Doyle, M.P., Buchanan, R.L. Editorial: ASM Press, Washington DC. Pp. 841-855.

[44] Wouters, D., Bernaert, N., Conjaerts, W., Van Droogenbroeck, B., De Loose, M. & De Vuyst, L. (2013). Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of spontaneous leek fermentations. Food Microbiology, 33, 185-196.

[45] Jung, J.Y., Lee, S.H., Kim, J.M., Park, M.S., Bae, J.-W., Hahn, Y., Madsen, E.L., & Jeon, C.O. (2011). Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. Applied and Environmental Microbiology, 77, 2264-2274.

[46] Tamang, J.P., Cotter, P.D., Endo, A., Han, N.S., Kort, R., Liu, S.Q., Mayo, B., Westerik, N., & Hutkins, R. (2020). Fermented foods in a global age: East meets West. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 19:184-217.

[47] Van Hylckama Vlieg, J.E.T., Veiga, P., Zhang, C., Derrien, M., & Zhao, L. (2011). Impact of microbial transformation of food on health - From fermented foods to fermentation in the gastro-intestinal tract. Current Opinion in Biotechnology, 22, 211-219.

[48] Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J.C., Gerds, M.L., Hammes, W.P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I.B., Prajapati, J.B., Seto, Y., Ter Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijtelaars, S., Hansen, E.B. (2012). Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. International Journal of Food Microbiology, 154, 87-97.

[49] Juvonen, R., Honkapää, K., Maina, N. H., Shi, Q., Viljanen, K., Maaheimo, H., & Lantto, R. (2015). The impact of fermentation with exopolysaccharide producing lactic acid bacteria on rheological, chemical and sensory properties of pureed carrots (Daucus carota L.). International Journal of Food Microbiology, 207, 109-118.

[50] Di Cagno, R., Surico, R.F., Paradiso, A., De Angelis, M., Salmon, J.-C., Buchin, S., De Gara, L., & Gobbetti, M. (2009). Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensory properties of tomato juices. International Journal of Food Microbiology, 128, 473-483.

[51] Ortíz-Serrano, P., & Gil, J.V. (2007). Quantitation of free and glycosidically bound volatiles in and effect of Glycosidase addition on three tomato varieties (Solanum lycopersicum L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 9170-9176.

[52] Bhanja Dey, T., Chakraborty, S., Jain, K., Sharma, A., Kuhad R.C. (2016). Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. Trends in Food Science & Technology, 53, 60-74.

[53] Soccol, C.R., da Costa, E.S.F., Letti, L.A.J., Karp, S.G., Woiciechowski, A.L., & de Souza Vandenberghe, L.P. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. Biotechnology Research and Innovation, 1(1), 52-71.

[54] Gassara, F., Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Valero, J. (2012). Liquid state fermentation of apple pomace sludge for the production of ligninolytic enzymes and liberation of polyphenolic compounds. Process Biochemistry, 47, 999-1004

[55] Raghuwanshi, S., Dutt, K., Gupta, P., Misra, S., & Saxena, R.K. (2011). Bacillus sphaericus: the highest bacterial tannase producer with potential for gallic acid synthesis. Journal of Bioscience and Bioengineering, 111, 635-640.

[56] da Costa, A.M., de Souza, C.G.M., Bracht, A., Kadowaki, M.K., da Silva de Souza, A. C., Oliveira, R.F., Peralta, R.M. (2013). Production of tannase and gallic acid by Aspergillus tamarii in submerged and solid state cultures. African Journal of Biochemistry Research, 7, 197-202.

[57] Kaur, B., Chakraborty, D., Kaur, G., & Kaur, G. (2013). Biotransformation of rice bran to ferulic acid by Pediococcal isolates. Applied Biochemistry and Biotechnology, 170, 854-867.

[58] Montet, D., Ray, R.C. & Zakhia-Rozis, N. (2014). Lactic Acid Fermentation of Vegetables and Fruits. Capítulo de libro en: Microorganisms and fermentation of traditional foods. Ed.: Ray, R. C., Montet, D. Editorial: CRC Press. Pp. 108-140.

[59] Liu, S.-N., Han, Y., & Zhou, Z.-J. (2011). Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese food. Food Research International, 44, 643-651.

[60] Vatansever, S., Vegi, A., Garden-Robinson, J., & Hall, C.A. (2017). The Effect of fermentation on the physicochemical characteristics of dry-salted vegetables. Journal of Food Research, 6, 32-40.

[61] Pérez-Díaz, I.M., Breidt, F., Buescher, R.W., Arroyo-López, F.N., Jiménez-Díaz, R., Garrido Fernández, A., Bautista Gallego, J. & Yoon, S.S. (2014). Chapter 51: Fermented and acidified vegetables. In: Pouch Downes, F. and Ito, K.A. (Eds.) Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, fifth edition. American Public Health Association, Washington, Dc.

[62] Dahal, N.R., Karki, T.B., Swamylingppa, B., Li, Q., & Gu, G. (2005). Traditional foods and beverages of Nepal-a review. Food Reviews International, 21, 1-25.

[63] Tamang, J.P., Tamang, B., Schillinger, U., Franz, C.M., Gores, M., & Holzapfel, W.H. (2005). Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. International Journal of Food Microbiology, 105, 347-356.

[64] Hölker, U., & Lenz, J. (2005). Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? Current Opinion in Microbiology, 8,301-306

[65] Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., Monta~nez-Saenz, J., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. Biotechnology Advance, 29, 365-373.

[66] Mitchell, D.A., Von Meien, O.F., & Krieger, N. (2003). Recent developments in modeling of solid state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors, Biochemical Engineering Journal, 13, 137-147.

[67] Di Luccio, M., Capra, F., & Ribeiro, N.P. (2004) Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by Penicillium simplicissimum. Applied Biochemistry and Biotechnology, 113, 173-180.

[68] Rodriguez de Olmos, A., Bru, E., & Garro, M.S. (2015). Optimization of fermentation parameters to study the behavior of selected lactic cultures on soy solid state fermentation. International Journal of Food Microbiology, 196, 16-23.

[69] Rui, X., Wang, M., Zhang, Y., Chen X., Li, L., Liu, Y., & Dong, M. (2017). Optimization of soy solid-state fermentation with selected lactic acid bacteria and the effect on the anti-nutritional components. Journal of Food Processing and Preservation, 41(6):e13290, https://doi.org/10.1111/jfpp.13290

[70] Juan, M.Y., & Chou, C.C. (2010). Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with Bacillus subtilis BCRC 14715. Food Microbiology, 27, 586-591.

[71] Bartkiene, E., Krungleviciute, V., Juodeikiene, G., Vidmantiene, D., & Maknickiene, Z. (2014). Solid state fermentation with lactic acid bacteria to improve the nutritional quality of lupin and soya bean. Journal of the Science of Food and Agriculture, 95(6), 1336-1342.

[72] Xiao Y., Xing, G., Rui, X., Li, W., Chen, X., Jiang, M. & Dong M. (2015) Effect of solid-state fermentation with Cordyceps militaris SN-18 on physicochemical and functional properties of chickpea (Cicer arietinum L.) flour. LWT - Food Science and Technology, 63, 1317-1324.

[73] Xiao, Y., Sun, M., Zhang, Q., Chen, Y., Miao, J., Rui, X., Dong, M. (2018). Effects of Cordyceps militaris (L.) Fr. fermentation on the nutritional, physicochemical, functional properties and angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of red bean (Phaseolus angularis [Willd.] W.F. Wight.) flour. Journal of Food Science and Technology, 55(4),1244-1255.

[74] Limón, R.I., Peñas, E., Torino, M.I., Martínez-Villaluenga, C., Dueñas, M., & Frias, J. (2015). Fermentation enhances the content of bioactive compounds in kidney bean extracts. Food Chemistry, 172, 343-352.

[75] Rezac, S., Kok, C.R., Heermann, M., & Hutkins, R. (2018). Fermented foods as a dietary source of live organisms. Frontiers in Microbiology. doi: 10.3389/fmicb.2018.01785.

[76] Ana, A.S., Azeredo, D.P., Costa, M., Macedo, V. (2002). Analysis of risks of minimal processing of vegetables. Higiene Alimentaria,16, 80-84.

[77] Ross, R.P., Morgan, S., & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. International Journal of Food Microbiology, 79, 3-16.

[78] Karovicova, J., Drdak, M., Greif, G., & Hybenova, E. (1999). The choice of strains of Lactobacillus species for the lactic acid fermentation of vegetable juices. European Food Research and Technology, 210, 53-56.

[79] Zieliński, H., Surma, M., & Zielińska, D. (2017). The naturally fermented sour pickled cucumbers. Capítulo de libro en: Fermented Foods in Health and Disease Prevention. Ed.; Frias, J., Martinez-Villaluenga, C., Peñas, E. Editorial: Academic Press. Pp. 503-516.

[80] Steinkraus, K.H. (2002). Fermentations in world food processing. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 1, 23-32.

[81] Halami, P.M., Ramesh, A., & Chandrashekar, A. (2005). Fermenting cucumber, a potential source for the isolation of pediocin like bacteriocin producers. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21, 1351-1358.

[82] Singh, A.K., & Ramesh, A. (2008). Succession of dominant and antagonistic lactic acid bacteria in fermented cucumber: insights from a PCR-based approach. Food Microbiology, 25, 278-287.

[83] Eom, H.J., Seo, D.M., & Han, N.S. (2007). Selection of psychrotrophic Leuconostoc spp. Producing highly active dextransucrase from lactate fermented vegetables. International Journal of Food Microbiology, 117, 61-67.

[84] Peñas, E., Martinez-Villaluenga, C., & Frias, J. (2016). Sauerkraut: production, composition, and health benefits. Capítulo de libro en: Fermented Foods in Health and Disease Prevention. Editorial: Academic Press. Pp. 557-576.

[85] Beganovic, J., Pavunc, A. L., Gjuracic, K., Spoljarec, M., Suskovic, J., & Kos, B. (2011). Improved sauerkraut production with probiotic strain Lactobacillus plantarum L4 and Leuconostoc mesenteroides LMG 7954. Journal of Food Science, 76, 124-129.

[86] Pederson, C.S. (1979). Microbiology of food fermentations (2nd edition). Westport, CT: AVI.

[87] Podsędek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: a review. LWT-Food Science and Technology, 40, 1-11.

[88] Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., & Rozes, N. (2012). Lactic acid bacteria from fermented table olives. Food Microbiology 31, 1-8.

[89] Peres, C. M., Peres, C., Hernández-Mendoza, A., & Malcata, F. X. (2012). Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria–with an emphasis on table olives. Trends in Food Science & Technology, 26, 31–42.

[90] Montano, A., Sánchez, A.H., Casado, F.J., de Castro, A., & Rejan, L. (2003). Chemical profile of industrially fermented green olives of different varieties. Food Chemistry, 82, 297-302.

[91] Tsapatsaris, S., & Kotzekidou, P. (2004). Application of central composite design and response surface methodology to the fermentation of olive juice by Lactobacillus plantarum and Debaryomyces hansenii. International Journal of Food Microbiology, 95, 157-168.

[92] Corsetti, A., Perpetuini, G., Schirone, M., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2012). Application of starter cultures to table olive fermentation: an overview on the experimental studies. Frontiers in Microbiology, doi: 10.3389/fmicb.2012.00248.

[93] Gavahian, M.; Khaneghah, A.M.; Lorenzo, J.M., Munekata P.E.S., Izaskun García-Mantrana, I.; Collado, M.C., Meléndez-Martínez, A.J., & Barba, F.J. (2019). Health benefits of olive oil and its components: Impacts on gut microbiota antioxidant activities, and prevention of noncommunicable diseases. Trends in Food Science & Technology 88, 220-227.

[94] Malheiro, R., Sousa, A., Casal, S., Bento, A., & Pereira, J.A. (2011). Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives. Food and Chemical Toxicology, 49, 450-457.

[95] Devanthi, P.V.P, & Gkatzionis, K. (2019). Soy sauce fermentation: Microorganisms, aroma formation, and process modification. Food Research International, 120, 364-374.

[96] Feng, Y., Cai, Y., Su, G., Zhao, H., Wang, C., & Zhao, M. (2014). Evaluation of aroma differences between high-salt liquid-state fermentation and low-salt solid-state fermentation soy sauces from China. Food Chemistry, 145, 126-134.

[97] van der Sluis, C., Tramper, J., & Wijffels, R.H. (2001). Enhancing and accelerating flavour formation by salt-tolerant yeasts in Japanese soy-sauce processes. Trends in Food Science and Technology, 12, 322–327.

[98] Luh, B.S. (1995). Industial production of soy sauce. Journal of Industrial Microbiology, 14, 467-741.

[99] Mar, T., Lynn, T.M., Aye, K.N., & Khaing, K.M. (2013). Study on the production of fermented soybean sauce by using Aspergillus oryzae and Aspergillus flavus. Journal of Scientific and Innovative Research, 2, 1-10.

[100] Kaneko, S., Kumazawa, K., & Nishimura, O. (2013). Studies on the key aroma compounds in raw (unheated) and heated japanese soy sauce. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 6, 3396-3402.

[101] Sun, S.Y., Jiang, W.G., & Zhao, Y.P. (2010). Profile of volatile compounds in 12 Chinese soy sauces produced by a high-salt-diluted state fermentation. Journal of the Institute of Brewing, 116, 316-328.

[102] Murooka, Y., & Yamashita, M. (2008). Traditional healthful fermented products of Japan. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35, 791-798.

[103] Kobayashi, M. (2013). Nutritional functions of polysaccharides from soy sauce in the gastrointestinal tract. Capítulo de libro en: Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal Disease. Ed.: Watson, R.R. Victor R., Preedy, V.R. Editorial: Academic Press. Pp. 139-147.

[104] Lee, D.Y., Kim, S.J., Cho, J.H., & Kim, J.H. (2008). Microbial population dynamics and temperature changes during fermentation of kimjang kimchi. Journal of Microbiology, 46, 590-593.

[105] Park, K.Y., & Kim, B.K. (2012). Lactic acid bacteria in vegetable fermentation. Capítulo de libro en: Lactic Acid Bacteria. Ed.: Lahtnen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., von Wright, A. Editorial: CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Pp. 187-211.

[106] Kim, Y.T., Kim, B.K., & Park, K.Y. (2007). Antimutagenic and anticancer effects of leaf mustard and leaf mustard kimchi. Journal of Food Science and Nutrition, 12, 84-88.

[107] Islam, M.S., & Choi, H. (2009). Antidiabetic effect of Korean traditional baechu (Chinese cabbage) kimchi in a type 2 diabetes model of rats. Journal of Medicinal Food, 12, 292-297.

[108] Lee, M.E., Jang, J.Y., Lee, J.H., Park, H.W., Choi, H.J., & Kim, T.W. (2015). Starter cultures for kimchi fermentation. Journal of Microbiology and Biotechnology, 25, 559-568

[109] Bong, Y.J., Jeong, J.K., & Park, K.Y. (2013). Fermentation properties and increased health functionality of kimchi by kimchi lactic acid bacteria starters. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 42, 1717-1726.

[110] Kong, S., & Park, J.H. (2019). Effect of bacteriophages on viability and growth of co-cultivated Weissella and Leuconostoc in kimchi fermentation. Journal of Microbiology and Biotechnology, 29, 558-561.

[111] Oliveira A.S., Weinberg, Z.G., Ogunade, I.M., Cervantes, A.A.P., Arriola, K.G., Jiang, Y., Kim, D., Li, X., Gonçalves, M.C.M., Vyas, D., & Adesogan, A.T. (2017). Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. Journal of Dairy Science, 100, 4587-4603.

[112] Oude Elferink, S.J.W.H., Driehuis, F., Gottschal, J.C. & Spoelstra, S.F. (1999). Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. En Conferencia Electrónica de la FAO sobre el Ensilaje en los Trópicos. Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos. Editorial: L. t'Mannetje. Roma, FAO. (Estudio FAO Producción y Protección Vegetal Nº 161). http://www.fao.org/ DOCREP/005/X8486S/x8486s04.htm#bm04

[113] Giraffa, G., Chanishvili, N., & Widyastuti, Y. (2010). Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. Research in Microbiology, 161, 480-487.

[114] Kalac, P. (2011). The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of

cow's milk: A review. Food Chemistry, 125, 307-317.

[115] Blajman, J.E., Páez, R.B., Vinderola, C.G., Lingua, M.S., & Signorini, M.L. (2018). A meta-analysis on the effectiveness of lactic acid bacteria for corn silage. Journal of Applied Microbiology, 125, 1655-1669.

[116] Ogunade, I.M., Martinez-Tuppia, C., Queiroz, O.C.M., Jiang, Y., Drouin, P., Wu, F., Vyas, D., & Adesogan, A.T. (2018). Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. Journal of Dairy Science,101, 4034-4059.

[117] Signorini, M.L., Gaggiotti, M., Molineri, A., Chiericatti, C.A., Zapata De Basílico, M.L., Basílico, J.C., & Pisani, M. (2012). Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. Food and Chemical Toxicology, 50, 250-257.

[118] Boye J., Zare F. & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. Food Research International, 43, 414-431.

[119] Campos-Vega, R.G., Loarca-Piña, B.D., & Oomah, C. (2010). Minor components of pulses and their potential impact on human health. Food Research International, 43, 461-482.

[120] Suárez-Martínez, S.E., Ferriz-Martínez, R.A., Campos-Vega, R., Elton-Puente, J.E., de la Torre Carbot, K., & García-Gasca, T. (2016). Bean seeds: leading nutraceutical source for human health. CyTA - Journal of Food, 14(1), 131-137.

[121] Miñarro, B., Albanell, E., Aguilar, N., Guamis, B., & Capellaset, M. (2012) Effect of legume flours on baking characteristics of gluten-free bread. Journal of Cereal Science, 56, 476-481.

[122] Khokhar, S., & Owusu Apenten, R.K. (2009). Antinutritional factors in food legumes and effects of processing. In V.R. Squires (Eds.), The Role of food, Agriculture, Forestry and Fisheries in Human Nutrition (pp. 82-116). Oxford, UK: Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). Publishers Co Ltd.

[123] Shimelis, E.A., & Rakshit, S.K. (2007). Effect of processing on antinutrients and in vitro protein digestibility of kidney bean (Phaseolus vulgaris L.) varieties grown in East Africa. Food Chemistry, 103,161-172.

[124] Ferreira, L.M.M., Ferreira, A.M., Benevides, C.M.J., Melo, D., Costa, A.S.G., Mendes-Faia A., & Oliveira M.B.P. (2019). Effect of controlled microbial fermentation on nutritional and functional characteristics of cowpea bean flours. Foods, 8, 530; doi:10.3390/foods8110530

[125] Rizzello, C.G., Calasso, M., Campanella, D., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2014) Use of sourdough fermentation and mixture of wheat, chickpea, lentil and bean flours for enhancing the nutritional, texture and sensory characteristics of white bread. International Journal of Food Microbiology, 180, 78-87.

[126] Gan, R.Y., Shah, N.P., Wang, M., Lui, W., & Corke, H. (2016). Fermentation alters antioxidant capacity and polyphenol distribution in selected edible legumes. International Journal of Food Science and Technology, 51, 875-884.

[127] Jhan, J.K., Chang, W.F., Wang, P.M., Chou, S.T, & Young, Y.C. (2015). Production of fermented red beans with multiple bioactives using co-cultures of Bacillus subtilis and Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus. LWT-Food Science and Technology, 63, 1281-1287

[128] Coda, R., Melama, L., Rizzello, C.G., Curiel, J.A., Sibakov, J., Holopainen, U., Pulkkinen, M., Sozer, N. (2015). Effect of air classification and fermentation by Lactobacillus plantarum VTT E-133328 on faba bean (Vicia faba L.) flour nutritional properties. International Journal Food Microbiology, 193, 34-42.

[129] Rizzello, C.G., Coda, R., Wang, Y., Verni, M., Kajala, I., Katina, K., & Laitila, A. (2018). Characterization of indigenous Pediococcus pentosaceus, Leuconostoc kimchii, Weissella cibaria and Weissella confusa for faba bean bioprocessing. International Journal of Food Microbiology. 303, 24-34.

[130] Rizzello, C.G., Losito, I., Facchini, L., Katina, K., Palmisano, F., Gobbetti, M., & Coda R. (2016). Degradation of vicine, convicine and their aglycones during fermentation of faba bean flour. Scientific Reports, 6, 32452.

[131] Granito, M., Frías, J., Doblado, R., Guerra, M., Champ, M., & Vidal-Valverde, C. (2002) Nutritional improvement of beans (Phaseolus vulgaris) by natural fermentation. European Food Research and Technology, 214, 226-231.

[132] Wang, N.F., Le, G.W., Shi, Y.H., & Zeng, Y. (2014). Production of bioactive peptides from soybean meal by solid state fermentation with lactic acid bacteria and protease. Advance Journal of Food Science and Technology, 6(9), 1080-1085.

[133] Rizzello, C.G., Hernández-Ledesma, B., Fernández-Tomé, S., Curiel, J.A., Pinto, D., Marzani, B., Coda, R., & Gobbetti, M. (2015). Italian legumes: Effect of sourdough fermentation on lunasin-like polypeptides. Microbial Cell Factories, 14, 168. doi: 10.1186/s12934-015-0358-6

[134] Biscola, V., Rodriguez de Olmos, A., Choiset, Y., Rabesona, H., Garro, M.S., Mozzi F., Chobert, J-M., Drouet, M., Haertlé, T., & Franco, B.D.G.M. (2017). Soymilk fermentation by Enterococcus faecalis VB43 leads to reduction in the immunoreactivity of the allergenic proteins β-conglycinin (7S) and glycinin (11S). Beneficial Microbes, 8(4), 635-643.

[135] Jungbauer, A., & Medjakovic, S. (2014). Phytoestrogens and the metabolic syndrome. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology,139, 277-289.

[136] Jakubczyk, A. (2018). Effect of addition of fermented bean seed flour on the content of bioactive components and nutraceutical potential of wheat wafers. LWT - Food Science and Technology. 98, 245-251.

[137] Sáez, G.D., Hébert, E.M., Saavedra, L. & Zárate, G. (2017). Molecular identification and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented kidney beans flours (Phaseolus vulgaris L. and P. coccineus) in northwestern Argentina. Food Research International, 102, 605-615.

[138] Sozer, N., Melama, L., Silbir, S., Rizzello, C.G., Flander, L., & Poutanen, K. (2019). Lactic acid fermentation as a pre-treatment process for faba bean flour and its effect on textural, structural and nutritional properties of protein-enriched gluten-free faba bean breads. Foods, 8, 431, doi:10.3390/foods8100431

[139] Lim, X.X., Koh, W.Y., Uthumporn, Maizura, M., & Wan Rosli, W.I. (2019). The development of legume-based yogurt by using water kefir as starter culture. International Food Research Journal, 26(4), 1219-1228.

[140] Coda, R., Rizzello, C.G., & Gobbetti, M. (2010). Use of sourdough fermentation and pseudocereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of gamma-aminobutyric acid (GABA). International Journal of Food Microbiology, 137, 236-245.

[141] Gabriele, M., Sparvoli, F., Bollini, R., Lubrano, V., Longo, V., & Pucci, L. (2019). The impact of sourdough fermentation on non-nutritive compounds and antioxidant activities of flours from different Phaseolus Vulgaris L. genotypes. Journal of Food Science, 84, doi: 10.1111/1750-3841.14672

[142] Ademiluyia, A.O., Oboha, G., Boligonb, A.A., & Athaydeba, M.L. (2015)
Dietary supplementation with fermented legumes modulate hyperglycemia and acetylcholinesterase activities in Streptozotocin-induced diabetes. Pathophysiology, 22(4), 195-201.

[143] Lacerda Ramos, C., & Freitas Schwan, R. (2017). Technological and nutritional aspects of indigenous Latin America fermented foods. Current Opinion in Food Science, 13, 97-102.

10

Fermentación de jugos y bebidas a base de frutas

Luciana G. Ruíz Rodríguez
rrlucianag@hotmail.com

• *CERELA-CONICET, Chacabuco 145, 4000. San Miguel de Tucumán, Argentina*

Lucía Mendoza
lmendoza@cerela.org.ar

• *CERELA-CONICET, Chacabuco 145, 4000. San Miguel de Tucumán, Argentina*

Carina Van Nieuwenhove
carina@cerela.org.ar

• *CERELA-CONICET, Chacabuco 145, 4000. San Miguel de Tucumán, Argentina*
• *Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, 4000.*

Micaela Pescuma
pescuma@cerela.org.ar

• *CERELA-CONICET, Chacabuco 145, 4000. San Miguel de Tucumán, Argentina*

Fernanda Mozzi
fmozzi@cerela.org.ar

• *CERELA-CONICET, Chacabuco 145, 4000. San Miguel de Tucumán, Argentina*

Resumen

Las frutas constituyen una fuente de carbohidratos, ácidos, minerales, polifenoles, vitaminas hidrosolubles (vitamina C y del grupo B), provitamina A, aminoácidos, compuestos aromáticos, carotenoides, fibras, fitoesteroles y otras sustancias bioactivas en la dieta humana. Estos compuestos pueden prevenir patologías crónicas, cáncer, mortalidad prematura, enfermedades coronarias y disminuir el riesgo de accidente cerebrovascular. Las frutas se consumen frescas o mínimamente procesadas y tienen una vida útil corta ya que son susceptibles al deterioro microbiano. La fermentación láctica es una tecnología simple, sostenible y

de bajo costo para mantener y/o mejorar las propiedades nutricionales y sensoriales de las materias primas y extender la vida útil de las frutas bajo condiciones de seguridad sanitaria. La fermentación por bacterias lácticas (BAL) puede contribuir al aroma y sabor de los jugos, así como incrementar la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos presentes en la fruta potenciando su actividad antioxidante. Además, los jugos pueden ser fermentados por bacterias probióticas que contribuyan con la seguridad por medio de la producción de metabolitos antagónicos (bacteriocinas, peróxido, etc.) o tengan un efecto inmunomodulador sobre el huésped. De esta manera, los jugos de fruta podrían ser una fuente de probióticos para veganos o personas intolerantes a la lactosa. El jugo fermentado de fruta más ampliamente consumido es el vino; esta bebida alcohólica es el resultado de interacciones complejas entre levaduras, bacterias y las condiciones físico-químicas del mosto de la uva. Al consumo moderado de vino tinto se le han atribuido diversos efectos benéficos para la salud, siendo el resveratrol el compuesto fenólico más estudiado y popularmente conocido. Las BAL intervienen en la fermentación maloláctica durante el proceso de vinificación disminuyendo la acidez de los vinos, fermentación que también permite mejorar las características aromáticas del producto a través del metabolismo de ácidos orgánicos, carbohidratos, polisacáridos, aminoácidos y la producción de enzimas como glicosidasas, esterasas y proteasas, que generan compuestos volátiles que modifican el flavor del producto final. El desarrollo de bebidas frutales fermentadas no-alcóholicas en nuestro país constituye un área de vacancia científico-tecnológica. La posibilidad de producir un sinergismo entre el metabolismo de las BAL y los compuestos bioactivos de las frutas, dirigido a la producción de bebidas con metabolitos bioactivos de mayor biodisponibilidad y/o funcionalidad representa un desafío para el desarrollo de nuevos alimentos fermentados funcionales que incluya a consumidores con hábitos veganos o personas que poseen alergias alimenticias provocadas por alimentos lácteos o intolerancia a la lactosa.

I. Las frutas como alimento y sus efectos benéficos para la salud

La OMS promueve la alimentación saludable, basada en una dieta sana y equilibrada, como herramienta fundamental para prevenir la malnutrición y el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) y otros trastornos. Las frutas y verduras resultan componentes importantes dentro de lo que se considera una dieta saludable. Así, por ejemplo, en el portal de la OMS se informa que una ingesta insuficiente de estos alimentos es uno de los 10 factores principales de riesgo de mortalidad, siendo alrededor de 3,9 millones de muertes ocurridas en el año 2017 atribuibles al consumo insuficiente de frutas y verduras. La OMS recomienda una ingesta diaria de al menos 400 g o cinco porciones de una selección variada de frutas y verduras, lo que contribuiría a reducir el riesgo de desarrollar ECNT y a garantizar la incorporación diaria suficiente de fibra dietaria. El consumo estimado de frutas y verduras es variable en todo el mundo (100-450 g/día); de acuerdo con los últimos registros, en Argentina se consume un promedio de 1,9 porciones por día por habitante encontrándose lejos de la dosis recomendada de 5 porciones diarias que era alcanzada solo por el 4,9 % de la población [1, 2]. En el documento *Guías alimentarias para la población argentina* [1] se recomienda también el consumo diario de 5 porciones de frutas y verduras de diversos tipos y colores (700 g/día) incluyendo 2 o 3 frutas por día (300 g/día) preferentemente crudas y con cáscara priorizando aquellas de estación por su mayor calidad. Nuestro país ofrece una gran diversidad de frutas todo el año, incluyendo cítricos (limón, lima, naranja, mandarina y pomelo), uvas, pomáceas (manzana y pera), frutas de carozo (durazno, nectarina, ciruela y damasco), frutas tropicales (banana, palta y mango) y otras frutas (nuez, cereza, frutilla, arándano, higo), etc. Las frutas producidas se destinan para el consumo directo o bien para ser procesadas industrialmente (jugos, bebidas alcohólicas, deshidratadas, jarabes, aceites esencias, dulces y mermeladas) [1].

Las frutas como alimento constituyen una fuente de carbohidratos, ácidos, minerales, polifenoles, vitaminas hidrosolubles (vitamina C y del grupo B), provitamina A, aminoácidos, compuestos aromáticos, carotenoides, fibras, fitoesteroles y otras sustancias bioactivas en la dieta humana. El contenido de agua de las frutas oscila entre el 70 al 90 %. Las frutas no poseen grandes cantidades de lípidos en la pulpa y cáscara, aunque sí en sus semillas que en general, no son consumidas. El contenido de proteínas es variable; sin embargo, el aporte proteico a través de las frutas es escaso [3] (Tabla 1).

Tabla 1. Composición nutricional de algunas frutas mencionadas en este capítulo.

Valor cada 100 g	Unidad	An	Ar	C	D	G	Mz	My	Ml	N	P	T	U
Agua	g	86	84,21	82,25	86,35	77.93	85,56	72,93	90,15	86,75	88,06	94,52	80,54
Valor energético	kcal	50	57	63	48	83	52	97	34	47	43	18	69
Valor energético	kJ	209	n.dt.	263	n.dt.	n.dt.	n.dt	406	n.dt	n.dt	179	n.dt	n.dt
Proteínas	g	0,54	0,74	1,06	1,4	1,67	0,26	2,2	0,84	0,94	0,47	0,88	0,72
Lípidos totales	g	0,12	0,33	0,2	0,39	1,17	0,17	0,7	0,19	0,12	0,26	0,2	0,16
Cenizas	g	0,22	n.dt.	0,48	n.dt.	n.dt.	n.dt	0,8	n.dt	n.dt	0,39	n.dt	n.dt
Carbohidratos	g	13,12	14,49	16,01	11,12	18,7	13,81	23,38	8,16	11,75	10,82	3,89	18,1
Fibra total	g	1,4	2,4	2,1	2	4	2,4	10,4	0,9	2,4	1,7	1,2	0,9
Azúcares totales	g	9,85	9,96	12,82	9,24	13,67	10,39	11,2	7,86	9,35	7,82	2,63	15,48
Sacarosa	g	5,99	n.dt.	0,15	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt	n.dt	0	n.dt	n.dt
Glucosa	g	1,73	n.dt.	6,59	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt	n.dt	4,09	n.dt	n.dt
Fructosa	g	2,12	n.dt.	5,37	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt	n.dt	3,73	n.dt	n.dt
MINERALES													
Calcio	mg	13	6	13	13	10	6	12	9	40	20	10	10
Hierro	mg	0,29	0,28	0,36	0,39	0,3	0,12	1,6	0,21	0,1	0,25	0,27	0,36
Magnesio	mg	12	6	11	10	12	5	29	12	10	21	11	7
Fósforo	mg	8	12	21	23	36	11	68	15	14	10	24	20
Potasio	mg	109	77	222	259	236	107	348	267	181	182	237	191
Sodio	mg	1	1	0	1	3	1	28	16	0	8	5	2
Zinc	mg	0,12	0,16	0,07	0,2	0,35	0,04	0,1	0,18	0,07	0,08	0,17	0,07
Cobre	mg	0,11	0,057	0,06	0,078	0,158	0,027	0,086	0,041	0,045	0,045	0,059	0,127
Manganeso	mg	0,927	n.dt.	0,07	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt	n.dt	0,04	n.dt	n.dt
Selenio	µg	0,1	0,1	0	0,1	0,5	0	0,6	0,4	0,5	0,6	0	0,1
VITAMINAS													
Vitamina C	mg	47,8	9,7	7	10	10,2	4,6	30	36,7	53,2	60,9	13,7	3,2
Tiamina	mg	0,079	0,037	0,027	0,03	0,067	0,017	0	0,041	0,087	0,023	0,037	0,069
Riboflavina	mg	0,032	0,041	0,033	0,04	0,053	0,026	0,13	0,019	0,04	0,027	0,019	0,07
Niacina	mg	0,5	0,418	0,154	0,06	0,293	0,091	1.500	0,734	0,282	0,357	0,594	0,188
Ácido pantoténico	mg	0,213	n.dt.	0,199	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt	n.dt	0,191	n.dt	n.dt
Vitamina B-6	mg	0,112	0,052	0,049	0,054	0,075	0,041	0,1	0,072	0,06	0,038	0,08	0,086
Folatos totales	µg	18	6	4	9	38	3	14	21	30	37	15	2
Colina	mg	5,5	6	6,1	2,8	7,6	3,4	7,6	7,6	8,4	6,1	6,7	5,6
Vitamina A	µg	3	3	3	96	0	3	64	169	11	47	42	3
β-caroteno	µg	35	32	38	1.094	0	27	743	2.020	71	274	449	39
α-caroteno	µg	0	0	0	19	0	0	0	16	11	2	101	1
β-criptoxantina	µg	0	0	0	104	0	11	41	1	116	589	0	0
Vitamina A	IU	58	n.dt.	64	96	n.dt.	n.dt	1.272	n.dt	n.dt	950	n.dt	n.dt

Valor cada 100 g	Unidad	An	Ar	C	D	G	Mz	My	Ml	N	P	T	U
Licopeno	µg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.828	2.573	0
Luteína + zeaxantina	µg	0	80	85	89	0	29	0	26	129	89	123	72
Vitamina E (α-tocoferol)	mg	0,02	0,57	0,07	0,89	0,6	0,18	0,02	0,05	0,18	0,3	0,54	0,19
Vitamina K	µg	0,7	19,3	2,1	3,3	16,4	2,2	0,7	2,5	0	2,6	7,9	14,6
LÍPIDOS													
Ácidos grasos saturados totales	g	0,009	0,028	0,038	0,027	0,12	0,028	0,059	0,051	0 015	0,081	0,028	0,054
Ácidos grasos monoinsaturados totales	g	0,013	0,047	0,047	0,17	0,093	0,007	0,086	0,003	0,023	0,072	0,031	0,007
Ácidos grasos poliinsaturados totales	g	0,04	0,146	0,052	0,077	0,079	0,051	0,411	0,081	0,025	0,058	0,083	0,048
AMINOÁCIDOS													
Triptófano	g	0,005	n.dt.	0,009	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt	n.dt	0,008	n.dt	n.dt
Treonina	g	0,019	n.dt.	0,022	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt	n.dt	0,011	n.dt	n.dt
Isoleucina	g	0,019	n.dt.	0,02	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt	n.dt	0,008	n.dt	n.dt
Leucina	g	0,024	n.dt.	0,03	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt	n.dt	0,016	n.dt	n.dt
Lisina	g	0,026	n.dt.	0,032	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt	n.dt	0,025	n.dt	n.dt
Metionina	g	0,012	n.dt.	0,01	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt	n.dt	0,002	n.dt	n.dt
Fenilalanina	g	0,021	n.dt.	0,024	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt	n.dt	0,009	n.dt	n.dt
Tirosina	g	0,019	n.dt.	0,014	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt.	n.dt.	0,005	n.dt.	n.dt.
Valina	g	0,024	n.dt.	0,024	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt.	n.dt.	0,01	n.dt.	n.dt.
Arginina	g	0,019	n.dt.	0,018	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt.	n.dt.	0,01	n.dt.	n.dt.
Histidina	g	0,01	n.dt.	0,015	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt.	n.dt.	0,005	n.dt.	n.dt.
Alanina	g	0,033	n.dt.	0,026	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt.	n.dt.	0,014	n.dt.	n.dt.
Ácido aspártico	g	0,121	n.dt.	0,569	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt.	n.dt.	0,049	n.dt.	n.dt.
Ácido glutámico	g	0,079	n.dt.	0,083	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt.	n.dt.	0,033	n.dt.	n.dt.
Glicina	g	0,024	n.dt.	0,023	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt.	n.dt.	0,018	n.dt.	n.dt.
Prolina	g	0,017	n.dt.	0,039	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt.	n.dt.	0,01	n.dt.	n.dt.
Serina	g	0,035	n.dt.	0,03	n.dt.	n.dt.	n.dt	n.dt.	n.dt.	n.dt.	0,015	n.dt.	n.dt.

An: ananá. ***Ar:*** arándano. ***C:*** cereza. ***D:*** damasco. ***G:*** granada. ***Mz:*** manzana. ***My:*** maracuyá. ***Ml:*** melón. ***N:*** naranja. ***P:*** papaya. ***T:*** tomate. ***U:*** uva. ***n.dt.:*** no hay datos disponibles.
Fuente: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Servicio de Investigación Agrícola, Base de Datos Nacional de Nutrientes.

Como se mencionó, las frutas y los vegetales se consumen normalmente frescos o mínimamente procesados ya sea enlatados, secos o como preparaciones de jugos, pastas, ensaladas, salsas y sopas. El jugo de frutas, cuya ingesta es muy común nuestra sociedad, es el contenido de líquido extraíble de las células o tejidos de las frutas. Se define como jugo fermentable pero no fermentado al obtenido por un proceso mecánico a partir de frutos maduros y sanos y conservado por medios físicos. El jugo puede ser turbio o transparente y puede ser adicionado o no con azúcares [3-5].

La ingesta de frutas contribuye a reducir el riesgo de diversas enfermedades principalmente debido a la presencia de compuestos bioactivos que son capaces de prevenir patologías crónicas, cáncer, mortalidad prematura, enfermedades coronarias y

disminuir el riesgo de accidente cerebrovascular. Los jugos de frutas tienen bajo contenido en sodio y potasio ayudando a mantener la presión arterial normal; su carencia en grasas es también beneficiosa para el sistema cardiovascular. Algunos informes indican que los jugos de frutas jugarían un papel importante en la desaceleración del progreso de la enfermedad de Alzheimer y el desarrollo de cáncer [6-8]. Debido al reconocimiento del valor nutricional de estas bebidas, su consumo se ha incrementado en las últimas décadas, aunque desafortunadamente la ingesta diaria es aún inferior a la dosis recomendada por la OMS y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (www.who.int/;www.fao.org/) [5, 9].

II. Desafíos a superar para incrementar el consumo de frutas

En general y también en nuestro país, existen distintos tipos de barreras que condicionan el consumo variado de frutas, como por ejemplo: i) económicas, debido al precio elevado de algunas frutas en relación con su alto valor nutritivo; ii) políticas, como la necesidad de mejoras en los contenidos de los currículum escolares referidos a la educación alimentaria nutricional, la falta de incentivos a la producción y la falta de regulación de la producción y distribución de alimentos saludables; y finalmente iii) físicas como la baja disponibilidad de frutas frescas en algunos ámbitos y lugares del país, su corta vida útil, el desperdicio y la estacionalidad, su conservación y preparación [1].

Las frutas tienen una vida útil corta porque son muy susceptibles al deterioro microbiano y a veces a la contaminación por microorganismos patógenos. Cada tipo de fruta proporciona un nicho único en términos de composición química, disponibilidad de nutrientes, microbiota competitiva que alberga y compuestos antagonistas naturales, y por lo tanto tiene una microbiota dominante característica (los conteos celulares varían entre 5 y 7 log UFC/g) [5, 9, 10]. Los altos niveles de carbohidratos y de actividad de agua resultan ideales para el crecimiento microbiano mientras que su bajo pH (2,0-4,5) las hace susceptibles al deterioro por hongos y levaduras, pero no por patógenos humanos. Así, los microorganismos tolerantes a ácidos y bajos valores de pH, como los hongos y las bacterias lácticas (BAL) forman parte de la microbiota autóctona de las frutas. Por otra parte, durante la elaboración de jugos y otros alimentos semi-procesados, las frutas están expuestas a numerosos microorganismos deteriorantes potenciales durante las distintas etapas del proceso productivo [11-14]. La pasteurización, la cocción y la adición de conservantes químicos son las principales opciones tecnológicas para garantizar la seguridad de estos alimentos; sin embargo, estos procesos pueden dar lugar a cambios fisicoquímicos y nutricionales indeseables. Para reducir estos inconvenientes, se han probado algunas tecnologías novedosas, como el procesamiento a alta presión hidrostática, campos eléctricos pulsados y radiación ionizante, nuevos sistemas de envasado y el uso de conservantes antimicrobianos naturales [5].

III. Fermentación láctica de frutas como alternativa de preservación y de valor agregado

Ante la necesidad de conservar las frutas y sus jugos alterando mínimamente sus propiedades, surge la fermentación láctica como alternativa de biopreservación, una de las técnicas más antiguas para extender la vida útil de los alimentos perecederos [15]. Debido al incremento sostenido en la demanda de bebidas no lácteas de alto valor funcional; de alimentos y bebidas frescas, nutritivas, saludables y apetecibles; la tendencia actual al vegetarianismo y veganismo y la prevalencia de intolerancia a la lactosa, los jugos de frutas fermentados por BAL constituyen una alternativa prometedora para suplir las necesidades mencionadas.

La fermentación láctica es una tecnología simple y valiosa, un proceso sostenible y de bajo costo para mantener y/o mejorar las propiedades nutricionales y sensoriales de las materias primas y extender la vida útil de frutas y vegetales bajo condiciones de seguridad sanitaria. Los alimentos fermentados derivados de las fermentaciones lácticas han sido elaborados durante miles de años por su valor saludable y son aceptados por los consumidores sin restricciones. Los procesos de fermentación de alimentos presentan diversas ventajas: i) preservan y mejoran la seguridad de los alimentos debido principalmente a la formación de ácidos orgánicos (ácidos láctico, acético, fórmico, propiónico, etc.), etanol, etc., que inhiben patógenos y eliminan compuestos tóxicos; ii) mejoran su valor nutricional; y iii) conservan su calidad organoléptica. La biopreservación por fermentación láctica se debe principalmente a la síntesis de una amplia variedad de metabolitos antagónicos como ácidos orgánicos, dióxido de carbono, etanol, peróxido de hidrógeno y diacetilo, compuestos antifúngicos (ácidos grasos, ácido fenil-láctico), bacteriocinas y antibióticos (reuterociclina) por las BAL empleadas [5, 16, 17].

La fermentación de frutas puede ocurrir "espontáneamente" por la microbiota láctica autóctona presente en la materia prima como por ejemplo *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. y *Pediococcus* spp. bajo condiciones favorables de anaerobiosis, actividad de agua, concentración de sal y temperatura. Sin embargo, el uso de cultivos iniciadores conteniendo, por ejemplo, cepas de *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. gasseri* y *Lb. acidophilus* confiere consistencia, fiabilidad, control y reproducibilidad en el proceso proporcionando productos finales estandarizados, seguros y de calidad constante [5, 15, 16, 18]. Sin embargo, el empleo de cultivos iniciadores en la elaboración de frutas y vegetales fermentados es todavía un área en desarrollo y de estudio reciente a diferencia de otros alimentos fermentados con matrices de origen animal como quesos y chacinados [19, 20].

El principal requisito que deben cumplir los cultivos iniciadores es la adaptación ambiental a las condiciones de estrés que presentan normalmente las matrices vegetales. La concentración de carbohidratos fermentables, el ambiente extremadamente ácido, la capacidad tamponante, la presencia de nutrientes no digeribles (fibra, inulina, fructooligosacáridos, etc.) y la presencia de factores antinutricionales y

compuestos inhibidores (taninos y compuestos fenólicos) son los principales factores ambientales que afectan el crecimiento y la acidificación de las BAL en las frutas. El uso de un número elevado de células en el cultivo iniciador (8,0-9,0 log UFC/mL) garantiza la higiene del producto y las eventuales propiedades probióticas de las BAL empleadas. La adaptación de las BAL a los ecosistemas de las diferentes frutas es muy variada entre especies y cepas y a pesar de la importancia que reviste este proceso, el metabolismo de adaptación y respuesta a dicho ecosistema ha sido muy poco estudiado en comparación con otros alimentos fermentados [5, 21].

El uso de cultivos iniciadores autóctonos seleccionados en la elaboración de alimentos fermentados garantiza mejores rendimientos en comparación con el empleo de cepas comerciales o alóctonas, o con procesos de fermentación espontánea, potenciando las propiedades nutricionales, sensoriales y reológicas de los productos fermentados y asegurando una vida útil prolongada. Así, el uso de cultivos iniciadores autóctonos en la fermentación de frutas permitiría preservar el color natural, firmeza, actividad antioxidante y otros compuestos promotores de la salud. Este efecto puede ser consecuencia de la modificación del perfil de ácidos orgánicos (síntesis de ácidos láctico y acético) y el metabolismo de aminoácidos libres. Todas estas modificaciones pueden tener repercusiones directas (pH) o indirectas (potencial redox) en enzimas responsables del pardeamiento endógeno y sobre las propiedades oxidativas y sensoriales (color, sabor y aroma) de las matrices vegetales. Por otra parte, el mantenimiento de una elevada viabilidad celular en la fase estacionaria de crecimiento en las condiciones ambientales de la matriz es un requisito que garantiza la prolongada vida útil de los productos fermentados especialmente en aquellos que contienen cultivos iniciadores funcionales. La selección de BAL para formular fermentos debería basarse principalmente en criterios protecnológicos, sensoriales y/o nutricionales [22]. Además, las BAL pertenecientes a nichos específicos podrían presentar rasgos metabólicos distintivos como resultado de adaptaciones al medio ambiente [23, 24].

A la fecha, se ha evaluado la aptitud de diversas frutas como materias primas para la elaboración de jugos de frutas fermentados y el uso de cultivos autóctonos en la fermentación de las mismas [25-28]. En matrices de origen vegetal, los cultivos autóctonos presentan las siguientes ventajas: i) rápida acidificación, ii) elevado crecimiento celular; iii) inhibición de microorganismos perjudiciales; iv) poder antioxidante; v) propiedades sensoriales y vi) mayor sobrevida [22, 29, 30].

Las bebidas y purés a base de frutas elaborados mediante fermentación controlada con BAL son productos relativamente nuevos que responden a la demanda de los consumidores de alimentos mínimamente procesados y/o funcionales, alternativos a los productos lácteos. El consumo de frutas fermentadas con BAL podría mejorar la nutrición humana mediante la ingesta equilibrada de vitaminas, minerales y carbohidratos y prevenir enfermedades según las propiedades probióticas que pudieran presentar los cultivos. Además, algunas de las frutas fermentadas contienen pigmentos coloreados como flavonoides, licopeno, antocianina, β-caroteno y glucosinolatos

que actúan como antioxidantes en el cuerpo pudiendo eliminar los radicales libres dañinos implicados en enfermedades degenerativas como el cáncer, la artritis y el envejecimiento [15, 22, 31].

IV. Compuestos fenólicos en frutas

La fermentación láctica de las frutas puede incidir sobre los diferentes componentes de la matriz, generando cambios o modificaciones en las estructuras de los compuestos, que pueden incrementar su biodisponibilidad y/o funcionalidad. Se destaca la incidencia del metabolismo microbiano sobre los compuestos fenólicos (CF), un grupo amplio de sustancias que presentan al menos un anillo fenólico en su estructura química, sustituido por uno o más grupos hidroxilos libres u ocupados por otra función química (grupos éter, éster o glicósido). Los CF pueden presentarse desde formas simples (ácidos fenólicos) a formas complejas de elevado peso molecular, asociados o conjugados con otras moléculas, como por ejemplo azúcares. Los CF se encuentran principalmente en las plantas, donde se forman como metabolitos secundarios (no asociados a su crecimiento) y son responsables de muchas de las propiedades sensoriales y funcionales de las frutas y vegetales. En general, se los clasifica en dos grandes grupos: i) flavonoides: antocianinas, flavonas, chalconas, favanoles, entre otros, y ii) no flavonoides: como los ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxibenzoico e hidroxicinámico y estilbenos, principalmente. Estos compuestos son muy abundantes en las frutas y se encuentran mayormente en la cáscara y semillas, aunque también se presentan en la pulpa. Los CF son en parte los responsables del color, desde azul a rojo debido a las antocianinas, del aroma cuando se presentan como vinil derivados, y de la astringencia, principalmente por la presencia de taninos.

Los CF tienen diversos efectos benéficos para el hombre y constituyen uno de los compuestos bioactivos más importantes de las frutas. Entre las actividades biológicas se destacan: efecto hipoglucémico, hipolipidémico y antinflamatorio, y elevada capacidad antioxidante [32-34]. Los antioxidantes son moléculas que inhiben la oxidación de otras moléculas y son de interés para el desarrollo de alimentos y nutracéuticos. La capacidad antioxidante determina el poder general de un compuesto para eliminar los radicales libres que son los causantes de la oxidación. Los fenoles son excelentes antioxidantes ya que presentan grupos hidroxilos en sus moléculas, estructura a la que se atribuye la elevada capacidad antioxidante de las frutas, por lo que se aconseja su consumo para prevenir la oxidación de las células durante la vida (envejecimiento celular).

La ingesta total promedio de CF es aproximadamente de 1 g/día, principalmente debido al consumo de frutas y vegetales, variando el tipo ingerido según la dieta. Se estima que la tercera parte de los CF consumidos corresponde a ácidos fenólicos y el resto a flavonoides, estos últimos muy abundantes en las frutas, principalmente en forma de antocianinas y flavanoles (catequinas y taninos condensados). Luego de la digestión gástrica e intestinal, la absorción de los CF ocurre principalmente en

el intestino delgado, donde los compuestos solubles son fácilmente hidrolizados y absorbidos en el duodeno. Sin embargo, muchos polifenoles tienen baja biodisponibilidad y no son absorbidos, especialmente los que se presentan como agliconas o glucósidos conjugados (ramnósidos o xilósidos de quercetina y galactósidos de quercetina) y los que están covalentemente unidos a polisacáridos o proteínas. Los flavonoides no absorbidos llegan al colon, donde la microbiota intestinal puede metabolizarlos gracias a diferentes enzimas, principalmente donde ocurre la deconjugación de los flavonoides liberando las agliconas. En este sentido, las BAL son también capaces de producir enzimas que metabolizan los diferentes CF de las frutas pudiendo liberar estructuras incrementando la biodisponibilidad y funcionalidad de estas sustancias.

IV.A. Metabolismo de los CF por BAL

El efecto de los CF sobre las BAL depende del tipo de compuesto, de su concentración y de la cepa en estudio. Diversos trabajos estudiaron la influencia de los CF de la uva sobre las BAL y las bacterias acéticas del vino. García-Ruiz y colaboradores [35] evaluaron la adición de 18 CF de la uva sobre el crecimiento de *Oenococcus oenii, Lb. hilgardii* y *P. pentosaceus,* determinando que los favonoles y estilbenos inhibían fuertemente el crecimiento, los ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos tenían un poder inhibidor medio, mientras que los alcoholes (flavanol-3-ol) presentaban un poder inhibitorio mínimo. Otros autores determinaron que el ácido gálico no ejercía ningún efecto sobre el crecimiento de *Oenococcus* y *Pediococcus* [36] mientras que era un estimulante del crecimiento de otras BAL [37, 38]. El efecto positivo de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento de *Lb. hilgardii* fue también informado por Campos y colaboradores [39]. La concentración de los CF también es un factor que incide en la respuesta del microorganismo; altas concentraciones de los ácidos p-cumárico, ferúlico y cafeico inhibieron el crecimiento de *Lb. collinoides* y *Lb. brevis*, mientras que bajas concentraciones de estos compuestos resultaron estimulantes [37]. Estos estudios demuestran la necesidad de evaluar el comportamiento de las cepas frente a los CF para determinar su potencial uso como cultivo iniciador en la fermentación de frutas. De hecho, algunas BAL pueden modificar, por medio de su metabolismo, los CF presentes en el medio y revertir su potencial inhibidor.

Ciertos polifenoles pueden afectar la pared y membrana celular de los microorganismos, motivo por el cual son bioconvertidos mediante diferentes procesos enzimáticos hacia formas menos tóxicas, proceso conocido como detoxificación celular. Si bien los CF poseen propiedades biológicas *per se*, muchos compuestos producidos o derivados del metabolismo microbiano tienen mayor funcionalidad o impacto en el aroma y color de los alimentos. Las diferentes enzimas microbianas implicadas (descarboxilasas, glicosidasas, tanasas, reductasas, etc.) provocan cambios en el perfil de estos compuestos causando la liberación, transformación y/o formación de nuevos compuestos bioactivos.

Algunas BAL son capaces de romper las uniones complejas entre ciertos polifenoles, especialmente los que forman parte de la pared celular vegetal, liberando formas bioactivas y disponibles para su posterior absorción [40]. De esta manera, flavanoles glicosilados son hidrolizados mediante enzimas glicosidasas producidas por distintos microorganismos, liberando azúcares y agliconas. Los azúcares son empleados como fuente de carbono durante el metabolismo microbiano y las agliconas, son potentes antioxidantes, pueden ser posteriormente metabolizadas a otras formas bioactivas.

La fermentación láctica puede incrementar [41, 42] o disminuir [43, 44] los CF totales en el jugo de fruta fermentado, dependiendo de la cepa y la matriz utilizada. En la fermentación de jugo de manzana con la cepa *Lb. plantarum* ATCC 14917 durante 72 horas, se observó una disminución significativa (22%) en el contenido de CF totales, mientras que los flavonoides disminuyeron 35% quizás por una conversión a fenoles simples y a la despolimerización de compuestos de alto peso molecular sin alterar la actividad antioxidante [44].

Las antocianinas, uno de los CF más importantes involucrados en el color de los jugos de frutas pueden ser también metabolizados durante la fermentación láctica disminuyendo su contenido en el jugo fermentado [42]. Al respecto, se encontró que *Lb. plantarum,* una de las especies de lactobacilos más versátiles desde el punto de vista metabólico, era capaz de hidrolizar taninos presentes en el medio de cultivo por acción de las enzimas tanasas [45]. Este microorganismo fue capaz de incrementar la actividad antioxidante luego de 4-8 días de fermentación de una mezcla de jugos de manzana, pera y zanahoria [46]. Otros autores determinaron que la fermentación con *Lb. plantarum* produce no solo cambios en las propiedades fisicoquímicas sino también en la actividad antioxidante y compuestos volátiles del jugo fermentado de castañas de cajú, relacionando la mayor actividad antioxidante con la cantidad de taninos condensados, pero no con los hidrolizables [47]. Por otro lado, el jugo de manzana fermentado con *Lb. plantarum* ATCC 14917, una bacteria probiótica de referencia, mostró un incremento de algunos CF (ácido 5-O-cafeoilquínico, quercetina y floretina) causando una mayor actividad antioxidante que en el jugo no fermentado [44]. La misma cepa utilizada para fermentar jugo de granada produjo un incremento en los CF totales y la actividad antioxidante luego de 24 horas de fermentación manteniéndose estable durante 28 días [41]. En un puré de arándanos fermentado con la cepa probiótica *Lb. rhamnosus* GG y una cepa de *Lb. plantarum* se observó un incremento significativo en la cantidad de CF totales (de 1066 a 4269 µg GAE/mL) y un descenso en las antocianinas (de 15 a 5 µg GAE/mL) [42]. En otro estudio usando jugo fermentado de cereza con diferentes BAL se determinó mayor bioconversión de los ácidos fenólicos (cafeico, cumárico y protocatéquico) durante la fermentación por cepas de *Lb. plantarum* comparado con cepas de *Lb. rhamnosus* y *Lb. paracasei* [48].

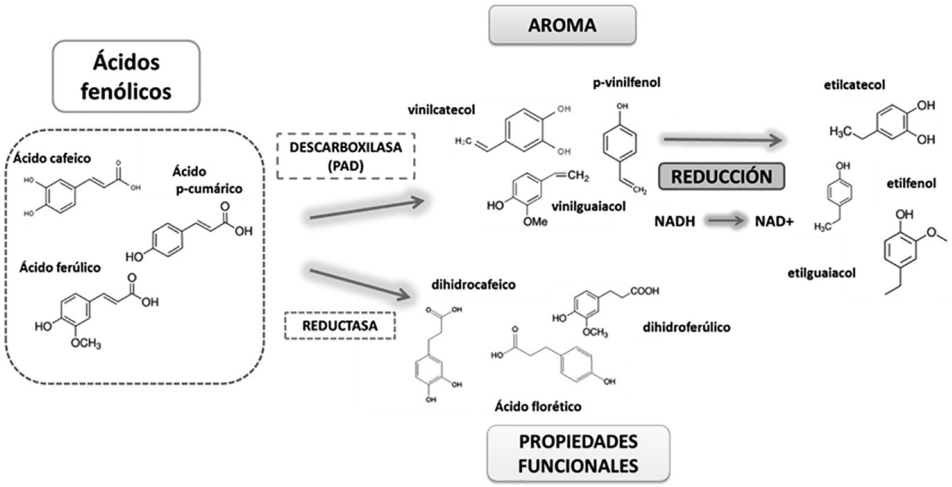
Como se mencionó anteriormente, la fermentación láctica no siempre conduce a un incremento en los CF totales de la bebida fermentada. Así, un jugo fermentado con una fruta originaria de Asia (*Diospyros lotus* L) con la cepa *Lb. plantarum* B7 mostró una disminución en los CF y un incremento de la actividad antioxidante [43].

Es importante destacar que, aunque disminuya el contenido de fenoles totales, la actividad antioxidante de la bebida fermentada puede no alterarse ya que se pueden formar productos derivados del metabolismo de las BAL con mayor poder antioxidante.

IV.B. Metabolismo de ácidos fenólicos: una ventaja energética

Los ácidos hidroxicinámicos son CF comunes en las plantas y poseen un ácido carboxílico funcional, siendo los ácidos cafeico, *p*-cumárico y ferúlico los más abundantes de frutas y verduras. Las BAL heterofermentativas, que obtienen menos energía que las homofermentativas a través de su metabolismo celular, pueden usar los ácidos fenólicos como aceptores externos de electrones y reoxidar el cofactor NADH a NAD+ durante el metabolismo de los ácidos hidroxicinámicos [49, 50]. Por otro lado, *Lb. plantarum,* una de las cepas más empleadas como cultivo iniciador de jugos de frutas, cuando crece en ausencia de aceptores de electrones reduce el 4-vinilfenol a 4-etilfenol para aumentar la formación de NAD+, confiriendo una ventaja energética a estos microorganismos (ver Figura 1). El vinil-fenol es un compuesto permitido para su incorporación en alimentos y se emplea generalmente como aromatizante de alimentos.

Figura 1. Metabolismo de los ácidos fenólicos por BAL heterofermentativas (adaptado de Filannino y col. [50])



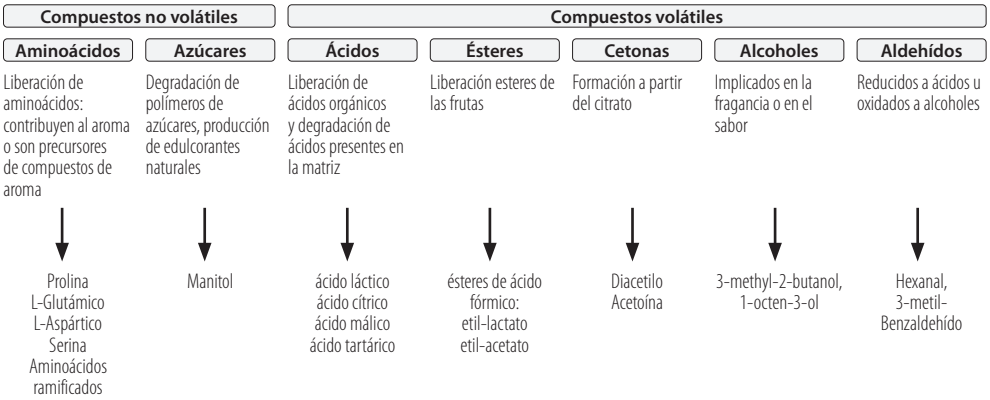
Algunas BAL pueden reducir el ácido cafeico a dihidrocafeico y el ácido ferúlico a dihidroferúlico, compuestos que tienen especial interés en la salud ya que inhiben la activación plaquetaria de una manera mucho más eficiente [51] y poseen actividad antioxidante sobre células endoteliales [52]. Los ácidos fenólicos pueden ser

decarboxilados produciendo vinil fenoles y posteriormente éstos pueden ser reducidos a etil fenoles, compuestos volátiles que inciden en el aroma [49] (ver Figura 1). El metabolismo es cepa-depediente; así, se ha informado que el *p*-cumárico fue totalmente metabolizado por *Lb. plantarum* 285 y POM1 mientras que la cepa *Lb. plantarum* C1 pudo solo convertirlo parcialmente durante la fermentación y totalmente durante el almacenamiento [48].

V. Formación de compuestos de aroma en jugos de frutas fermentadas

El efecto de la fermentación de jugos de frutas por BAL puede generar modificaciones en el perfil de aroma natural de los jugos: la cantidad de algunos compuestos puede incrementarse, otros pueden disminuir y otros pueden mantenerse sin cambios luego de la fermentación. En general, las fermentaciones se llevan a cabo usando diferentes cepas de lactobacilos (generalmente *Lb. plantarum, Lb. casei, Lb. rhamnosus*, etc.). De acuerdo a su composición química, los compuestos de aroma de los jugos pueden clasificarse en volátiles, no volátiles y ácidos (ver Figura 2). Entre los compuestos volátiles se pueden mencionar a los alcoholes, ácidos, cetonas, hidrocarburos, aldehídos y ésteres. Los compuestos no volátiles pueden incluir aminoácidos como L-serina, prolina, L-ácido glutámico y L-aspártico. Entre los ácidos se pueden encontrar los ácidos cítrico, málico y láctico.

Figura 2. Compuestos de aroma producidos por BAL en matrices frutales.



En jugo de tomate fermentado por cepas de *Lb. plantarum* y *Lb. casei* se encontró que los alcoholes fueron los compuestos más abundantes (49-52%) entre los compuestos volátiles, notándose un aumento en el contenido de los mismos luego de la fermentación para ambas cepas. Además, la concentración de ácidos grasos en el jugo fermentado por *Lb. casei* aumentó por formación de acetato de amonio (10%). Se observaron también cambios en la concentración de ácido acético (de 3 a 27%)

cuando se usó la cepa de *Lb. plantarum*. Las cetonas se incrementaron de 0,5 a 15% (con la cepa de *Lb. casei*) y a 12% (*Lb. plantarum*) luego de la fermentación, siendo uno de los principales compuestos detectados 6-metil-5-heptano-2-ona. Por otro lado, los hidrocarburos volátiles disminuyeron significativamente desde 15 a 4% (*Lb. casei*) y 2% (*Lb. plantarum*) en el jugo fermentado. Todos los hexadecanos, con excepción de algunos compuestos, se incrementaron en ambos jugos. Respecto a los aldehídos, la concentración de este grupo disminuyó casi en su totalidad por acción de ambos lactobacilos, aunque que se detectó la formación del compuesto undecanal. Dentro de los compuestos de aroma, los ésteres son los que confieren aromas frutales y florales a los jugos fermentados que se forman durante la fermentación. Se observó una escasa disminución en la cantidad total de ésteres durante la fermentación mediante la desaparición de acetato de etilo; sin embargo, se formaron nuevos compuestos cuando se usó la cepa de *Lb. casei*. Los cambios encontrados se deberían a la actividad y variedad de enzimas de *Lb. plantarum* y *Lb. casei*. Respecto a los alcoholes, se detectó la formación de un nuevo grupo de sustancias de compuestos aromáticos diferentes. Además de los ésteres y alcoholes, la aparición de otros compuestos posiblemente contribuyó a las propiedades antioxidantes y antimicrobianas del jugo de tomate [53].

Otros autores evaluaron los compuestos de aroma en mezcla de jugos de frutas y vegetales (manzana, zanahoria, tomate, pepino y baya de espino) fermentados por diferentes especies de lactobacilos y pudieron identificar un total de 14 compuestos como marcadores determinantes del aroma y el sabor de las muestras mediante espectrometría de masa acoplado a cromatografía gaseosa [54]. Mediante análisis estadísticos (ACP y PLS-DA) se distinguieron tres tipos de compuestos que significativamente afectaban el perfil de los compuestos volátiles y no volátiles de las frutas y vegetales fermentados. Así, por ejemplo, en un grupo se incluyó a cepas de *Lb. casei* y *Lb. rhamnosus* como principales contribuyentes del sabor umami (o sabroso, uno de los cinco sabores básicos). Otro grupo que incluyó cepas de *Lb. plantarum* y *Lb. acidophilus* observó que contribuyeron principalmente al sabor ácido, mientras que se encontró que *Lb. fermentum* afectó fuertemente la producción de compuestos volátiles. Es importante destacar que distintas cepas de *Lactobacillus* pueden jugar un papel diferente en la modificación de los compuestos relacionados con las características de aroma y sabor.

En otro estudio, se analizó el efecto de la fermentación láctica en jugo de sauco [55] usando 15 cepas de *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* y *Lb. casei* aisladas de diferentes tipos de matrices. El perfil de compuestos volátiles se evaluó mediante cromatografía gaseosa (HS-SPME/GC-MS) luego de una fermentación de 48 horas y de una vida de estante de 12 días a 4 °C. El perfil de compuestos aromáticos de todos los jugos fermentados se caracterizó por la presencia de 82 compuestos volátiles pertenecientes a diferentes clases: alcoholes, terpenos y norisoprenoides, ácidos orgánicos, cetonas y ésteres. El jugo de sauco fermentado con cepas de *Lb. plantarum* mostró un aumento de los compuestos volátiles totales luego de 48 horas mientras que los jugos

fermentados con *Lb. rhamnosus* y *Lb. casei* exhibieron un incremento aún mayor después de la vida de estante. La concentración más alta de compuestos volátiles se encontró con el jugo fermentado con *Lb. plantarum* aislado de un producto lácteo. Las cetonas, principalmente acetoína y diacetilo, se incrementaron en todos los jugos fermentados después de la fermentación y de la vida de estante. Los ácidos orgánicos más abundantes encontrados fueron el ácido acético e isovalérico. Los alcoholes hexanol, 3-hexen-1-ol y 2-hexen-1-ol aumentaron durante la fermentación con bacterias de origen lácteo. Los ésteres más representativos, etil acetato, metil isovaleriato, isoamil isovaleriato y metil salicilato se correlacionaron con las notas frutales. Entre los terpenos y los norisoprenoides, la β-damascenona fue el compuesto principal con nota típica del sauco. Finalmente, mediante la aplicación de análisis estadísticos multivariados fue posible relacionar el perfil volátil característico de las muestras con las diferentes especies y cepas de lactobacilos usados en este trabajo.

En otro trabajo se investigó el efecto de la fermentación sobre el perfil de compuestos volátiles de jugos fermentados de melón y de castañas de cajú mediante micro-extracción en fase sólida en un sistema de Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrómetro de Masas (HS-SPME/GC-MS, por sus siglas en inglés). La fermentación con *L. casei* provocó una reducción de etil butanoato, 2-etil metilbutirato y etil hexanoato en el jugo de melón mientras que etil acetato, etil 2-metil butanoato, etil crotonato, etil isovaleriato, benzaldehído, y etil hexanoato en jugo de castañas. Las medidas de estabilidad de estos compuestos y la formación de del compuesto 3-metil-2-butenilo en el jugo de melón podrían usarse como marcadores de compuestos volátiles durante la fermentación [56].

VI. Bacterias probióticas en jugos de fruta

El bienestar, la salud y el riesgo de contraer diferentes enfermedades están relacionados con la alimentación, por esta razón el desarrollo de alimentos capaces de mejorar la calidad de vida es la nueva tendencia en la ciencia de la nutrición, poniéndose así énfasis en prevención y no en medicación [57]. Ya 400 años a.C. Hipócrates había manifestado "Que tu medicina sea tu alimento, y el alimento sea tu medicina".

Las bebidas funcionales son una categoría relevante dentro del mercado de los alimentos [41] y el consumo de jugos de fruta ha mostrado un incremento a nivel mundial. El desarrollo de bebidas funcionales a base de frutas fermentadas o como vehículo de bacterias probióticas son una alternativa atractiva no sólo por las cualidades inherentes a las frutas (vitaminas, minerales, compuestos antioxidantes, etc.) sino que también pueden alcanzar a consumidores que eviten alimentos lácteos. A partir de la fermentación espontánea de la fruta pueden aislarse BAL autóctonas que pueden ser luego utilizadas para la elaboración de otros alimentos con el fin de aumentar la calidad y/o funcionalidad de nuevos productos con valor agregado.

Los beneficios en la salud asociados al consumo de probióticos son principalmente la reducción de los niveles de colesterol [15, 58, 59], modulación del sistema inmune, disminución en constipación, aumento de la absorción de minerales, efectos anticancerígenos y antihipertensivos, entre otros. Sin embargo, la característica más sobresaliente de los probióticos es su capacidad de inhibir el desarrollo de organismos patógenos y modular la microbiota intestinal por medio de la exclusión competitiva dada por su capacidad de adhesión y producción de bacteriocinas, peróxido de hidrogeno y ácidos orgánicos, los cuales reducen el pH del intestino y retardan el crecimiento de patógenos sensibles al ácido [60].

Si bien la mayoría de los probióticos comerciales fueron aislados del tracto gastrointestinal humano, las frutas podrían constituir una fuente de cepas capaces de resistir ambientes similares a los del tracto gastrointestinal ya que el microambiente de las frutas es en general extremadamente ácido, posee elevadas concentraciones de nutrientes poco digeribles (fibras, oligosacáridos) y factores antinutricionales (taninos, fenoles) [5]. Por otro lado, las bacterias en la fruta pueden tener la capacidad de adherirse y ejercer actividad inhibitoria sobre otras bacterias deteriorantes y patógenas. El uso de cepas aisladas de fruta para la elaboración de jugos de fruta fermentados tendría una ventaja adaptativa sobre probióticos aislados de otras fuentes ya que provendrían del mismo nicho que las bebidas de fruta fermentadas. Recientemente, se demostró que los jugos de fruta podrían ser un sustrato apto para la propagación y/o como vehículo de probióticos. Los microorganismos deben ser capaces de crecer y/o sobrevivir a las condiciones de la fruta para poder ejercer su efecto benéfico en el huésped. Durante este proceso, los microorganismos además de aumentar su biomasa consumen azúcares y pueden producir metabolitos tales como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos que pueden inhibir la proliferación de microorganismos deteriorantes y/o patógenos. Como se mencionó antes, las bacterias inoculadas pueden producir compuestos de aroma, aumentar la biodisponibilidad de compuestos fenólicos y degradar polímeros de azúcares no digeribles y proteínas aumentando su valor nutricional. Sin embargo, para que se produzca una fermentación eficiente, los microorganismos deben además consumir los azúcares presentes en la fruta (sacarosa, fructosa, glucosa) y tolerar las condiciones ambientales dadas por una mínima concentración de aminoácidos y proteínas, presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y pH ácido.

Si bien se ha logrado que algunos probióticos crezcan y se mantengan viables durante la vida de estante con valores de contaje celular mayores a 7 log UFC/mL en jugos de fruta fermentados, como por ejemplo *Lb. plantarum* ATCC 14917 en jugo de granada, en otros jugos fue necesario aplicar diferentes estrategias para lograr su crecimiento. Una de ellas fue aumentar el pH del jugo a valores cercanos a 6,0-7,0. Bujna y colaboradores [61] lograron desarrollar un jugo de damasco fermentado por un cultivo mixto conteniendo las cepas *Bifidobacterium lactis* Bb-12, *B. longum* Bb-46, *Lb. casei* 01 y *Lb. acidophilus* La-5, mientras que Nguyen y colaboradores [57] formularon un jugo fermentado de ananá con la cepa probiótica *Lb.*

plantarum 299V. Lu y colaboradores [62] desarrollaron una bebida fermentada a base de fruta estrella (*Averrhoa carambola*) logrando un adecuado crecimiento y producción de ácido láctico por una cepa de *Lb. rhamnosus*. Por otro lado, Nithya y Vasudevan [63] observaron un crecimiento adecuado de cepas de *Lb. plantarum* y *Lb. acidophilus* en jugo de papaya cuando lo sometieron a clarificación utilizando pectinasa. Otra de las estrategias para mejorar el crecimiento es el agregado de prebióticos como inulinas de cadena corta y larga a los jugos de frutas, ya que pueden promover el desarrollo de microorganismos probióticos y/o mantener su sobrevida durante el almacenamiento [64]. Otra alternativa es utilizar una mezcla de jugos de fruta con una matriz láctea. En este sentido, Martínez y colaboradores [65] formularon una bebida fermentada a base de jugo de naranja, mango y leche. En este caso las BAL utilizadas pudieron fermentar fructosa, pero no lactosa, por lo que la leche se agregó solo para incrementar el pH inicial del jugo y suplementarlo con proteínas. Las cepas utilizadas fueron capaces de crecer y sobrevivir durante el almacenamiento y la digestión gastro-intesinal *in vitro*. Ozcan y colaboradores [66] formularon una bebida en la que se mezcló la leche fermentada por una cepa de *Lb. rhamnosus* en cantidades iguales con jugo de manzana y arándanos. Los autores observaron que la cepa era capaz de sobrevivir las condiciones de almacenamiento y presentaba elevada aceptabilidad. La inmovilización celular es otro proceso tecnológico que puede tener un efecto favorable sobre la fermentación. Recientemente, Mantzourani y colaboradores [41] demostraron que células inmovilizadas de *Lb. plantarum* ATCC 14917 producían mayores concentraciones de compuestos fenólicos en jugo de cereza cornalina (*Cornus* subg. *Cornus*) que las células libres. La sobrevida de los probióticos durante la vida de estante es también un parámetro importante a tener en cuenta. Una de las estrategias para reducir la muerte celular durante la conservación es la microencapsulación de los probióticos utilizando diferentes polímeros como alginatos, gelatinas, etc., que protegen al microorganismo durante el almacenamiento del alimento y el pasaje por el tracto gastrointestinal. Gandomi y colaboradores [67] comprobaron que la micro-encapsulación de *Lb. rhamnosus* GG usando quitosano e inulina tenía un efecto positivo en su sobrevida inoculado en jugo de manzana durante el almacenamiento a temperaturas de refrigeración. Otra de las metodologías aplicadas es la pre-adaptación del microorganismo a las condiciones de estrés del jugo. Perricone y colaboradores [68] observaron que la viabilidad de *Lb. reuteri* DSM 20016 disminuía durante la conservación debido al efecto combinado del pH y los fenoles presentes en una mezcla de jugos de ananá, naranja, manzana verde y frutos rojos y observaron que este efecto era menor si cultivaban la cepa en distintas concentraciones de jugo de frutos rojos (hasta 50 %) con ácido valínico y pH 5 como agente de estrés. Por otro lado, Saarela y colaboradores [69] pudieron incrementar la sobrevida de una cepa de *B. breve* en jugo de naranja, uva y maracuyá generando una variante tolerante a ácido por mutagénesis con UV y crecimiento a valores de pH sub-letales.

Durante el almacenamiento, los niveles de oxígeno deben mantenerse bajos para

evitar el daño oxidativo a los microorganismos probióticos, los cuales tienen sensibilidades variables dependiendo de las cepas. El daño oxidativo está dado por la generación de especies reactivas de oxígeno, como por ejemplo el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido. La incorporación de antioxidantes en los jugos podría disminuir el efecto nocivo del oxígeno. Así las cepas probióticas HOWARU *Lb. rhamnosus* HN001, HOWARU *B. lactis* HN001 y *Lb. paracasei* LPC 37 fueron incorporados en un jugo modelo al que se le agregó vitaminas B_2, B_3, B_6, vitaminas C, E y antioxidantes como semillas de uva y extracto de té verde, siendo el jugo con semillas de uva, té verde y vitamina C el que mostró mayor efecto en la viabilidad de los probióticos [70].

La producción de alimentos funcionales y/o probióticos a base de frutas se está incrementando debido al aumento y popularidad del veganismo o por la búsqueda de opciones no lácteas debido a factores como intolerancia a la lactosa o alergia a proteínas de la leche. A la fecha, las investigaciones sobre el uso de frutas para la elaboración de alimentos funcionales se han centrado en la aplicación de nuevas tecnologías que eviten afectar negativamente las propiedades sensoriales y nutricionales de las frutas. Los estudios se han realizado con jugos de tomate, mango, naranja-manzana, uva-melón, granada, duraznos, etc., usando mayormente cepas de *Lactobacillus* spp. (*Lb. acidophilus, Lb. helveticus, Lb. casei, Lb. paracasei, Lb. johnsonii, Lb. plantarum, Lb. gasseri, Lb. reuteri, Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, Lb. crispatus, Lb. fermentum, Lb. rhamnosus); Bifidobacterium* spp. *(B. bifidum, B. longum, B. adolescentis, B. infantis, B. breve, B. lactis, B. laterosporus)* y otras especies como *Streptococcus thermophilus, Weissella* spp., *Propionibacterium* spp., *Pediococcus* spp., *Enterococcus faecium, Leuconostoc* spp *y Lactococcus lactis*. La mayoría de los microorganismos probióticos utilizados son BAL y microorganismos relacionados; sin embargo, se han utilizado también levaduras como por ejemplo *Saccharomyces boulardii* [59].

VII. Alimentos fermentados artesanales y comerciales a base de frutas

Existen diversos alimentos a base de frutas fermentadas típicos de distintos lugares del mundo; entre ellos podría nombrarse al *Tempoyak* que es un condimento fermentado típico de Malasia a base de pulpa de la fruta durian (*Durio zibethinus*), salada y fermentada espontáneamente a temperatura ambiente en un recipiente herméticamente cerrado durante 7 días. El sabor ácido de este alimento fue atribuido al crecimiento de BAL principalmente de *Lb. brevis, Lb. mali*, *Lb. fermentum*, *Lb. durianis* y *Leuconostoc mesenteroides*. El *Yan-taozih* es un pickle a base de durazno, alimento popular en China y Taiwán que se prepara salando los duraznos con 5-10% de sal y agitando hasta que exude el agua. Luego se lavan y se les agrega azúcar y ciruelas en escabeche, esta mezcla se fermenta a temperaturas entre 6 y 10°C durante un día. De este alimento se aislaron cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Weissella cibaria*, *W. paramesenteroides*, *W. minor*, *Enterococcus faecalis* y *Lb. brevis*. Las

conservas de frutas como el mango (*Mangifera indica* L.) y algunos vegetales (pepinos) son utilizadas en la cocina de distintas partes del mundo. Una de las frutas fermentadas más consumidas mundialmente son las cerezas (*Prunus avium* L.) producidas en Italia, Estados Unidos, Irán y Turquía [15].

Si bien los alimentos a base de frutas fermentadas existen en la tradición de algunas culturas, el primer producto vegetal probiótico comercial denominado Proviva® desarrollado por la empresa sueca *Skane Dairy* surgió recién en el año 1994. El componente activo de este producto es avena fermentada con la cepa probiótica *Lb. plantarum* 299v y el producto final es un jugo de fruta conteniendo 5% de avena y 1010 UFC/ml de la cepa probiótica [71]. Todavía, son necesarios estudios más profundos para garantizar la inocuidad, el efecto probiótico y la calidad nutricional de este tipo de bebidas [72]. Dentro de las bebidas probióticas o funcionales a base de frutas comercializadas mundialmente se pueden mencionar: GoodBelly® en Estados Unidos y ProViva® en Suecia que usan *Lb. plantarum* 299v como cepa probiótica, mientras que Biola® en Noruega y Finlandia y Gefilus® en Finlandia usan la cepa probiótica *Lb. rhamnosus* GG. Por otro lado, Healthy Life® de Australia usa la cepa *Lb. plantarum* HEAL 9 y *Lb. paracasei* 8700:2. Berggren y colaboradores [73] demostraron que este producto era capaz de fortalecer el sistema inmune contra infecciones virales. ProViva® incluye en su composición avena mientras que GoodBelly® tiene algunas formulaciones a base únicamente de frutas y azúcar de caña aptas para celíacos. Xu y colaboradores [74] demostraron que diferentes formulaciones de ProViva® eran capaces de atenuar la respuesta temprana a insulina lo que estaba relacionado con el contenido de polifenoles presentes en las frutas, mientras que otros autores [75] mostraron que esta bebida a base de rosa mosqueta (escaramujo) reducía los síntomas del síndrome de intestino irritable. Wang y colaboradores [76] mostraron que una bebida fermentada comercial a base de fruta de la montaña Changbai podía modular la microbiota intestinal de ratones, incrementando la proporción de bacterias de la familia *Prevotellacea*, *Bacteroidales* S24-7 y *Bacteroidaceae* del género *Bacteroides,* consideradas benéficas para la salud. Otros trabajos utilizando jugos de frutas mostraron que la fermentación incrementaba la actividad antioxidante de la bebida fermentada. En este sentido, Yan y colaboradores [42] observaron que la fermentación de un jugo a base de orujo de arándanos con *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. plantarum*-1, y *Lb. plantarum*-2 incrementaba la actividad antioxidante debido al aumento de la concentración de fenoles y flavonoides. Este jugo tuvo también efecto positivo en la velocidad de depuración del colesterol. Mantzourani y colaboradores [41] observaron que cuando se fermentaba jugo de granada con la bacteria probiótica *Lb. plantarum* ATCC 14917 aumentaba la actividad antioxidante debido al aumento de la concentración de compuestos fenólicos, especialmente de ácido gálico. Estos resultados indicarían que los jugos fermentados podrían tener efectos específicos sobre la salud más allá de los atribuidos a las cepas probióticas utilizadas para su elaboración mediante la liberación y/o transformación de compuestos específicos presentes en las frutas.

VII.A. Vino: la bebida alcohólica fermentada a base de jugo de uva mundialmente aceptada

El vino es la bebida proveniente de la fermentación alcohólica de la uva fresca, estrujada o no, o del mosto de uva. Esta bebida es el resultado de interacciones complejas entre levaduras, bacterias, mosto y condiciones físico-químicas. Por lo tanto, la calidad del vino dependerá tanto de la composición química del mosto de uva con el cual se elabora el producto, como de los aspectos tecnológicos y microbiológicos relacionados con el proceso de vinificación [77]. La elaboración del vino es un proceso complejo que puede variar de un lugar a otro y de acuerdo al tipo de producto elaborado. Los vinos pueden clasificarse de acuerdo a su color en: blancos, tintos y rosados. Los vinos blancos son los procedentes de mostos de uva blanca o de uva tinta con pulpa y sin los hollejos. Los vinos tintos y rosados provienen de uvas tintas fermentadas en presencia de los hollejos para llevar a cabo la maceración, siendo este paso muy breve en los vinos rosados [78].

VII.A.1. Producción de vino en Argentina

De acuerdo a los datos estadísticos de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), Argentina es el quinto país productor a nivel mundial con un rendimiento de 10 a 14 millones de hL en los 5 últimos años que representa el 5% de la producción global (www.oiv.int/public/medias/6782/oiv-2019-statistical-report-on-world-vitiviniculture).

En nuestro país, numerosas bodegas de diferentes regiones como las de Cuyo y el Noroeste (NOA) todavía emplean cultivos iniciadores comerciales de origen extranjero; considerando la tendencia a producir vinos diferenciados, surge la necesidad de usar microorganismos autóctonos a fin de preservar las características sensoriales propias de cada región de producción denominado terruño o *terroir* [79].

Argentina produce vinos de diferentes varietales (ver Figura 3), siendo la provincia de Mendoza, en la región de Cuyo, la principal productora a nivel nacional y el vino tinto Malbec su varietal emblemático. En la región NOA, la zona vitivinícola de mayor producción es Cafayate (Salta) y el varietal más destacado es el blanco Torrontés. Además, en Salta también se elaboran vinos tintos Malbec y Cabernet Sauvignon. En la Patagonia (Río Negro y Neuquén), los principales varietales que se producen son Malbec, Merlot, Cabernet Sauvignon y Pinot Noir (www.argentina.gob.ar/inv/vinos/estadisticas/regiones-vitivinicolas).

Figura 3. Producción de vino a nivel mundial y nacional.

VII.A.2. Composición del mosto de uva y vino

El mosto de uva es un medio nutritivo que contiene los elementos necesarios para el desarrollo de microorganismos, tanto levaduras como bacterias. La concentración de cada componente depende del tipo de uva, región de producción, clima, procesamiento de la uva, entre otros factores. El mosto de uva contiene D-glucosa y D-fructosa como azúcares principales y en proporciones similares, y pequeñas cantidades de D-xilosa, D-arabinosa y L-ramnosa [80]. El contenido total de azúcares reductores varía entre 140-250 g/L, dependiendo del grado de maduración de las bayas de uva, y determina el grado alcohólico del vino. Otro componente importante es el nitrógeno (presente como amonio y aminoácidos libres) cuyo contenido en el mosto puede variar entre 0,3-1,5 g/L, limitando el crecimiento de las levaduras y en algunos casos deteniendo o retrasando la fermentación [81]. La concentración de proteínas del mosto depende de la variedad y madurez de las uvas, así como de la forma en que se manipulan antes de la fermentación [82].

Con respecto a los ácidos orgánicos, los predominantes en el mosto son el ácido L-tartárico y el ácido L-málico. Estos ácidos, la extensión de su disociación, la acidez titulable y el pH determinan el carácter ácido del mosto, propiedad fundamental para la vinificación y de gran influencia en la calidad organoléptica del vino obtenido [78].

Los compuestos fenólicos (CF) son un grupo extenso y complejo de particular importancia en los vinos. Su concentración en vinos tintos es mucho mayor que en los blancos. Los CF presentes en la piel y semillas de la uva tinta son los mayores responsables del color, además de contribuir al sabor, la astringencia y el amargor [77]. Como se mencionó antes, se clasifican como no flavonoides (ácidos benzoicos, ácidos cinámicos y estilbenos) y flavonoides (flavonoles, antocianos y flavanoles). Los antocianos y los taninos (flavanoles polimerizados o procianidinas) son los compuestos más abundantes y relevantes en relación al color, calidad y estabilidad de los vinos tintos [83]. Sus propiedades antioxidantes también se han asociado al consumo moderado de vino tinto y se le han atribuido diversos efectos benéficos para la salud, siendo el resveratrol el CF más estudiado y popularmente conocido del vino [84, 85].

VII.A.3. Tipos de fermentaciones que ocurren durante la vinificación

Durante el proceso de vinificación pueden tener lugar dos tipos de fermentaciones, dependiendo del tipo de vino y las características deseadas en el producto final. La fermentación primaria o alcohólica (FA) es conducida por levaduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, que son los microorganismos responsables de transformar los azúcares del mosto en etanol [86]. En algunos tipos de vinos como los tintos y espumantes, tiene lugar una fermentación secundaria o maloláctica (FML) realizada por BAL [87]. Ambas fermentaciones pueden ser llevadas a cabo de forma espontánea, a partir de poblaciones autóctonas de microorganismos presentes en la uva y/o en la bodega. En la actualidad, se prefieren las fermentaciones controladas, en las cuales se inoculan cultivos iniciadores que permiten reducir la producción de subproductos indeseados, aumentar la velocidad de la fermentación, disminuir la posibilidad de contaminación con otros microorganismos y la interrupción de la fermentación [77]. Sin embargo, en las fermentaciones inoculadas se obtienen vinos que carecen de identidad regional [79]. La selección de levaduras y bacterias autóctonas asegura el mantenimiento de las propiedades sensoriales típicas de los vinos producidos en una determinada región preservando así la biodiversidad microbiana [88]. En nuestro país, se realizaron diferentes estudios para caracterizar y seleccionar microorganismos autóctonos de diferentes regiones vitivinícolas [89-96].

VII.A.4. Importancia de las BAL en la producción del vino

En el vino, las BAL conducen la FML que consiste en la decarboxilación enzimática del ácido L-málico en ácido L-láctico y dióxido de carbono por acción de la enzima maloláctica. *Oenococcus oeni* es la especie tradicionalmente usada como cultivo iniciador maloláctico por ser la más adaptada y resistente a las condiciones de estrés como bajos valores de pH, elevado contenido de etanol y presencia de dióxido de azufre [97, 98]. Sin embargo, en la última década se ha propuesto a *Lb. plantarum* como un cultivo iniciador alternativo por presentar elevada actividad enzimática y tolerar las condiciones desfavorables del vino [99, 100].

Desde el punto de vista enológico, la FML es importante por disminuir la acidez, incrementar la estabilidad microbiológica para contrarrestar la presencia de microorganismos indeseables capaces de consumir carbohidratos presentes y mejorar el flavor del vino por acción de enzimas producidas por las BAL [101, 102]. Sin embargo, este proceso es todavía difícil de controlar debido a los diferentes factores que pueden afectar el crecimiento y actividad de la bacteria maloláctica. Por esto, y con el fin seleccionar cepas más adaptadas que puedan conducir exitosamente la FML, se están llevando a cabo diversos estudios para caracterizar la tolerancia al estrés de las BAL vínicas [93, 103-105].

Si bien el principal beneficio de la FML para el proceso de vinificación es la disminución de la acidez de los vinos, esta fermentación también permite mejorar las

características aromáticas del producto a través del metabolismo de ácidos orgánicos, carbohidratos, polisacáridos, aminoácidos y la producción de enzimas como glicosidasas, esterasas y proteasas, que generan compuestos volátiles que modifican el flavor [106]. La FML puede incrementar los aromas frutales y mantecosos mediante la formación e hidrólisis de ésteres y producción de diacetilo por el metabolismo de citrato. Por otra parte, la reducción de los aromas vegetales o herbáceos podría deberse al catabolismo de los aldehídos convirtiéndolos en etanol y acetato [107]. *O. oeni* tiene numerosas glicosidasas y sus actividades contribuyen a la liberación de numerosos compuestos aromáticos incluyendo monoterpenos, norisoprenoides y compuestos alifáticos que contribuyen a los atributos frutales y florales de los vinos [108, 109]. Estudios más recientes también demostraron la influencia de *Lb. plantarum* en las características organolépticas de los vinos [106, 110, 111].

VII.A.5. Estrategias de inoculación: fermentación secuencial vs. simultánea

Naturalmente, la FML ocurre una vez que la FA ha terminado. Esto se debe a que las levaduras pierden viabilidad al final de la fermentación, se lisan y liberan nutrientes intracelulares que permiten a las BAL, resistentes al etanol, crecer en el vino [112]. Cuando se emplean cultivos iniciadores de levaduras y bacterias, estos generalmente se inoculan en forma secuencial para reproducir las fermentaciones espontáneas. Sin embargo, los cultivos malolácticos pueden ser inoculados antes de la FA, co-inoculados con las levaduras o secuencialmente después de la FA [99, 113, 114]. En el caso del clásico par *S. cerevisiae-O. oeni* se prefiere la inoculación secuencial para evitar una elevada concentración de ácido acético en el producto final. Este problema no ocurre al usar *Lb. plantarum* para inducir la FML debido a su metabolismo homofermentativo, permitiendo así su inoculación simultánea. En los últimos años, ha crecido el interés en implementar la inoculación de los cultivos de BAL en forma simultánea o apenas iniciada la FA debido a ciertas ventajas como menor tiempo necesario para completar el proceso fermentativo, mejor perfil aromático y mayor control de los microorganismos deteriorantes siendo el principal requisito realizar una adecuada selección de los cultivos iniciadores [115, 116].

VIII. Conclusiones y perspectivas

El consumo de frutas está asociado con el beneficio para la salud del consumidor ya que los componentes que se encuentran en estos alimentos claramente avalan sus propiedades funcionales. Sin embargo, el rápido deterioro post-cosecha restringe el consumo de algunas frutas como productos frescos en lugares cercanos a su cultivo y provoca grandes pérdidas económicas. La fermentación láctica de estos alimentos surge entonces como una alternativa efectiva, eco-amigable y sustentable para producir alimentos o bebidas con mayor vida de estante. De las bebidas fermentadas

a base de frutas existentes en el mercado internacional, el vino ocupa definitivamente el primer lugar en cuanto a su consumo. Sin embargo, es una bebida producida por fermentación alcohólica, lo cual limita o restringe su consumo. En los últimos años, la población ha dirigido sus hábitos alimenticios hacia alimentos saludables que aporten beneficios adicionales a los nutricionales básicos (alimentos funcionales). Las ventajas de la ingesta diaria de frutas han sido ya demostradas en diversos estudios científicos y epidemiológicos, así como las ventajas de consumir alimentos fermentados derivados de las mismas. En cuanto al desarrollo y formulación de bebidas frutales fermentadas no-alcohólicas en nuestro país, existe todavía una gran área de vacancia científico-tecnológica que los microbiólogos debemos atender. La posibilidad de producir un sinergismo entre el metabolismo de BAL y los compuestos bioactivos de las frutas, dirigido a la producción de bebidas con metabolitos bioactivos de mayor biodisponibilidad y/o funcionalidad, han sido detalladas en este capítulo. Este proceso biotecnológico representa un desafío para el desarrollo de nuevos alimentos fermentados, con el objetivo de ofrecer nuevos alimentos funcionales que incluyan a consumidores con hábitos veganos o vegetarianos o aquellas personas que prefieran alternativas a los alimentos lácteos.

IX. Declaración de posibles conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

X. Bibliografía

[1] MSN. (2016). Guías Alimentarias para la Población Argentina. Buenos Aires.

[2] MSN. (2013). Encuesta Nacional de Factores de Riesgo 2013 para Enfermedades no Transmisibles. Argentina.

[3] Bates, R. P., Morris, J. R. y Crandall, P. G. (2001). Principles and practices of small-and medium-scale fruit juice processing: Rome: Food and Agriculture Organization (FAO).

[4] Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Campaniello, D., D'Amato, D., Gallo, M., Speranza, B. y Sinigaglia, M. (2011). Shelf life prolongation of fruit juices through essential oils and homogenization: a review. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, 3, 1157-1166.

[5] Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M. y Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. Food Microbiology, 33(1), 1-10.

[6] Cutler, G. J., Nettleton, J. A., Ross, J. A., Harnack, L. J., Jacobs Jr, D. R., Scrafford, C. G.,

Barraj, L. M., Mink, P. J. y Robien, K. (2008). Dietary flavonoid intake and risk of cancer in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. International Journal of Cancer, 123(3), 664-671.

[7] Dai, Q., Borenstein, A. R., Wu, Y., Jackson, J. C. y Larson, E. B. (2006). Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: the Kame Project. The American Journal of Medicine, 119(9), 751-759.

[8] Aune, D., Giovannucci, E., Boffetta, P., Fadnes, L. T., Keum, N., Norat, T., Greenwood, D. C., Riboli, E., Vatten, L. J. y Tonstad, S. (2017). Fruit and vegetable intake and the risk of cardiovascular disease, total cancer and all-cause mortality—a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. International Journal of Epidemiology, 46(3), 1029-1056.

[9] Garcia, E. F., Luciano, W. A., Xavier, D. E., da Costa, W. C., de Sousa Oliveira, K., Franco, O. L., de Morais Júnior, M. A., Lucena, B. T., Picão, R. C. y Magnani, M. (2016). Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected Lactobacillus strains. Frontiers in Microbiology, 7.

[10] Ruiz Rodriguez, L. G., Mohamed, F., Bleckwedel, J., Medina, R., De Vuyst, L., Hebert, E. M. y Mozzi, F. (2019). Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in Northern Argentina. Frontiers in Microbiology, 10, 1091.

[11] Wareing, P. y Davenport, R. (2005). Microbiology of soft drinks and fruit juices. Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices, 279-299.

[12] Lawlor, K. A., Schuman, J. D., Simpson, P. G. y Taormina, P. J. (2009). Microbiological spoilage of beverages Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages (pp. 245-284): Springer.

[13] Bevilacqua, A., Corbo, M. R. y Sinigaglia, M. (2012). Use of natural antimicrobials and high pressure homogenization to control the growth of Saccharomyces bayanus in apple juice. Food Control, 24(1-2), 109-115.

[14] Patil, S. y Kamble, V. (2011). Antibacterial activity of some essential oils against foodborne pathogen and food spoilage bacteria. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2, 143-150.

[15] Swain, M. R., Anandharaj, M., Ray, R. C. y Parveen Rani, R. (2014). Fermented fruits and vegetables of Asia: a potential source of probiotics. Biotechnology Research International, 2014.

[16] Buckenhüskes, H. J. (1993). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. FEMS Microbiology Reviews, 12(1-3), 253-271.

[17] Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S. y Ouwehand, A. (2012). Food fermentations: microorganisms

with technological beneficial use. International Journal of Food Microbiology, 154(3), 87-97.

[18] Ruiz Rodríguez, L., Bleckwedel, J., Eugenia Ortiz, M., Pescuma, M. y Mozzi, F. (2017). Lactic acid bacteria. En Wittmann, C. y Liao, J. C. (Eds.), Industrial Biotechnology: Microorganisms (Vol. 1, pp. 395-451).

[19] Di Cagno, R., Filannino, P., Vincentini, O., Lanera, A., Cavoski, I. y Gobbetti, M. (2016). Exploitation of Leuconostoc mesenteroides strains to improve shelf life, rheological, sensory and functional features of prickly pear (Opuntia ficus-indica L.) fruit puree. Food Microbiology, 59, 176-189.

[20] Filannino, P., Di Cagno, R. y Gobbetti, M. (2018). Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth. Current Opinion in Biotechnology, 49, 64-72.

[21] Filannino, P., Cardinali, G., Rizzello, C. G., Buchin, S., De Angelis, M., Gobbetti, M. y Di Cagno, R. (2014). Metabolic responses of Lactobacillus plantarum strains during fermentation and storage of vegetable and fruit juices. Applied and Environmental Microbiology, 80(7), 2206-2215.

[22] Di Cagno, R., Filannino, P. y Gobbetti, M. (2015). Vegetable and fruit fermentation by lactic acid bacteria. En Mozzi, F., Raya, R. R. y Vignolo, G. M. (Eds.), Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications (2 ed., pp. 216-230). Chichester: John Wiley & Sons.

[23] Endo, A. (2012). Fructophilic lactic acid bacteria inhabit fructose-rich niches in nature. Microbial Ecology in Health and Disease, 23(1), 18563.

[24] Siezen, R. J. y Bachmann, H. (2008). Genomics of dairy fermentations. Microbial Biotechnology, 1(6), 435-442. doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00067.x

[25] Di Cagno, R., Cardinali, G., Minervini, G., Antonielli, L., Rizzello, C. G., Ricciuti, P. y Gobbetti, M. (2010). Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (Ananas comosus L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. Food Microbiology, 27(3), 381-389.

[26] Di Cagno, R., Filannino, P. y Gobbetti, M. (2017). Lactic acid fermentation drives the optimal volatile flavor-aroma profile of pomegranate juice. International Journal of Food Microbiology, 248, 56-62.

[27] Fessard, A., Kapoor, A., Patche, J., Assemat, S., Hoarau, M., Bourdon, E., Bahorun, T. y Remize, F. (2017). Lactic fermentation as an efficient tool to enhance the antioxidant activity of tropical fruit juices and teas. Microorganisms, 5(2), 23.

[28] Verón, H. E., Di Risio, H. D., Isla, M. I. y Torres, S. (2017). Isolation and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from Opuntia ficus-indica fruits that grow in Northwest Argentina. LWT-Food Science and Technology, 84, 231-240.

[29] Di Cagno, R., Surico, R. F., Paradiso, A., De Angelis, M., Salmon, J.-C., Buchin, S., De Gara, L. y Gobbetti, M. (2009). Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensory properties of tomato juices. International Journal of Food Microbiology, 128(3), 473-483.

[30] Di Cagno, R., Surico, R. F., Minervini, G., Rizzello, C. G., Lovino, R., Servili, M., Taticchi, A., Urbani, S. y Gobbetti, M. (2011). Exploitation of sweet cherry (Prunus avium L.) puree added of stem infusion through fermentation by selected autochthonous lactic acid bacteria. Food Microbiology, 28(5), 900-909.

[31] Vitali, B., Minervini, G., Rizzello, C. G., Spisni, E., Maccaferri, S., Brigidi, P., Gobbetti, M. y Di Cagno, R. (2012). Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. Food Microbiology, 31(1), 116-125.

[32] Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. y Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45(4), 287-306.

[33] Andriantsitohaina, R., Auger, C., Chataigneau, T., Étienne-Selloum, N., Li, H., Martínez, M. C., Schini-Kerth, V. B. y Laher, I. (2012). Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. British Journal of Nutrition, 108(9), 1532-1549.

[34] Coban, D., Milenkovic, D., Chanet, A., Khallou-Laschet, J., Sabbe, L., Palagani, A., Vanden Berghe, W., Mazur, A. y Morand, C. (2012). Dietary curcumin inhibits atherosclerosis by affecting the expression of genes involved in leukocyte adhesion and transendothelial migration. Molecular Nutrition & Food Research, 56(8), 1270-1281.

[35] García-Ruiz, A., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J. y Bartolomé, B. (2011). Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of enological lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 145(2-3), 426-431.

[36] Sabel, A., Bredefeld, S., Schlander, M. y Claus, H. (2017). Wine phenolic compounds: Antimicrobial properties against yeasts, lactic acid and acetic acid bacteria. Beverages, 3(3), 29.

[37] Stead, D. (1993). The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine-spoilage lactic acid bacteria. Journal of Applied Bacteriology, 75(2), 135-141.

[38] Vivas, N., Lonvaud-Funel, A. y Glories, Y. (1997). Effect of phenolic acids and anthocyanins on growth, viability and malolactic activity of a lactic acid bacterium. Food Microbiology, 14(3), 291-299.

[39] Campos, F., Couto, J. y Hogg, T. (2003). Influence of phenolic acids on growth and inactivation of Oenococcus oeni and Lactobacillus hilgardii. Journal of Applied Microbiology, 94(2), 167-174.

[40] Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y.-C., Choi, I. y Kim, G.-B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. Food Chemistry, 160, 346-356.

[41] Mantzourani, I., Kazakos, S., Terpou, A., Alexopoulos, A., Bezirtzoglou, E., Bekatorou, A. y Plessas, S. (2019). Potential of the probiotic Lactobacillus plantarum ATCC 14917 strain to produce functional fermented pomegranate juice. Foods, 8(1), 4.

[42] Yan, Y., Zhang, F., Chai, Z., Liu, M., Battino, M. y Meng, X. (2019). Mixed fermentation of blueberry pomace with L. rhamnosus GG and L. plantarum-1: Enhance the active ingredient, antioxidant activity and health-promoting benefits. Food and Chemical Toxicology, 131, 110541.

[43] Zhang, Z.-P., Ma, J., He, Y.-Y., Lu, J. y Ren, D.-F. (2018). Antioxidant and hypoglycemic effects of Diospyros lotus fruit fermented with Microbacterium flavum and Lactobacillus plantarum. Journal of Bioscience and Bioengineering, 125(6), 682-687.

[44] Li, Z., Teng, J., Lyu, Y., Hu, X., Zhao, Y. y Wang, M. (2019). Enhanced antioxidant activity for apple juice fermented with Lactobacillus plantarum ATCC14917. Molecules, 24(1), 51.

[45] Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., de las Rivas, B., de Felipe, F. L., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J. M. y Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 132(2-3), 79-90.

[46] Septembre-Malaterre, A., Remize, F. y Poucheret, P. (2018). Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. Food Research International, 104, 86-99.

[47] Kaprasob, R., Kerdchoechuen, O., Laohakunjit, N., Thumthanaruk, B. y Shetty, K. (2018). Changes in physico-chemical, astringency, volatile compounds and antioxidant activity of fresh and concentrated cashew apple juice fermented with Lactobacillus plantarum. Journal of Food Science and Technology, 55(10), 3979-3990.

[48] Ricci, A., Cirlini, M., Maoloni, A., Del Rio, D., Calani, L., Bernini, V., Galaverna, G., Neviani, E. y Lazzi, C. (2019). Use of dairy and plant-derived lactobacilli as starters for cherry juice fermentation. Nutrients, 11(2), 213.

[49] Filannino, P., Bai, Y., Di Cagno, R., Gobbetti, M. y Gänzle, M. G. (2015). Metabolism of phenolic compounds by Lactobacillus spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. Food Microbiology, 46, 272-279.

[50] Filannino, P., Gobbetti, M., De Angelis, M. y Di Cagno, R. (2014). Hydroxycinnamic acids used as external acceptors of electrons: an energetic advantage for strictly heterofermentative lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 80(24), 7574-7582.

[51] Baeza, G., Bachmair, E.-M., Wood, S., Mateos, R., Bravo, L. y De Roos, B. (2017). The colonic

metabolites dihydrocaffeic acid and dihydroferulic acid are more effective inhibitors of in vitro platelet activation than their phenolic precursors. Food & Function, 8(3), 1333-1342.

[52] Huang, J., de Paulis, T. y May, J. M. (2004). Antioxidant effects of dihydrocaffeic acid in human EA. hy926 endothelial cells. The Journal of Nutritional Biochemistry, 15(12), 722-729.

[53] Liu, Y., Chen, H., Chen, W., Zhong, Q., Zhang, G. y Chen, W. (2018). Beneficial effects of tomato juice fermented by Lactobacillus plantarum and Lactobacillus casei: antioxidation, antimicrobial effect, and volatile profiles. Molecules, 23(9), 2366.

[54] Cui, S., Zhao, N., Lu, W., Zhao, F., Zheng, S., Wang, W. y Chen, W. (2019). Effect of different Lactobacillus species on volatile and nonvolatile flavor compounds in juices fermentation. Food Science & Nutrition, 7(7), 2214-2223.

[55] Ricci, A., Cirlini, M., Levante, A., Dall'Asta, C., Galaverna, G. y Lazzi, C. (2018). Volatile profile of elderberry juice: Effect of lactic acid fermentation using L. plantarum, L. rhamnosus and L. casei strains. Food Research International, 105, 412-422.

[56] de Godoy Alves Filho, E., Rodrigues, T. H. S., Fernandes, F. A. N., Pereira, A. L. F., Narain, N., de Brito, E. S. y Rodrigues, S. (2017). Chemometric evaluation of the volatile profile of probiotic melon and probiotic cashew juice. Food Research International, 99, 461-468.

[57] Nguyen, B. T., Bujna, E., Fekete, N., Tran, A. T., Rezessy-Szabo, J. M., Prasad, R. y Nguyen, Q. D. (2019). Probiotic beverage from pineapple juice fermented with Lactobacillus and Bifidobacterium strains. Frontiers in Nutrition, 6.

[58] Sybesma, W. y Hugenholz, J. (2004). Food fermentation by lactic acid bacteria for the prevention of cardiovascular disease Functional Foods, Cardiovascular Disease and Diabetes (pp. 448-474): Elsevier.

[59] Istrati, D. I., Pricop, E. M., Profir, A. G. y Vizireanu, C. (2018). Fermented Functional Beverages. En Lagouri, V. (Ed.), Functional Foods: IntechOpen.

[60] Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J.-M. y Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. LWT-Food Science and Technology, 50(1), 1-16.

[61] Bujna, E., Farkas, N. A., Tran, A. M., Sao Dam, M. y Nguyen, Q. D. (2018). Lactic acid fermentation of apricot juice by mono-and mixed cultures of probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains. Food Science and Biotechnology, 27(2), 547-554.

[62] Lu, Y., Tan, C. W., Chen, D. y Liu, S. Q. (2018). Potential of three probiotic lactobacilli in transforming star fruit juice into functional beverages. Food Science & Nutrition, 6(8), 2141-2150.

[63] Nithya, P. S. y Vasudevan, A. (2016). Effect of lactic acid bacteria in development of papaya juice using response surface methodology. International Journal of Biotechnology

and Biochemistry, 12(1), 27-32.

[64] White, J. y Hekmat, S. (2018). Development of probiotic fruit juices using Lactobacillus rhamnosus GR-1 fortified with short chain and long chain inulin fiber. Fermentation, 4(2), 1-12.

[65] Martínez, F. G., Barrientos, M. E. C., Mozzi, F. y Pescuma, M. (2019). Survival of selenium-enriched lactic acid bacteria in a fermented drink under storage and simulated gastro-intestinal digestion. Food Research International, 123, 115-124.

[66] Ozcan, T., Yilmaz-Ersan, L., Akpinar-Bayizit, A., Delikanli, B. y Barat, A. (2015). Survival of Lactobacillus spp. In fruit based fermented dairy beverages. International Journal of Food Engineering, 1(1), 44-49.

[67] Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Misaghi, A., Bokaie, S. y Noori, N. (2016). Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of Lactobacillus rhamnosus GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. LWT-Food Science and Technology, 69, 365-371.

[68] Perricone, M., Bevilacqua, A., Altieri, C., Sinigaglia, M. y Corbo, M. R. (2015). Challenges for the production of probiotic fruit juices. Beverages, 1(2), 95-103.

[69] Saarela, M., Alakomi, H.-L., Mättö, J., Ahonen, A., Puhakka, A. y Tynkkynen, S. (2011). Improving the storage stability of Bifidobacterium breve in low pH fruit juice. International Journal of Food Microbiology, 149(1), 106-110.

[70] Chaudhary, A. (2019). Probiotic Fruit and Vegetable Juices: Approach Towards a Healthy Gut. IInternational Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 8(6), 1265-1279.

[71] Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A. y Soccol, C. R. (2008). Trends in non-dairy probiotic beverages. Food Research International, 41(2), 111-123.

[72] Marsh, A. J., Hill, C., Ross, R. P. y Cotter, P. D. (2014). Fermented beverages with health-promoting potential: past and future perspectives. Trends in Food Science & Technology, 38(2), 113-124.

[73] Berggren, A., Ahrén, I. L., Larsson, N. y Önning, G. (2011). Randomised, double-blind and placebo-controlled study using new probiotic lactobacilli for strengthening the body immune defence against viral infections. European Journal of Nutrition, 50(3), 203-210.

[74] Xu, J., Jönsson, T., Plaza, M., Håkansson, Å., Antonsson, M., Ahrén, I. L., Turner, C., Spégel, P. y Granfeldt, Y. (2018). Probiotic fruit beverages with different polyphenol profiles attenuated early insulin response. Nutrition Journal, 17(1), 1-10.

[75] Nobaek, S., Johansson, M.-L., Molin, G., Ahrné, S. y Jeppsson, B. (2000). Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients

with irritable bowel syndrome. The American Journal of Gastroenterology, 95(5), 1231-1238.

[76] Wang, Y., Yu, M., Shi, Y., Lu, T., Xu, W., Sun, Y., Yang, L., Gan, Z. y Xie, L. (2019). Effects of a fermented beverage of Changbai mountain fruit and vegetables on the composition of gut microbiota in mice. Plant Foods for Human Nutrition, 74(4), 468-473.

[77] Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. y Dubourdieu, D. (2006). Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine-Stabilization and Treatments (Vol. 2): John Wiley & Sons.

[78] Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast, 16(8), 675-729.

[79] Knight, S., Klaere, S., Fedrizzi, B. y Goddard, M. R. (2015). Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: evidence for a microbial aspect to terroir. Scientific Reports, 5(1), 1-10.

[80] Waterhouse, A. L., Sacks, G. L. y Jeffery, D. W. (2016). Grape Must Composition Overview Understanding wine chemistry (pp. 172-178): John Wiley & Sons.

[81] Mauricio, J. C., Valero, E., Millán, C. y Ortega, J. M. (2001). Changes in nitrogen compounds in must and wine during fermentation and biological aging by flor yeasts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(7), 3310-3315.

[82] Paetzold, M., Dulau, L. y Dubourdieu, D. (1990). Fractionnement et caractérisation des glycoprotéines dans les moûts de raisins blancs. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 24(1), 13-28.

[83] Kontoudakis, N. (2010). Grape phenolic maturity; determination methods and consequences on wine phenolic composition. Universitat Rovira i Virgili. Retrieved from https://www.tdx.cat/handle/10803/8687

[84] Kaur, G., Padiya, R., Adela, R., Putcha, U. K., Reddy, G., Reddy, B., Kumar, K., Chakravarty, S. y Banerjee, S. K. (2016). Garlic and resveratrol attenuate diabetic complications, loss of β-cells, pancreatic and hepatic oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Frontiers in Pharmacology, 7*, 360.

[85] Kuršvietienė, L., Stanevičienė, I., Mongirdienė, A. y Bernatonienė, J. (2016). Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina, 52*(3), 148-155.

[86] Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G. y Romano, P. (2016). Yeast interactions in inoculated wine fermentation. *Frontiers in Microbiology, 7*, 555.

[87] Ruiz, P., Izquierdo, P. M., Sesena, S., García, E. y Palop, M. L. (2012). Malolactic fermentation and secondary metabolite production by *Oenoccocus oeni* strains in low pH wines. *Journal of Food Science, 77*(10), M579-M585.

[88] Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. y Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology, 153*(3), 243-259.

[89] Lopes, C., Van Broock, M., Querol, A. y Caballero, A. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. *Journal of Applied Microbiology, 93*(4), 608-615.

[90] Sangorrín, M. P., Lopes, C. A., Giraudo, M. R. y Caballero, A. C. (2007). Diversity and killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. *International Journal of Food Microbiology, 119*(3), 351-357.

[91] Fernández de Ullivarri, M., Mendoza, L. M., Raya, R. R. y Farías, M. E. (2011). Killer phenotype of indigenous yeasts isolated from Argentinian wine cellars and their potential starter cultures for winemaking. *Biotechnology Letters, 33*(11), 2177-2183.

[92] Mendoza, L. M., Merín, M. G., Morata, V. I. y Farías, M. E. (2011). Characterization of wines produced by mixed culture of autochthonous yeasts and *Oenococcus oeni* from the northwest region of Argentina. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 38*(11), 1777-1785.

[93] Mendoza, L. M., Saavedra, L. y Raya, R. R. (2015). Draft genome sequence of *Oenococcus oeni* strain X2L (CRL1947), isolated from red wine of Northwest Argentina. *Genome Announcements, 3*(1), e01376-01314.

[94] Mendoza, L. M., Vega-Lopez, G. A., de Ullivarri, M. F. y Raya, R. R. (2019). Population and oenological characteristics of non-*Saccharomyces* yeasts associated with grapes of Northwestern Argentina. *Archives of Microbiology, 201*(2), 235-244.

[95] Mercado, L., Sturm, M. E., Rojo, M. C., Ciklic, I., Martínez, C. y Combina, M. (2011). Biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* populations in Malbec vineyards from the "Zona Alta del Río Mendoza" region in Argentina. *International Journal of Food Microbiology, 151*(3), 319-326.

[96] Maturano, Y. P., Assof, M., Fabani, M. P., Nally, M. C., Jofré, V., Assaf, L. A. R., Toro, M. E., De Figueroa, L. I. C. y Vazquez, F. (2015). Enzymatic activities produced by mixed *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* cultures: relationship with wine volatile composition. *Antonie Van Leeuwenhoek, 108*(5), 1239-1256.

[97] Henick-Kling, T. (1993). Malolactic fermentation. *Wine Microbiology and Biotechnology*, 289-326.

[98] Betteridge, A., Grbin, P. y Jiranek, V. (2015). Improving *Oenococcus oeni* to overcome challenges of wine malolactic fermentation. *Trends in Biotechnology, 33*(9), 547-553.

[99] Lucio, O., Pardo, I., Heras, J., Krieger-Weber, S. y Ferrer, S. (2017). Use of starter cultures of *Lactobacillus* to induce malolactic fermentation in wine. *Australian Journal of Grape and Wine*

Research, 23(1), 15-21.

[100] Brizuela, N., Tymczyszyn, E. E., Semorile, L. C., La Hens, D. V., Delfederico, L., Hollmann, A. y Bravo-Ferrada, B. (2019). *Lactobacillus plantarum* as a malolactic starter culture in winemaking: A new (old) player? *Electronic Journal of Biotechnology, 38*, 10-18.

[101] Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine *Lactic acid bacteria: Genetics, metabolism and applications* (pp. 317-331): Springer.

[102] Bartowsky, E., Costello, P. J. y Henschke, P. A. (2002). Management of malolactic fermentation: wine flavour manipulation. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*(461), 10-12.

[103] Maitre, M., Weidmann, S., Dubois-Brissonnet, F., David, V., Covès, J. y Guzzo, J. (2014). Adaptation of the wine bacterium *Oenococcus oeni* to ethanol stress: role of the small heat shock protein Lo18 in membrane integrity. *Applied and Environmental Microbiology, 80*(10), 2973-2980.

[104] Margalef-Català, M., Araque, I., Weidmann, S., Guzzo, J., Bordons, A. y Reguant, C. (2016). Protective role of glutathione addition against wine-related stress in *Oenococcus oeni*. *Food Research International, 90*, 8-15.

[105] Olguín, N. T., La Hens, D. V. s., Delfederico, L. y Semorile, L. (2019). Relative expression of stress-related genes during acclimation at low temperature of psychrotrophic *Oenococcus oeni* strains from Patagonian wine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 35*(1), 5.

[106] Cappello, M. S., Zapparoli, G., Logrieco, A. y Bartowsky, E. J. (2017). Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour. *International Journal of Food Microbiology, 243*, 16-27.

[107] Osborne, J., Mira de Orduna, R., Pilone, G. y Liu, S.-Q. (2000). Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters, 191*(1), 51-55.

[108] Grimaldi, A., Bartowsky, E. y Jiranek, V. (2005). A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology, 105*(2), 233-244.

[109] Ugliano, M. y Moio, L. (2006). The influence of malolactic fermentation and *Oenococcus oeni* strain on glycosidic aroma precursors and related volatile compounds of red wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 86*(14), 2468-2476.

[110] Maarman, B. C. (2014). Interaction between wine yeast and malolactic bacteria and the impact on wine aroma and flavour. *Department of Viticulture and Oenology, Institute for Wine Biotechnology. Stellenbosch University*.

[111] Du Plessis, H., Du Toit, M., Nieuwoudt, H., Van der Rijst, M., Kidd, M. y Jolly, N. (2017). Effect of *Saccharomyces*, non-*Saccharomyces* yeasts and malolactic fermentation strategies on fermentation kinetics and flavor of Shiraz wines. *Fermentation, 3*(4), 64.

[112] Fungelsang, K. y Edwards, C. (2007). *Wine Microbiology, Practical Applications and Procedures* (2 ed.). New York, USA: Springer Science+ Business Media, LLC.

[113] Lerena, M. C., Rojo, M., Sari, S., Mercado, L., Krieger-Weber, S. y Combina, M. (2016). Malolactic fermentation induced by *Lactobacillus plantarum* in Malbec wines from Argentina. *South African Journal of Enology and Viticulture, 37*(2), 115-123.

[114] Brizuela, N. S., Bravo-Ferrada, B. M., Pozo-Bayón, M. Á., Semorile, L. y Tymczyszyn, E. E. (2018). Changes in the volatile profile of Pinot noir wines caused by Patagonian *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains. *Food Research International, 106*, 22-28.

[115] Tristezza, M., di Feo, L., Tufariello, M., Grieco, F., Capozzi, V., Spano, G. y Mita, G. (2016). Simultaneous inoculation of yeasts and lactic acid bacteria: Effects on fermentation dynamics and chemical composition of Negroamaro wine. *LWT-Food Science and Technology, 66*, 406-412.

[116] Pardo, I. y Ferrer, S. (2019). Yeast-Bacteria Coinoculation *Red Wine Technology* (pp. 99-114): Elsevier.

11

Levaduras en cerveza y panificados, aportes desde la Patagonia Argentina

Diego Libkind
libkindfd@comahue-conicet.gob.ar

Lucía Álvarez
alvarez.lucia@comahue-conicet.gob.ar

• *Centro de Referencia en Levaduras y Tecnología Cervecera (CRELTEC), Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC) – CONICET / Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Argentina. www.ipatec.conicet.gob.ar*

Resumen

La cerveza y el pan son de los alimentos fermentados más antiguos y más consumidos. La fermentación de estos alimentos es llevada a cabo por hongos microscópicos denominados levaduras que han sufrido una fuerte domesticación como resultado de cientos de años de asociación a dichos procesos fermentativos. Las levaduras en el proceso producen gas carbónico y alcohol a partir de los azúcares presentes en los cereales, pero también son responsables de gran parte del aroma y sabor del producto terminado. Las materias primas para elaborar pan son cereal molido (usualmente harina de trigo), agua y levaduras y, en algunos casos, también bacterias fermentadoras. Pueden agregarse otros ingredientes como materia grasa, sal, miel, frutas, semillas, frutos secos. El pan tradicional de panadería se obtiene a través de un proceso no automatizado, con bajos niveles de tecnificación. En cambio, el pan industrial incluye variedades de pan de molde y panes de bollería (pan para pancho, hamburguesas y otros), fabricados en plantas industriales a través de líneas de producción automatizadas o semi automatizadas. Por su parte, la cerveza se fabrica con agua, cebada malteada, lúpulo y levadura. Las cervezas "*ale*" son fermentadas a temperatura ambiente por cepas de *S. cerevisiae*. Estas cervezas son las más antiguas y las que tienen más variedad de aromas y sabores y han alcanzado una gran popularidad a partir de la expansión del mercado artesanal. Por el contrario,

las cervezas "*lager*" se fermentan a temperaturas bajas (5-15°C) y fueron desarrolladas más recientemente en el siglo XV. Las cervezas *lager* corresponden a las cervezas industriales y representan el 95% del mercado mundial. Estas cervezas son fermentadas con *S. pastorianus*, una levadura bien adaptada a temperaturas frías debido a que se trata de una levadura híbrida, siendo sus parentales una cepa *ale* de *S. cerevisiae* y una levadura salvaje criotolerante que fue recientemente descubierta por científicos en los ambientes naturales de la Patagonia Argentina y bautizada *Saccharomyces eubayanus* o EUBY®. Su transferencia a la industria y su empleo para fabricar cervezas novedosas donde predominan notas especiadas y clavo de olor, representó la oportunidad para elaborar por primera vez cervezas 100% argentinas. Actualmente se está estudiando el uso de esta levadura nativa en panificados, poniendo en valor el uso de microorganismos nativos no convencionales para elaborar alimentos fermentados con identidad regional, aportando mayor agregado de valor y oportunidades de diferenciación productiva.

I. Breve historia de la cerveza y el pan

Los alimentos fermentados han sido y serán claves en la construcción y el desarrollo de la civilización humana, como se demuestra a lo largo de este libro. Este capítulo se enfocará en los alimentos fermentados posiblemente más antiguos y mundialmente más populares –la cerveza y el pan– como queda demostrado por su nivel de consumo, distribución geográfica, así como por la gran diversidad de variantes y la constante innovación en su industria. Ambos se caracterizan por el uso de cereales como materia prima y como principal fuente de azúcares para la acción fermentativa de las levaduras. La fermentación alcohólica por parte de levaduras especiales constituye la base de la producción de ambos alimentos. En la cerveza, el alcohol en rangos del 4 al 10% v/v es el producto metabólico más buscado, mientras que en el pan es el gas carbónico, necesario para la generación de burbujas y el aireado de la masa para lograr el volumen y la estructura deseada. En ambos casos el proceso fermentativo conlleva a la síntesis de cientos de compuestos organolépticamente activos que serán determinantes en el sabor y aroma (definido conjuntamente como flavor) final de estos alimentos fermentados. La fermentación requiere azúcares, pero no todos los tipos de azúcares son asimilables por las levaduras, por lo cual los cereales ricos en almidón (azúcar no fermentable) requieren de tratamientos previos para su uso. Estos se basan en la acción de enzimas (alfa y beta amilasas) como herramientas fundamentales para la hidrólisis del almidón y "disponibilización" de azúcares fermentables. La humanidad ha usado distintas fuentes de alfa y beta amilasas para obtener azúcares fermentables de sustratos ricos en almidón, incluyendo la saliva humana en las chichas sudamericanas, hongos en las bebidas asiáticas sake y shochu, y la de los propios cereales como en la cerveza y otras bebidas equivalentes, que al ser germinados o malteados generan la activación de sus propias enzimas.

I.A. Producción de cerveza

La cerveza es la bebida alcohólica más consumida en todo el planeta y representa una de las biotecnologías más antiguas del mundo. Se produce mayormente con los siguientes ingredientes principales, en proporción relativa decreciente: agua, cebada malteada (minoritariamente se usan otros granos malteados o no, tales como trigo, maíz, arroz, mijo, sorgo, maíz, etc.), lúpulo y levadura.

Uno de los primeros indicios arqueológicos de la producción de bebidas fermentadas que contenían arroz y frutas provienen de China y datan de 9.000 años atrás. Las primeras producciones de bebidas semejantes a la cerveza se revelan en escritos sumerios de hace 5.000 a 6.000 años. Las tribus celtas diseminaron la producción de cerveza y su consumo hace 2.000 años por toda Europa [1]. El proceso de elaboración de cerveza ha evolucionado mucho desde entonces, implicando actualmente el uso de algún cereal malteado molido (malta base), principalmente cebada cervecera, que se mezcla con el agua en el primer paso denominado maceración, en el cual se

gelatiniza el almidón y se dan las condiciones fisicoquímicas para que actúen las enzimas amilasas del grano y se generen los azúcares fermentables, en particular maltosa, maltotriosa y glucosa. En este paso también se agregan maltas especiales con distintos procesos de caramelización o torrado que aportan al color y al aroma y sabor de la cerveza. Luego la cama de restos de grano (bagazo) se emplea de filtro para lavar los azúcares y compuestos de color, aroma y sabor hacia la olla de hervor, donde se aplicará a este líquido azucarado denominado mosto temperaturas de ebullición durante al menos una hora. En esta etapa de cocción se agregan las flores del lúpulo las cuales aportarán el sabor amargo (que equilibra el dulce de la malta), aromas y sabores especiales (florales, frutados o herbales dependiendo de la variedad de lúpulo) y también propiedades antimicrobianas que ayudan a la estabilidad del producto. El proceso de cocción implica también una fuerte coagulación de material proteico (ayuda a la clarificación del líquido) y una baja considerable de los microorganismos presentes, la cual es fundamental para que los sabores y aromas del producto final provengan meramente de la acción de la levadura introducida por el productor en la etapa subsiguiente: la fermentación. Previo al proceso fermentativo el mosto lupulado debe ser enfriado a la temperatura requerida por la levadura a emplear y el estilo de cerveza buscado. Para las cervezas *ale* es entre 17 y 23°C, mientras que para las *lager* es entre 8 y 14°C. El proceso de fermentación dura entre 2 a 7 días y es seguido luego por un período de maduración en caliente (entre 14 y 24°C, dependiendo del estilo) y luego en frío, que tienen como objetivo mejorar los aspectos organolépticos del producto final, así como su clarificación, para luego proceder a su acondicionamiento en botella, latas o barriles.

Existen cientos de estilos diferentes de cerveza, la mayoría originarios de Europa, derivados no solo de diferentes tipos de maltas, variedades de lúpulo y de levaduras, sino también de diferencias en el proceso de elaboración. A esta gran lista de estilos se le van lentamente sumando innovaciones o aportes desde otros continentes, inclusive el sudamericano, incluida Argentina. Sin embargo, las cervezas denominadas *ale* son las más antiguas, las cuales se caracterizan por ser fermentadas a temperaturas más elevadas (18-23°C), emplean en muchos estilos más cantidad de maltas y lúpulo, y la levadura utilizada es alguna de las cepas domesticadas para cerveza de la especie *Saccharomyces cerevisiae* (levadura *ale*). Las cervezas *lager* emergieron más recientemente a fines del siglo XIII, como resultado de comprobar que fermentaciones a menores temperaturas y períodos de maduración en frío prolongados (en bodegas o cuevas) daban como resultado cervezas más livianas de sabor y aroma y, por lo tanto, mayor "tomabilidad", y también mayor vida útil del producto. En Europa continental se fue lentamente restringiendo la posibilidad de hacer cerveza en las estaciones cálidas, obligando a producir cerveza *lager* mayoritariamente. Así fue como, a diferencia de las islas británicas donde se continuó produciendo fuertemente estilos *ale* (ej. *Pale Ale, India Pale Ale, Mild, Bitter, Scottish, Irish, Porter, Stout*), numerosos cerveceros de la región que hoy es Alemania y la república Checa fueron incorporando innovaciones a las cervezas *lager* que permitieron producir cervezas cada vez más

livianas, traslúcidas y de mayor estabilidad y tomabilidad, creando así una diversidad de estilos que incluye: Pilsen, Marzen, Schwarzbier, Bock, entre otros [2].

Los cambios de temperaturas de fermentación generaron un cambio significativo en la microbiología del proceso de elaboración de cerveza, que explica las diferencias notables entre las cervezas *ale* y *lager*. Estos cambios fueron recién comprendidos a mediados del siglo XIII gracias a los aportes de Louis Pasteur y más tarde de Christian Hansen, quienes entre otros científicos, dilucidaron el rol de las levaduras en el proceso fermentativo y desarrollaron las técnicas para aislar y manipular microorganismos puros. Esto tiene particular relevancia porque hasta el momento las cervezas se elaboraban con fermentaciones mixtas, lo que significa que además de las levaduras cerveceras se encontraban también otros microorganismos como bacterias y otras levaduras, que sin duda contribuían negativamente a la complejidad del aroma y sabor y a la estabilidad organoléptica de las cervezas de aquella época. Los productores sabían empíricamente que, si agregaban parte de la crema densa que se originaba en el fondo de cada fermentador luego de finalizada la fermentación en una nueva producción, es decir en mosto nuevo, este iba a proceder mucho más rápido que si no lo hacían. De esta manera estaban re-utilizando las levaduras y otros microorganismos, y al mismo tiempo aportando a la domesticación de las primeras al proceso cervecero. Este término, "domesticación", refiere a la selección y mejoramiento de especies salvajes para obtener variantes cultivables con características tecnológicas deseadas que puedan ser empleadas en ambientes antrópicos como por ejemplo industriales.

Así fue como al empezar a fabricar cervezas *lager* (a menor temperatura) los microorganismos de la cerveza se vieron condicionados por el frío generando una transición de fermentaciones mixtas principalmente gobernadas por levaduras *ale* a fermentaciones también mixtas pero gobernadas por levaduras fermentadoras adaptadas al frío (criotolerantes). Existen especies del género *Saccharomyces* diferentes a *S. cerevisiae* que viven en bosques en zonas templadas a frías y que están naturalmente adaptadas a las bajas temperaturas, pero que mantienen una buena capacidad fermentativa, por ejemplo *S. uvarum* y el hallazgo más reciente: *S. eubayanus* [3].

En el año 1883 Hansen logra aislar y purificar el primer microorganismo, el cual fue ni más ni menos que la levadura *lager*, la cual se conoce actualmente como *Saccharomyces pastorianus*. Esta levadura se repartió a las principales cervecerías del mundo y se convirtió en el agente de fermentación por excelencia, dando lugar a que las cervecerías profundicen sus protocolos de limpieza y sanitización para favorecer que gradualmente sea la levadura Lager el único agente de fermentación en la producción, así es que hoy el 95% de la producción es *lager* [4]. Sin embargo, en las últimas décadas se observa un fuerte crecimiento en la producción y demanda de cervezas artesanales, tanto en la Argentina como en todo el mundo. En el año 2000 comenzó la revolución de la cerveza artesanal en Estados Unidos como respuesta a la búsqueda de los consumidores de nuevos y más complejos sabores y aromas. Diez años después Argentina se suma a esa tendencia, alcanzando hoy el 3% del mercado nacional (1200 cervecerías artesanales), cuando en EE.UU. ya superó el 10% (más de

3000 micro-cervecerías). Este proceso se da en paralelo al de la oligopolización de la producción a escala industrial.

El crecimiento del consumo de la cerveza artesanal puede explicarse por diversos factores. Entre ellos, están un renovado interés de consumo de productos locales y una mayor demanda turística por el consumo de bienes artesanales locales, entre los que se incluyen alimentos y bebidas.

I.B. Producción de pan

El pan fermentado resulta de la actividad de microorganismos productores de gas que generan burbujas en la masa aumentando su volumen. Las materias primas son cereal molido (usualmente harina de trigo), agua y levaduras o bacterias fermentadoras. Pueden agregarse otros ingredientes como materia grasa, sal, miel, frutas, semillas, frutos secos. La evidencia arqueológica más antigua de panes fermentados proviene del segundo milenio en Egipto y el primer milenio en China. Sin embargo, el origen del inóculo microbiano de los panes de la antigüedad no es claro. No se sabe si las levaduras se dispersaron desde ambientes naturales contiguos (como cereales, suelo y árboles) o desde bebidas fermentadas, o si ocurrió el proceso inverso. La evidencia arqueológica de las bebidas fermentadas precede a la de los panes, sin embargo, esto puede deberse a la mejor conservación de las bebidas por su contenido alcohólico [5].

El arte de los panes fermentados se desarrolló durante la Edad Media y fue diseminándose a través del Mediterráneo y de los países del Medio Oriente. Hasta la Edad Media, el pan fue elaborado mayormente en los hogares. Durante la expansión de la población en los siglos XI y XII, se construyeron molinos y hornos comunitarios, haciendo que el proceso de elaboración del pan sea parte de la organización de la comunidad. Los panaderos profesionales se hicieron populares. La elaboración del pan consistía en mezclar harina, agua y masa madre. La masa madre se obtiene a partir de harina y agua y contiene levaduras y bacterias ácido lácticas. Estos microorganismos venían de la harina, el agua y/o de otros ambientes panaderos o cerveceros. Dependiendo de la localización geográfica y de los hábitos culturales, se usaban diferentes tipos de harinas, incluyendo trigo, cebada, centeno, espelta, maíz, sorgo, etc. En el siglo XIX, la industrialización de la producción de alimentos y el advenimiento de la microbiología como ciencia generaron cambios en las prácticas panaderas. La posibilidad de hacer cultivos puros y de trabajar con levaduras secas dieron lugar al desarrollo de los "*starters*" o cultivos iniciadores industriales de levaduras. Este desarrollo revolucionó la producción panadera y pastelera. Las consecuencias de estos cambios son evidentes en la actualidad, donde la mayor parte de los panificados se elaboran utilizando la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, lo que genera reproducibilidad y control en el proceso industrial. Existen además masas madre comerciales que contienen levaduras y bacterias seleccionadas con las características deseadas. Además, actualmente, también se utiliza masa madre natural, que es fermentada espontáneamente, sin *starters* (inoculantes) comerciales [5].

II. Levaduras asociadas a pan y cerveza

II.A. Levaduras de la cerveza

A pesar de que hay cientos de variedades de cerveza diferentes, la mayoría puede ser agrupada en 2 tipos en función de la levadura utilizada: cervezas *ale* elaboradas con levaduras *ale* (*S. cerevisiae*, fermentación alta) y cervezas *lager* elaboradas con levaduras *lager* (*S. pastorianus*, fermentación baja).

II.A.1. Levaduras *ale*

Las levaduras *ale* son las más antiguas, dado que son las que se fueron adaptando mediante el proceso de domesticación al proceso cervecero más tempranamente. Del mismo modo en que se han domesticado a los perros para distintos fines (caza, compañía, carrera, etc.) durante quince mil años a partir del lobo salvaje ancestral, a las levaduras *ale* también se las fue modificando genéticamente pero sin estar en conocimiento de ello y en un período de tiempo de solo cientos de años. Es así como hoy existen variedades o cepas (equivalentes a razas) de *S. cerevisiae* que son más aptas para uso en cerveza (levaduras *ale*), y otras que han sido domesticadas fuera del mundo cervecero y son más aptas para otros procesos fermentativos como la fabricación de vino, sake y pan. En comparación con las otras variedades de levaduras de uso industrial, las levaduras cerveceras son las que han sufrido los cambios más radicales a nivel genético debido a que la producción continua de cerveza y la re-utilización de las levaduras como se mencionara antes profundizó la adaptación y domesticación al proceso cervecero. Entre los cambios más destacados podemos mencionar mayor tolerancia a altos contenidos de azúcar y de alcohol, menor producción de aromas indeseados (fenoles) y una más eficiente utilización de maltotriosa (azúcar específico del mosto cervecero). Estudios recientes sugieren que el proceso real de domesticación de las levaduras *ale* comenzó mucho más recientemente de lo que se creía, alrededor de los años 1600-1700, cuando iniciaron las producciones cerveceras más industrializadas. El análisis a nivel genómico reveló que existen 2 grandes grupos de cepas de levaduras *ale* que poseen estas características tecnológicas útiles para la elaboración de la cerveza, el más grande e importante contiene 3 sub-grupos: levaduras provenientes de cervezas alemanas muy particulares (levaduras de cervezas Alt y Kolsch), levaduras británicas, y levaduras belgas y de cerveza de trigo. Estas últimas tienen la característica diferencial de mantener la capacidad de producir compuestos fenólicos que otorgan los aromas especiados característicos de dichos estilos. El segundo grupo de levaduras cerveceras está emparentado con las levaduras de vino, a diferencia del grupo principal que está más emparentado con las levaduras de uso en panificación e incluye cepas de usos variados [1, 6, 7].

Las levaduras *ale* en general poseen una alta capacidad de producir compuestos organolépticamente activos, en particular ésteres que aportan a las cervezas aromas

y sabores frutados muy particulares. Existen determinados estilos de cerveza *ale* donde las levaduras son protagonistas en el aroma y sabor, donde dichos ésteres son muy importantes, por ejemplo estilos británicos como *Pale Ales* o *Scottish*, o en estilos de origen Belga donde, a la gran producción de ésteres, se le suman compuestos fenólicos especiados que crean una complejidad única. Quizás el estilo más notable en cuanto al aporte de las levaduras *ale* es el de las cervezas de trigo donde las levaduras usadas para ese estilo en particular producen mucho acetato de isoamilo que aporta sabor y aroma a banana [8, 9]. En resumen, gracias a que se dieron distintos procesos de domesticación en lugares y condiciones de producción diferentes es que hoy existen cientos de cepas distintas de levaduras *ale* que tienen atributos deseables para diferentes estilos de cerveza, y explican la gran diversidad de estilos *ale* que hoy se pueden disfrutar.

II.A.2 Levaduras *lager*

Como se mencionó previamente, este tipo de cervezas se originó en el siglo XV a partir del descubrimiento de que fabricar y madurar cervezas a bajas temperaturas producía cervezas más ligeras y tomables y de mayor vida útil. Esta nueva modalidad productiva favoreció a aquellas más adaptadas a las bajas temperaturas y a la selección de forma natural de una nueva levadura, un híbrido entre una levadura *ale* (*S. cerevisiae*) y otra especie sacaromicética adaptada a bajas temperaturas. Este híbrido, *S. pastorianus,* fermenta a temperaturas entre 5–15 °C y es uno de los microorganismos biotecnológicamente más relevantes del mundo, porque es el responsable de la producción del 95% de la cerveza a nivel mundial. Sin embargo, no se descubrió hasta hace unos pocos años cuál era el parental criotolerante. La falta de este eslabón en el conocimiento y la historia de la levadura *lager* constituyó una gran limitación para la investigación de los procesos de domesticación de esta levadura y para la innovación y construcción de nuevas levaduras *lager*.

Hoy existen tan sólo dos tipos de levaduras *lager* denominadas Saaz (o Tipo 1) y Frohberg (o Tipo 2), las cuales se diferencian básicamente en la proporción de su ADN que conservan de cada uno de sus parentales. Las levaduras Frohberg son las que actualmente más se emplean en la industria, debido a que contienen mayor proporción de ADN de *S. cerevisiae* y por lo tanto tienen mejores características para fermentar a mayores temperaturas (12-14°C) que las Saaz (8-10°C). Existen evidencias genéticas que estos dos grupos se originaron de un solo evento de hibridización, por lo cual provendrían de una única cepa de levaduras *ale* y una única cepa de *S. eubayanus*. El descubrimiento de *S. eubayanus* y de distintas poblaciones de la especie, significó un avance muy importante a nivel científico, pero también a nivel tecnológico, porque al contar con los dos parentales ahora es posible construir híbridos nuevos pero pudiendo elegir los parentales más interesantes para cada interés productivo particular.

II.B. Levaduras del pan

Las levaduras de panificación comparten con las cervezas *ale* al mismo microorganismo inicial: *S. cerevisiae*. Las cepas utilizadas para elaborar cerveza y pan son filogenéticamente cercanas (pero no iguales), lo que demuestra que en un principio estas cepas se usaban indistintamente para fabricar estos alimentos. Actualmente hay cepas de *S. cerevisiae* específicamente adaptadas a cerveza o a pan. Las levaduras del pan no solamente afectan su volumen y estructura, sino también su sabor y aroma, color y vida útil.

Existen varias formas de elaborar pan. Puede utilizarse un cultivo iniciador o "*starter*" como levadura fresca, seca o instantánea, obtenida comercialmente, o puede elaborarse el pan a partir de masa madre iniciada a partir de un "*starter*" o iniciada de forma natural [10].

La masa madre natural se inicia mezclando algún tipo de harina integral y agua y eventualmente pueden agregarse otros ingredientes como frutas o miel que también pueden ser fuente de microorganismos. Día tras día se va "alimentando" a la masa madre con más harina y agua hasta que la mezcla comienza a fermentar naturalmente. Este proceso se repite hasta que la masa madre esté lista para elaborar pan. En ese momento se usa una parte para el pan y otra parte se mantiene por reinoculación continua de harina y agua hasta que se desee volver a utilizar. En estas masas madre se obtienen mezclas de levaduras y bacterias ácido lácticas que le dan características particulares al pan elaborado de esta manera, como mayor acidez, aroma y sabor particulares y costras más crocantes [11].

Comparado con la industria de la cerveza, donde el uso de levaduras alternativas ha crecido en los últimos años, el uso de cepas no convencionales para panificados ha recibido poca atención. Esto se debe a la creencia general de que lo único que aportan las levaduras en el pan es el gas producido, ya que los aromas aportados por las levaduras se perderían con el calor del horneado. Sin embargo, diferentes estudios han demostrado que los compuestos derivados de las levaduras contribuyen en gran parte al perfil de aromas del pan [10, 12].

Por otra parte, *S. cerevisiae* normalmente es considerada inocua desde el punto de vista de seguridad alimentaria. Sin embargo, en los últimos años las infecciones por *S. cerevisiae* han aumentado, y se han encontrado cepas particulares de esta especie que se utilizan en alimentos o complementos dietarios que poseen alta capacidad patogénica, por lo que su condición de inocuidad, en particular para pacientes inmunocomprometidos, está en revisión. La posibilidad de utilizar una levadura alternativa como *S. eubayanus* para producción de alimentos sería una solución a esta problemática debido a que no tienen capacidad de crecimiento a la temperatura corporal humana [13].

III. El caso del híbrido *lager* y sus orígenes patagónicos

A partir del siglo XV, la evolución en los procesos de elaboración de cervezas, más allá de su tipo, implicó un proceso de selección y "domesticación" de levaduras subyacente a la producción, de manera que fueron adquiriendo características que las hicieron más aptas y eficientes para su utilización en el proceso de fermentación. Esta actividad ha tenido como consecuencia una elevada influencia sobre la diversidad genética y la progresiva diferenciación de poblaciones. Actualmente, existen diferentes levaduras disponibles para cada proceso de fermentación. Sin embargo, esta diversidad y sus adaptaciones específicas a los nichos industriales no habían sido estudiadas hasta hace relativamente poco tiempo [2, 4, 14].

Hacia 2011, se sabía que la levadura Lager, *Saccharomyces pastorianus*, era un organismo híbrido, pero aún no se sabía cuáles eran sus levaduras parentales. Ese híbrido parecía involucrar a *S. cerevisiae* (posiblemente alguna cepa de las utilizadas para la producción de *ale*) y una cepa compleja denominada *S. bayanus* y que únicamente se encontraba en cervezas contaminadas. Sin embargo, no había consenso sobre la condición de parental de *S. bayanus* [15].

Entre los resultados de sus proyectos de investigación, el equipo del CRELTEC (Centro de Referencia en Levaduras y Tecnología Cervecera) reportó, en colaboración con grupos de investigación de Portugal y Estados Unidos, el aislamiento de una nueva especie aislada de los bosques patagónicos a la que, luego de realizar los estudios genéticos correspondientes, pudieron identificar como la "madre" de la levadura Lager y la bautizaron con el nombre *S. eubayanus*, la verdadera bayanus. En ese mismo trabajo se demostró que *S. bayanus* en realidad no correspondía a una especie biológica sino a un triple híbrido con aportes de *S. cerevisiae*, *S. eubayanus* y una tercera especie llamada *S. uvarum*.

Un tiempo después de la publicación del Dr. Libkind y col., otros grupos de especialistas en levaduras intensificaron sus intentos de aislar esta levadura y algunos con mucho esfuerzo tuvieron éxito en EEUU y Canadá, luego en China, y un poco después en Nueva Zelanda. Al estudiar el genoma de estas levaduras encontraron algunas cepas en USA un poco más cercanas genéticamente al híbrido que las patagónicas y las versiones chinas se acercaron levemente más, lo suficiente como para adjudicarse el origen de la madre de la levadura Lager. El equipo del CRELTEC se propuso entonces profundizar el estudio de *S. eubayanus* en la Patagonia a fin de entender si se trataba de una levadura nativa de los bosques y evaluar su distribución. Así, se obtuvieron más de 200 especímenes de la especie en la Patagonia andina, desde el norte de Neuquén hasta Tierra del Fuego. Se obtuvieron principalmente en Argentina pero también en Chile, superando ampliamente lo obtenido en otros lugares del mundo donde no excedían los 10-15 aislamientos. Los resultados demostraron que la abundancia de *S. eubayanus* en Patagonia es la más alta a nivel mundial, hasta 100 veces mayor, y su distribución se demostró estar preferentemente asociada a los bosques de ciertas especies de árboles endémicos del género *Nothofagus*. Luego los 200

aislamientos obtenidos fueron estudiados a nivel genómico mostrando la existencia de dos grandes poblaciones (A y B) y al menos 5 subpoblaciones genéticamente diferentes y poniendo en evidencia que la Patagonia posee la mayor diversidad genética conocida de la especie. Los datos previos sumados a estos sugieren fuertemente la naturaleza autóctona de esta levadura para el sur argentino, situación que no pudo hasta el momento confirmarse para otro lugar del planeta. Además, se relevaron las propiedades fermentativas de la mayoría de los grupos genéticos encontrados, pudiendo seleccionar las cepas más interesantes para transferir a la industria [16, 17, 18].

IV. Alimentos fermentados con *S. eubayanus*: el desafío de la vinculación público-privada

A pesar de la prevalencia de *S. cerevisiae* en la producción de alimentos, el uso de especies no sacaromicéticas está siendo considerada como una forma de mejorar los sabores, aromas y funcionalidad de una gran cantidad de alimentos, incluyendo cervezas, pan, vinos y sidra.

Luego del descubrimiento de la levadura *S. eubayanus*, la madre de la levadura con la que se fabrica el 95% de la cerveza a nivel mundial, la gran pregunta era si se podía hacer cerveza con esta levadura patagónica. La experiencia del CRELTEC como laboratorio de ciencia y tecnología cervecera no era suficiente como para poder evaluar el valor tecnológico de *S. eubayanus* y por lo tanto estaba en una posición débil para su negociación frente al fuerte interés por parte de los productores de todo el mundo. Ante el riesgo de que otros se apropien de un recurso biológico argentino, ya que el descubrimiento estaba publicado, se decidió iniciar un camino de investigación enfocado en entender si esta levadura servía para hacer cerveza, qué características podía tener ésta, y si era factible utilizarla industrialmente como un nuevo insumo que agregara valor y diferenciación productiva. Bajo el asesoramiento de expertos locales como el Dr. Pablo Tognetti, se realizó el primer batch de cerveza elaborada con *S. eubayanus* a nivel mundial en un garaje de la ciudad de Bariloche. El resultado fue una cerveza fresca y de complejidad liviana (tipo *lager*), de final algo dulce y donde predominaban notas especiadas, en particular clavo de olor. Este primer ensayo generó el entusiasmo necesario para seguir estudiando la levadura a escala laboratorio, lo que rápidamente evidenció que *S. eubayanus* no era una levadura "fácil", algo comprensible por su condición de salvaje. Los ensayos comparativos con levaduras *lager* en mosto cervecero mostraron algunas limitaciones como el no consumo de maltotriosa (el segundo azúcar fermentable más importante del mosto cervecero), una menor producción de alcohol, baja floculación (dando origen a cervezas turbias) y producción de fenoles (aroma y sabor a clavo de olor) que en las cervezas Lager son considerados defectos. Quedó en evidencia entonces la necesidad de realizar adaptaciones al proceso o a la levadura. Así se inició un proceso de domesticación acelerada conocida técnicamente como Evolución Experimental Dirigida en donde

luego de dos años de trabajo se obtuvo una variante con características mejoradas que mostró una fermentación más rápida, mayor consumo de azúcares y confiabilidad en las fermentaciones [16].

Al mismo tiempo se inició un proceso de fuerte acercamiento al sector cervecero, que en el 2012 en Bariloche mostraba un auge atípico para nuestro país. Rápidamente fue evidente que él éxito de la vinculación dependía de poder hablar un idioma común entre la parte científica y la productiva, pues esta segunda tenía serias limitaciones y deficiencias en los aspectos microbiológicos y bioquímicos del proceso productivo y no contaba con estrategias de control de calidad. Así fue como se inició un intenso proceso de aprendizaje por parte de los referentes del laboratorio de microbiología en aspectos de elaboración, análisis sensorial, estilos cerveceros, lo que sirvió para construir las bases de la vinculación futura. En simultáneo se fueron desplegando y poniendo a disposición servicios de control de calidad de producto y materias primas que no existían por entonces. También se incorporaron nuevos recursos humanos al laboratorio formados en áreas como biotecnología y tecnología de los alimentos, se incorporó equipamiento acorde a la temática, se iniciaron proyectos de investigación y desarrollo en el tema, muchos con participación de empresas, y se iniciaron capacitaciones concebidas para cerveceros de distintas escalas productivas dando origen al programa itinerante Ciencia y Cerveza. En paralelo y con el acompañamiento del área de vinculación de CONICET se encaraba la inimaginada odisea de la transferencia de un recurso biológico argentino al sector productivo, algo de lo que no había antecedentes. En el año 2015 el CONICET, la Universidad Nacional del Comahue y Administración de Parques Nacionales finalmente sustanciaron una licencia sin precedentes en donde la empresa Heineken, segunda productora mundial de cerveza, accedió a la madre de la levadura Lager para elaborar la cerveza Wild Lager H41 de edición limitada que se fabrica en Holanda y se comercializa en diversos pases de Europa, Asia y América, incluida Argentina. La licencia es exclusiva a nivel industrial permitiendo el uso de la levadura a productores artesanales argentinos. Al mismo tiempo se desarrolló un proyecto de I+D conjunto entre IPATEC y Heineken financiado por la empresa holandesa buscando generar nuevas variedades híbridas. Esto fue una licencia sin precedentes para Argentina, así como para Heineken, quien no había innovado su receta de bandera durante 140 años, para hacerlo finalmente con una levadura argentina.

En el año 2018 fue posible generar las primeras licencias con las cervecerías artesanales argentinas, 11 de Bariloche y el Bolsón, dado que se dio prioridad a las cervecerías asociadas a la Asociación de Cervecerías Artesanales de Bariloche y Zona Andina (ACAB) por un período de 2 años. Así se generó el proyecto Cervezas Patagonia Salvaje con las cuales se identifican las cervezas elaboradas con *S. eubayanus* (rebautizada como EUBY®). Las cervezas del proyecto tienen la particularidad de contar con ingredientes únicos y locales como el agua de deshielo ideal para la elaboración, el lúpulo patagónico y la famosa EUBY®, faltando solo la cebada local para lograr productos 100% regionales. En el año 2019 gracias a una iniciativa del INTA y

otros actores privados se presentó conjuntamente la primera cerveza 100% rionegrina incorporando cebada cultivada en el Bolsón y malteada localmente, demostrando que es posible generar productos 100% locales. Luego, con la cervecería Manush se ideó una cerveza especial con buenas capacidades de hidratación y recuperación para deportistas extremos, que se presentó en la competencia Ironman, empleando a EUBY® que naturalmente queda en suspensión, siendo una fuente importante de proteínas y vitaminas del complejo B. También produce fenoles que poseen actividad antioxidante y deja azúcares residuales que brindan calorías extra. Su contenido alcohólico fue a propósito bajo, de sólo el 3%, y se agregó un plus de minerales de Ca, Mg y Zn, así como coriandro por su frescura y actividad antiinflamatoria. La cerveza fue denominada Sauvage y se produjeron 1000 litros de los cuales se consumieron 700 solamente por los competidores del IronMan 2018 de Bariloche.

En cuanto al uso de EUBY® en panificados, pruebas preliminares llevadas a cabo en el CRELTEC evidenciaron una buena velocidad de fermentación, especialmente a temperaturas de entre 4 y 15 °C, sabor afrutado y aroma pronunciado, y una buena conservación de masas en frío. Esta última característica es particularmente interesante, debido a que el almacenamiento de masas congeladas es una práctica común en las panaderías, por lo que este proceso requiere de cepas tolerantes al frío que conserven su capacidad fermentativa luego de ser congeladas.

Actualmente se está llevando a cabo un proyecto para estudiar con rigor científico el uso y características de EUBY® en panificados, en donde se evaluará la domesticación de la levadura para su uso en panificación y se establecerán las condiciones de producción de la levadura, su implementación y transferencia al sector productivo. Dicho proyecto se llama PFIP-ESPRO: "Desarrollo y transferencia de levaduras nativas para diferenciación productiva y agregado de valor en la gastronomía patagónica". El desarrollo de una levadura patagónica apta para panificación con propiedades organolépticas diferenciales y un desempeño productivo mejorado será una innovación sin precedentes para la región y el país.

El interés creciente en productos tradicionales, artesanales y regionales, así como la demanda de productos con perfiles de aromas distintivos, evidencia un renovado interés en el potencial del uso de microorganismos nativos no convencionales para elaborar alimentos fermentados con agregado de valor y diferenciación productiva. Esto pone en valor los recursos biológicos nativos y su explotación para fomentar la sinergia entre el sector científico y productivo.

V. Declaración de posibles conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

VI. Bibliografía citada

[1] Gonçalves, M., Pontes, A., Almeida P., Barbosa R., Giza M., Libkind D., Hutzler M., Gonçalves P., Sampaio, J.P. 2016. Distinct domestication trajectories in top-fermenting beer yeasts and wine yeasts. *Current Biology*. 26(20):2750–2761. 10.1016/j.cub.2016.08.040.

[2] Gallone B, Steensels J, Mertens S, Dzialo MC, Gordon JL, Wauters R, Theßeling FA, Bellinazzo F, Saels V, Herrera-Malaver B, Prahl T, White C, Hutzler M, Meußdoerffer F, Malcorps P, Souffriau B, Daenen L, Baele G, Maere S, Verstrepen KJ. 2019. Interspecific hybridization facilitates niche adaptation in beer yeast. Nat Ecol Evol. 2019 Nov;3(11):1562-1575. doi: 10.1038/s41559-019-0997-9

[3] Libkind, D.; Hittinger, C.T.; Valério, E.; Gonçalves, C.; Dover, J.; Johnston, M.; Gonçalves, P.; Sampaio, J.P. 2011. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (PNAS). 35(108): 14539-14544.

[4] Gallone B, Mertens S, Gordon JL, Maere S, Verstrepen KJ, Steensels J. Origins, evolution, domestication and diversity of Saccharomyces beer yeasts. Curr Opin Biotechnol. 2018 Feb;49:148-155. doi: 10.1016/j.copbio.2017.08.005.

[5] Carbonetto B, Ramsayer J, Nidelet T, Legrand J, Sicard D. Bakery yeasts, a new model for studies in ecology and evolution. Yeast. 2018 Nov;35(11):591-603. doi: 10.1002/yea.3350.

[6] Sampaio, J.P.; Pontes, A.; Libkind, D.; Huztler, M. 2017. Taxonomy, Diversity, and Typing of Brewing Yeasts. Bamforth & Bokulich (Eds.) En: Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology. Caister Academic Press, U.K. 978-1-910190-61-6. Pp. 85-118.

[7] Langdon, Q.; D. Peris, E.P. Baker, D.A. Opulente, Huu-Vang Nguyen, U. Bond, P. Gonçalves, J. P. Sampaio, D. Libkind, C.T. Hittinger. 2019. Fermentation innovation through complex hybridization of wild and domesticated yeasts. Nature Ecology & Evolution 3, pp.1576–1586. doi:10.1038/s41559-019-0998-8.

[8] Loviso, C.; Libkind, D. 2018. Síntesis y regulación de compuestos de aroma y sabor derivados de la levadura en la cerveza: ésteres. *Rev Argent Microbiol*. 50(4):436-446. doi: 10.1016/j.ram.2017.11.006.

[9] Loviso, C.; Libkind, D. 2019. Síntesis y regulación de compuestos de aroma y sabor derivados de la levadura en la cerveza: alcoholes superiores. *Revista Argentina de Microbiología* 51(4):386-39. https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.08.006.

[10] Heitmann M, Zannini E, Arendt E. Impact of Saccharomyces cerevisiae metabolites produced during fermentation on bread quality parameters: A review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2018 May 3;58(7):1152-1164. doi: 10.1080/10408398.2016.1244153

[11] Luc De Vuyst, Henning Harth, Simon Van Kerrebroeck, Frédéric Leroy. Yeast diversity of

sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. International Journal of Food Microbiology. 2016. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.018

[12] Aslankoohi E, Herrera-Malaver B, Rezaei MN, Steensels J, Courtin CM, Verstrepen KJ. Non-Conventional Yeast Strains Increase the Aroma Complexity of Bread. PLoS One. 2016 Oct 24;11(10):e0165126. doi: 10.1371/journal.pone.0165126. eCollection 2016

[13] Perez-Torrado, Querol. Opportunistic Strains of *Saccharomyces cerevisiae*: A Potential Risk Sold in Food Products. Front Microbiol. 2015; 6: 1522. doi: 10.3389/fmicb.2015.01522.

[14] Gibson, B.; Geertman, J-M; Hittinger, C.; Krogerus, K.; Libkind, D.; Louis, E.; Magalhães, F.; Sampaio, JP. 2017. New yeasts - new brews: modern approaches to brewing yeast design and development. *FEMS Yeast Research*, 17(4): DOI:doi.org/10.1093/femsyr/fox038.

[15] Nakao Y, Kanamori T, Itoh T, Kodama Y, Rainieri S, Nakamura N, Shimonaga T, Hattori M, Ashikari T. Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. DNA Res. 2009 Apr;16(2):115-29. doi: 10.1093/dnares/dsp003.

[16] Eizaguirre J.I., Peris, D.; Rodríguez, ME,; Lopes, C.; de Los Ríos, P.; Hittinger, CT; Libkind, D. 2018. Phylogeography of the wild Lager-brewing ancestor (*Saccharomyces eubayanus*) in Patagonia. *Environ Microbiol*. 20(10):3732-3743 doi: 10.1111/1462-2920.14375.

[17] Peris D, Langdon Q, Moriarty RV, Sylvester K, Bontrager M, Charron G, Leducq J-B, Landry CR, Libkind D, Hittinger CT. 2016. Complex origins of lager-brewing hybrids were shaped by standing variation in the wild yeast *Saccharomyces eubayanus*. Plos Genetics. 12(7):e1006155.

[18] Baker, E. Wang, B., Bellora, N., Peris, D.; Hulfachor, A.; Koshalek, Adams, M.; Libkind, D. Hittinger, CH. 2015. The genome sequence of *Saccharomyces eubayanus* and the domestication of lager-brewing yeasts. *Molecular Biology and Evolution*. 32(11):2818–2831.

12

El Papel de los Alimentos Fermentados en la Alimentación

Carlos Gómez-Gallego
carlosgo@uef.fi

- *Universidad de Finlandia Oriental, Kuopio, Finlandia.*

Miguel Gueimonde

- *Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Villaviciosa, España.*

Anna Kårlund

- *Universidad de Finlandia Oriental, Kuopio, Finlandia.*

Seppo Salminen

- *Universidad de Turku, Turku, Finlandia.*

Resumen

Los alimentos y bebidas fermentados están entre los primeros alimentos producidos y consumidos por los seres humanos, formando parte importante de la cultura y gastronomía de prácticamente todas las poblaciones alrededor del mundo. El proceso de fermentación ha sido importante desde un punto de vista histórico ya que incrementa la seguridad y el tiempo de conservación de los alimentos junto con cambios deseables en sus propiedades organolépticas. Pero, además, al día de hoy sabemos que la fermentación modifica o incrementa las propiedades nutritivas de los alimentos y produce compuestos funcionales capaces de mejorar el estado de salud. Durante la fermentación, los microorganismos responsables del proceso compiten e impiden el crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos, sintetizan vitaminas y aumentan la biodisponibilidad de los minerales presentes en la materia prima de origen, producen péptidos biológicamente activos y eliminan antinutrientes. Muchos de los alimentos fermentados contienen microorganismos vivos que pueden contribuir a mejorar la salud de los consumidores de una manera similar a los alimentos probióticos. Entre los microorganismos más estudiados y utilizados en la elaboración

de alimentos y bebidas fermentadas se encuentran las bacterias del ácido láctico, como las de los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus,* aunque otros microorganismos –como las levaduras y los hongos– también son importantes. Prácticamente todos los tipos de alimentos que contienen hidratos de carbono y proteínas son susceptibles de ser fermentados, pero destacan los obtenidos a partir de la fermentación de la leche, los cereales y las legumbres. Más allá de sus beneficios nutricionales y sobre la salud, la promoción del consumo de alimentos fermentados podría tener un papel social, ayudando al desarrollo de comunidades más desfavorecidas como han demostrado los programas "Yogurito Escolar" y "*Yoba for Life*".

I. Introducción

Se cree que los alimentos fermentados han sido parte de la dieta del ser humano desde la aparición de nuestra especie en la tierra [1], lo que explica por qué los alimentos fermentados han sido parte central de prácticamente todas las culturas y gastronomías conocidas en alguna de sus formas (pensemos en el papel del vino, la cerveza o el pan). La presencia de alimentos fermentados, como parte de nuestra alimentación desde los inicios de nuestra especie, supone que tanto nuestro sistema digestivo como nuestras funciones biológicas han evolucionado para adaptarse a este tipo de alimentos, lo que ayudaría a explicar la asociación entre el consumo regular de alimentos fermentados en la dieta y un mejor estado de salud [2].

Los alimentos fermentados son aquellos alimentos o bebidas producidos mediante un proceso de transformación microbiana que da lugar a cambios fisicoquímicos en su composición. Las bacterias ácido lácticas (BAL) son los microorganismos más utilizados en la producción de alimentos y bebidas, pero existen muchos más, incluyendo hongos y levaduras.

Las evidencias en humanos aún son escasas, pero estudios recientes parecen asociar el consumo de alimentos fermentados, de manera similar a lo que ocurre con el consumo de alimentos probióticos, con cambios beneficiosos en la microbiota intestinal, el mantenimiento de determinadas funciones fisiológicas y, en general, con un mayor bienestar. Aunque los alimentos fermentados y los probióticos pueden estar estrechamente relacionados, ya que muchos de los organismos presentes en alimentos fermentados están filogenéticamente relacionados con las cepas microbianas que se utilizan como probióticos [2], y el consumo de ambos está asociado con un efecto positivo en la salud, no son lo mismo. La principal diferencia es que los probióticos, por definición, son "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio sobre la salud del consumidor" [3], y tanto la dosis como el tipo de microorganismo específico que se debe consumir para obtener ese efecto beneficioso debe estar perfectamente definida. Sin embargo, en un alimento fermentado, la comunidad microbiana total no está claramente definida y está formada por una o varias especies dominantes acompañadas de otras especies que pueden variar, y que además no tienen por qué estar vivas en el momento en el que se consume el alimento fermentado. A su vez, los alimentos fermentados no tienen por qué tener asociado un beneficio específico sobre la salud, mientras que un probiótico, por definición, sí debe tenerlo. En los alimentos fermentados, lo que sí está claramente definido es el tipo de transformación microbiana que se produce y los cambios que se dan en la matriz alimentaria. Llama la atención, la existencia de estudios que indican que la eficacia de los probióticos parece aumentar cuando se consumen junto con alimentos fermentados, como por ejemplo en forma de yogures o leches fermentadas con probióticos [4].

En este capítulo se presentan evidencias científicas sobre el papel beneficioso que los alimentos fermentados pueden tener sobre la salud y el bienestar, lo que hace que sea interesante y recomendable que formen parte de la dieta habitual.

II. La fermentación de los alimentos: cultura, gastronomía y ciencia

Existen alimentos fermentados en todas las culturas que varían en función de la materia prima de origen y del tipo de fermentación (ver Figura 1), y que van desde el *mikyuk o muktuk*, que es como denominan los Inuit a la piel y grasa de ballena fermentada, a las bebidas a base de flores fermentadas que elaboran los aborígenes australianos. Muchos de estos alimentos fermentados todavía son producidos en las propias casas y consumidos de forma local [5].

Figura 1. Alimentos fermentados alrededor del mundo.

El superíndice indica el tipo de materia prima de origen: (1) cereales y semillas; (2) leche; (3) legumbres; (4) frutas, verduras, tubérculos y otros vegetales; (5) carne; (6) pescado y marisco.

Las dietas tradicionales como la dieta mediterránea o la cocina tradicional de los países asiáticos, incluyen gran cantidad y variedad de alimentos fermentados. La industrialización de la producción de alimentos durante el siglo pasado redujo la diversidad de los alimentos fermentados consumidos, principalmente, en los países desarrollados [2], reduciéndose su presencia en la dieta habitual de las diferentes poblaciones, conforme estas se alejaban de sus dietas tradicionales. Sin embargo, en los últimos años, el desarrollo de alimentos funcionales es una de las principales tendencias en alimentación que, a su vez, ha incrementado el interés sobre los alimentos fermentados por su potencial efecto beneficioso sobre la salud [6], aumentando al mismo tiempo la popularidad de alimentos fermentados con probióticos adicionados como la kombucha, el yogur o el kefir.

Teniendo en cuenta el mercado actual de alimentos, el yogur y los lácteos fermentados posiblemente son los productos fermentados más populares entre los consumidores, pero los cereales, vegetales, legumbres y frutas fermentadas se están abriendo camino en los lineales de los supermercados [6]. Aunque los productos

cárnicos, los derivados de pescado y las frutas y verduras fermentadas son consumidos tradicionalmente y son muy interesantes desde un punto de vista nutricional, los productos lácteos, cereales y legumbres fermentadas son los que están teniendo una mayor presencia y crecimiento en los mercados junto con la kombucha y el kimchi, con un crecimiento previsto del 30% en los próximos 5 años según un informe de Lantern. Una de las razones de este resurgimiento es su potencial papel como promotores de la salud, papel que se conoce bien desde principios del siglo pasado cuando el Dr. Elie Metchnikoff, que recibió el premio Nobel por sus estudios sobre el papel de la fagocitosis en la inmunidad, señaló una posible asociación entre mayor consumo de yogur y una mayor longevidad en ciertas comunidades de Bulgaria [5].

El tipo de fermentación puede ser clasificada en función del tipo de metabolito principal que se produce y de los principales microorganismos implicados:

- Fermentación alcohólica: alcohol y dióxido de carbono (levaduras).
- Fermentación acética: ácido acético (bacterias del género *Acetobacter*).
- Fermentación láctica: ácido láctico (BAL).
- Fermentación propiónica: ácido propiónico (bacterias del género *Propinibacterium*).
- Fermentación butírica: ácido butírico (bacterias del género *Clostridium*)
- Fermentación proteica o amoniacal: amoníaco y ácidos grasos (bacterias del género *Bacillus* y hongos).

Así, la combinación de diferentes materias primas de partida y de diferentes microorganismos es responsable de la existencia de los más de 3500 alimentos fermentados distintos que se pueden encontrar alrededor del mundo [7].

Aunque el proceso de fermentación está dirigido por unos pocos microorganismos dominantes, durante la fermentación se dan complejos cambios dinámicos que afectan de manera distinta a las a diferentes cepas y poblaciones microbianas minoritarias, y van a producir las variaciones en la composición y en las propiedades organolépticas que se observan en los diferentes productos fermentados. Esto, además, se ve influenciado por otros parámetros como el tiempo y la temperatura de fermentación. Por dichos motivos, en fermentaciones tradicionales y menos controladas hay mucha variación en cuanto a calidad, propiedades nutricionales, sabor y textura. A el contexto industrial, este proceso es –en general– cuidadosamente controlado, seleccionándose los microorganismos que van a dar lugar a la fermentación, y poniendo atención a la estabilidad espacial y temporal del proceso con el fin de producir alimentos de alta calidad y con una calidad homogénea entre los distintos lotes de producción [2].

La fermentación de alimentos confiere ciertas ventajas: 1) facilita la conservación de alimentos debido a los cambios que se producen en el pH y a la presencia de compuestos antimicrobianos, como ácidos orgánicos, alcohol o bacteriocinas; 2) produce cambios en el sabor y la textura, mejorando las propiedades organolépticas y haciéndolos más apreciados por los consumidores; 3) confiere beneficios nutricionales que dependen del tipo de fermentación y de la matriz alimentaria, entre los que destacan los cambios en la disponibilidad de nutrientes y la eliminación de compuestos tóxicos y antinutrientes. La combinación de todos estos efectos hace que los alimentos fermentados sean muy interesantes a tanto desde una perspectiva gastronómica como nutricional.

III. Beneficios nutricionales de los alimentos fermentados

La fermentación de los alimentos produce cambios en la composición, tanto de los macronutrientes como de los micronutrientes. Por ejemplo, muchas BAL muestran capacidad amilolítica durante el proceso de fermentación, contribuyendo a la hidrólisis del almidón e incrementando su digestibilidad y la disponibilidad energética del alimento [8]. Por el contrario, existen otros microorganismos que disminuyen la biodisponibilidad del almidón, produciendo almidón resistente.

La fermentación es capaz de producir también un incremento en la digestibilidad de la proteína y del contenido de aminoácidos libres, que serán más fácil de absorber durante la digestión, lo que es muy interesante desde el punto de vista nutricional [9–11]. Esto parece ser un efecto general presente en la mayoría de BAL, ya que se ha confirmado en diferentes cepas bacterianas y matrices alimentarias como en el caso de elaboraciones a base de quinoa fermentada y masas madre de harinas germinadas [12, 13]. Es importante tener en cuenta que, aunque la fermentación parece incrementar de manera general la biodisponibilidad de proteínas, al mismo tiempo, ciertas cepas bacterianas podrían utilizar y reducir la cantidad de algunos aminoácidos esenciales, reduciendo el valor nutricional de ese alimento [14]. Así, desde el punto de vista de la producción de alimentos, si el objetivo es mejorar la digestibilidad y la biodisponibilidad del almidón o de las proteínas presentes, es importante seleccionar cuidadosamente los microorganismos que se van a utilizar en ese proceso de fermentación de manera que se obtenga un producto con el perfil nutricional deseado.

La fermentación puede producir también nuevos compuestos con valor nutricional o con un efecto positivo sobre la salud, como por ejemplo lactato, vitaminas del grupo B, aminoácidos esenciales y compuestos derivados, péptidos bioactivos, polisacaridos, isoflavonas más biodisponibles, ácido γ-aminobutírico y compuestos antioxidantes, entre otros [2, 15]. En el *tempeh*, que es producido por la fermentación de los granos de soja y originario de Indonesia, aumenta el contenido de vitaminas tales como ácido fólico, niacina, riboflavina, nicotinamida y piridoxina, que son producidas por el hongo *Rhizopus oligosporus*, al mismo tiempo que cepas no

patógenicas de las especies *Klebsiella pneumoniae* y *Citrobacter freundii* incrementan el contenido de vitamina B12 [10]. En el *idli*, un producto a base de lentejas y arroz fermentados típico de India, el contenido en riboflavina y metionina incrementa durante la fermentación [16]. En el *pulque,* una bebida producida en México a partir del agave, la fermentación aumenta la cantidad y la biodisponibilidad de micronutrientes como vitaminas del grupo B, vitamina C, lisina, triptófano y hierro [10]. En el *kimchi*, alimento tradicional fermentado coreano, se ha demostrado que la presencia de bacterias como *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus sakei* producen e incrementan los niveles de riboflavina y ácido fólico [17]. En muchos alimentos fermentados, la presencia de bacterias del género *Bacillus* aumentan los niveles de riboflavina y niacina [10] mientras que levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis, Aureobasidium* sp., y *Pichia manschuria* son capaces de producir vitamina B12 dependiendo de la materia prima y las condiciones de fermentación [18].

Pero la fermentación no solo condiciona la biodisponibilidad de macronutrientes y aumenta la presencia de micronutrientes, sino que además también reduce la presencia de antinutrientes. En muchos alimentos de origen vegetal, por ejemplo aquellos derivados del mijo, sorgo, maíz y otros cereales, es común la presencia de cantidades significativas de fitatos y otros antinutrientes que reducen la absorción de minerales como el calcio, fosforo, zinc, hierro, cobre y manganeso. La fermentación de estos alimentos con bacterias lácticas, muchas de las cuales presentan actividad fitasa, reduce la cantidad de fitatos y aumenta la absorción de minerales.

En el mercado podemos encontrar alimentos fermentados que contienen organismos vivos con otros que no, bien porque los propios microorganismos producen compuestos y metabolitos antimicrobianos o porque se realiza un tratamiento que los elimina. En aquellos productos fermentados que contienen microorganismos vivos, como el chucrut, el kimchi, el kefir, las salchichas y embutidos fermentados, el yogur, los quesos, la kombucha o el miso, suelen aparecer entre 10^6 y 10^9 células viables por g o ml, dependiendo del tipo de producto y del proceso de fermentación. En consumidores habituales de alimentos fermentados, se ha estimado que la cantidad de microorganismos ingeridos diariamente oscila entre las 10^8 y 10^{12} microorganismos viables al día [5]. Una cantidad relativamente alta de estas bacterias podría sobrevivir al tránsito a través del tracto digestivo, modulando y complementando de manera beneficiosa a la microbiota residente. Por ejemplo, esas bacterias en tránsito podrían ayudar a la microbiota residente estimulando la fermentación de carbohidratos y compitiendo con microorganismos patógenos por nutrientes y sitios de unión a la mucosa [19].

Antiguamente, el consumo de alimentos y bebidas fermentadas como parte de la alimentación tradicional constituía un tercio de la dieta humana. Esto contrasta con los alimentos altamente procesados e higienizados que se consumen hoy en día en los países desarrollados, que limita la exposición a microorganismos a través de la dieta [20]. La hipótesis de la higiene propone que la falta de exposición a determinados microorganismos en ambientes extremadamente limpios provoca alteraciones en la

función inmune y del sistema nervioso [21, 22] lo que podría estar detrás del incremento de determinadas enfermedades en poblaciones urbanas, como por ejemplo alergias y otras enfermedades autoinmunes. En estas poblaciones, el consumo de alimentos fermentados producidos de manera segura puede utilizarse para contrarrestar y equilibrar el efecto del ambiente limpio y desinfectado, incorporando a la dieta microorganismos que pueden ejercer un efecto positivos en la salud. Por ejemplo, un consumidor medio en un país desarrollado ingiere aproximadamente del orden de 10^6 microorganismos viables al día [23], mucho menos de los 10^9 que se ingieren de media cuando se siguen dietas tradicionales ricas en alimentos fermentados como la dieta mediterránea. La ingesta de microorganismos en dietas occidentales puede incrementarse 100 veces simplemente con el consumo de una porción de yogur [23, 24].

III.A. Leches fermentadas y productos lácteos fermentados

Aunque el yogur y el queso son los productos lácteos fermentados más populares alrededor del mundo, existen muchos tipos diferentes de productos lácteos dependiendo del origen de la leche y del tipo de fermentación dominante [25]. Si la fermentación dominante es láctica, podemos encontrar productos como el yogur y el queso, pero también el *tarag,* que es un producto tradicional de Mongolia parecido al yogur, o el *kule naoto* y el *mursik* que son leches fermentadas producidas tradicionalmente en Kenia por las comunidades Masái y Kalenjin respectivamente. Podemos encontrar también productos lácteos obtenidos por la combinación de una fermentación láctica y una fermentación por levaduras simultáneamente. De este tipo, son productos como el kéfir, el *kumys* que es un producto tradicionalmente elaborado con leche de yegua tradicional en el Asia Central, el *suusac* que es elaborado con leche de camella en Kenia, el *kurut* que es un tipo de yogur agrio utilizado en la comida persa y turca, o el *leban* que una especie de queso de yogur muy típico de la cocina de Oriente Medio. En la gastronomía tradicional finlandesa, podemos encontrar el *viili*, un producto que se obtiene por la combinación de una fermentación láctica en el interior junto con una fermentación en superficie por el moho *Geotrichum candidum* (que es importante también para la elaboración de algunos tipos de queso). Diferencias en la materia prima de origen y en el tipo de fermentación, van a afectar no solo a las propiedades organolépticas, sino también a las propiedades nutricionales del producto final.

Muchos estudios asocian el consumo de productos lácteos con ciertos beneficios nutricionales. Por ejemplo, se ha visto que el consumo regular de yogur se asocia con una reducción del riesgo de sufrir diabetes tipo 2 en adultos y población anciana [26, 27], el kefir podría ayudar a mejorar la densidad ósea en pacientes con osteoporosis [28], y en general, las leches fermentadas podrían ayudar a reducir el dolor muscular después de la actividad física intensa, y parecen ayudar a mejorar el tránsito intestinal y reducen el riesgo de infección en personas mayores [29, 30].

En productos lácteos fermentados, las proteínas de la leche son parcialmente

degradadas por la acción de enzimas proteolíticas, lo que facilita su digestión y asimilación [31]. Además, se ha visto que este proceso, en general, no afecta a la concentración total de proteínas y aminoácidos siendo similares a los de la leche de origen [32]. Además, muchos péptidos liberados durante el proceso de fermentación han sido identificados en yogur, leche agria, kéfir, *dahi* (un tipo de producto parecido al yogur y tradicional en las cocinas de Bangladesh, India, Nepal, Pakistan y Sri Lanka) y en otros productos lácteos fermentados. Estos péptidos pueden tener un amplio espectro de actividades, habiéndose identificado péptidos con actividad antimicrobiana, antioxidante, antihipertensiva, antitrombótica e inmunomoduladora entre otras [33].

De entre todos los beneficios de la fermentación de los productos lácteos, destaca la reducción de la lactosa, que es consumida por los microorganismos durante el proceso fermentativo haciendo productos como el queso o el yogur más fáciles de digerir que la leche en personas con intolerancia a este disacárido. El caso del yogur es particularmente interesante ya que cuando se comparan cantidades similares de lactosa en el yogur o en la leche se observa que el yogur, que contiene bacterias vivas, es mejor tolerado por las personas con intolerancia a la lactosa ya que las bacterias del yogur poseen enzimas con actividad lactasa que van a facilitar la digestión de esa lactosa durante el tránsito por el intestino [34].

La fermentación, en general no afecta al contenido en minerales de los productos lácteos, aunque algunos estudios sugieren que la fermentación podría incrementar la biodisponibilidad y absorción de los minerales. Por ejemplo, varios estudios en adultos sanos, adultos intolerantes a la lactosa y en mujeres postmenopáusicas han demostrado que el yogur es capaz de incrementar la absorción del calcio, la salud ósea y disminuir el riesgo de fractura de cadera [35–37]. Resultados similares se han observado en el consumo de kefir en pacientes de osteoporosis [28], y en estudios *in vitro*, el uso de bacterias probióticas durante la producción de queso incrementa la biodisponibilidad del calcio, fósforo y magnesio [37].

La fermentación de los productos lácteos también incrementa el contenido en vitaminas del grupo B ya que muchas bacterias ácido-lácticas son capaces de producir estas vitaminas. El tipo de vitaminas y la cantidad va a depender de las cepas que se utilicen para la fermentación. Distintas cepas de *Streptococcus thermophilus* y muchas bifidobacterias son capaces de producir ácido fólico, mientras que diferentes cepas utilizadas en la elaboración de yogur son capaces de producir tiamina y riboflavina [38, 39].

III.B. Cereales fermentados

Numerosos tipos de bebidas a base de cereales fermentados son consumidos alrededor del mundo, especialmente en las regiones tropicales y en África [40]. Normalmente estos productos son elaborados utilizando la microbiota natural presente en los cereales (muy típico en productos fermentados a partir de avena y centeno) o a través del método conocido como *'back slopping',* donde una parte del producto fermentado se utiliza para iniciar la fermentación siguiente, para facilitar

y acelerar el proceso. El problema de este tipo de fermentaciones espontáneas o utilizando un procedimiento denominado *"back slopping"* es que las poblaciones microbianas que conducen el proceso no están claramente identificadas y pueden cambiar con el tiempo. Entre este tipo de fermentaciones encontramos la elaboración del pan con masa madre o el *kvas,* que es una bebida fermentada a partir del centeno con levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y bacterias lácticas *(Lactobacillus casei, Leuconostoc mesenteroides*), tradicionalmente consumida en Rusia, Ucrania y otros países del este de Europa y con un ligero contenido alcohólico. La *boza*, es una bebida no alcohólica o con muy bajo contenido alcohólico que se consume principalmente en Turquía, los Balcanes y en el norte de África, a partir de la fermentación del trigo, pero también otros tipos distintos de cereales como mijo, cebada, avena, centeno, maíz o arroz [40] usando como fuente de microorganismos para iniciar la fermentación masas madre de panadería, yogur o una porción guardada de una producción anterior de *boza*.

En contraposición a estas fermentaciones tradicionales, en los últimos años han proliferado muchas bebidas y productos tipo yogur a base de cereales fermentados, y donde a nivel industrial se controla perfectamente el proceso y el tipo de bacterias utilizadas. De entre estos productos, destacan en el mercado los elaborados a partir de avena fermentada con diferentes tipos de bacterias lácticas y con probióticos adicionados.

Los beneficios de la fermentación de cereales incluyen el incremento en la digestibilidad de las proteínas [41–43] y la reducción de los niveles de ácido fítico e inhibidores de proteasas [43, 44].

Hay estudios que sugieren que el consumo de bebidas a base de cereales fermentados podría ayudar a mitigar los síntomas asociados enfermedades como el síndrome del intestino irritable, diarrea, estreñimiento e incluso flatulencias, ya que la fermentación reduce el contenido en oligosacáridos productores de gas [43, 45]. La elaboración de productos de panadería a partir de masas madre, también se asocia a mejoras en la sintomatología del síndrome del intestino irritable y de la intolerancia al gluten [43].

III.C. Legumbres fermentadas

A día de hoy, conviven en el mercado productos tradicionales a base de legumbres fermentadas, como por ejemplo el *tempeh,* junto con otros derivados de soja fermentada de reciente aparición como los postres tipo yogur. Los microorganismos que más comúnmente se utilizan y aparecen en los productos a base de legumbres fermentadas son *L. acidophlus*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. sakei* y *S. thermophilus*, junto con otras bacterias de los géneros *Bifidobacterium* y *Pediococcus* siendo *L. plantarum* el más frecuente de entre todos ellos. En el caso del *tempeh* y productos similares, los hongos del género *Rhizopus* son los que más se han utilizado tradicionalmente.

Uno de los beneficios nutricionales más destacados que se producen con la

fermentación de las legumbres es un aumento de la digestibilidad de proteínas, aunque esta depende mucho tanto de las condiciones de fermentación como del tipo de legumbre [46]. Además, durante la fermentación se reduce el contenido de ácido fítico, lo que aumenta la biodisponibilidad de los minerales. Estudios con diferentes cepas de BAL (*L. acidophilus* B4496, *L. bulgaricus* CFR2028, *L. casei* B1922, *L. plantarum* B4495, and *L. fermentum* B4655) parecen indicar que se produce un aumento en la biodisponibilidad del calcio y del magnesio durante la fermentación.

Además, la fermentación parece producir un mayor confort digestivo durante la digestión de las legumbres. La fermentación intestinal durante la digestión de oligosacáridos presentes en las legumbres, como la rafinosa, estaquiosa o la verbascosa está asociado a gran producción de gas, malestar durante la digestión y flatulencias. En el *tempeh* tanto la fermentación espontánea (no controlada) como la controlada con *Rhizopus* y *L. plantarum* reducen significativamente la cantidad de esos oligosacáridos [47, 48]. Esto hace que los productos fermentados a base de legumbres sean una buena alternativa dietética en aquellas personas que tienen problemas durante la digestión de legumbres sin fermentar.

IV. Alimentos fermentados más allá de sus beneficios nutricionales

Con la excepción del yogur, los alimentos fermentados no están específicamente incluidos en las guías alimentarias a pesar de sus propiedades nutricionales y de los efectos beneficiosos sobre la salud [49]. Una excepción a esta generalidad son las guías alimentarias de la India, donde se recomienda explícitamente un mayor consumo de alimentos fermentados. Recientemente, están aumentado las voces que sugieren que los alimentos fermentados deberían incluirse específicamente como parte de las recomendaciones nutricionales [50], con un especial énfasis en el yogur [24] y en aquellos productos que sean propios de la dieta tradicional de cada país o comunidad.

Pero más allá de su papel dietético o nutricional, la promoción de alimentos fermentados y la recuperación de alimentos fermentados tradicionales puede tener un papel social, promoviendo el desarrollo de comunidades desfavorecidas. Como ejemplos, pueden mencionarse los programas "Yogurito Escolar" en Argentina, y "*Yoba for Life*" en África.

El caso de "Yogurito Escolar" es un yogur enriquecido con el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 destinado a reducir la diarrea en niños desnutridos. Desde el año 2008, el "Yogurito" ha sido distribuido diariamente a más de 500.000 niños en Tucumán, con la ayuda de las autoridades locales. Este programa es quizás una de las mayores intervenciones en niños hasta la fecha. "Yogurito Escolar" no solo ha permitido reducir el riesgo de infecciones en niños durante este tiempo, sino que –además– ha contribuido al desarrollo local, promocionando y estimulando la innovación en pequeñas y medianas empresas gracias a la constante demanda del yogur enriquecido en probióticos [51].

En África, la Fundación "*Yoba for Life*" ha desarrollado un programa similar. La idea es incrementar el acceso de poblaciones con escasos recursos a alimentos fermentados funcionales seguros, principalmente estimulando la producción local de yogur fermentado con *Lactobacillus rhamnosus* yoba 2012 y *S. thermophilus*, llamado "Yoba", y que al igual que el programa "Yogurito", ha demostrado ser capaz de disminuir el riesgo de infecciones. "Yoba" es producido localmente y accesible incluso para las comunidades más pobres. Este programa se lleva a cabo en varios países, incluidos Uganda, Kenia, Tanzania, Zambia, Zimbabue, y Burkina Faso. Muchos estudios han documentado la seguridad y la estabilidad de las 2 bacterias utilizadas en las condiciones ambientales que se dan en África [52]. La diferencia entre el enfoque africano y el argentino es que, en el primero, además, las bacterias se utilizan para la fermentación de otras materias primas además de la leche, como vegetales, cereales y otros ingredientes.

V. Conclusiones y recomendaciones

Los alimentos fermentados, históricamente han sido parte integral de la dieta de casi todas las poblaciones humanas alrededor del mundo, siendo reconocidos por los beneficios que aporta a salud su consumo. Estos beneficios de los alimentos fermentados son mucho mayores que la suma individual de la presencia de microorganismos beneficiosos, nutrientes y compuestos bioactivos. Existen cada vez más evidencias de que el proceso de fermentación puede incrementar la digestibilidad de las proteínas y la cantidad de aminoácidos libres, reducir la presencia de compuestos antinutritivos y aumentar la biodisponibilidad de minerales.

Muchos de estos beneficios parecen ser generales para los diferentes alimentos fermentados, pero existen diferencias dependiendo de la materia prima de origen y de las cepas microbianas utilizadas, lo que debe ser cuidadosamente tenido en cuenta a la hora de elaborar alimentos fermentados con fines específicos. Otros parámetros como el tiempo y la temperatura de fermentación.

En comunidades con menores ingresos, los alimentos fermentados pueden servir como una fuente de nutrientes relativamente barata, fácil de conservar y segura, capaz de mejorar el estado nutricional y de salud de esas poblaciones.

Los microorganismos y los metabolitos derivados de la fermentación son capaces de modificar la composición y la actividad de la microbiota intestinal, pudiendo tener un efecto positivo en muchas funciones corporales, especialmente, cuando el alimento fermentado además sirve como fuente de microorganismos probióticos y compuestos prebióticos. Por lo tanto, los alimentos fermentados deben ser considerados como una categoría de alimentos importante a la hora de establecer recomendaciones nutricionales y dietéticas.

VI. Agradecimientos

Los autores CGG y AK quieren agradecer al proyecto regional Food Valley (A73605), por el apoyo recibido en el desarrollo del conocimiento técnico y científico en alimentos fermentados y probióticos.

VII. Declaración de posibles conflictos de interés

Seppo Salminen es Presidente de la Junta Directiva de la Sociedad Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP) y es ponente habitual en conferencias científicas patrocinadas por la industria alimentaria. Anna Kårlund y Carlos Gómez Gallego, como parte del Proyecto Food Valley, asesoran científicamente a empresas relacionadas con productos lácteos, alimentos fermentados y probióticos sin recibir compensación económica por parte de esas empresas. Miguel Gueimonde declara no poseer ningún conflicto de intereses.

VIII. Bibliografía citada

[1] Hutkins, R.W. (Robert W. *Microbiology and technology of fermented foods*; ISBN 9781119027447.

[2] Marco, M.L.; Heeney, D.; Binda, S.; Cifelli, C.J.; Cotter, P.D.; Foligné, B.; Gänzle, M.; Kort, R.; Pasin, G.; Pihlanto, A.; et al. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2017, *44*, 94–102.

[3] Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014, *11*, 506–514.

[4] Ranadheera, R.D.C.S.; Baines, S.K.; Adams, M.C. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res. Int.* 2010, *43*, 1–7.

[5] Mota de Carvalho, N.; Costa, E.M.; Silva, S.; Pimentel, L.; Fernandes, T.H.; Estevez Pintado, M. Fermented foods and beverages in human diet and their influence on gut microbiota and health. *Fermentation* 2018, *4*.

[6] Xiang, H.; Sun-Waterhouse, D.; Waterhouse, G.I.N.; Cui, C.; Ruan, Z. Fermentation-enabled wellness foods: A fresh perspective. *Food Sci. Hum. Wellness* 2019, *8*, 203–243.

[7] Kabak, B.; Dobson, A.D.W. An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2011, *51*, 248–260.

[8] Soro-Yao, A.A.; Brou, K.; Amani, G.; Thonart, P.; Thonart, P.; Djè, K.M. the use of lactic acid bacteria starter cultures during the processing of fermented cereal-based foods in West Africa: A review. *Trop. Life Sci. Res.* 2014, *25*, 81–100.

[9] Day, C.N.; Morawicki, R.O. Effects of Fermentation by Yeast and Amylolytic Lactic Acid Bacteria on Grain Sorghum Protein Content and Digestibility. *J. Food Qual.* 2018, *2018*.

[10] Tamang, J.P.; Shin, D.H.; Jung, S.J.; Chae, S.W. Functional properties of microorganisms in fermented foods. *Front. Microbiol.* 2016, *7*.

[11] Omer, G.; Adam, A.; Hua, Y.; Vernonxious, M.; Chamba, M.; Gasmalla, M.A.A. Functional properties and in vitro protein digestibility of fermented sorghum and broad bean (Visia faba L. Major) blended flour. *Pakistan J. Food Sci.* 2013, *23*, 10–16.

[12] Lorusso, A.; Coda, R.; Montemurro, M.; Rizzello, C.G. Use of selected lactic acid bacteria and quinoa flour for manufacturing novel yogurt-like beverages. *Foods* 2018, *7*.

[13] Montemurro, M.; Pontonio, E.; Gobbetti, M.; Rizzello, C.G. Investigation of the nutritional, functional and technological effects of the sourdough fermentation of sprouted flours. *Int. J. Food Microbiol.* 2019, *302*, 47–58.

[14] Çabuk, B.; Nosworthy, M.G.; Stone, A.K.; Korber, D.R.; Tanaka, T.; House, J.D.; Nickerson, M.T. Effect of fermentation on the protein digestibility and levels of non-nutritive compounds of pea protein concentrate. *Food Technol. Biotechnol.* 2018, *56*, 257–264.

[15] Leroy, F.; De Vuyst, L. Fermented food in the context of a healthy diet: How to produce novel functional foods? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2014, *17*, 574–581.

[16] Ghosh, D.; Chattopadhyay, P. Preparation of idli batter, its properties and nutritional improvement during fermentation. *J. Food Sci. Technol.* 2011, *48*, 610–615.

[17] Jung, J.Y.; Lee, S.H.; Jin, H.M.; Hahn, Y.; Madsen, E.L.; Jeon, C.O. Metatranscriptomic analysis of lactic acid bacterial gene expression during kimchi fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 2013, *163*, 171–179.

[18] SYAL, P.; VOHRA, A. PROBIOTIC POTENTIAL OF YEASTS ISOLATED FROM TRADITIONAL INDIAN FERMENTED FOODS. *Int. J. Microbiol. Res.* 2013, *5*, 390–398.

[19] Derrien, M.; van Hylckama Vlieg, J.E.T. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends Microbiol.* 2015, *23*, 354–366.

[20] Plé, C.; Breton, J.; Daniel, C.; Foligné, B. Maintaining gut ecosystems for health: Are transitory food bugs stowaways or part of the crew? *Int. J. Food Microbiol.* 2015, *213*, 139–143.

[21] Ege, M.J. The hygiene hypothesis in the age of the microbiome. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 2017, *14*, S348–S353.

[22] Rook, G.A.W.; Lowry, C.A. The hygiene hypothesis and psychiatric disorders. *Trends Immunol.* 2008, *29*, 150–158.

[23] Lang, J.M.; Eisen, J.A.; Zivkovic, A.M. The microbes we eat: Abundance and taxonomy of microbes consumed in a day's worth of meals for three diet types. *PeerJ* 2014, *2014*.

[24] Gómez-Gallego, C.; Gueimonde, M.; Salminen, S. The role of yogurt in food-based dietary guidelines. *Nutr. Rev.* 2018, *76*, 29–39.

[25] Khurana, H.; Kanawjia, S. Recent Trends in Development of Fermented Milks. *Curr. Nutr. Food Sci.* 2012, *3*, 91–108.

[26] Chen, M.; Sun, Q.; Giovannucci, E.; Mozaffarian, D.; Manson, J.E.; Willett, W.C.; Hu, F.B. Dairy consumption and risk of type 2 diabetes: 3 cohorts of US adults and an updated meta-analysis. *BMC Med.* 2014, *12*, 215.

[27] Díaz-López, A.; Bulló, M.; Martínez-González, M.A.; Corella, D.; Estruch, R.; Fitó, M.; Gómez-Gracia, E.; Fiol, M.; García de la Corte, F.J.; Ros, E.; et al. Dairy product consumption and risk of type 2 diabetes in an elderly Spanish Mediterranean population at high cardiovascular risk. *Eur. J. Nutr.* 2016, *55*, 349–360.

[28] Tu, M.Y.; Chen, H.L.; Tung, Y.T.; Kao, C.C.; Hu, F.C.; Chen, C.M. Short-Term Effects of Kefir-Fermented Milk Consumption on Bone Mineral Density and Bone Metabolism in a Randomized Clinical Trial of Osteoporotic Patients. *PLoS One* 2015, *10*.

[29] Nagata, S.; Asahara, T.; Wang, C.; Suyama, Y.; Chonan, O.; Takano, K.; Daibou, M.; Takahashi, T.; Nomoto, K.; Yamashiro, Y. The Effectiveness of Lactobacillus Beverages in Controlling Infections among the Residents of an Aged Care Facility: A Randomized Placebo-Controlled Double-Blind Trial. *Ann. Nutr. Metab.* 2016, *68*, 51–59.

[30] Guillemard, E.; Tondu, F.; Lacoin, F.; Schrezenmeir, J. Consumption of a fermented dairy product containing the probiotic Lactobacillus casei DN-114001 reduces the duration of respiratory infections in the elderly in a randomised controlled trial. *Br. J. Nutr.* 2010, *103*, 58–68.

[31] Moreno Aznar, L.A.; Cervera Ral, P.; Ortega Anta, R.M.; Díaz Martín, J.J.; Baladia, E.; Basulto, J.; Bel Serrat, S.; Iglesia Altaba, I.; López-Sobaler, A.M.; Manera, M.; et al. Scientific evidence about the role of yogurt and other fermented milks in the healthy diet for the Spanish population. *Nutr. Hosp.* 2013, *28*, 2039–89.

[32] McKevith, B.; Shortt, C. FERMENTED MILKS | Other Relevant Products. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*; Elsevier, 2003; pp. 2383–2389.

[33] Marcone, S.; Belton, O.; Fitzgerald, D.J. Milk-derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role in atherosclerosis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2017, *83*, 152–162.

[34] Savaiano, D.A. Lactose digestion from yogurt: Mechanism and relevance. *Am. J. Clin. Nutr.* 2014, *99*.

[35] Parra, M.D.; Martínez de Morentin, B.E.; Cobo, J.M.; Lenoir-Wijnkoop, I.; Martínez, J.A. Acute calcium assimilation from fresh or pasteurized yoghurt depending on the lactose digestibility status. *J. Am. Coll. Nutr.* 2007, *26*, 288–294.

[36] van den Heuvel, E.G.H.M.; Schoterman, M.H.C.; Muijs, T. Transgalactooligosaccharides Stimulate Calcium Absorption in Postmenopausal Women. *J. Nutr.* 2000, *130*, 2938–2942.

[37] Rizzoli, R. Dairy products, yogurts, and bone health. *Am. J. Clin. Nutr.* 2014, *99*.

[38] Shahani, K.M.; Chandan, R.C. Nutritional and Healthful Aspects of Cultured and Culture-Containing Dairy Foods. *J. Dairy Sci.* 1979, *62*, 1685–1694.

[39] Fabian, E.; Majchrzak, D.; Dieminger, B.; Meyer, E.; Elmadfa, I. Influence of probiotic and conventional yoghurt on the status of vitamins B1, B2 and B6 in young healthy women. *Ann. Nutr. Metab.* 2008, *52*, 29–36.

[40] Marsh, A.J.; Hill, C.; Ross, R.P.; Cotter, P.D. Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends Food Sci. Technol.* 2014, *38*, 113–124.

[41] Michaelsen, K.F.; Hoppe, C.; Roos, N.; Kaestel, P.; Stougaard, M.; Lauritzen, L.; Mølgaard, C.; Girma, T.; Friis, H. Choice of foods and ingredients for moderately malnourished children 6 months to 5 years of age. *Food Nutr. Bull.* 2009, *30*.

[42] Luana, N.; Rossana, C.; Curiel, J.A.; Kaisa, P.; Marco, G.; Rizzello, C.G. Manufacture and characterization of a yogurt-like beverage made with oat flakes fermented by selected lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 2014, *185*, 17–26.

[43] Waters, D.M.; Mauch, A.; Coffey, A.; Arendt, E.K.; Zannini, E. Lactic Acid Bacteria as a Cell Factory for the Delivery of Functional Biomolecules and Ingredients in Cereal-Based Beverages: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2015, *55*, 503–520.

[44] Özkaya, H.; Özkaya, B.; Duman, B.; Turksoy, S. Effect of Dephytinization by Fermentation and Hydrothermal Autoclaving Treatments on the Antioxidant Activity, Dietary Fiber, and Phenolic Content of Oat Bran. *J. Agric. Food Chem.* 2017, *65*, 5713–5719.

[45] Angelov, A.; Yaneva-Marinova, T.; Gotcheva, V. Oats as a matrix of choice for developing fermented functional beverages. *J. Food Sci. Technol.* 2018, *55*, 2351–2360.

[46] Coda, R.; Melama, L.; Rizzello, C.G.; Curiel, J.A.; Sibakov, J.; Holopainen, U.; Pulkkinen, M.; Sozer, N. Effect of air classification and fermentation by Lactobacillus plantarum VTT E-133328 on faba bean (Vicia faba L.) flour nutritional properties. *Int. J. Food Microbiol.* 2015, *193*, 34–42.

[47] Starzyńska-Janiszewska, A.; Stodolak, B.; Mickowska, B. Effect of controlled lactic acid fermentation on selected bioactive and nutritional parameters of tempeh obtained from unhulled common bean (Phaseolus vulgaris) seeds. *J. Sci. Food Agric.* 2014, *94*, 359–366.

[48] Shimelis, E.A. massu; Rakshit, S.K. mar Influence of natural and controlled fermentations on alpha-galactosides, antinutrients and protein digestibility of beans (Phaseolus vulgaris L.). *Int. J. Food Sci. Technol.* 2008, *43*, 658–665.

[49] Bell, V.; Ferrão, J.; Fernandes, T. Nutritional Guidelines and Fermented Food Frameworks. *Foods* 2017, *6*, 65.

[50] Ebner, S.; Smug, L.N.; Kneifel, W.; Salminen, S.J.; Sanders, M.E. Probiotics in dietary guidelines and clinical recommendations outside the European Union. *World J. Gastroenterol.* 2014, *20*, 16095–16100.

[51] Villena, Julio Cesar; Salva, Maria Susanal; Nuñez, Martha Susanal; Corzo, Josefina; Tolaba, René; Faedda, Julio; Font, Graciela Marial; Alvarez, G.S. Probiotics for Everyone! The Novel Immunobiotic Lactobacillus rhamnosus CRL1505 and the Beginning of Social Probiotic Programs in Argentina. *Int. J. Biotechnol. Wellness Ind.* 2012, 189–198.

[52] Kort, R.; Westerik, N.; Mariela Serrano, L.; Douillard, F.P.; Gottstein, W.; Mukisa, I.M.; Tuijn, C.J.; Basten, L.; Hafkamp, B.; Meijer, W.C.; et al. A novel consortium of Lactobacillus rhamnosus and Streptococcus thermophilus for increased access to functional fermented foods. *Microb. Cell Fact.* 2015, *14*.

13

Rol del ácido láctico en los efectos benéficos de los alimentos fermentados

Agustina J. Errea
aquinohaynadie2@gmail.com

• *Instituto de Estudios Inmunológicios y Fisiopatológicos IIFP – CONICET – Universidad Nacional de La Plata*

Martín Rumbo
rumbo.martin@gmail.com

• *Instituto de Estudios Inmunológicios y Fisiopatológicos IIFP – CONICET – Universidad Nacional de La Plata*

Resumen

El ácido láctico fue considerado durante muchos años como un producto de desecho del metabolismo energético. Sin embargo, en los últimos años se han descubierto distintos mecanismos de acción y propiedades bioactivas del lactato, que están cambiando de manera drástica su consideración en las ciencias biomédicas. Se ha acumulado evidencia que indica que el ácido láctico, en dosis adecuadas tales como las encontradas en el intestino proximal, tiene capacidad de modular procesos inflamatorios y de activar la inmunidad innata. A su vez, también es capaz de inducir una respuesta inmune regulatoria, necesaria para el mantenimiento de la homeostasis gastrointestinal. El descubrimiento de receptores de membrana que reconocen el lactato y generan señales intracelulares como el GPR81, el reconocimiento de que el lactato puede modular la expresión génica a través de sus efectos sobre la modificación postraduccional de histonas modificando la estructura de la cromatina, y el rol del lactato como modulador de activación de células inmunes a partir de la modulación de su reprogramación metabólica, son conocimientos que traen una nueva visión sobre las capacidades de esta molécula. Por otra parte, el reconocimiento de que muchos productos fermentados tienen como elemento en común altos niveles de lactato, en concentraciones similares o mayores a las compatibles con su bioactividad, refuerza la hipótesis de que alguna

de las propiedades beneficiosas atribuibles al consumo de alimentos fermentados está relacionada con la presencia de lactato en los mismos. En el presente capitulo se desarrollarán estos conceptos que están aportando nueva evidencia sobre como el consumo de alimentos fermentados contribuye a mejorar la salud.

I. Introducción

El ácido láctico es uno de los metabolitos presente en concentraciones relativamente elevadas en la mayoría de los alimentos fermentados. El ácido láctico es producto del metabolismo fermentativo de los microorganismos que realizan la fermentación de los alimentos a partir de distintos sustratos fermentables presentes en los ingredientes de partida, sean estos vegetales, carnes, lácteos u otras variedades. La producción de ácido láctico depende de las características metabólicas de los microorganismos que realizan la fermentación y de los sustratos que se utilicen en la fermentación. Las bacterias lácticas se encuentran entre los microorganismos principales responsables de la fermentación de alimentos y en su mayoría realizan la fermentación láctica como vía principal [1]. Es por ello que distintos alimentos fermentados contienen cantidades significativas de ácido láctico, independientemente del tipo de sustrato fermentado de origen (ver Tabla 1). El ácido láctico además de ser responsable de algunas de las características organolépticas de los alimentos fermentados, tiene una serie de propiedades bioactivas que discutiremos en el presente capítulo, que en parte pueden explicar algunos de los beneficios a la salud del consumidor que aportan los productos fermentados.

Tabla 1. Contenido de ácido láctico de distintos alimentos fermentados.

Producto	Material fermentado	Concentración de ácido láctico [g/L]	Concentración de ácido láctico [mM]
Chucrut	Vegetal	17 a 23	188 a 255
Pepinillos	Vegetal	6 a 10	66 a 111
Aceitunas	Vegetal	4 a 7	44 a 77
Kimchi	Vegetal	4 a 8	44 a 88
Yogur	Leche	10	111
Kefir	Leche	10 a 15	111 a 165
Kombucha	Te azucarado	0,2	2,2

En el tracto gastrointestinal el ácido láctico se presentará en forma conjugada o disociada, dependiendo del pH. En entornos de pH menor que 3, básicamente en el estómago, el ácido láctico se mantiene como ácido conjugado, sin carga neta. Esto aumenta su capacidad de difusión a través de membranas, lo que explica su poder microbicida. Por otra parte, a partir del pasaje al intestino delgado y por el resto del tránsito por el tracto gastrointestinal, se mantendrá en su forma disociada como lactato. Su absorción e ingreso al compartimento intracelular se realiza a través de distintos transportadores de la familia de los MCT (transportadores de ácidos monocarboxílicos), compartidos con otros metabolitos, que funcionan co-transportando la forma aniónica junto con un ión H+ [2]. Por lo tanto, muchas de las propiedades biológicas del ácido láctico ingerido con los alimentos fermentados, responderán a

las capacidades bioactivas del lactato, tanto en el intestino como en otros compartimentos del organismo.

Como ocurre con todas las sustancias, los efectos biológicos dependerán de la concentración de la molécula bioactiva. En el caso de lactato, los mayores niveles se encuentran en los alimentos fermentados (ver Tabla 1), pudiendo llegar a niveles de 100 mM o mayores en productos como el chucrut, así como en el kefir y otros lácteos fermentados, dependiendo de las condiciones de fermentación. Estas concentraciones van disminuyendo con el mezclado de alimentos y jugos gástricos, y con el avance a lo largo del tracto gastrointestinal, la absorción –principalmente a nivel de intestino delgado– hace que la concentración de lactato disminuya. No existen muchos datos reportados en humanos, siendo la mayoría en animales de producción, tales como porcinos y bovinos y también en animales de laboratorio. En estos casos, las concentraciones de lactato son mayores en el intestino delgado, del orden de 20 a 50 mM, tendiendo a ser máximas en la porción distal del intestino delgado en animales adultos [3]. En todos los casos estudiados se ha encontrado una importante influencia de la dieta en los niveles de lactato en las distintas porciones del tracto gastrointestinal, pero con el mismo patrón de distribución relativo [4]. En general se observa una disminución de los niveles de lactato en el ciego y en el colon, con respecto al intestino delgado, principalmente por el consumo de lactato como sustrato de las diversas poblaciones microbianas del intestino grueso, que se caracterizan por la fermentación del lactato y generación de ácidos grasos de cadena corta, que se encuentran en mayores concentraciones en el intestino grueso (acetato, propionato y butirato) [5].

Si bien hay menos información y solamente procedente de algunos estudios en porcinos, es muy interesante que los niveles de lactato en el tracto gastrointestinal son máximos durante la lactancia y en este caso los niveles mayores se encuentran en duodeno e intestino delgado proximal, disminuyendo luego hasta el íleon y siendo menores aun en intestino grueso [4]. Presumiblemente, la fermentación de la lactosa de la leche por poblaciones de lactobacilos que se encuentran entre los primeros colonizadores del tracto gastrointestinal y constituyen la población mayoritaria en las porciones proximales del intestino delgado, contribuye a los elevados niveles de lactato en el intestino durante la lactancia. Como veremos más adelante, las propiedades bioactivas del lactato, estimulando circuitos homeostáticos, pueden tener importancia en estas primeras etapas de la vida, en la que se establecen circuitos de tolerancia frente a antígenos alimentarios, principalmente por mecanismos que operan en el intestino delgado proximal, en donde los niveles de lactato serán máximos durante la lactancia.

A lo largo del capítulo se describirán las evidencias existentes sobre la capacidad del lactato de modular procesos inmunológicos en distintos blancos celulares/procesos, siendo los tres principales las células mieloides/inmunidad innata, células T regulatorias/ inmunidad adaptativa y los enterocitos/biología del epitelio intestinal.

Por otra parte, se abordarán los principales mecanismos por los cuales el lactato puede estar generando estos efectos: modulación a través del receptores acoplados

a proteínas G (*G-protein coupled receptors*, GPCRs), inhibición de la reprogramación metabólica y efectos sobre la arquitectura de la cromatina (inhibición de histona deacetilasas y modificación directa o lactilación de histonas).

II. Rol del lactato sobre células inmunes

Entre las propiedades bioactivas del lactato se ha descripto su capacidad de regular la funcionalidad del sistema inmune a través de su accionar sobre distintos tipos celulares, incluyendo células de origen mieloide, linfoide y células de epitelio intestinal.

Distintos trabajos han señalado la capacidad del lactato de limitar la activación de monocitos, macrófagos y células dendríticas inducida por la señalización a través de distintos receptores centrales de la respuesta inmune innata. En monocitos, el lactato limita la activación provocada por LPS promoviendo cambios cuali-cuantitativos en los perfiles de expresión génica, con un incremento tardío de citoquinas y quimoquinas pro-inflamatorias. Estos efectos fueron atribuidos a modificaciones cinéticas en los eventos de transducción de señales, en particular de una de las vías centrales que controlan la inflamación: la activación del factor NFkB [6]. También se ha descripto su efecto modulador en macrófagos, limitando la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, receptores de la inmunidad innata y moléculas coestimulatorias en respuesta al tratamiento con LPS [7]. Este efecto anti-inflamatorio ha sido correlacionado con el rol protector de la administración del lactato en modelos experimentales de injuria hepática y pancreática en donde disminuye la activación de vías inflamatorias como la mencionada NFkB y la activación de procesos intracelulares que magnifican la inflamación, como lo es el ensamblado del "inflamosoma", un complejo multienzimático central en la liberación de citoquinas inflamatorias en células macrofágicas [8].

Además de modular la activación pro-inflamatoria de células mieloides, el lactato también puede condicionar los procesos de diferenciación celular y adquisición de perfiles funcionales. Así, es capaz de promover la inducción de células mieloides supresoras y limitar la diferenciación de monocitos a células dendríticas y macrofágicas [9, 10]. También se ha descripto su participación en la polarización de macrófagos hacia un perfil M2 vinculado a funciones anti-inflamatorias y de reparación tisular [11]. Este último efecto involucra la participación del factor de transcripción HIF-1α, regulador central de las adaptaciones fisiológicas a situaciones de hipoxia con gran impacto en la funcionalidad inmune y el mantenimiento de la barrera epitelial [11, 12].

El lactato ha mostrado ser capaz de limitar los procesos de diferenciación de células dendríticas, quienes son las células presentadoras de antígeno por excelencia, capaces de instruir el perfil de respuesta y activación de linfocitos T. Por otra parte, la funcionalidad de las células dendríticas es influenciada por este metabolito limitando la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y moléculas co-estimulatorias e incrementando la secreción de la citoquina regulatoria IL10 [13, 14]. Este efecto inmunorregulatorio

también incluye la limitación de producción de citoquinas como interferón alfa (IFN α), una de las citoquinas de importancia funcional en la respuesta inmune [15].

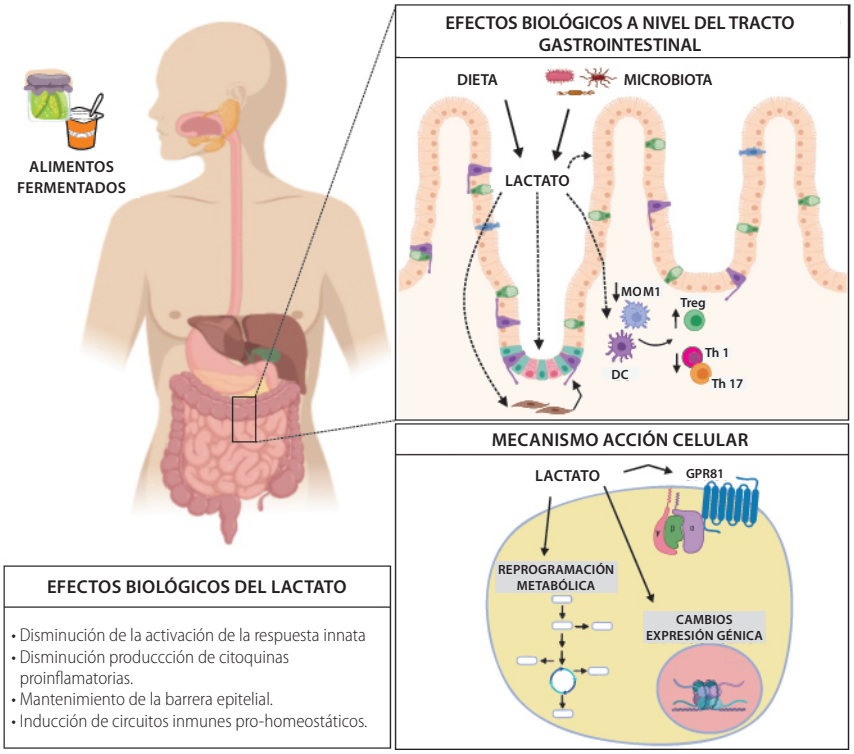
A través de modulación de la funcionalidad de células dendríticas, el lactato puede condicionar el proceso de instauración de la respuesta inmune adaptativa y sus características. Así, por ejemplo, el efecto inmuno-regulador sobre células dendríticas involucra además la capacidad de promover un perfil pro-tolerogénico mediante el aumento del metabolismo del triptofano y la producción de kinurenina favoreciendo la inducción de células T regulatorias (CD3+CD4+CD25+ Foxp3+) y su función supresora [15]. De esta manera el lactato no solo ejerce funciones anti-inflamatorias, sino que además favorece la instauración de perfiles pro-tolerogénicos, modificando así las características de la respuesta inmune adaptativa establecida. Ambos efectos han sido observados también en el entorno de la mucosa intestinal en donde células dendríticas y macrófagos participan activamente en el balance entre el establecimiento de respuestas inmunológicas regulatorias e inflamatorias. En este contexto se ha observado que la señalización a través del receptor del lactato en células dendríticas y macrófagos limita la producción de citoquinas pro-inflamatorias y promueve la expresión de factores inmunoregulatorios entre los que se encuentran IL-10, el ácido retinoico y la expresión de IDO (*Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase*), la enzima que cataliza el paso limitante del metabolismo del triptofano y la producción de kinurenina. Estos cambios funcionales favorecen el establecimiento de circuitos homeostáticos, incrementando la diferenciación de células T regulatorias en la mucosa colónica, y una disminución en el número de células T efectoras de perfiles inflamatorios. Este efecto resulta relevante no solo en situaciones de homeostasis sino que además contribuye a limitar la inflamación y la patología observadas en situaciones de colitis experimental [16, 17].

Además de la modulación de la respuesta inmune adaptativa mediante el condicionamiento del perfil funcional de células presentadoras de antígeno, el lactato puede ejercer su rol modulador de la respuesta adaptativa actuando en forma directa sobre los linfocitos T. Se ha descripto su capacidad de condicionar los perfiles de activación de células T CD4+ *naive* limitando la polarización hacia perfiles T inflamatorios y favoreciendo la inducción de células T regulatorias en un mecanismo que implica la participación de transportadores de monocarboxilatos presentes en la membrana plasmática [18]. Además de impactar en los procesos de activación y polarización funcional de células T el lactato también puede suprimir en forma activa la proliferación y actividad de células T efectoras [19, 20]. Su capacidad supresora se ha observado tanto para células efectoras T CD4+ como para células T CD8+ [21]. A diferencia de lo que ocurre en células T efectoras que presentan un metabolismo predominantemente glicolítico, las celulas T regulatorias mantienen un metabolismo oxidativo lo que les permite mantener su funcionalidad en presencia de altos niveles de lactato en el medio extracelular [19].

De esta forma, el lactato actúa como una molécula inmuno-reguladora promoviendo el establecimiento de circuitos celulares y moleculares capaces de limitar la

respuesta pro-inflamatoria y favorecer la inducción de respuestas regulatorias o tolerogénicas. Los mecanismos involucrados en esta funcionalidad son diversos, pudiendo depender del entorno tisular y el tipo celular (ver Figura 1).

Figura 1. Efectos biológicos del lactato a nivel del tracto gastrointestinal y mecanismos de acción a nivel celular y molecular.



El lactato presente en los productos fermentados contribuye al pool de lactato presente en la luz del tracto gastrointestinal, el cual ejerce su acción sobre distintos blancos celulares, básicamente el epitelio intestinal, células dendríticas, macrófagos y linfocitos. Los mecanismos de acción sobre las distintas células pueden ser por señalización a partir del receptor GPR81, por modulación de la reprogramación metabólica o por control de expresión de genes actuando de distinta manera sobre las modificaciones postraduccionales de las histonas.

III. Efecto del lactato sobre la biología epitelial

El epitelio intestinal es un actor central en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Además de funcionar como una barrera física frente a los estímulos que tienen acceso al organismo a través de la vía oral, es un componente integral de la inmunidad innata que funciona como un centro integrador de señales, capaz de coordinar el funcionamiento y el balance de la respuesta inmunológica mucosal. Entre los

mecanismos de diálogo microbiota-hospedador, los metabolitos microbianos han mostrado distintos efectos sobre la funcionalidad epitelial. El lactato ha sido identificado como un metabolito central en las propiedades inmunomodulatorias de la fracción no microbiana del kefir sobre las células de epitelio intestinal [22]. Esta molécula es capaz de disminuir la activación inflamatoria, limitando la activación del factor de transcripción NFkB y la producción de citoquinas y quimoquinas pro-inflamatorias [21]. El efecto anti-inflamatorio del lactato sobre el epitelio intestinal es un fenómeno general, independiente del estímulo pro-inflamatorio considerado [14].

Con el fin de mantener la integridad de la barrera y la homeostasis intestinal, el epitelio se renueva continuamente cada 3 a 5 días. Este proceso involucra la proliferación y diferenciación de células madre intestinales, acompañado de eventos de migración celular desde la base de la cripta, donde se ubican las células madre, hacia la punta de la vellosidad, en la cual se encuentran las células diferenciadas terminalmente. A partir de las células madre se diferencian las distintas células del epitelio: los enterocitos asociados a las funciones absortivas, las células de Paneth encargadas de la producción de péptidos antimicrobianos, las células de goblet productoras del mucus, las células enteroendócrinas productoras de distintas hormonas modulatorias de funciones digestivas y no digestivas, y las células tuft, que cumplen funciones de articulación de respuesta inmune. El "orquestado" y la coordinación de "actores" celulares y moleculares capaces de sostener la funcionalidad del nicho de células madre es clave para el mantenimiento de la homeostasis y los eventos de regeneración asociadas a distintas situaciones de injuria tisular. Las células de Paneth, que se disponen intercaladas con las células madre en la base de la cripta, y las células especializadas del estroma participan activamente de este proceso brindando señales que actúan en forma parácrina sobre las células madre. Entre los mecanismos que sostienen y regulan la capacidad de regeneración del epitelio la vía de señalización conocida como Wnt / β-catenina tiene una función central. Además de esta función, existe una creciente evidencia de que la vía Wnt está altamente interconectada con muchas otras cascadas de señalización, y que la combinación de eventos de señalización dan forma a la homeostasis epitelial y la regeneración de tejidos [23]. Sin embargo, las señales ambientales de relevancia a lo largo del tracto gastrointestinal que sostienen la activación de estas vías y cuáles son los mecanismos intervinientes, no son completamente conocidos. Distintas evidencias sugieren que lactato ejerce una función activa en la biología proliferativa del epitelio intestinal. En modelos de inanición-realimentación se ha observado que la presencia de lactato producto del metabolismo de lactobacilos actúa como una señal capaz de promover el aumento de la proliferación de enterocitos colónicos durante el período de realimentación [24]. Más recientemente se ha descripto la compartimentalización de los perfiles metabólicos de las células de la cripta intestinal y la importancia de su complementación para el desarrollo epitelial. Mientras que las células de Paneth tienen un metabolismo energético basado en la actividad glicolítica, el metabolismo oxidativo a nivel mitocondrial sostiene la capacidad de renovación y diferenciación de las células madre. De manera significativa, el lactato, producto del metabolismo de las

células de Paneth, es el sustrato metabólico que sostiene la actividad mitocondrial de las células madre promoviendo un circuito de interconexión metabólica a través del cual las células de Paneth promueven el mantenimiento del nicho de células madre [25]. Además de su rol metabólico, también se ha descripto la capacidad del lactato de promover el desarrollo epitelial, incrementando el número y proliferación de las células madre intestinales. En este proceso las células estromales y células de Paneth en el entorno de la cripta son responsables de la detección del lactato en el ambiente extracelular, la cual promueve la producción de señales Wnt que actúan en forma parácrina sobre las células madre activando la señalización vía β-catenina y estableciendo un circuito de comunicación celular capaz de sostener la función regenerativa del epitelio. Este efecto ha sido observado tanto en condiciones de homeostasis como en situaciones de injuria intestinal experimental promovida por tratamientos con radiación o quimioterapéuticos en donde la administración oral de lactato ha mostrado un rol protector limitando la perdida de células madre intestinales y manteniendo su capacidad proliferativa [26].

De esta manera, el lactato es una señal de relevancia en la regulación de la biología epitelial modulando su funcionalidad inmune y el mantenimiento del nicho de células madre (ver Figura 1). Ambos efectos, en combinación con su capacidad de establecer circuitos pro-homeostáticos previamente descriptos pueden ser responsables de los efectos protectores del daño tisular observado en modelos experimentales colitis y de injuria por indometacina [27, 28].

IV. Mecanismos de acción del lactato

Distintos mecanismos han sido implicados en los efectos biológicos del lactato. Por un lado, puede funcionar como agonista de receptores de membrana o ser incorporado a la célula a través de transportadores de monocarboxilatos MCT-1 a MCT-4. Una vez en el interior celular es capaz de modular los perfiles metabólicos y funcionar como molécula capaz de regular la expresión génica a través de modificaciones estructurales de la cromatina. Estos mecanismos y sus implicancias se describen a continuación (ver Figura 1).

IV.A. Modificación del metabolismo celular

En los últimos años se ha evidenciado que muchos cambios en la actividad celular son acompañados por cambios en los flujos metabólicos de distintas vías metabólicas celulares. Esto es particularmente evidente por la magnitud de sus cambios en las células del sistema inmune, las que por su naturaleza sufren cambios dramáticos de actividad en base a la detección de señales tales como la presencia de microorganismos invasores en el caso de las células mieloides o señales de activación antigénica para linfocitos T y B. Actualmente la fisiología del sistema inmune ha incorporado esta temática

como una nueva área conceptual: el inmunometabolismo [29]. Si bien muchos estudios realizados a nivel celular todavía deben integrarse a una visión a nivel sistémico/organismo, es aceptado que los cambios metabólicos que ocurren durante la activación de las células inmunes son necesarios para el correcto funcionamiento integrado de todo el sistema inmune. Estos cambios reciben el nombre genérico de "reprogramación metabólica" y si bien existen muchas particularidades asociadas al tipo de célula que se considere y a la combinación de señales de activación que reciba la misma y la disponibilidad de sustratos metabólicos, se han definido algunos patrones comunes de reprogramación. En general la activación de linfocitos T por estimulación antigénica de su receptor T y señales concomitantes de coestimulación y citoquinas determinan un cambio de un estado de baja actividad o reposo a un aumento dramático de la velocidad de división celular, generando una enorme cantidad de células que mantienen la misma clonalidad en su capacidad de reconocimiento y que se diferencian a distintos perfiles funcionales. Para mantener el proceso de alta actividad de división celular los linfocitos T aumentan la velocidad con que realizan la glicolisis y mantienen una actividad respiratoria mitocondrial [30]. La adquisición de los perfiles de respuesta pro-inflamatorios (como son los perfiles Th1 y Th17) dependen fundamentalmente de una alta velocidad de glicolisis, mientras que la generación de respuesta regulatoria y células Tregs depende fundamentalmente del metabolismo oxidativo mitocondrial [31]. Por otra parte, las células mieloides, entre las que se destacan por sus roles de centinelas del organismo los macrófagos y las células dendríticas se pueden activar a través de distintos receptores de citoquinas y de señales microbianas. Dependiendo de las vías de activación y señales del entorno pueden tomar distintos perfiles funcionales. Un paradigma un tanto reduccionista pero que sirve como modelo conceptual, asigna dos estados diferentes de activación para los macrófagos, denominados M1 y M2. Los macrófagos M1 son los "más inflamatorios", y están caracterizados por alta producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y distintas citoquinas inflamatorias. El otro perfil funcional, denominado M2, está asociado a procesos no inflamatorios, relacionados con respuesta inmune humoral y en muchos casos reparación tisular, y se caracteriza por una producción de algunas citoquinas como la anfiregulina y enzimas como la arginasa y ausencia de todos los efectores M1 [32]. En los últimos años ha sido evidenciado que, para la adquisición de estos fenotipos, los macrófagos durante su activación realizan una reprogramación metabólica paradigmática. La activación M1 implica un aumento del flujo glicolítico y una disrupción del ciclo del ácido cítrico mitocondrial, con exportación de citrato al citosol, producción de otros metabolitos derivados del citrato como itaconato, ausencia de consumo de oxígeno en mitocondria y reposición de oxalato a partir de aminoácidos [33]. La activación M2, por otra parte, depende fundamentalmente de un metabolismo mitocondrial clásico, con consumo de oxígeno mitocondrial y bajos niveles de glucólisis.

Es notable que el lactato, presente a concentraciones del orden de 10 a 50 mM en el entorno extracelular, puede ingresar a las distintas células inmunes, linfocitos o macrófagos, a través de distintos MCTs y modular la velocidad del flujo glicolítico

[34]. A su vez, puede modificar la relación NADH/NAD+ ejerciendo distintos efectos modulatorios a nivel de distintas enzimas. En su conjunto, todos estos cambios limitan la velocidad del flujo glicolítico, sin afectar el metabolismo mitocondrial [35]. En consecuencia, niveles de lactato como los encontrados en el tracto gastrointestinal limitan la activación inflamatoria de macrófagos M1 o linfocitos inflamatorios (de perfiles Th1 y Th17), sin alterar circuitos modulatorios como la generación de células Tregs o macrófagos M2 [7, 35, 36].

IV.B. El lactato como molécula de señalización: rol del GPR81

La importancia de la dieta y la microbiota intestinal en el mantenimiento del status de salud es conocida. En el último tiempo se ha descripto la existencia de mecanismos de censado de intermediarios metabólicos capaces de regular procesos fisiológicos diversos entre los que se encuentran el metabolismo y la funcionalidad inmune. Entre ellos, se destaca la participación de una familia de receptores de membrana asociados a proteína G recientemente caracterizada, entre los que se encuentran sensores tanto de metabolitos microbianos como de metabolitos endógenos. Dentro de este grupo de receptores se encuentran los receptores de ácidos hidroxicarboxílicos (HCA), acoplados a proteína G inhibitoria, entre los que se encuentra el receptor de lactato HCA1 o GPR81, el receptor filogenéticamente más antiguo dentro de este grupo. Tanto el L-lactato como el D-lactato pueden actuar como agonistas del GPR81, siendo el enantiómero D menos potente. La activación del receptor promueve una cascada de transducción de señales que involucra la inhibición de la adenilato ciclasa con la disminución en los niveles de AMP cíclico, mediada por la subunidad α inhibitoria, la movilización de Ca++ inducida por las subunidades β y γ y la activación de la vía no canónica asociada a la unión y activación de β–arrestina 2 [8, 15, 37, 38]. Dicha activación ocurre a concentraciones milimolares de lactato (EC_{50} aproximadamente 2mM) las cuales pueden ser alcanzadas a nivel sistémico o en forma local (denominada "tejido-específica") en distintos escenarios fisiológicos (activación de células inmunes, ejercicio, intervenciones dietarias) y fisiopatológicos (cáncer /ACV, etc) [37]. Así, los niveles de lactato en el lumen intestinal pueden alcanzar en situaciones de homeostasis del orden de 20 a 40 mM, pudiendo sus niveles incrementarse en por consumo de bacterias probióticas o consumo de alimentos fermentados, resultando compatibles con los rangos de respuesta del receptor GPR81.

El receptor GPR81 fue originalmente descripto por su función anti-lipolítica en tejido adiposo con un patrón de expresión en células/tejidos, relativamente acotado. Actualmente se conoce su implicancia en distintos escenarios fisiológicos, incluida la funcionalidad de células inmunes, su acción anti-inflamatoria, la funcionalidad cardíaca, la regulación de funciones neuronales y la biología tumoral. Así, se ha descripto su expresión en adipocitos, cerebro, riñón, células de músculo esquelético, células tumorales y células inmunes, entre ellas macrófagos hepáticos y peritoneales [8]. En el entorno del tracto gastrointestinal se encuentra expresado en células gástricas AGS,

en colon e intestino delgado humanos [22], en células de Paneth y células estromales intestinales [26] y en células epiteliales Caco-2. También es expresado en forma significativa en células inmunes presentadoras de antígeno en donde los niveles son mucho mayores que los observados en macrófagos y dendríticas de bazo sugiriendo que el lactato puede ser una señal de relevancia en el entorno mucosal. GPR81 se expresa en relativamente niveles más bajos en otras células inmunes como las células T CD4+, Células T CD8+ y células B [17].

Entre las funciones asociadas al GPR81 se ha observado su capacidad de regular la respuesta pro-inflamatoria en distintas situaciones fisiológicas. La capacidad protectora del lactato a través de su efecto anti-inflamatorio también se ha observado en modelos de injuria hepática y pancreática, en los cuales la señalización vía GPR81 a través de la participación de la β–arrestina 2 limita la activación de vías de señalización de la inmunidad innata disminuyendo la expresión de moléculas pro-inflamatorias en células macrofágicas y el daño tisular asociado [8]. La funcionalidad anti-inflamatoria del GPR81 también ha sido evidenciada en células dendríticas, en las cuales limita la producción de interferones tipo I [15]. En la mucosa intestinal, la funcionalidad de GPR81 también ha sido asociada a la regulación de la respuesta inflamatoria y establecimiento de respuestas pro-homeostáticas. Mediante el empleo de modelos experimentales de colitis se ha evidenciado que la señalización de este receptor tiene un efecto protector mediado básicamente a través de la disminución de la producción de citoquinas pro-inflamatorias y aumento de la expresión de mediadores inmunoreguladores como IL-10, ácido retinoico e IDO en células presentadoras de antígeno con el consecuente aumento de la diferenciación de células T regulatorias y una disminución de células T efectoras de perfiles inflamatorios [16]. En este contexto los efectos mediados por el receptor son relevantes a nivel de las células de origen hematopoyético no siendo significativa la participación de las células epiteliales o estromales en los efectos anti-inflamatorios.

La funcionalidad del GPR81 también ha sido implicada en la regulación de mecanismos proliferativos/regenerativos del epitelio intestinal. En este proceso la activación del receptor en células de Paneth y células estromales del entorno de la cripta intestinal es responsable de la producción de señales Wnt y la activación de b-catenina involucrada en la proliferación y diferenciación de células madre intestinales descriptos previamente [26].

IV.C. El lactato como modificador de la expresión génica y su participación en procesos de reparación del ADN

Una vez dentro de la célula el lactato puede modificar la expresión génica generando modificaciones estructurales de la cromatina mediante la modificación post-traduccional de las histonas a través de dos mecanismos principales. Uno de los mecanismos más caracterizado de regulación epigenética involucra procesos de modificación de histonas H3 y H4 por procesos de acetilación y desacetilación los

cuales se encuentran regulados a través de la actividad enzimática de las histonas acetiltransferasas y las histonas deacetilasas respectivamente. En general, los aumentos de la acetilación resultan en una conformación transcripcionalmente más activa mientras que, a la inversa, una hipoacetilación resulta en un mayor nivel de condensación y una represión de la transcripción. En forma semejante a lo observado para otros metabolitos de fermentación microbiana, el lactato puede funcionar como inhibidor de histonas deacetilasas. Si bien es un inhibidor débil comparado con otros inhibidores como el butirato (IC50 40mM) los efectos transcripcionales son equivalentes a los de éste, para quien esta funcionalidad ha sido asociada al establecimiento de circuitos de regulación pro-homeostatica [39]. Dentro de las cuatro clases definidas de histona deacetilasas, se encuentran las sirtuinas (clase III) una familia única de enzimas altamente conservadas con importantes implicaciones en el epigenoma cuya funcionalidad depende del cofactor NAD+. La captación de lactato extracelular puede modificar el equilibrio entre las formas oxidada y reducida del dinucléotido de nicotinamida (NAD+/ NADH) promoviendo la expresión y activación de sirtuinas pudiendo de esta manera funcionar como un regulador transcripcional que vincule el estado metabólico de la célula con la expresión génica [39, 40]. La participación de este mecanismo en el rol inmunomodulador del lactato ha sido observado para células T en donde la presencia de este metabolito en el medio extracelular induce la expresión de SIRT-1 quien promueve una supresión de la polarización células T CD4+ hacia un perfil funcional inflamatorio [18].

Además de su efecto sobre la actividad transcripcional, las histonas acetilasas y deacetilasas participan en la orquestación y regulación de los mecanismos de reparación de ADN. Ambas enzimas son reclutadas a los sitios de ruptura en donde promueven una conformación de la cromatina pro-reparación y regulan el accionar de la maquinaria molecular involucrada. El lactato también ha mostrado un efecto pro-reparación del ADN al modificar la accesibilidad de la cromatina, incrementar la expresión de genes involucrados en la recombinación homóloga y la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y promoviendo, además, la actividad de DNA-PKcs, una enzima clave en este último proceso (NHEJ). Interesantemente, esta actividad es una característica de ambos enantiómeros del lactato indicando que tanto el lactato producido en forma endógena (L-lactato) como el proveniente de la microbiota (predominantemente D-lactato) pueden tener implicancias en este fenómeno [41]. La relevancia de este fenómeno en el entorno de la mucosa intestinal es aún desconocida.

Recientemente se ha descripto un segundo mecanismo por el cual el lactato puede generar cambios post-traduccionales de histonas. El aumento de lactato intracelular, ya sea por transporte a través de la membrana o por aumento del metabolismo glicolítico puede, en un proceso llamado lactoilación, modificar los residuos de lisina de las histonas modificando la conformación de la cromatina y consecuentemente la expresión génica. Este proceso ocurre con una cinética más tardía respecto de otras modificaciones de histonas como puede ser los procesos de acetilación/deacetilación y se ha relacionado con el aumento de la expresión de genes que promueven

circuitos de reparación tisular y restauración de la homeostasis [42]. Así, la activación de macrófagos hacia un perfil pro-inflamatorio con perfil M1 involucra una reprogramación metabólica con aumento de la glicólisis con el aumento concomitante de lactato que promueve la expresión de marcadores como la arginasa 1 característica de los macrófagos M2 pudiendo servir como un reloj funcional que induce un fenotipo con capacidad de intervenir en procesos de reparación del daño tisular asociado a la actividad inflamatoria.

V. Conclusiones

Durante muchos años considerado como un metabolito de desecho, en los últimos años se han descubierto distintos mecanismos de acción y propiedades bioactivas del lactato que están cambiando de manera drástica su consideración en las ciencias biomédicas. Por otra parte, el reconocimiento que muchos productos fermentados tienen como elemento en común altos niveles de lactato, en concentraciones similares o mayores a las compatibles con su bioactividad refuerza la hipótesis que alguna de las propiedades beneficiosas atribuibles al consumo de alimentos fermentados está relacionada con la presencia de lactato en los mismos.

VI. Declaración de posibles conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

VII. Bibliografia

[1] Tamang JP, Cotter PD, Endo A, Han PS, Kort R, Liu QS, Mayo B, Westerik R, Hutkins R. Fermented foods in a global age: East meets West. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2020;19:184–217.

[2] Iwanaga T, Kishimoto A. Cellular distributions of monocarboxylate transporters: A review. *Biomed Res*. 2015;36(5):279-301. doi:10.2220/biomedres.36.279

[3] Pieper R, Boudry C, Bindelle J, Vahjen W, Zentek J. Interaction between dietary protein content and the source of carbohydrates along the gastrointestinal tract of weaned piglets. *Arch Anim Nutr*. 2014;68(4):263-280. doi:10.1080/1745039X.2014.932962

[4] Pieper R, Vahjen W, Zentek J. Intestinal lactose and mineral concentration affect the microbial ecophysiology along the gastrointestinal tract of formula-fed neonatal piglets. *J Anim Sci*. 2016;94(9):3786-3795. doi:10.2527/jas.2016-0459

[5] Sharon G, Garg N, Debelius J, Knight R, Dorrestein PC, Mazmanian SK. Specialized metabolites from the microbiome in health and disease. *Cell Metab*. 2014;20(5):719-730. doi:10.1016/j.cmet.2014.10.016

[6] Peter K, Rehli M, Singer K, Renner-Sattler K, Kreutz M. Lactic acid delays the inflammatory response of human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;457(3):412-418. doi:10.1016/j.bbrc.2015.01.005

[7] Errea A, Cayet D, Marchetti P, et al. Lactate inhibits the pro-inflammatory response and metabolic reprogramming in Murine macrophages in a GPR81-independent manner. *PLoS One*. 2016;11(11). doi:10.1371/journal.pone.0164098

[8] Hoque R, Farooq A, Ghani A, Gorelick F, Mehal WZ. Lactate reduces liver and pancreatic injury in toll-like receptor- and inflammasome-mediated inflammation via gpr81-mediated suppression of innate immunity. *Gastroenterology*. 2014;146(7):1763-1774. doi:10.1053/j.gastro.2014.03.014

[9] Husain Z, Huang Y, Seth P, Sukhatme VP. Tumor-derived lactate modifies antitumor immune response: effect on myeloid-derived suppressor cells and NK cells. *J Immunol*. 2013;191(3):1486-1495. doi:10.4049/jimmunol.1202702

[10] Puig-Kröger A, Pello OM, Muñiz-Pello O, et al. Peritoneal dialysis solutions inhibit the differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: effect of lactate and glucose-degradation products. *J Leukoc Biol*. 2003;73(4):482-492. doi:10.1189/jlb.0902451

[11] Colegio OR, Chu N-Q, Szabo AL, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*. 2014;513(7519):559-563. doi:10.1038/nature13490

[12] Wei L, Zhou Y, Yao J, et al. Lactate promotes PGE2 synthesis and gluconeogenesis in monocytes to benefit the growth of inflammation-associated colorectal tumor. *Oncotarget*. 2015;6(18):16198-16214. doi:10.18632/oncotarget.3838

[13] Vivar N, Rethi Stuart Snowden B, Rajnavölgyi E, et al. Endogenously Produced Lactic Acid Dendritic Cell Reprogramming by Dendritic Cell Reprogramming by Endogenously Produced Lactic Acid. *J Immunol Univ Libr Utr*. 2013;191:3090-3099. doi:10.4049/jimmunol.1300772

[14] Iraporda C, Errea A, Romanin DE, et al. Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells. *Immunobiology*. June 2015. doi:10.1016/j.imbio.2015.06.004

[15] Raychaudhuri D, Bhattacharya R, Sinha BP, et al. Lactate Induces Pro-tumor Reprogramming in Intratumoral Plasmacytoid Dendritic Cells. *Front Immunol*. 2019;10:1878. doi:10.3389/fimmu.2019.01878

[16] Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity*. 2014;40(1):128-139. doi:10.1016/j.immuni.2013.12.007

[17] Ranganathan P, Shanmugam A, Swafford D, et al. GPR81, a Cell-Surface Receptor for Lactate, Regulates Intestinal Homeostasis and Protects Mice from Experimental Colitis. *J Immunol*. 2018;200(5):1781-1789. doi:10.4049/jimmunol.1700604

[18] Comito G, Iscaro A, Bacci M, et al. Lactate modulates CD4 + T-cell polarization and induces an immunosuppressive environment, which sustains prostate carcinoma progression via TLR8/miR21 axis. *Oncogene*. 2019;38(19):3681-3695. doi:10.1038/s41388-019-0688-7

[19] Angelin A, Gil-de-Gómez L, Dahiya S, et al. Foxp3 reprograms T cell metabolism to function in low-glucose, high-lactate environments. *Cell Metab*. 2017:1-12. doi:10.1016/j.cmet.2016.12.018

[20] Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*. 2007;109(9):3812-3819. doi:10.1182/blood-2006-07-035972

[21] Brand A, Singer K, Koehl GE, et al. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab*. 2016;24(5):657-671. doi:10.1016/j.cmet.2016.08.011

[22] Iraporda C, Romanin DE, Rumbo M, Garrote GL, Abraham AG. The role of lactate on the immunomodulatory properties of the nonbacterial fraction of kefir. *Food Res Int*. 2014;62. doi:10.1016/j.foodres.2014.03.003

[23] Gehart H, Clevers H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(1):19-34. doi:10.1038/s41575-018-0081-y

[24] Okada T, Fukuda S, Hase K, et al. Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. *Nat Commun*. 2013;4(April):1654. doi:10.1038/ncomms2668

[25] Rodríguez-Colman MJ, Schewe M, Meerlo M, et al. Interplay between metabolic identities in the intestinal crypt supports stem cell function. *Nature*. 2017. doi:10.1038/nature21673

[26] Lee YS, Kim TY, Kim Y, et al. Microbiota-Derived Lactate Accelerates Intestinal Stem-Cell-Mediated Epithelial Development. *Cell Host Microbe*. 2018;24(6):833-846.e6. doi:10.1016/j.chom.2018.11.002

[27] Watanabe T, Nishio H, Tanigawa T, et al. Probiotic Lactobacillus casei strain Shirota prevents indomethacin-induced small intestinal injury: involvement of lactic acid. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;297(3):G506-G513. doi:10.1152/ajpgi.90553.2008

[28] Iraporda C, Romanin DE, Bengoa AA, et al. Local treatment with lactate prevents intestinal inflammation in the TNBS-induced colitis model. *Front Immunol*. 2016;7(DEC). doi:10.3389/fimmu.2016.00651

[29] O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(9):553-565. doi:10.1038/nri.2016.70

[30] Pearce EL, Pearce EJ. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity*. 2013;38(4):633-643. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.005

[31] Klein Geltink RI, Kyle RL, Pearce EL. Unraveling the Complex Interplay Between T Cell Metabolism and Function. *Annu Rev Immunol*. 2018;36(1):461-488. doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053019

[32] Jha AK, Huang SCC, Sergushichev A, et al. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity*. 2015;42(3):419-430. doi:10.1016/j.immuni.2015.02.005

[33] O'Neill LAJ. A Broken Krebs Cycle in Macrophages. *Immunity*. 2015;42(3):393-394. doi:10.1016/j.immuni.2015.02.017

[34] Kennedy KM, Scarbrough PM, Ribeiro A, et al. Catabolism of Exogenous Lactate Reveals It as a Legitimate Metabolic Substrate in Breast Cancer. *PLoS One*. 2013;8(9). doi:10.1371/journal.pone.0075154

[35] Haas R, Smith J, Rocher-Ros V, et al. Lactate regulates metabolic and proinflammatory circuits in control of T cell migration and effector functions. *PLoS Biol*. 2015;13(7):1-24. doi:10.1371/journal.pbio.1002202

[36] Ratter JM, Rooijackers HMM, Hooiveld GJ, et al. In vitro and in vivo Effects of Lactate on Metabolism and Cytokine Production of Human Primary PBMCs and Monocytes. *Front Immunol*. 2018;9(November):2564. doi:10.3389/fimmu.2018.02564

[37] Ahmed K, Tunaru S, Tang C, et al. An Autocrine Lactate Loop Mediates Insulin-Dependent Inhibition of Lipolysis through GPR81. *Cell Metab*. 2010;11(4):311-319. doi:10.1016/j.cmet.2010.02.012

[38] Liu C, Wu J, Zhu J, et al. Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. *J Biol Chem*. 2009;284(5):2811-2822. doi:10.1074/jbc.M806409200

[39] Latham T, MacKay L, Sproul D, et al. Lactate, a product of glycolytic metabolism, inhibits histone deacetylase activity and promotes changes in gene expression. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(11):4794-4803. doi:10.1093/nar/gks066

[40] Garrote GL, Abraham AG, Rumbo M. Is lactate an undervalued functional component of

fermented food products? *Front Microbiol*. 2015;6:629. doi:10.3389/fmicb.2015.00629

[41] Wagner W, Ciszewski WM, Kania KD. L- and D-lactate enhance DNA repair and modulate the resistance of cervical carcinoma cells to anticancer drugs via histone deacetylase inhibition and hydroxycarboxylic acid receptor 1 activation. *Cell Commun Signal*. 2015;13:36. doi:10.1186/s12964-015-0114-x

[42] Zhang D, Tang Z, Huang H, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature*. 2019;574(7779):575-580. doi:10.1038/s41586-019-1678-1

14

Seguridad microbiológica de los alimentos fermentados

Patricia A. Barril
patricia.barril@conicet.gov.ar

- *Investigador Adjunto del CONICET, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria (CIATI), Neuquén, Argentina.*
- *Jefe de Trabajos Prácticos, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Comahue, Cipolletti, Río Negro, Argentina.*

Juan Martín Oteiza
juano@ciati.com.ar

- *Investigador Adjunto del CONICET, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria (CIATI), Neuquén, Argentina.*

Resumen

La fermentación es un proceso a través del cual un producto se transforma y cambia sus propiedades debido a la acción de microorganismos, presentes de forma natural o añadidos de forma intencional. El crecimiento y desarrollo de los microorganismos fermentativos en los alimentos genera, entre otras cosas, ácidos orgánicos y enzimas capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos deteriorantes y patógenos, resultando en una mejora en la seguridad alimentaria, entre otros beneficios de la fermentación.

Sin embargo, el potencial de la fermentación para controlar los efectos negativos de la posible contaminación alimentaria depende de múltiples factores, tales como el nivel inicial de contaminación de la materia prima, la higiene durante el proceso de elaboración, la acidificación, la actividad acuosa del alimento, la concentración de sal, la temperatura y el tiempo del proceso fermentativo, y el agregado de cultivos iniciadores, entre otros. Por lo tanto, los alimentos incorrectamente fermentados no están exentos de riesgos y pueden ser vehículos de microorganismos patógenos y/o de deterioro. En este sentido, si bien preparar alimentos fermentados tanto a nivel industrial como en pequeña escala (hogar) presenta

grandes beneficios, es recomendable contar tanto con el conocimiento como con la infraestructura adecuada para realizarlo de manera segura.

Para evitar la contaminación de los alimentos durante su preparación y almacenamiento, y así elaborar alimentos fermentados que sean inocuos, es recomendable considerar los siguientes aspectos:

1. Disponer de agua potable y materias primas seguras y de calidad. Seleccionar proveedores confiables.

2. Mantener la limpieza de las manos, materias primas y superficies donde se trabajará.

3. Separar los alimentos crudos y cocidos a los fines de evitar contaminación cruzada.

4. Pasteurizar los alimentos que así lo requieran.

5. Mantener los alimentos a temperaturas seguras.

6. Utilizar materiales de grado alimenticio para evitar posibles contaminaciones, transferencias, o migraciones de compuestos desde el envase al alimento.

7. Trabajar con cultivos iniciadores adecuados a los fines de evitar fermentaciones no controladas las cuales pueden resultar en productos fermentados potencialmente peligrosos para la salud.

8. Cuando el tipo de alimento lo permita, adicionar concentraciones adecuadas de sal ya que, dependiendo de las circunstancias, una disminución en la actividad acuosa reducirá el potencial de crecimiento microbiano.

9. Controlar tiempos, temperaturas y condiciones de fermentación.

10. En caso de productos destinados a la venta, incluir en el rótulo toda la información requerida en la legislación vigente.

En resumen, la utilización de aguas y materias primas seguras, el monitoreo del pH, temperatura, actividad acuosa y tiempos de fermentación, así como la implementación de buenas prácticas de fermentación (incluyendo el posible tratamiento térmico) y contar con las habilitaciones correspondientes (cuando sea necesario) resultan en las claves para la elaboración de alimentos fermentados seguros tanto a nivel industrial como en el hogar.

I. Introducción y conceptos generales

Desde hace miles de años, el hombre se ha encontrado con el problema de cómo conservar los alimentos durante períodos prolongados. Con el correr del tiempo, el masivo crecimiento de la población mundial y su desplazamiento desde el campo a las ciudades ha hecho que la necesidad de preservar los alimentos sea cada vez mayor.

Por muchos motivos, la industria alimentaria de hoy en día no puede basarse en técnicas artesanales para elaborar y conservar alimentos destinados a la venta. Es por ello que, para que sean estables, puedan almacenarse y transportarse con facilidad, tengan sabor agradable, mantengan las propiedades nutricionales y conserven las características de los productos frescos originales, recurre a métodos confiables y seguros de conservación, siendo la fermentación uno de ellos (la cual también es aplicada mundialmente a nivel doméstico y/o artesanal hace cientos de años).

Para avanzar con el desarrollo del presente capítulo, resulta apropiado definir los siguientes conceptos, que facilitarán la comprensión de las ideas que aquí se exponen:

- Microorganismos patógenos: aquellos que son capaces de provocar enfermedades infecciosas en el organismo en el cual se encuentran. Según la *Gut Microbiota for Health* [1], este término se emplea normalmente para describir agentes biológicos infecciosos como virus, bacterias y mohos, entre otros, que pueden interrumpir la fisiología normal de plantas, animales o humanos. Cabe destacar que el crecimiento de estos microorganismos puede no modificar las características organolépticas del alimento ingerido, con lo cual resulta casi imposible inferir su presencia en un producto. Algunos ejemplos de microorganismos patógenos son: *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* patogénicas, *Salmonella enteritidis*, y *Clostridium botulinum*, entre otros.

- Microorganismos de deterioro: aquellos que, como consecuencia de su desarrollo, producen una alteración negativa en un alimento que afecta sus características organolépticas, su valor nutricional, y/o su estado higiénico convirtiendo al producto en inadecuado para su consumo. Resulta importante diferenciar el "deterioro y/o putrefacción" de la "fermentación", ya que, si bien en ambos ocurre un desarrollo microbiano, la putrefacción tiene como resultado cambios indeseables (hidrólisis de hidratos de carbono, lipólisis y oxidación de lípidos, desnaturalización de proteínas, deterioro de pigmentos y vitaminas, producción de compuestos no deseables, entre otros) a diferencia de lo que ocurre en la fermentación.

- Fermentos, cultivos iniciadores o "*starters*": preparaciones microbianas de cepas seleccionadas que se adicionan intencionalmente a una matriz alimentaria para poner en marcha el proceso de fermentación. Desde el

punto de vista de la composición, se pueden clasificar en los siguientes dos grupos.

- Cultivos iniciadores de composición conocida: los cuales pueden estar compuestos tanto por un cultivo único, el cual está constituido por una única cepa, como por un cultivo múltiple, formado por una mezcla definida de cultivos puros (cepas de diferentes especies o diferentes cepas de una misma especie). Como ejemplo se menciona los cultivos iniciadores utilizados para la elaboración de yogurt.

- Cultivos iniciadores de composición desconocida o parcialmente conocida: los cuales están constituidos por una mezcla indefinida de distintos tipos de microorganismos (bacterias y levaduras). Como ejemplo se menciona a los gránulos de kefir o el SCOBY empleado para la elaboración de kombucha. Dentro de las funciones de los cultivos iniciadores se mencionan: asegurar la calidad microbiológica del producto, evitando el desarrollo de microorganismos patógenos y de deterioro; favorecer el desarrollo de color y la estabilización del producto; contribuir con la formación de aromas y sabores; mejorar la consistencia del producto; y generar productos estandarizados con características organolépticas semejantes entre lotes, entre otras.

- **Peligro:** agente biológico, físico, químico o propiedad de un alimento que puede tener efectos adversos sobre la salud. El peligro biológico representa el mayor riesgo a la inocuidad de los alimentos. Entre estos, se incluyen organismos como bacterias, virus y parásitos. La identificación de los peligros y la asociación con determinados productos alimentarios, se lleva a cabo gracias al conocimiento científico, a las legislaciones, y/o a las experiencias de la industria alimentaria y de los consumidores.

- **Riesgo**: probabilidad de ocurrencia de un efecto adverso como consecuencia de la presencia de un peligro.

- **Percepción de riesgo**: juicio subjetivo que las personas hacen sobre las características y la gravedad de un riesgo. Aparece cuando existe más de un resultado posible como consecuencia de una acción y uno o más de estos resultados es considerado desfavorable, peligroso o indeseable por algún motivo. La percepción de riesgo determina cómo las personas reaccionan ante un peligro [2]. Estudios realizados por Aparici y colaboradores [3] ponen de manifiesto que los procesos sociales de construcción del riesgo alimentario resultan ser multifactoriales, diversos y que conjugan elementos a menudo paradójicos y que contradicen los conocimientos aportados por la ciencia.

- **Inocuidad**: según la Food and Agriculture Organization (FAO), es la ausencia, o niveles seguros y aceptables, de peligros en los alimentos que pueden dañar la salud de los consumidores [4]. La inocuidad es la seguridad de que el alimento no causará un efecto adverso en la salud del consumidor durante su elaboración y/o consumo.

Otra de las definiciones necesarias para continuar con el desarrollo del capítulo, es aquella que establece que la fermentación es un proceso a través del cual un producto se transforma y cambia sus propiedades organolépticas debido a la acción de ácidos orgánicos y/o enzimas segregadas por microorganismos en un ambiente, generalmente anaeróbico. La misma ocurre cuando ciertas bacterias, mohos, y/o levaduras, presentes de forma natural, o añadidas en forma intencional, encuentran un entorno propicio para proliferar gracias a los azúcares de los alimentos, generando productos que colaboran tanto con la estabilización y transformación como con la inocuidad de los alimentos, al inhibir el crecimiento de la mayoría de las bacterias patógenas y la formación de toxinas bacterianas. Asimismo, la OMS atribuye a los alimentos fermentados ciertos beneficios biológicos, químicos y nutricionales [5].

Por otra parte, para la FAO, la fermentación es una técnica de conservación de alimentos segura, económica, fácil y adecuada donde otros métodos son inaccesibles o no existen, como las conservas y la congelación. Dependiendo del tipo de fermentación que tenga lugar en un alimento (alcohólica, láctica, acética, maloláctica, propiónica y/o butírica, entre otras), son los subproductos y productos finales que se generan. Por citar un ejemplo, mediante la fermentación alcohólica del trigo se obtiene como producto final el pan, así como etanol y dióxido de carbono como subproductos, mientras que durante la fermentación láctica de la leche se obtiene como producto final el yogur y el ácido láctico como subproducto.

Como se ha visto a lo largo de los diferentes capítulos del presente libro, tanto cereales como productos cárnicos, lácteos, frutas, vegetales, y bebidas entre otros, son susceptibles de ser fermentados a pequeña o gran escala.

En términos históricos, el desarrollo de las técnicas de fermentación se inició mediante ensayos de prueba y error, mucho antes de que se conociera el papel de los microorganismos. Debido a los diferentes hábitos particulares de cada región, las prácticas de preparación de alimentos fermentados como así también el tipo y la calidad de las materias primas empleadas, entre otros parámetros, suelen ser diferentes. En el proceso de fermentación se encuentran involucradas numerosas variables, incluidos los microorganismos, los ingredientes nutricionales y las condiciones ambientales. Estas variables, y la combinación de ellas, dan lugar a numerosas variantes de alimentos fermentados, tales como la leche fermentada, el yogur, la cerveza, la kombucha, el kefir, el chucrut, el kimchi y los embutidos fermentados, entre otros.

Desde el punto de vista de los cultivos iniciadores existen varios métodos a través de los cuales se fermentan los alimentos. Por un lado, la fermentación natural (o no controlada desde el punto de vista microbiológico), la cual es llevada a cabo por los

microorganismos que están presentes de manera constitutiva, tanto en los alimentos que se van a fermentar como en el entorno de procesamiento. El chucrut, el kimchi y ciertos productos de soja fermentados, generalmente son elaborados de esta manera. Este tipo de fermentaciones tiene, entre otras, la limitación de no poder lograr obtener lotes estandarizados de producción. Otra limitación en este tipo de fermentación de alimentos suele ser el tiempo que implica el procesamiento de los mismos. En el hogar, muchas veces, la falta de tiempo puede llevar a intentar acelerar el proceso de fermentación o a acortar los tiempos del mismo. Sin embargo, esto puede acarrear consecuencias significativas en cuanto a la seguridad y calidad nutricional de los alimentos fermentados, ya que el tiempo ahorrado al acortar los períodos de fermentación puede poner en peligro la efectividad de la acidificación por parte de las bacterias ácido lácticas, o la degradación de toxinas de plantas y factores anti-nutricionales por parte de enzimas relevantes. Por este motivo, en el contexto industrial, tanto el tiempo de fermentación como la temperatura son parámetros finamente controlados y estandarizados.

Por otro lado, la fermentación puede llevarse a cabo mediante la adición de cultivos iniciadores (fermentación controlada desde el punto de vista microbiológico), en la cual la composición microbiana del "*starter*" es conocida. Esto resulta de importancia ya que es una alternativa segura que permite disminuir los tiempos de fermentación, y posee un papel crucial tanto en la estabilización microbiológica del producto, como en la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos, como es el caso de los productos cárnicos curados. Este tipo de fermentaciones se emplea a nivel industrial (y en menor medida a pequeña escala) en la elaboración de productos lácteos (yogures, quesos, leches fermentadas, kefir comercial), vinagre, embutidos, pan, vino, y cerveza, entre otros.

Asimismo, existen alimentos fermentados tales como el kefir y la kombucha en los cuales la composición microbiana del cultivo iniciador se conoce parcialmente (fermentación semi controlada), pudiendo ser variable, dependiendo del tipo de cultivo y de la zona geográfica de elaboración, entre otros factores.

Si bien en la actualidad, la mayoría de las técnicas de producción de alimentos fermentados tradicionales no ha sufrido mayores cambios, a pesar de los grandes avances en la microbiología, la biología molecular y la tecnología de alimentos [6], es necesario contar tanto con sistemas de control de calidad adecuados, así como la implementación de buenas prácticas de elaboración acordes a los productos preparados. Estos aspectos deben ser considerados tanto por las industrias elaboradoras de alimentos fermentados, como también por los elaboradores que realizan fermentaciones artesanales o a pequeña escala (hogar). La educación de los manipuladores de alimentos es crucial a la hora de prevenir Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs), siendo la inocuidad algo que se debe trabajar tanto a nivel industrial como a pequeña escala.

II. Seguridad microbiológica de los alimentos fermentados

Como se mencionó antes, los peligros potenciales en los alimentos se pueden clasificar como físicos, químicos o biológicos. Los biológicos son los que representan el mayor riesgo para la inocuidad alimentaria. Bacterias y sus toxinas, virus y parásitos pueden estar presentes de forma natural tanto en la materia prima como en el ambiente de elaboración. Asimismo, algunos de ellos pueden generarse durante el proceso de elaboración como resultado del crecimiento microbiano no controlado (como las aminas biogénicas) [7]. En otros casos, ciertos peligros biológicos están asociados con frecuencia a manipuladores de alimentos, como por ejemplo la presencia de la bacteria *Staphylococcus aureus*.

Si bien el concepto de "manipulador de alimentos" generalmente está dirigido a aquellas personas que por cuestiones laborales tienen algún tipo de intervención en la cadena alimentaria, ya sea durante la preparación, fabricación, transformación, envasado, almacenamiento, distribución, y/o comercialización, antes de llegar al consumidor, el concepto tiene relevancia, sin lugar a dudas, también en los hogares, ya que la contaminación de un alimento puede producirse en cualquier momento de la cadena alimentaria.

La preparación y manipulación de alimentos son factores claves en el desarrollo de las ETAs. De acuerdo a estadísticas elaboradas por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de ETAs, aproximadamente el 40% de los brotes reportados en la Argentina tienen su origen en el hogar [8]. Este fenómeno se debe fundamentalmente a la ausencia de normas de higiene, así como al inadecuado aseo de las personas que manipulan los alimentos en el lugar de preparación. En este sentido resulta importante tomar conciencia que la correcta manipulación, fermentación y almacenamiento de los alimentos fermentados es un recurso indispensable para evitar todo tipo de enfermedades alimentarias.

Las mejoras en la seguridad alimentaria de los productos fermentados se deben, mayormente, a la actividad microbiana durante el proceso fermentativo. Una gran variedad de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) se requieren para elaborar la diversidad de productos fermentados que se consumen en el mundo, siendo las bacterias ácido lácticas las que se utilizan con mayor frecuencia (por ejemplo, para la producción de yogures, leches fermentadas, chucrut, olivas, embutidos y encurtidos, entre otros). En la elaboración de pan y bebidas alcohólicas se utilizan levaduras, típicamente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales convierten la glucosa en etanol y dióxido de carbono. En ciertas fermentaciones, como en la producción de queso azul y salsas de soja, también se utilizan mohos. El crecimiento y desarrollo de los microorganismos fermentativos en los alimentos genera, entre otras cosas, ácidos orgánicos y péptidos antimicrobianos capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y de deterioro. Esta inhibición puede actuar mediante el retraso o detenimiento del crecimiento de los microorganismos patógenos y/o alterantes, o a través de la inactivación o muerte de estos microorganismos. Ambos

procedimientos pueden resultar en una mejora en la seguridad de los alimentos.

Sin embargo, a pesar de que se conoce que la fermentación inhibe el crecimiento de bacterias patógenas y formación de toxinas bacterianas, el potencial de la fermentación para controlar los efectos nocivos de la contaminación alimentaria depende de factores tales como el nivel inicial de contaminación de la materia prima, el nivel de higiene durante el proceso, la acidificación, la actividad acuosa (a_w), la concentración salina, la temperatura y el tiempo del proceso fermentativo, y el agregado de cultivos iniciadores, entre otros [5].

Existen microorganismos patógenos que pueden ser resistentes al pH y la acidez presentes durante la fermentación, pero que pueden ser destruidos en otras etapas del proceso de elaboración de alimentos, como por ejemplo mediante la cocción, salazón o secado parcial. En este sentido, si bien la fermentación ha sido considerada históricamente como una práctica segura, por sí sola no puede eliminar todos los riesgos para la salud relacionados con los alimentos, y no debe verse como un reemplazo de las prácticas básicas de higiene alimentaria [9]. Compuestos como los plaguicidas o las micotoxinas que pudieran estar presentes en algunos alimentos, por ejemplo, seguirán estando presentes al finalizar el proceso de fermentación si no son eliminados con anterioridad. Resulta importante destacar que los alimentos fermentados no están exentos de riesgos. Cuando la fermentación es incorrecta, éstos pueden ser vehículos de bacterias patógenas tales como *L. monocytogenes, E. coli* patogénicas, *S. enteritidis, S. aureus*, y *C. botulinum*, entre otros. A nivel industrial, la implementación de sistemas integrados de gestión de calidad e inocuidad de los alimentos, así como las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), los sistemas de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC, o HACCP, por sus siglas en inglés), y los estándares de inocuidad alimentaria (por ejemplo, la implementación de la norma ISO 22.000), garantizan la obtención de productos inocuos para uso humano desde el comienzo de la cadena agroalimentaria.

Los alimentos fermentados resultan importantes para una dieta saludable, ya que tienen el potencial de mejorar la calidad y diversidad de la microbiota, están relacionados con un menor riesgo de enfermedades infecciosas y crónicas no transmisibles y pueden proporcionar nutrientes esenciales, entre otros beneficios. Se informa constantemente a los consumidores acerca de estos beneficios y de lo fácil que resulta fermentar alimentos, lo que implica un resurgir de la fermentación de productos en el hogar. Sin embargo, pocas veces se mencionan los riesgos asociados a las fermentaciones caseras.

Si bien preparar alimentos fermentados tanto a nivel industrial como en pequeña escala sin dudas puede ser una buena idea, es recomendable contar con el conocimiento adecuado para hacerlo de manera segura, un aspecto abordado históricamente por la industria de alimentos.

III. Sugerencias para elaborar alimentos fermentados seguros

En su documento titulado "Manual sobre las Cinco Claves para la Inocuidad de los Alimentos", la OMS establece recomendaciones para evitar la contaminación de los alimentos durante su preparación y almacenamiento [10]. Estas recomendaciones, aplicadas a los alimentos fermentados, son las que se enuncian a continuación.

III.A. Utilizar agua y materias primas seguras

Disponer de agua potable (incluye al hielo), segura y de calidad es fundamental para la producción de alimentos inocuos. En nuestro país, el Código Alimentario Argentino (CAA) establece una serie de normas de calidad para el agua potable, que van desde aspectos microbiológicos, a químicos y organolépticos [11]. El objetivo es proteger la salud de los consumidores, ya que la misma podría contener tanto peligros microbiológicos como peligros químicos, lo que hace necesario tener conocimiento de su aptitud para elaborar y procesar alimentos. Si existen dudas respecto a la calidad del agua de consumo, se recomienda hervirla hasta que salgan burbujas durante al menos 5 minutos, o agregar dos gotas de hipoclorito de sodio concentrado por cada litro de agua (si la solución concentrada posee 50-60 g/litro de cloro activo, esto da como resultado una concentración final de 5-6 mg de cloro activo por litro de agua) contenida en un recipiente limpio y preferentemente con tapa, mezclando adecuadamente y dejándola reposar durante al menos 30 minutos antes de utilizarla.

Respecto de las materias primas, el primer paso es elegir los proveedores y definir los parámetros de calidad que se desean para los alimentos. Durante esta fase se define una mayor o menor calidad del producto final. Para esta selección el criterio se basa en el marco legal actual, es decir, las condiciones que dicta la ley, además de los aspectos organolépticos que se deseen. Posteriormente, se recomienda realizar una inspección y clasificación previa de los insumos a los fines de descartar aquellos que se encuentren dañados o con signos visibles de deterioro. Esta primera selección puede ayudar a excluir, por ejemplo, carne en descomposición, fruta dañada o mohosa, granos infectados por mohos, entre otros. El Codex Alimentarius [12] destaca la necesidad de impedir, en la medida en que sea razonablemente posible, el deterioro y la descomposición de las materias primas, aplicando medidas como el control de la temperatura, la humedad, y/u otros controles. Asimismo, establece la necesidad de proteger los alimentos y los ingredientes de la contaminación de plagas o de contaminantes químicos, físicos o microbiológicos, así como de otras sustancias objetables durante la manipulación, el almacenamiento y el transporte.

En caso de trabajar con productos lácteos, de manera de garantizar su inocuidad, es indispensable utilizar siempre alimentos ya procesados, como por ejemplo leche pasteurizada. No se debe utilizar leche cruda, ya que puede albergar microorganismos peligrosos, tales como *Salmonella* spp., *E. coli* patogénicas, *L. monocytogenes,* y *Brucella* spp. entre otros, que pueden representar serios riesgos para la salud del

consumidor [13]. Cabe destacar que la venta al público de leche cruda, de cualquier especie, se encuentra expresamente prohibida por la legislación argentina actual (artículo 556 bis del CAA) [11].

En todos los casos, se debe verificar la fecha de vencimiento y/o consumo preferente de la materia prima empleada para la elaboración de los alimentos fermentados, y no utilizar alimentos después de dicha fecha.

Cuando la elaboración de los productos fermentados sea con fines de comercialización, es necesario contar con un registro de materias primas que incluya, entre otras, la siguiente información:

- Nombre del productor y/o proveedor
- Identidad y cantidad de cada lote de materias primas
- Fecha de producción y adquisición
- Calidad microbiológica y fisicoquímica de las materias primas empleadas

Una correcta elección de las materias primas significa un menor riesgo de intoxicación alimentaria, una mayor calidad y vida útil del producto final, así como un menor número de desperdicios. Si bien la fermentación ayuda a conservar los alimentos frescos por más tiempo, no rescatará aquellos productos en mal estado.

III.B. Mantener la limpieza

La limpieza es el factor clave para prevenir las ETAs. Todo aquello que tenga contacto con los alimentos debe estar limpio. En este contexto resulta importante diferenciar dos conceptos: la **limpieza**, que es la eliminación de todos los residuos visibles que pueden servir de alimento para los microorganismos, y la **desinfección**, que es la eliminación de los microorganismos patógenos y la disminución del número de microorganismos que puedan estar presentes. En la elaboración de alimentos existen puntos críticos de contaminación, etapas del procedimiento, lugares u operaciones en las cuales los alimentos están más predispuestos a contaminarse o alterarse. Las buenas prácticas de higiene pueden ayudar a controlar estos puntos críticos y así mejorar la calidad microbiológica de los productos fermentados.

Una de estas prácticas, de particular relevancia, es el **correcto lavado de manos**, el cual debe realizarse, con agua potable caliente y jabón líquido antes de manipular los alimentos (ver Tabla 1). Este procedimiento debe repetirse después de ejecutar algún tipo de actividad donde se puedan haber contaminado las manos y al terminar de elaborar los alimentos. El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) recomienda lavar las manos especialmente durante ciertos momentos claves en que existen más probabilidades de contraer y propagar

microorganismos (ver Tabla 2) [14].

El lavado de manos con agua y jabón es la forma más eficaz de eliminar microorganismos. Sin embargo, en caso de no disponer inmediatamente de estos elementos, puede utilizarse un desinfectante de manos que contenga al menos un 60 % de alcohol. De todos modos, si bien la alternativa de utilizar desinfectantes ayuda a disminuir la carga microbiana, no elimina todos los tipos de microorganismos ni tampoco las sustancias químicas perjudiciales, como pesticidas y metales pesados [14].

Tabla 1. Forma correcta de lavarse las manos.

1.	Arremangarse hasta el codo
2.	Enjuagarse hasta el antebrazo
3.	Enjabonarse cuidadosamente
4.	Frotarse las manos con el jabón hasta que haga espuma
5.	Frotarse la espuma por el dorso de las manos, entre los dedos y debajo de las uñas
6.	Enjuagarse con agua limpia para eliminar el jabón
7.	Secarse preferentemente con toalla de papel o al aire

Tabla 2. Cuándo lavarse las manos.

Antes de	Durante	Después de
Tocar materia prima	Preparación de alimentos	Manipular alimentos crudos (carne, pescado, pollo, huevos)
Preparar alimentos		Ir al baño
Comer		Jugar en el parque
Cuidar a alguien que tenga vómitos o diarrea		Cuidar a alguien que tenga vómitos o diarrea
Tratar una cortadura o una herida		Tratar una cortadura o una herida
		Cambiar pañales o limpiar a un niño que haya ido al baño
		Sonarse la nariz, estornudar, rascarse o toser
		Tocar a un animal, alimento para animales o excrementos de animales
		Tocar la basura

III.B.1. Lavar y desinfectar las materias primas que se utilizarán

Los patógenos microbianos pueden estar asociados a la superficie de frutas y verduras como resultado de la contaminación en el campo o durante las etapas de cosecha y post-cosecha. *Bacillus cereus, C. botulinum* y *L. monocytogenes* pueden estar presentes de forma natural en el suelo y dar lugar a la contaminación de frutas y

vegetales, mientras que otros microorganismos, como ciertos virus y bacterias tales como *Salmonella* spp., *E. coli* y *Shigella* spp., pueden ser de origen entérico, alcanzando a este tipo de alimentos a través del abono o riego con aguas residuales deficientemente tratadas o sin tratar. En este sentido, el lavado de las frutas y verduras resulta de utilidad para reducir la carga microbiana. Sin embargo, no garantiza la completa eliminación de los peligros. La eficacia del lavado puede mejorarse a través de la incorporación de agentes antimicrobianos al agua de lavado, como por ejemplo hipoclorito de sodio. Se debe tener presente que la limpieza y desinfección es el comienzo y no el final del procesamiento de alimentos.

III.B.2. Trabajar sobre superficies limpias

Se recomienda lavar y desinfectar las superficies (mármol, mesas, etc.) y contenedores que se utilizarán, con agua caliente y jabón, y enjuagar con abundante agua caliente antes de usarlas. Asimismo, es necesario mantener limpios y desinfectados los equipos y utensilios que se utilizarán para la preparación de los alimentos fermentados (tablas de cortar, cuchillos, cucharas, entre otros). No se deben utilizar escobas, escurridores, cepillos, baldes, esponjas, trapos usados para limpiar pisos, desagües y paredes, sobre superficies que estén en contacto con alimentos. Los elementos de limpieza utilizados en baños no se deben utilizar en áreas de producción. Los paños de cocina se deben lavar con frecuencia y reemplazarlos cuando sea necesario.

III.B.3. Proteger los alimentos y las áreas de elaboración de las plagas, mascotas y otros animales

Se define como plagas a todos aquellos animales que compiten con el hombre en la búsqueda de agua y alimentos, invadiendo los espacios en los que se desarrollan las actividades humanas. Los mismos pueden dañar estructuras o bienes, y constituyen uno de los más importantes vectores para la propagación de ETAs. Las plagas más comunes asociadas a la elaboración de alimentos son los insectos (cucarachas, hormigas, moscas), roedores, y aves. Resulta importante que tanto a nivel industrial como en el hogar donde se elaboran alimentos fermentados, se cuente con un sistema eficiente de control y manejo integrado de plagas. El mismo debe poseer un enfoque sistemático, basado en buenas prácticas de limpieza, inspección y vigilancia junto a métodos de control físicos y químicos, así como una buena gestión del entorno.

Una buena herramienta para evitar la propagación de plagas en el sector de la alimentación es la guía "*Pest Control in the Food Industry*", publicada por el *Chartered Institute of Environmental Health* (Reino Unido) [15], en la que, además de explicarse los principios del control de plagas en el sector, se realiza una descripción del comportamiento de aquellas plagas que más comúnmente afectan a la industria alimentaria.

III.C. Separar alimentos crudos y cocidos

Los alimentos crudos pueden estar contaminados con microorganismos y trasladarse a los alimentos cocidos o listos para consumir. Este proceso se conoce como contaminación cruzada, y puede realizarse de manera directa o indirecta.

La contaminación cruzada **directa** ocurre cuando un alimento contaminado entra en "contacto directo" con uno que no lo está o cuando los contaminantes llegan al alimento por medio de la persona que los manipula. Por ejemplo, si se mezclan alimentos que no fueron lavados junto a otros que no están contaminados, o cuando un manipulador estornuda sobre el alimento que está elaborando.

Por otra parte, la contaminación cruzada **indirecta** se entiende como el paso de un peligro presente en un alimento a otro que se encontraba inocuo, utilizando como vehículo superficies o utensilios que han estado en contacto con ambos alimentos sin la debida limpieza y desinfección requerida (utensilios de cocina, tablas, equipos de cocina, etc.). Por ejemplo, el empleo de un cuchillo que se utilizó para cortar carne cruda y que luego se emplea para cortar verduras.

Para evitar la contaminación cruzada se recomienda:

- Separar siempre los alimentos crudos de los cocidos y de los listos para consumir.
- Conservar los alimentos en recipientes cerrados, separados para evitar el contacto entre crudos y cocidos.
- Usar equipos y utensilios diferentes, como cuchillos o tablas de cortar, para manipular alimentos crudos y cocidos.

III.D. Tratar térmicamente los alimentos que así lo requieran

Ciertos alimentos pueden requerir de una etapa de tratamiento térmico antes o después del proceso de fermentación, ya sea para detener y/o ralentizar el proceso, como para eliminar la posible presencia tanto de microorganismos patógenos resistentes a la acidez, como de microorganismos de deterioro (por ejemplo, bacterias y mohos).

Este es el caso de, por ejemplo, la kombucha. De acuerdo con un estudio publicado por Nummer [16], el mejor método de conservación de este alimento fermentado es la pasteurización, la cual evitará tanto la acumulación de dióxido de carbono como de alcohol en la botella. Una recomendación simple es calentar la kombucha a 82,2 °C y embotellar inmediatamente. Después de 30 segundos, invertir la botella y sostenerla por otros 30 segundos. Otro ejemplo de alimento fermentado en donde se recomienda el empleo de pasteurización como método de conservación es el chucrut. El CAA en su capítulo XI (artículo 976) establece que, si el chucrut se presenta

en envases cerrados herméticamente, deberá someterse al proceso de esterilización industrial [11]. Asimismo, países como Alemania, España y Uruguay definen a la pasteurización como uno de los procesos aplicables para la conservación de encurtidos vegetales con el objetivo de aumentar su seguridad microbiológica.

Por otra parte, en el ámbito industrial, la leche utilizada para la elaboración del yogur es sometida a un doble tratamiento térmico previo al agregado de los cultivos iniciadores, lo que asegura la inocuidad de estos productos, en este caso la viabilidad de las bacterias benéficas no se ve alterada, ya que la fermentación es posterior al tratamiento térmico de la leche.

III.E. Mantener los alimentos a temperaturas seguras

Se conoce como "zona de peligro" al rango de temperaturas comprendidas entre los 4 °C y 60 °C. En estas condiciones, los microorganismos patógenos o deteriorantes encuentran un espacio ideal para reproducirse, dañando la calidad de los alimentos y poniendo en riesgo la salud de los consumidores. Por lo tanto, los productos frescos, crudos y cocidos, no deben permanecer a temperatura ambiente por más de dos horas. Evitar que los alimentos se encuentren dentro de la zona de peligro es un esfuerzo que se debe mantener durante todo el proceso de producción de alimentos fermentados (sobre todo en el hogar). Controlar la temperatura en cada etapa será crucial para ofrecer la máxima seguridad alimentaria al consumidor.

Se recomienda refrigerar lo más pronto posible los alimentos cocidos y los perecederos (preferentemente a temperatura inferior a los 4 °C). Por otra parte, se debe tener en cuenta que todos los alimentos poseen una fecha de vencimiento. Es por ello que se recomienda no guardar los alimentos por demasiado tiempo, aunque sea a temperatura de refrigeración.

Adicionalmente a las claves de la OMS orientadas a la elaboración de alimentos inocuos, para la elaboración de alimentos fermentados se pueden sumar otras recomendaciones (varias de ellas recomendadas por la *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP) [17]):

III.F. Utilizar materiales de grado alimenticio

El CAA define en su capítulo IV, a los utensilios, recipientes, envases, envolturas, aparatos y accesorios alimentarios, así como las características que deben cumplir los mismos para estar en contacto con alimentos [11].

El envase cumple diversas funciones de gran importancia: contener los alimentos, protegerlos del deterioro químico y físico, y brindar información a los consumidores sobre los productos. Preserva la forma y la textura del alimento que contiene, evita que pierda sabor o aroma, y prolonga el tiempo de almacenamiento.

En algunos casos, el material seleccionado para el envase puede afectar la calidad nutricional del producto. Un ejemplo son los envases de plástico donde los

monómeros no polimerizados y aditivos podrían pasar al alimento. Otro ejemplo son los envases de hojalata donde puede producirse la incorporación de elementos metálicos a los productos alimenticios. Varios de estos elementos pueden reaccionar con el ácido de los alimentos y conferir al producto un sabor o color extraño.

A los fines de evitar posibles contaminaciones, transferencias o migraciones de compuestos desde el envase al alimento, se deben utilizar como componentes de los envases aquellos que se encuentran autorizados para su uso por haber demostrado su inocuidad.

III.G. Utilizar cultivos iniciadores adecuados

En la fermentación controlada es fundamental utilizar un protocolo de trabajo estandarizado, que establezca las cantidades adecuadas de fermentos iniciadores, entre otros ingredientes. Confiar en la fermentación espontánea incrementa de algún modo el riesgo de fermentaciones no controladas causadas por bacterias, levaduras y mohos inadecuados, resultando productos fermentados potencialmente peligrosos para la salud, o de calidad mala o variable, aunque la fermentación no controlada es factible de ser llevada a cabo y obtener productos seguros, como en el caso del kimchi, chucrut o embutidos cárnicos, siempre y cuando se tengan en cuenta los aspectos discutidos en este capítulo.

Por otra parte, en algunos casos el empleo de cultivos iniciadores se traduce directamente en un aumento de la inocuidad de los productos fermentados. Por ejemplo, un estudio realizado por la Red de Seguridad Alimentaria del Conicet (RSA-Conicet) demostró que el empleo de cultivos iniciadores (bacterias ácido lácticas) en el proceso de elaboración de embutidos, reduce en al menos tres órdenes de magnitud la probabilidad de que los consumidores sufran listeriosis, en comparación con la no aplicación de los mismos. Asimismo, el pH alcanzado por la masa cárnica durante la fase de fermentación y el valor de a_w al final de la maduración del embutido fueron los factores de proceso que más impactaron sobre la probabilidad de que el producto generado cause enfermedad en los consumidores [18].

Cabe señalar que la RSA-Conicet (https://rsa.conicet.gov.ar/) es una unidad del Conicet, de referencia nacional e internacional, diseñada para contribuir en la resolución de temas prioritarios para el país en materia de Seguridad Alimentaria. Desarrolla y analiza información, con fundamento científico tecnológico, para que las autoridades responsables puedan definir políticas de gestión y el sector productivo se desarrolle armónicamente dentro de las recomendaciones establecidas. La misma busca interactuar con todos los investigadores del sistema de ciencia y técnica del país, no solamente del Conicet, sino también de otras instituciones (INTA, INTI, CONEA, universidades, etc) que estén vinculadas directa o indirectamente con la seguridad alimentaria.

En la pequeña escala, se debe prestar especial atención a los cultivos iniciadores que han sido "heredados", sobre todo los gránulos utilizados en la preparación del kefir de agua y leche, así como el scoby empleado en la preparación de la kombucha, ya que en

la mayoría de los casos no se dispone de registros vinculados con la calidad e inocuidad de los mismos. Por otro lado, no existe una forma rápida y económicamente viable para un consumidor cualquiera de saber, a priori, acerca de la funcionalidad e inocuidad de estos gránulos o complejos microbianos, sino que la recomendación es que los mismos sean provistos por alguien conocido, que los esté usando y consumiendo los productos con ellos elaborados (kefir de agua, kefir de leche, té de kombucha).

Es sabido que algunas bacterias lácticas pueden formar compuestos como las aminas biogénicas a partir de aminoácidos, las cuales pueden provocar problemas de salud como dolor de cabeza, caída de presión arterial, diarrea e incluso problemas cardíacos. Asimismo, el SCOBY podría presentar contaminación con mohos tales como Aspergillus spp. y Penicillium spp.

III.H. Adicionar una concentración salina adecuada

Los cambios en la actividad acuosa de un alimento pueden tener efectos profundos en los microorganismos contaminantes. Dependiendo de las circunstancias, una disminución en la a_w, producida por el secado o la adición de solutos (como la sal), reducirá el potencial de crecimiento microbiano, pero también podrá generar un aumento en la resistencia microbiana a condiciones adversas, mejorando potencialmente la supervivencia de ciertos microorganismos patógenos que pueden estar presentes en el alimento. Por el contrario, un aumento de la a_w se vincula con la capacidad de crecimiento de organismos previamente inactivos, permitiéndoles, en ciertos casos, alcanzar concentraciones que puedan causar daños a la salud, debido a su presencia y/o de sus toxinas. Bajo ciertas circunstancias, para garantizar la seguridad del proceso fermentativo resulta esencial adicionar las cantidades de sal indicadas en las recetas, sobre todo en productos vegetales fermentados.

III.I. Controlar tiempos, temperaturas y condiciones de fermentación

Es necesario dar el tiempo de fermentación adecuado. Intentar no interrumpir el proceso fermentativo para reducir la cantidad de oxígeno que alcanza a los alimentos de manera que no se desarrollen mohos y otros microorganismos indeseables. Todos los productos fermentados necesitan un tiempo determinado de fermentación para asegurar no solo las características organolépticas del producto final sino su inocuidad. Los tiempos son variables y propios de cada producto pudiendo ir desde horas (por ejemplo, la elaboración de pan, o de yogures a nivel industrial), días (por ejemplo, la elaboración de yogur o kefir en el hogar) hasta semanas (por ejemplo, la elaboración de vinos, chucrut, o embutidos).

Por otra parte, resulta importante controlar la temperatura de fermentación, ya que la misma puede permitir la destrucción de posibles patógenos e inhibir las bacterias de deterioro, siendo las mismas propias de cada tipo de alimento a fermentar. Mientras que una temperatura ambiente de 18-22 ºC puede ser adecuada para la

fermentación del chucrut, la temperatura óptima de fermentación del yogur es cercana a los 43°C [9]. Especial atención se debe tener en las fermentaciones realizadas en el hogar, debido a los cambios de temperatura ambiente que tienen lugar en invierno y verano (en caso de no utilizar una incubadora o cámara de incubación, se debe encontrar el lugar adecuado de la casa para llevar a cabo las fermentaciones en estas dos estaciones).

Asimismo, se debe procurar que el proceso de acidificación sea lo más rápido posible. Los microorganismos patógenos, generalmente, no pueden crecer en ambientes con alto contenido de ácido. Un pH de 4 es un objetivo seguro, el cual debe alcanzarse lo más rápido posible durante la fermentación para evitar el crecimiento de bacterias que pueden producir toxinas o sabores desagradables. Se debe tener presente que el contenido de ácido no protege la comida indefinidamente. Algunas levaduras y hongos pueden crecer en presencia de un elevado contenido de ácido. En todos los casos estos peligros se mitigan mediante el monitoreo y control de los niveles de pH durante la etapa de fermentación. El monitoreo aceptable se debe realizar mediante el empleo de un medidor de pH digital calibrado para mayor precisión, en comparación con el uso de tiras de pH de papel, las cuales no están recomendadas.

Además de la acidificación, el control microbiano se logra mediante la reducción de la a_w, generalmente mediante el salado y/o secado. Esto resulta de gran importancia durante la elaboración de embutidos fermentados. Es importante señalar que la carne cruda es una matriz particularmente peligrosa, que requiere aún más cuidado y atención cuando se realiza en casa.

III.J. Rotular los alimentos fermentados elaborados

Si bien es verdad que los alimentos producidos para consumo personal no tienen la obligación de ser rotulados, es recomendable que el envase cuente con información mínima como tipo de producto, fecha de elaboración, fecha de caducidad.

Por otra parte, si los productos fermentados estarán destinados a la comercialización, en cualquiera de sus formas, la legislación vigente establece la obligatoriedad de contar con un rotulado [11]. La información que figura en los rótulos de los alimentos es el principal medio de comunicación entre el consumidor y el elaborador [19]. Los consumidores han de saber qué hay en los alimentos que compran, sobre todo si son personas con problemas de intolerancias y alergias. El rótulo deberá contener la siguiente información:

-Fecha de duración del producto, indicando día y mes para los productos que tengan una duración mínima no superior a tres meses, y mes y año para aquellos que tengan una duración mayor a tres meses (la información debe estar impresa y no escrita a mano). Esta información no es necesaria para vinos, bebidas alcohólicas que contengan al menos 10% (v/v) de alcohol, vinagre, ni tampoco para productos de panadería y pastelería que, por la naturaleza de su contenido, se consuman por lo general dentro de las 24 horas siguientes a su fabricación.

- Lista de ingredientes (incluyendo los alérgenos).
- Contenidos netos.
- Identificación del origen, indicando nombre del fabricante, localidad y país.
- Nombre o razón social y dirección del importador, cuando corresponda.
- Identificación del lote: indicación en clave o lenguaje claro, impresa, grabada o marcada de forma indeleble, legible y visible, que permita identificar el lote al que pertenece el alimento.
- Preparación e instrucciones de uso del alimento, cuando corresponda.
- Rótulo nutricional.
- Número de registro o código de identificación del establecimiento elaborador ante el organismo competente, es decir el Registro Nacional de Establecimiento (RNE) y, opcionalmente, puede contener el número de Registro Nacional de Producto Alimenticio (RNPA).

Respecto de este último punto, resulta importante aclarar que una empresa con RNE y RNPA es aquella que cuenta con un establecimiento habilitado para la elaboración de alimentos y posee su producto registrado. La habilitación de un establecimiento constata que las normas generales sobre el lugar físico de elaboración son aptas para el desarrollo de productos comestibles o la actividad declarada (elaborar, fraccionar, distribuir). Una empresa sin el establecimiento habilitado no debería elaborar, manipular, procesar, fraccionar, distribuir ni comercializar alimentos [20].

Por último, dado que la compra de alimentos (fermentados y no fermentados) a través de internet (sitios web, redes sociales, plataformas de venta) cada vez es mayor, debido a las ventajas que aporta: es cómodo, no hay que salir de casa, se puede elegir entre varios productos, comparar los precios, etc., resulta importante tener en cuenta que estos alimentos deben cumplir con toda la legislación alimentaria vigente, así como con los requisitos de inocuidad. En muchos casos, estos productos carecen de todo tipo de registros (elaboración, almacenamiento, transporte) así como de trazabilidad y rotulado.

El elaborador debe saber que será el responsable de los alimentos que se comercialicen independientemente de la vía por la que se realice.

En resumen, en este capítulo del libro se mostró que la utilización de aguas y materias primas seguras, el monitoreo del pH, temperatura, actividad acuosa y tiempos de fermentación, así como la implementación de buenas prácticas de fermentación

(incluyendo el posible tratamiento térmico) y contar con las habilitaciones correspondientes (cuando sea necesario) resultan claves para la elaboración de alimentos fermentados seguros tanto a nivel industrial como en el hogar (ver Tabla 3). Como consumidores debemos ser inteligentes y responsables, capaces de identificar alimentos fermentados que sean seguros e inocuos.

Tabla 3. Recomendaciones para elaborar alimentos fermentados inocuos.

• Utilizar agua y materias prima seguras
• Mantener la limpieza: Correcto lavado de manos Lavar y desinfectar materias primas Trabajar sobre superficies limpias Proteger los alimentos y superficies de plagas, mascotas y otros animales
• Separar alimentos crudos y cocidos
• Tratar térmicamente alimentos que así lo requieran
• Mantener los alimentos a temperaturas seguras
• Utilizar materiales de grado alimenticio
• Trabajar con cultivos iniciadores adecuados, en el caso que el alimento así lo requiera (yogur, kefir, kombucha)
• Adicionar concentraciones adecuadas de sal, cuando el alimento lo permita (chucrut, embutidos).
• Controlar tiempos, temperaturas y condiciones de fermentación
• Rotular los productos elaborados

IV. Declaración de posibles conflictos de interés

Juan Martín Oteiza ha llevado adelante tareas de vinculación y transferencia de conocimiento con diversas empresas productoras de alimentos, desde el 2009 en adelante.

V. Bibliografía citada

[1] GUT MICROBIOTA FOR HEALTH (GMFH).
https://www.gutmicrobiotaforhealth.com/es/glossary/agente-patogeno/. Fecha de último acceso 5 de Diciembre del 2019.

[2] Luna-carrasco J., Signorini-Porchietto M., Díaz-García R., Ordoñez-Méndez L.B. 2009. El análisis de riesgos en alimentos. ILSI México. ISBN: 978-607-00-1385-0, p. 43.

[3] Zafra Aparici E., Muñoz García A., Larrea-Killinger C. 2016. ¿Sabemos lo que comemos?:

Percepciones sobre el riesgo alimentario en Cataluña, España. Salud colectiva, 12(4): 505-518.

[4] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). http://www.fao.org/food-safety/es/. Fecha de último acceso 5 de Diciembre del 2019.

[5] Motarjemi Y., Nout M.J.R. 1996. Food fermentation: a safety and nutritional assessment. Bulletin of the World Health Organization, 74 (6): 553-559.

[6] Wacher Rodarte C. 2014. La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados. Revista Digital Universitaria Vol. 15, N°8. ISSN: 1607-6079. Disponible en: http://www.revista.unam.mx/vol.15/num8/art64/index.html.

[7] Halász Á., Baráth A., Holzapfel W.H. 1999. The influence of starter culture selection on sauerkraut fermentation. European Food Research and Technology, 208, 434–438.

[8] Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Presidencia de la Nación. http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Nutricion/inocuidad_de_alimentos.php. Fecha de último acceso 9 de Diciembre del 2019.

[9] Seguretat Alimentària i Seguretat de l'Aigua.

https://saia.es/como-fermentar-alimentos-con-seguridad-consejos/. Fecha de último acceso 9 de Diciembre del 2019.

[10] Organización Mundial de la Salud (OMS) 2007. Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de los alimentos. https://www.who.int/foodsafety/publications/consumer/manual_keys_es.pdf. Fecha de último acceso 10 de Diciembre del 2019.

[11] Código Alimentario Argentino. https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario. Fecha de último acceso 11 de Diciembre del 2019.

[12] Codex Alimentarius. 1999. CAC/RCP 1-1969 Código Internacional de Prácticas Recomendadas para Principios Generales de Higiene de los Alimentos, rev. 1997, ad. 1999.

[13] Food and Drug Administration (FDA). https://www.fda.gov/media/119384/download. Fecha de último acceso 10 de Diciembre del 2019.

[14] Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). El lavado de las manos: Las manos limpias salvan vidas.

https://www.cdc.gov/handwashing/esp/when-how-handwashing.html. Fecha de último acceso 12 de Diciembre del 2019.

[15] Pest control procedures in the food industry. Chartered Institute of Environmental Health. https://higieneambiental.com/sites/default/files/images/pdf/Pest_control_food_industry.pdf. Fecha de último acceso 10 de Diciembre del 2019.

[16] Nummer B.A. 2013. Kombucha Brewing Under the Food and Drug Administration Model Food Code: Risk Analysis and Processing Guidance. Journal of Environmental Health, 76 (4): 8-11.

[17] International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP).

https://isappscience.org/suggestions-making-safe-fermented-foods-home/. Fecha de último acceso 11 de Diciembre del 2019.

[18] Red de Seguridad Alimentaria- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (RSA-CONICET). Evaluación de riesgos de Listeria monocytogenes en chacinados embutidos secos y salazones crudas.

https://rsa.conicet.gov.ar/wp-content/uploads/2018/04/Informe-Final-2-ECR-Listeria-en-embutidos-y-salazones-RSA.pdf. Fecha de último acceso 11 de Diciembre del 2019.

[19] Ministerio de Agroindustria de Argentina. 2016. Guía de rotulado para alimentos envasados. http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/publicaciones/calidad/Guias/GRotulado.pdf. Fecha de último acceso 11 de Diciembre del 2019.

[20] Secretaría de Agroindustria, Ministerio de Producción y Trabajo de la Nación. 2018. Guía del consumidor.

http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/publicaciones/calidad/Consumidor/GUIACONSUMIDOR.pdf. Fecha de último acceso 11 de Diciembre del 2019.

15

Alimentos fermentados y enfermedades crónicas no transmisibles: una revisión narrativa de la literatura

Jeadran N. Malagón-Rojas
jnmalagon@unbosque.edu.co

- *Instituto Nacional de Salud de Colombia*
- *Facultad de Medicina, Universidad El Bosque de Colombia*

Diana Pinzón

- *Instituto Nacional de Salud de Colombia*

Mónica Coy

- *Facultad de Medicina, Universidad El Bosque de Colombia*

Resumen

Las enfermedades crónicas no transmisibles tienen una alta prevalencia en el mundo actual y son la principal causa de muerte en el mundo. Por lo tanto, el estudio de las alternativas terapéuticas para estas condiciones ha mostrado un auge. Los alimentos fermentados son parte de la dieta habitual de múltiples personas alrededor del mundo. Los beneficios para la salud humana están siendo estudiados, así como también los beneficios terapéuticos que podrían tener en enfermedades crónicas no transmisible como diabetes, hipertensión arterial, obesidad, entre otras. Se han evidenciado los efectos que tiene el consumo de alimentos fermentados en la regulación del eje renina-angiotensina-aldosterona beneficiando a pacientes hipertensos, en el sistema inmunológico como antiinflamatorios, la reducción del riesgo cardiovascular, disminución en el peso corporal en pacientes con obesidad, entre otros beneficios. En esta revisión se pretende realizar una revisión narrativa de la literatura correspondiente a los registros existentes acerca de los beneficios del consumo de alimentos fermentados para la salud humana.

I. Introducción

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) causan alrededor del 70% de las muertes que se producen cada año en el mundo, siendo la enfermedad cardiovascular la de mayor incidencia [1, 2]. Adicionalmente, entre los factores de riesgo más predominantes para ECNT se encuentran la hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2 y el exceso de peso que, en conjunto, afectan a más de mil millones de personas a nivel mundial [1-5].

En este contexto, cada vez existe un mayor interés en el desarrollo y estudio de alternativas terapéuticas eficaces, de fácil acceso y aceptabilidad, como lo podrían ser aquellas relacionadas con la dieta y alimentación [6-8].

De esta forma, durante los últimos treinta años se viene incluyendo, dentro de diferentes guías nacionales alimentarias, a los alimentos fermentados como una alternativa viable y de fácil acceso, vinculada a las dietas tradicionales. Entre los alimentos mencionados por varias guías nacionales se encuentran el yogur, kefir, queso, kimchi, chucrut, tempeh, miso, kombucha, natto y aceitunas fermentadas [9-18]. Adicionalmente, este tipo de alimentos desde hace unas décadas ha llamado la atención de empresas de alimentos, que paulatinamente han desarrollado una generación de alimentos fermentados industriales [10, 19].

La fermentación de alimentos es casi tan antigua como la humanidad, acompañando el desarrollo de múltiples civilizaciones alrededor del globo [10]. A pesar de que no hay un consenso acerca de lo que se denomina un alimento fermentado, para efectos de la presente revisión se considerará que **el alimento fermentado es aquél alimento transformado como resultado de su exposición controlada a bacterias, hongos o levaduras que inducen la transformación biológica del alimento y la producción de compuestos bioactivos** [19, 20]. Esta transformación se traduce en un aumento del valor nutricional y de las características organolépticas de los alimentos [21].

Estos procesos generados por la fermentación pueden ser clasificados en diferentes tipos de acuerdo a los microorganismos que intervienen en la fermentación, o de los productos que se generan el proceso. Se conoce ampliamente que algunos productos de la fermentación son el alcohol y dióxido de carbono (levadura), el ácido acético (*Acetobacter*), ácido láctico (bacterias de los géneros *Leuconostoc, Lactobacillus* y *Streptococcus*), ácido propiónico (*Propionibacterium freudenreichii*), amoníaco y ácidos grasos, entre otros [19].

Se ha señalado que estos compuestos bioactivos, productos de la fermentación, pueden tener diferentes efectos, entre los que se ha descrito la disminución de la presión sanguínea, modular la respuesta inmune, promover la actividad antioxidante, disminuir la resistencia a la insulina, entre otros [20].

En la actualidad no se conocen en su totalidad los mecanismos mediante los cuales los alimentos fermentados pueden contribuir a generar efectos benéficos sobre la salud humana. Algunos de los mecanismos estudiados han sido descriptos ya en este libro, como por ejemplo el rol de la microbiota en la salud y la enfermedad (Capítulo 3),

los efectos del consumo de leches fermentadas sobre el sistema inmune (Capítulo 4), la transformación de los alimentos por intermedio de la fermentación (Capítulo 12) y el rol del ácido láctico en los efectos benéficos atribuidos a los alimentos fermentados (Capítulo 13).

Se han postulado dos vías principales mediante las cuales la ingesta de alimentos fermentados puede tener un efecto benéfico sobre la salud de las personas. En primer lugar, se encuentran aquellos relacionados con la ingesta de los productos del metabolismo o degradación bacteriana, como acetato, lactato, propionato, factores de crecimiento y la presencia de exopolisacáridos de membrana [20, 22]. Estos productos de degradación ejercen un efecto a nivel local, influyendo sobre la respuesta inmune del huésped o la homeostasis de la mucosa intestinal.

La segunda vía tiene que ver con la interacción generada por las bacterias vivas ingeridas con la microbiota residente, induciendo una mayor producción de propionato y butirato o la liberación de azúcares, aminoácidos, ácidos siálicos y sulfato que sirven como sustratos para los comensales residentes. Esta interacción también puede alterar el pH, esencialmente por medio de la producción de lactato y ácidos grasos de cadena corta, competencia de nicho o la excreción de bacteriocinas [20, 23]

En ambos casos, la producción de metabolitos o la interacción con el microbioma del huésped está dada por la cantidad de bacterias vivas o los productos de su degradación en los alimentos [23]. Se considera que entre mayor sea la concentración de bacterias vivas, mayor será el efecto sobre la microbiota del consumidor. En general la mayor parte de los alimentos fermentados tienen concentraciones de $1 \times 10^{5\text{-}7}$ bacterias por mL o gramo, aunque en el caso de los derivados de la leche estos pueden ser incluso mayores [23].

A su vez, se ha señalado en algunos casos que los péptidos derivados de la β-caseína presentes en leches fermentadas y yogur, pueden tener un efecto anti-inflamatorio y anti-aterogénico [24]. Otro mecanismo de acción propuesto es la reducción de la presión arterial que por acción de ciertos productos de la fermentación pueden ejercer un efecto inhibidor sobre el eje renina angiotensina, como en el caso de la natoquinasa [25]. También, se ha propuesto que productos derivados de la fermentación de la soya contribuyen a reducir los niveles de angiotensina II y aldosterona [26]. En este mismo sentido, se ha señalado que alimentos fermentados como el yogur puede aportar péptidos derivados de la caseína β-, κ-, αs1-, generando patrones de inhibición del eje renina-angiotensina y alguna actividad sobre tolerancia al dolor en experimentos en animales [27].

De esta forma, con el advenimiento de la medicina de precisión, existe un interés creciente en conocer los beneficios potenciales del consumo de alimentos fermentados, como una estrategia de mejorar el valor nutricional y de recibir los beneficios bioactivos que poseen estos productos para la salud humana, con el fin de incluirlos como parte de los estilos de vida saludable, recomendarlos en el tratamiento de enfermedades crónicas como hipertensión [8, 28], diabetes mellitus tipo 2 [20, 29], enfermedad cardiovascular [30], síndrome metabólico, entre otros [7, 20].

El presente trabajo trata de dar cuenta de la evidencia científica sobre los beneficios sobre la salud proporcionados por el consumo de alimentos fermentados reportados, a través de una revisión narrativa de la literatura.

II. Alimentos fermentados en el manejo y enfermedades inmunológicas

Tal como se detalla en el Capítulo 4, se ha postulado que la acción de los alimentos fermentados sobre la microbiota intestinal tiene lugar en los receptores de patrones de reconocimiento (PRRs por sus siglas en inglés). Dentro de los PRRs más conocidos se encuentran los receptores *Toll-like* (TLR por sus siglas en inglés) y los receptores de dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NLR por sus siglas en inglés). La unión de los receptores a las estructuras microbianas como lipopolisacáridos, ácidos nucleicos, y péptidos bacterianos entre otros, puede inducir la activación o modulación de la respuesta inmune adaptativa. Productos de la fermentación como el ácido lipoteicoico pueden tener un efecto antiinflamatorio, reduciendo la producción de radicales libres e interleuquina 2, además de aumentar la producción de interleuquinas IL-4, IL-6 y IL-10 [31]. Asimismo, en el Capítulo 13 se describen los efectos conocidos para el ácido láctico, otro producto de la fermentación bacteriana. Dichos efectos alcanzan distintos sistemas orgánicos y metabólicos, como el sistema inmune.

Debido a lo anterior, tal como se señala en el Capítulo 3, varios autores han sugerido el uso de alimentos fermentados para el manejo de enfermedades como la dermatitis atópica [32]. Un estudio realizado en Turquía encontró que la ingesta de alimentos fermentados como yogur, aceitunas en conserva y queso tenía un efecto protector para el desarrollo de dermatitis atópica en niños menores de cinco años (*odds ratio* 0,41; IC95%: 0,23 a 0,73) [33]. Un estudio de cohorte en población europea encontró que la incidencia de enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa era menor en la población con mayor consumo de yogur y queso (*odds ratio* 0,61; IC95%: 0,32 a 1,19 y 0,80; IC95%: 0,50 a 1,30 respectivamente) [34].

III. Alimentos fermentados, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2

La asociación entre microbiota intestinal y los componentes del síndrome metabólico como la obesidad, la inflamación sistémica crónica de bajo grado, la dislipidemia y el metabolismo alterado de la glucosa han sido presentados por varios autores [35-37]. Una de las estrategias sugeridas para la prevención del síndrome metabólico y las relacionadas con la alteración de la glucemia ha sido la intervención de la microbiota intestinal como blanco [35], tal como ha sido desarrollado en el Capítulo 3.

En este sentido, desde hace varias décadas atrás se viene estudiando el efecto del yogur sobre estas condiciones de salud. Una revisión sistemática de la literatura que tenía como objetivo evaluar el efecto del consumo de yogur en pacientes con síndrome metabólico, encontró beneficios a favor del consumo de este alimento [38]. Los estudios revisados, que agruparon alrededor de 100.000 participantes, mostraron en sus estimaciones asociaciones inversas entre el consumo de yogur y los cambios en la circunferencia de la cintura, cambios en el peso, riesgo de sobrepeso u obesidad y riesgo de síndrome metabólico durante el seguimiento. Los autores concluyen que el consumo de yogur (independientemente de si se trata descremado o sin descremar) puede contribuir a una reducción del porcentaje de grasa corporal y el riesgo de desarrollar síndrome metabólico (*odds ratio* 0,77; IC95%: 0,65 a 0,91 y 0,73; IC95%: 0,62 a 0,86; respectivamente) [39].

Se ha reportado en varios estudios el efecto del kimchi en la disminución de la resistencia periférica a la insulina y el índice de masa corporal. Un estudio aleatorizado realizado en pacientes con diagnóstico de pre-diabetes encontró que el consumo de 300 g de kimchi fresco o fermentado, repartidos en tres comidas al día, al cabo de ocho semanas, reducía los niveles plasmáticos de glucemia, pasando de 105,7 ± 12,5 mg/dL to 101,7 ± 8,9 mg/dl en el grupo de kimchi fermentado ($p = 0,05$) (40). No obstante, tras dos semanas de suspender la administración de kimchi, los efectos sobre la glucemia se revertían.

Asimismo, se sugiere que el consumo de kimchi tiene efectos positivos asociados con el síndrome metabólico, incluyendo la disminución de las cifras de presión arterial, el porcentaje de grasa corporal y el colesterol total, en especial el kimchi fermentado [41].

Existen varios estudios en curso que sugieren que alimentos fermentados como natto, y sauerkraut, entre otros y sus efectos sobre el síndrome metabólico pero a la fecha no hay resultados disponibles [42].

IV. Alimentos fermentados e hipertensión arterial

Existen algunos ensayos clínicos aleatorizados que sostienen el efecto antihipertensivo de varios alimentos fermentados entre los que se mencionan leches fermentadas, yogur y queso, entre otros.

El primer caso es relacionado con el efecto que tiene la administración de leches fermentadas con *Lactococcus lactis* NRRL B-50571. Los péptidos bioactivos generados durante el proceso de acidificación de la leche parecieran tener un efecto regulador sobre la angiotensina y la bradiquinina, reduciendo las cifras de presión arterial en pacientes con prehipertensión e hipertensión grado 1 [43]. Pacientes que consumen a diario 150 mL de leche fermentada tiene efecto de reducción de la presión arterial, además de disminuir los niveles de LDL circulando en sangre. Los beneficios sobre la presión arterial se pueden observar hasta una semana luego de finalizada la intervención [44].

Sin embargo, otros estudios realizados administrando leches fermentadas con altos contenidos de lactotripéptidos (IPP y VPP) no han encontrado los beneficios anteriormente descritos [45]. Tampoco se observaron efectos significativos sobre los niveles de angiotensina II, glucemia, y la excreción de sodio y potasio, creatinina.

Por otro lado, se ha reportado en algunos estudios la acción hipotensora que pueden tener ciertos tipos de bebidas lácteas similares al yogur. Un ensayo clínico aleatorizado realizado para determinar el efecto del consumo 450 mL/día de una bebida láctea con *S. thermophilus* y *L. delbrueckii,* comparada con una bebida láctea que además de tener *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* fue enriquecida con *L. rhamnosus* vs en adultos hipertensos. Ambas intervenciones fueron comparadas contra un placebo de características organolépticas similares [46]. Los autores reportaron el efecto reductor sobre la presión arterial sistólica en los participantes que recibieron la bebida láctea comparada contra placebo, siendo esta más notoria en el grupo que recibió la bebida láctea con *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* y *L. rhamnosus*. Los autores además reportaron una disminución estadísticamente significativa en los niveles de LDL en los grupos de intervención comparados con placebo [46].

A su vez, la administración de ciertos tipos de queso se ha asociado a una reducción de las cifras de tensión arterial. Se realizó un estudio aleatorizado, doble ciego, en Italia para evaluar el efecto del consumo diario de 30 g del queso Grana Padano en la reducción de la TA en individuos con HTA moderada [47]. Los autores encontraron que el consumo a diario de queso Grana Padano tiene un efecto positivo en la reducción de la presión arterial en sujetos con HTA moderada. En promedio se redujo 3,5 mmHg de la presión arterial sistólica y 2,4 mmHg de la presión arterial diastólica (con un valor $p = 0{,}0063$ y $p = 0{,}0065$ respectivamente).

V. Alimentos fermentados y exceso de peso

La evidencia frente al consumo de ciertos alimentos fermentados y desenlaces en salud como reducción de peso o niveles de colesterol no es concluyente y diferentes trabajos parecen mostrar resultados diferentes. Durante un estudio que incluyó 75 mujeres pre menopáusicas con sobrepeso u obesidad entre los 25-45 años, se administró de forma aleatoria 200 mL de kéfir en dos porciones al día y lo comparó contra placebo [48]. Las diferencias entre los grupos frente al índice de masa corporal no fueron significativas. No obstante, el grupo que recibió kefir presentó niveles de LDL y colesterol total significativamente inferiores al grupo control ($p=<0{,}005$), tras ocho semanas de consumo de 200 mL de kefir dos veces al día [48].

La acción sobre el peso, índice masa corporal también ha sido reportada con la administración de productos de huevo fermentado. Un estudio aleatorizado, doble ciego, se realizó para evaluar el efecto de reducción de tejido adiposo visceral al consumir diariamente clara de huevo fermentada [49]. La intervención iba dirigida a sujetos con sobrepeso y obesidad en Japón. El consumo de 200 mL de una bebida de

clara fermentada con *Lactobacillus acidophilus* una vez al día durante 12 semanas, encontró una disminución del área de tejido adiposo visceral, medida en TAC abdominal, además de la cantidad de tejido adiposo visceral los niveles de colesterol total y niveles de LDL oxidado.

VI. Aproximación al impacto económico potencial de la promoción del consumo de ciertos alimentos fermentados sobre los sistemas de salud públicos y privados

Hasta donde sabemos, no existen muchos estudios de economía de la salud acerca de los alimentos fermentados. No obstante, los estudios adelantados en el campo de los probióticos y el consumo de algunos lácteos enriquecidos con probióticos podrían ser un espejo del impacto económico.

Un estudio realizado en los Países Bajos, Francia y Suecia que tenía como objetivo evaluar el efecto de la administración de productos lácteos sobre el riesgo de fractura en pacientes con osteoporosis encontró hallazgos interesantes. Para el caso de prevención de fracturas se encontró que un incremento del consumo de lácteos hasta llegar a 1.300 g/día de calcio se traduciría en prevenir 2.600 fracturas de cadera al año en los tres países, lo que redundaría en el beneficio de 7.883 años de vida perdidos menos, por discapacidad, en los tres países. Esto significa un ahorro de 169 millones de Euros al año sumando a los tres países [50].

Otro de los escenarios es el relacionado a los alimentos adicionados con probióticos o postbióticos debido al efecto que pueden tener estos en la reducción de casos de infecciones comunes en la infancia. Un estudio realizado en Francia que pretendía evaluar el efecto económico de la suplementación con probióticos en infecciones respiratorias comunes, encontró que la suplementación rutinaria con probióticos reduciría 291.000 formulaciones de antibióticos y 581.000 días de incapacidad por enfermedad. El impacto económico de los probióticos sobre el ahorro en el sistema de salud oscilaría entre 14,6 y 37,7 millones de Euros [51].

Finalmente, un estudio de simulación económica que evaluó el efecto de la suplementación con probióticos en Canadá reportó que el uso de probióticos redujo los casos de administración de antibióticos entre 52.000 y 84.000, además de disminuir los días de ausentismo laboral por enfermedad (entre 330.000 y 500.000 días menos). El ahorro para el sistema de salud fue estimado entre 1,3 y 8,9 millones de dólares canadienses y entre 61,2 y 99,7 millones dólares canadienses por pérdidas de productividad [52].

Desde esta perspectiva la administración de probióticos y lácteos fermentados pudiera tener efectos beneficiosos no solo para los individuos sino para las economías y sistemas de salud. La inclusión de alimentos fermentados como vía de administración de bacterias vivas con efectos biológicos benéficos para el huésped podría constituir una alternativa en un futuro cercano, reduciendo el uso de antibióticos, los eventos adversos y el gasto de los sistemas de salud.

VII. Declaración de posibles conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

VIII. Bibliografía citada

[1] Enfermedades no transmisibles [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2018.

[2] WHO. Global health risks: Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. 2009. 9–19 p.

[3] Collaborators G 2015 O. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. N Engl J Med. 2017;377(1):13–27.

[4] Obesidad y sobrepeso [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2018.

[5] Vos T, Abajobir AA, Abbafati C, Abbas KM, Abate KH, Abd-Allah F, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. Lancet. 2017;390(10100):1211–59.

[6] Rapsomaniki E, Timmis A, George J, Pujades-rodriguez M, Shah AD, Denaxas S, et al. Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases : lifetime risks , healthy life-years lost , and age-specifi c associations in 1 · 25 million people. 2019;383.

[7] Speyer H, Jakobsen AS, Westergaard C, Nørgaard HCB, Pisinger C, Krogh J, et al. Lifestyle Interventions for Weight Management in People with Serious Mental Illness: A Systematic Review with Meta-Analysis, Trial Sequential Analysis, and Meta-Regression Analysis Exploring the Mediators and Moderators of Treatment Effects. Psychother Psychosom [Internet]. 2019.

[8] Wadden TA, Tsai AG, Tronieri JS. A Protocol to Deliver Intensive Behavioral Therapy (IBT) for Obesity in Primary Care Settings: The MODEL-IBT Program. Obesity (Silver Spring). 2019 Oct;27(10):1562–6.

[9] Barengolts E. Gut microbiota, prebiotics, probiotics, and synbiotics in management of obesity and prediabetes: Review of randomized controlled trials. Endocr Pr [Internet]. 2016;22(10):1224–34.

[10] Melini F, Melini V, Luziatelli F, Ficca AG, Ruzzi M. Health-Promoting Components in Fermented Foods: An Up-to-Date Systematic Review. Nutrients. 2019 May;11(5).

[11] Barengolts E, Smith ED, Reutrakul S, Tonucci L, Anothaisintawee T. The Effect of Probiotic Yogurt on Glycemic Control in Type 2 Diabetes or Obesity: A Meta-Analysis of Nine Randomized Controlled Trials. Nutrients. 2019 Mar;11(3).

[12] Public Health England. From Plate to Guide: What, why and how for the eatwell model [Internet]. 2016 [cited 2019 Nov 20]. 7–22 p.

[13] National Health and Medical Research Council. Australian Guidelines Dietary. [Internet]. 2013 [cited 2019 Nov 20]. 1–226 p.

[14] (NICUS) TNIC of the U of S. Milk, cheese and other dairy products [Internet]. Milk cheese other dairy products. [cited 2019 Nov 20].

[15] ICBF. Plato saludable de la familia colombiana: Guías alimentarias Basadas en Alimentos para la población colombiana mayor a 2 años. 2013. 1–314 p.

[16] Jang YA, Lee HS, Kim BH, Lee Phd Y, Lee HJ, Moon JJ, et al. Revised dietary guidelines for Koreans. Vol. 17, Asia Pac J Clin Nutr. 2008.

[17] The Nutrition Information Centre of the University of Stellenbosch (NICUS). Food Based Dietary Guidelines:The South African Food Based Dietary Guidelines [Internet]. [cited 2019 Nov 20].

[18] MAFF. Traditional Dietary Cultures of the Japanese.

[19] Vinderola G. Dried cell-free fraction of fermented milks: new functional additives for the food industry. Trends Food Sci Technol. 2008;19(1):40–6.

[20] Gille D, Schmid A, Walther B, Vergères G. Fermented food and non-communicable chronic diseases: A review. Nutrients [Internet]. 2018;10(4).

[21] Marco ML, Heeney D, Binda S, Cifelli CJ, Cotter PD, Foligne B, et al. Health benefits of fermented foods : microbiota and beyond. Curr Opin Biotechnol. 2017;44:94–102.

[22] Derrien M, van Hylckama Vlieg JET. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. Vol. 23, Trends in Microbiology. Elsevier Ltd; 2015. p. 354–66.

[23] Rezac S, Kok CR, Heermann M, Hutkins R. Fermented foods as a dietary source of live organisms. Front Microbiol. 2018;9.

[24] Fekete ÁA, Givens DI, Lovegrove JA. Casein-Derived Lactotripeptides Reduce Systolic and Diastolic Blood Pressure in a Meta-Analysis of Randomised Clinical Trials. 2015;659–81.

[25] Kim JY, Gum SN, Paik JK, Lim HH, Kim K-C, Ogasawara K, et al. Effects of nattokinase on blood pressure: a randomized, controlled trial. Hypertens Res [Internet]. 2008 Aug;31(8):1583–8.

[26] Abuajah CI, Ogbonna AC, Osuji CM. Functional components and medicinal properties of food : a review. 2015;52(May):2522–9.

[27] Miguel M, Recio I, Ramos M, Delgado MA, Aleixandre MA. Antihypertensive effect of peptides obtained from Enterococcus faecalis-fermented milk in rats. J Dairy Sci [Internet]. 2006;89(9):3352–9.

[28] Guerrero AEC, Domínguez González K, González Márquez H, Gómez Ruiz LC. El efecto antihipertensivo de las leches fermentadas. Rev Argent Microbiol. 2014;46(1):58–65.

[29] Bhagavathi S, Periyanaina K, Mani Iyer P, Chaiyavat C. A Mini Review on Antidiabetic Properties of Fermented Foods. Nutrients. 2018;10:1–18.

[30] Brassard D, Tessier-grenier M, Côté JA, Labonté M-ève, Desroches S, Couture P, et al. Systematic Review of the Association between Dairy Product Consumption and Risk of Cardiovascular-Related Clinical Outcomes 1 – 3. Adv Nutr. 2016;7:1026–40.

[31] Kim KW, Kang S, Woo S, Park O, Ahn KB, Song K, et al. Lipoteichoic Acid of Probiotic Lactobacillus plantarum Attenuates Poly I : C-Induced IL-8 Production in Porcine Intestinal Epithelial Cells. 2017;8(September):1–8.

[32] Shoda T, Futamura M, Yang L, Narita M, Saito H, Ohya Y. Yogurt consumption in infancy is inversely associated with atopic dermatitis and food sensitization at 5 years of age: A hospital-based birth cohort study. J Dermatol Sci. 2017 May 1;86(2):90–6.

[33] Celik V, Beken B, Yazicioglu M, Ozdemir PG, Sut N. Do traditional fermented foods protect against infantile atopic dermatitis. Pediatr Allergy Immunol. 2019 Aug;30(5):540–6.

[34] Opstelten JL, Leenders M, Dik VK, Chan SSM, Van Schaik FDM, Khaw KT, et al. Dairy products, dietary calcium, and risk of inflammatory bowel disease: Results from a European prospective cohort investigation. Inflamm Bowel Dis. 2016 Jun 1;22(6):1403–11.

[35] Saad MJA, Santos A, Prada PO. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. Physiology [Internet]. 2016 Jul [cited 2019 Nov 20];31(4):283–93.

[36] Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. Mol Aspects Med. 2013 Feb;34(1):39–58.

[37] Bellikci-Koyu E, Sarer-Yurekli Bp, Akyon Y, Aydin-Kose F, Karagozlu C OA. Effects of Regular Kefir Consumption on Gut Microbiota in Patients with Metabolic Syndrome: A Parallel-Group, Randomized, Controlled Study. Nutrients. 2019 Sep 4;11(9):2089.

[38] Thushara RM, Gangadaran S, Solati Z, Moghadasian MH. Cardiovascular benefits of probiotics: A review of experimental and clinical studies. Vol. 7, Food and Function. Royal Society of Chemistry; 2016. p. 632–42.

[39] Sayon-Orea C, Martínez-González MA, Ruiz-Canela M, Bes-Rastrollo M. Associations between Yogurt Consumption and Weight Gain and Risk of Obesity and Metabolic Syndrome: A Systematic Review. Adv Nutr An Int Rev J. 2017 Jan;8(1):146S-154S.

[40] An SY, Lee MS, Jeon JY, Ha ES, Kim TH, Yoon JY, et al. Beneficial effects of fresh and fermented kimchi in prediabetic individuals. Ann Nutr Metab. 2013 Oct;63(1–2):111–9.

[41] Kim EK, An SY, Lee MS, Kim TH, Lee HK, Hwang WS, et al. Fermented kimchi reduces body weight and improves metabolic parameters in overweight and obese patients. Nutr Res. 2011 Jun;31(6):436–43.

[42] Chan M, Baxter H, Larsen N, Jespersen L, Ekinci EI, Howell K. Impact of botanical fermented foods on metabolic biomarkers and gut microbiota in adults with metabolic syndrome and type 2 diabetes: a systematic review protocol. BMJ Open. 2019 Jul;9(7):e029242.

[43] Seppo L, Jauhiainen T, Poussa T, Korpela R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. Am J Clin Nutr. 2003 Feb 1;77(2):326–30.

[44] Beltrán-Barrientos LM, González-Córdova AF, Hernández-Mendoza A, Torres-Inguanzo EH, Astiazarán-García H, Esparza-Romero J, et al. Randomized double-blind controlled clinical trial of the blood pressure–lowering effect of fermented milk with Lactococcus lactis: A pilot study2. J Dairy Sci. 2018 Apr 1;101(4):2819–25.

[45] Engberink MF, Schouten EG, Kok FJ, Van Mierlo LAJ, Brouwer IA, Geleijnse JM. Lactotripeptides show no effect on human blood pressure: Results from a double-blind randomized controlled trial. Hypertension. 2008 Feb;51(2):399–405.

[46] Qian B, Xing M, Cui L, Deng Y, Xu Y, Huang M, et al. Antioxidant, antihypertensive, and immunomodulatory activities of peptide fractions from fermented skim milk with Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus LB340. Vol. v. 78, Journal of dairy research. Cambridge University Press; 2011.

[47] Crippa G, Zabzuni D, Bravi E, Piva G, De Noni I, Bighi E, et al. Randomized, double blind placebo-controlled pilot study of the antihypertensive effects of Grana Padano D.O.P. cheese consumption in mild - Moderate hypertensive subjects. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2018;22(21):7573–81.

[48] Fathi Y, Ghodrati N, Zibaeenezhad MJ, Faghih S. Kefir drink causes a significant yet similar improvement in serum lipid profile, compared with low-fat milk, in a dairy-rich diet in overweight or obese premenopausal women: A randomized controlled trial. J Clin Lipidol. 2017 Jan 1;11(1):136–46.

[49] Matsuoka R, Kamachi K, Usuda M, Wang W, Masuda Y, Kunou M, et al. Lactic-fermented egg white improves visceral fat obesity in Japanese subjects—double-blind, placebo-controlled study. Lipids Health Dis [Internet]. 2017 Dec 8 [cited 2019 Nov 20];16(1):237

[50] Lötters FJB, Lenoir-Wijnkoop I, Fardellone P, Rizzoli R, Rocher E, Poley MJ. Dairy foods and osteoporosis: An example of assessing the health-economic impact of food products. Osteoporos Int. 2013;24(1):139–50.

[51] Lenoir-wijnkoop I, Gerlier L, Bresson J, Pen C Le. Public Health and Budget Impact of Probiotics on Common Respiratory Tract Infections : A Modelling Study. PLoS One. 2015;10(4):1–17.

[52] Lenoir-Wijnkoop I, Gerlier L, Roy D, Reid G. The clinical and economic impact of probiotics consumption on respiratory tract infections: Projections for Canada. PLoS One. 2016;11(11):1–16.

16

La Fermentación y la Gastronomía

Un cocinero entre los científicos, un científico entre los cocineros

Martín Russo
marmatrussos@gmail.com
Instagram: @chemartin

- *Cocinero especializado en fermentaciones*
- *Lugar de trabajo: La Fermentaduría (@lafermentaduria)*

Resumen

El arte de fermentar alimentos –en definitiva– es un poco como la esencia misma de la cocina: tomar una materia prima, cruda y transformarla en otra cosa, brillante, sabrosa. Es un proceso **orgánico**, **complejo**, que depende de decenas de factores; eso es lo que lo vuelve tan intrigante, misterioso y atractivo. Una comunidad de seres microscópicos transformando la materia orgánica en otra cosa, modificándola, enalteciéndola, y haciendo brotar frutos inesperados. Pero también es mucho más que eso. Lo que en la cocina puede parecer un rasgo de sofisticación, en realidad es un proceso versátil, amplio, con un espectro significativo de aplicaciones. Puede ser la manera de enaltecer el *bouquet* de un plato, pero también una herramienta. La fermentación de alimentos, bebidas, vegetales o carnes, es una actividad milenaria. Sin embargo, todavía hay margen para la innovación. Esta innovación puede conseguirse de muchas maneras: mezclando ingredientes que no se han combinado antes, realizando procesos de cocción o de preparación que nunca antes se ha aplicado sobre cierta materia prima, y hasta trasladando alimentos desde una región a otra, para transformarlos y acomodarlos a un nuevo clima.

Sin embargo, a pesar de toda su versatilidad, los habitantes de nuestra región no son muy propensos al consumo de alimentos fermentados, salvo –quizás– algunas bebidas alcohólicas y yogur. Pero este hecho no es una ley: de a poco, la región está empezando a hacerse fuerte en ciertos alimentos a base de vegetales fermentados, como el kimchi, el chucrut, los pickles o los encurtidos en salmuera.

La fermentación, o "cocina microbiológica", es el resultado de un enlace entre la ciencia y la gastronomía que hace décadas comenzó a formarse y día a día se fortalece. Esto, con la ayuda de paladares sensibles, puede derivar en un cambio cultural, un cambio en nuestra relación con los alimentos que exceda a lo fermentado y que es una parte crucial para todas las personas. La fermentación gastronómica es un laboratorio científico que a la vez funciona de canal de divulgación a través de los clientes. ¡Cuánto de lo que la ciencia facilita a los más osados cocineros fermentistas se refleja en las cocinas de los hogares! En este capítulo se relatan algunas historias de vida, y explico por qué disfruto sintiéndome **un científico entre los cocineros y un verdadero cocinero entre los científicos.**

I. Martín Russo por Martín Russo

I.A. El camino a la cocina

Con frecuencia, aparece la pregunta acerca de cómo es que una persona llega a convertirse en cocinero. No es una pregunta fácil de contestar, y seguramente hay tantas respuestas como profesionales cocinando. De todas maneras hay algunos denominadores comunes que pueden rastrearse en las cualidades de las personas que luego dedicarán su vida a la cocina y, casi siempre, son características que también describen a los artistas prolíficos. Saberlas no resuelve el interrogante, pero reconocerlas, ayuda. Una de esas cualidades, fundamental, es la **paciencia**. Y la otra, sin duda, el **orden**. No es casualidad, probablemente, que el destino empuje a los pacientes hacia el sutil arte de la fermentación, un mundo que se caracteriza por los tiempos, por la dedicación, por la espera silenciosa y ordenada.

Mi primer encuentro con la cocina fue durante un viaje por Latinoamérica, que comenzó en abril del año 2014. Junto con unos amigos, acondicionamos una camioneta y salimos a recorrer países, conocer gente y probar comidas, sin más metas que las de descubrir lugares nuevos y construir anécdotas. Decidimos que una buena manera de subsistir durante el viaje, era vender comida. Vendíamos los panes rellenos que preparábamos con la receta de mi tía Brenda. Nos turnábamos para vender o cocinar, y así aprendí las ventajas y cualidades de estar de uno u otro lado del mostrador. La cocina, durante esa aventura, fue como un amor de viaje: cambiante, fresco, con altibajos, y no fue más que eso. Un romance de vacaciones. Unas vacaciones que luego de un tiempo mis compañeros de ruta decidieron culminar. La separación fue difícil, como también lo fueron algunas rutas del sur del amazonas. Pero sentía una extraña necesidad de seguir mi viaje solo y no pude ignorarla. Buscando y buscándome, me encontré en Madre de Dios, en una camionetita cargada de gallinas camino al Cusco.

Allí crecieron las primeras raíces de lo que luego terminarían siendo los brotes de lo que soy hoy. En Perú encontré trabajo de ayudante de cocina en un restorán de cazuelas; de todos los trabajos que tuve allá, ese fue el mejor. Aunque no fuera lo que buscaba, esa experiencia me dejó marcas indelebles. Una de ellas es que la comida, la verdadera, la que está saturada de aromas y sabores locales, no está en los platos de los restoranes, sino en la calle. Cada noche, en los puestos callejeros donde cenaba, encontraba la identidad cultural y gastronómica de Perú, lejos de las cartas en las vidrieras de los grandes locales.

Apenas aparecieron los primeros ahorros, decidí seguir viaje, a dedo, hacia el interior de la provincia de Urubamba y Apurimac, con Álvaro –un compañero de trabajo– y con Guachina, una perrita que nos empezó a seguir en Pisac. Un borracho en un bar nos habló del Paititi, unas ruinas incas aún sin descubrir, y por lo tanto, decidimos comprar un par de libros fotocopiados sobre el tema e incursionarnos en su búsqueda. Los sinuosos y angostos senderos andinos nos llevaron a todos lados menos a esa

ciudad perdida. En cambio, fuimos de la selva al altiplano varias veces, descubriendo la cocina de altura, durmiendo en maizales, ruinas escondidas, amaneciendo entre cultivos de papa y desayunando con campesinos, que en más de una ocasión nos acogieron y nos salvaron de fuertes tormentas, o nos detuvieron la marcha y nos invitaron a acampar para evitar que nos encontráramos ascendiendo de noche.

La chicha, la coca, el San Pedro, el choclo, la papa, 170 km a pie y todas las maravillas andinas nos dejaron suficientemente satisfechos como para darle fin a nuestro viaje, y decidí volver a la Argentina. Pero ya mi camino estaba decidido. Mi futuro tenía que estar entre los cuchillos y los fuegos, donde la naturaleza se transforma en cultura. Con el envión de la montaña me inscribí en un curso intensivo del Instituto Argentino de Gastronomía, y empecé a trabajar como cocinero en un restorán de comida Peruana. Ahí me dediqué a los panes rellenos, las cazuelas y luego estuve a cargo de la barra de "tiraditos" de pescado de un restorán nuevo, trabajo que me duró hasta que la clientela fue demasiada y mi velocidad insuficiente.

Al finalizar mis estudios en el IAG, me recomendaron para una beca, y unos meses después , en marzo de 2016, estaba viajando al País Vasco a capacitarme en uno de los restaurantes más prestigiosos del mundo: Mugaritz.

Figura 1. La camioneta y los viajeros.

Compañeros de viaje: Santiago Bertín (adentro de la camioneta), Kevin De Fazio (sobre el techo) y José Llambias. Martín Russo adelante, con la pelota.

I.B. Orden y disciplina: Mugaritz

Mugaritz tiene múltiples pisos, separados según el tipo de trabajo, y los pasantes rotan por las distintas secciones –denominadas "Partidas"– en el transcurso del año, perfeccionándose en cada una de las subdisciplinas que forman parte de la cocina. Las partidas son divisiones prácticas de espacios con personas asignadas, especializadas en tareas particulares. Fue una época de trabajo fuerte, con jornadas muy largas e intensas, pasando por los sectores dedicados a la preparación de carnes y pescados, luego el despacho de platos, pastelería y finalmente la innovación, la última parada. Durante ese tiempo se trabajó con una disciplina rigurosa, con mucho orden, y silencio. Quizás sea la **disciplina** otra cualidad para agregar a la lista, junto con el orden y la paciencia.

Figura 2. Un dibujo que pinta la esencia de un día de trabajo en Mugaritz.

De esa época perduran anécdotas divertidas, pero también ciertos momentos y sensaciones que ahora, vistos en retrospectiva, quizás fueron bisagras en el camino. Uno de ellos, es el deseo por aprender más y más cosas, que predominaba en el aire de la cocina. Ahí donde se mirase, había algo nuevo, raro, un ingrediente, un instrumento, y era imposible no querer saber qué era, para qué servía, y en qué platos podía

usarse. Esa era una sensación que no tenía desde aquellos "caminos incaicos". Y saltando de una maravilla en otra, aparecieron los fermentos. Los fermentos se destacaban del resto de los ingredientes por ser materia viva, sustancia activa, la transformación en sí misma, que –en definitiva– es la esencia de la cocina: **transformación**. Comencé a comprar libros sobre fermentación, y a aprender todo lo que pude el tema –como si me estuviera emprendiendo en un nuevo viaje en busca del Paititi– y mientras transitaba por la última parada en Mugaritz, la partida de Investigación y Desarrollo (I+D), noté que todos los fermentos eran preparados en distintas secciones. Que no había criterios unificados, que se producían algunas cosas de más, y otras de menos, y apareció la idea de que unificar todos esos procesos podía ser una estrategia superadora. Ese fue el origen de una nueva Sección, en la que fui elegido para quedar a cargo: **Partida de Fermentaciones de Mugaritz**.

Figura 3. Equipo de Investigación y Desarrollo en Mugaritz.

Arriba: Martín Russo, Irene Compte, Juliana Farias Thorpe, Álvaro Velasco, María Fernanda Barriga, Pedro Talavera. Abajo: Caio Barcellos, Ariadna Talero, Miquel Sarda, Andrés Felipe López Londoño, Yordy Alhuay, Danitza Alpaca, Carlos Manresa, Ignacio Zuzulich.

I.C. La Partida de Fermentos

Todos los desafíos son importantes, pero quizás ese fue un pilar profesional. Para armar una Partida nueva, fue necesario hacer todo: buscar espacio, acondicionarlo, desarrollar las técnicas y procedimientos, acopiar contenedores, instrumentos y material de cocina e identificar las mejores materias primas. También fue necesario resolver toda clase de problemas, como poner estantes, o ajustar una puerta rebelde. Fue un tiempo fértil, en que todo lo sembrado daba sus frutos: el **orden**, para organizar el espacio de trabajo de manera útil e higiénica –una clave fundamental–, la **paciencia**, para aprender de los errores y esperar a los tiempos naturales de la fermentación, y esa cuota de **disciplina** necesaria para conseguir buenos resultados.

Ramón Perisè, del departamento de I+D, fue mi guía, y predijo que una vez que todos los fermentos comenzaran a trabajar, se formaría una especie de simbiosis entre todos los tipos distintos de microorganismos. La Partida de Fermentos fue creciendo de a poco, como un solo organismo con sus distintas partes. Los Jefes de Cocina estaban contentos, y cada semana salían de la Partida más y mejores productos, estables y sabrosos. Era un tiempo de crecimiento constante, pero que –como todas las etapas– también tenía que terminar. El traspaso de las tareas de fermentación se presentó como un último y enorme desafío, porque cada vez que los fermentos pasaban de mano, caía la calidad, se contaminaban, o simplemente dejaban de crecer. Pero con la convicción de que una buena instrucción, buenos protocolos y un sector ordenado, tenían que garantizar la continuidad de los productos, los fermentos casi "ni se enteraron" del cambio. **Kenzo Hirose**, un colega boliviano del que tuve la suerte de aprender muchísimo, quedó a cargo. Hicimos un solapamiento de roles de dos semanas para evitar ejercer un cambio brusco de contexto a los microorganismos de la partida, y todo funcionó perfectamente. Es que uno mismo –terminé descubriendo– es una parte vital del ecosistema de los fermentos que manipula.

De regreso en Buenos Aires, en mayo de 2017, conseguí trabajo primero en 1000 Rosa Negra, un restorán de muchísimos cubiertos, una cocina grande perfectamente dirigida, y luego en la cocina de una prestigiosa cocinera local: Narda Lepes. Fue tiempo de asentar ideas y adaptarlas, la oportunidad de desarrollar todo lo capitalizado; los viajes, el andar, el aprendizaje, la organización de nuevos proyectos, todo combinado en un nuevo espacio.

II. Los alimentos fermentados, aquí y ahora

II.A. ¿Qué implica fermentar alimentos?

Fermentar alimentos es un poco como la esencia misma de la cocina: tomar una materia prima, rica, cruda, o directamente "bruta", y transformarla en otra cosa, brillante, sabrosa. Es un proceso que sucede naturalmente hace millones de años, pero –como

el fuego– lo que la hace "humana" es el control que puede ejercerse sobre ella. Es una transformación muy distinta a la que producen las altas temperaturas, ya que es una manera de desnaturalizar alimentos sin quemar con la brasa, la llama o el aceite caliente, sino favorecer la vida con frascos, trampas de aire y limpieza. Estas diferencias se notan en los perfumes característicos de cada producto, cuando se desarrollan las texturas y los potentes o sutiles sabores de la fermentación. Es un proceso **orgánico**, **complejo**, que depende de decenas de factores; eso es lo que lo vuelve tan intrigante, misterioso y atractivo. Una comunidad de seres microscópicos transformando la materia orgánica en otra cosa, modificándola, enalteciéndola, y haciendo brotar frutos inesperados.

Pero la fermentación es mucho más que eso. Lo que en la cocina puede parecer un rasgo de sofisticación, en realidad es un proceso versátil, amplio, con un espectro significativo de aplicaciones. Puede ser la manera de enaltecer el *bouquet* de un plato, pero también una **herramienta**. Por eso, fermentar es, en definitiva, un acto político, porque es un proceso que puede utilizarse para preservar alimentos durante mucho tiempo. El problema es que incluso algunos productores de alimentos todavía no conocen las técnicas de fermentación, como si fueran un tabú. Definitivamente, son herramientas que deben conocerse, de manera que –a modo de ejemplo– un trabajador de la tierra que produzca repollo no se vea obligado a ceder al precio de venta que el mercado le impone, a veces al costo, sino que tenga la alternativa de transformarlo en chucrut. Los alimentos fermentados se pueden conservar un montón de tiempo. Entonces, ¿cuál es el obstáculo? Para poder preparar y distribuir alimentos fermentados, todavía hay que superar una cierta cantidad de mitos, como la creencia de que lo fermentado es podrido, o que en todos los fermentos hay microorganismos probióticos. Además, hay demasiada gente intentando vender alimentos fermentados crudos, sin pasteurizar. Hoy, un chucrut que fermentó y no tuvo proceso de pasteurización, no puede ser comercializado legalmente, porque es una fermentación salvaje y –por lo tanto– no sabemos exactamente qué microorganismos tiene. No es lo mismo cuando se realiza una inoculación controlada. Seguramente en este y otros libros, iremos encontrando ideas acerca de cómo acercar a la población alimentos fermentados de altísima calidad –como el chucrut, o los kimchis de la comunidad coreana– de manera segura, saludable y de acuerdo a las reglamentaciones sanitarias vigentes.

II.B. ¿Qué alimentos fermentados se consumen en la Argentina, y en la región?

Desde sus inicios la fermentación estuvo plenamente ligada a lo sensorial. Como ejemplos de esto, pueden citarse algunas preparaciones que se hacían en Mugaritz, exóticas, como preparar una madre de kombucha que luego se comía como si fuera una frutilla. Era un show permanente de emociones, buenas y malas; era la vanguardia de la gastronomía. Pero con el tiempo empezaron a aparecer las preguntas, la curiosidad, y la fermentación se destacaba como lo más osado que se estaba haciendo Mugaritz en ese momento. En ese momento, la fermentación ya era una tendencia

global; todos los grandes restaurantes estaban ya empezando a producir sus propios alimentos fermentados.

Cuando se habla de los fermentos propios, una pregunta que surge casi naturalmente, es aquella de ¿qué fermentos consumimos en el Cono Sur? ¿Qué se fermenta en esta región? La respuesta es cultural, y depende mucho de la subregión. Más allá del pan, que es un alimento fermentado casi universal, la **raíz inmigrante** de la población de países como la Argentina, hace que haya **poca identidad cultural gastronómica**, por fuera de las milanesas y las empanadas. No hay, en la Argentina, una identidad gastronómica como la que hay en Perú –por ejemplo– que no tiene nada que envidiar a la tradición fermentadora de Japón o Francia. Estos países han heredado el conocimiento milenario de los habitantes asentados, que tenían que rebuscárselas para conservar sus alimentos. En Perú, a diferencia de la Argentina, hay montones de fermentos, sobre todo bebidas, como la **chicha** –una bebida a base de maíz fermentado– y el **masato**, entre otros, que es un producto preparado a partir de la mandioca. En nuestro país, los principales alimentos fermentados no alcohólicos que se consumen son, en realidad, bebidas. Se trata del **yogur**, que todos conocemos, la **kombucha** y el **kefir** de agua. La kombucha es un té fermentado, preparado con un proceso muy similar al del vinagre, solo que la alcoholización y la acetización suceden simultáneamente. En vez de alcoholizar primero y acetizar después, en la kombucha lo que se hace es agregar una madre fermentada por SCOBY (siglas en inglés para *symbiotic culture of bacteria and yeast*, que significa "cultivo simbiótico de bacterias y levaduras") a un té azucarado, y lo que ocurre es la transformación del azúcar del té en alcohol. En ese mismo paso, las bacterias acéticas transforman ese alcohol en ácido acético. Se trata de una fermentación aeróbica, lo que significa que la preparación debe hacerse tapándola solamente con un paño, para que el oxígeno del aire llegue hasta los microorganismos. La kombucha se toma fría, con o sin gas, dependiendo de si se lo quiere cerrar en una botella o no, y resulta una bebida muy refrescante, como un jugo, con muy poco alcohol. Por su parte, el kefir de agua es –al igual que el kefir de leche– una bebida fermentada que se produce utilizando una comunidad microbiana compleja como iniciador de la fermentación, algo muy similar a lo que ocurre con la kombucha, y distinto del chucrut o el kimchi, en los que la fermentación es espontánea. Los habitantes de esta región no son muy propensos al consumo de vegetales fermentados, más que nada a causa de la falta de costumbre a su aspecto, y a su fuerte olor. No es una ley: de a poco, la región está empezando a hacerse fuerte en ciertos alimentos a base de vegetales fermentados, como el **kimchi**, el **chucrut**, los **pickles** o los **encurtidos en salmuera**. Los pickles de zanahoria son un ejemplo paradigmático de la falta de costumbre a los alimentos fermentados: al colocar mini-zanahorias en salmuera, luego de dos semanas de fermentación, se obtiene un producto de una acidez sutil, una textura intacta, y de un sabor maravilloso; puestos en el plato, la gente los devora y tienen un aspecto muy elegante. Pero tras bambalinas, el proceso consiste en dejar que las zanahorias fermenten en un frasco, con un guante a modo de trampa de aire, una realidad bastante menos elegante que lo que podría suponerse.

Figura 4. Repollos enteros fermentados.

II.C. En busca de la vanguardia de la fermentación

La fermentación de alimentos, bebidas, vegetales o carnes, es una actividad milenaria. Sin embargo, todavía hay margen para la innovación. Innovar es, en definitiva, realizar una tarea introduciendo novedades, y eso puede conseguirse de muchas maneras. Mezclar ingredientes que no se han combinado antes, podría ser un ejemplo, como también lo es un proceso de cocción o preparación que nunca antes se ha aplicado sobre cierta materia prima. Pero también hay innovación en trasladar alimentos desde una región hasta otra, para transformarlos y acomodarlos a un nuevo clima.

La vanguardia de la fermentación tiene ejemplos de todas estas formas de innovación, siempre en la búsqueda de nuevas texturas y sabores. Por ejemplo, tuve la suerte de probar una elaboración innovadora en Narda Comedor cuando, unos colegas peruanos de Mo Bistró, trajeron masato madurado y lo mezclaron con un puré de papas. El resultado fue un puré con un potente sabor a queso, aunque no tuviera ni un gramo de lácteos. Eso era vanguardia, a pesar de que ni el puré ni el propio masato lo fueran; aunque el fermento en sí no lo sea, la **manera de usarlo** puede que sea vanguardista. Un vivo ejemplo de esto son las maduraciones de carnes de pescado o vaca con koji –un fermento característico de Japón–, porque difícilmente lo haga nadie en Japón. El **koji** es el moho que crece en el arroz, conocido como *Aspergillus oryzae,* que se usa para hacer el **sake**. Si en lugar de poner el arroz fermentado en agua, se adoba una carne como si fuera una milanesa y se la deja reposar dos días en frío, las enzimas del *Aspergillus* hacen madurar la carne muy rápidamente y transforman completamente el sabor. El resultado es una carne con una textura muy diferente, más blanda y más dulzona. Son carnes que, a la hora de sellarlas, toman un color negro, de caramelización, mucho más rápidamente que cuando están frescas.

Entonces, ¿es innovación eso? La respuesta tiene mucho que ver con el contexto, porque poner masato en Europa quizás sea vanguardista, pero en el Amazonas no. Hay un factor clave en la descontextualización, como lo que se hacía en Mugaritz con el hongo que crece en el queso Roquefort (*Penicillium roqueforti)*; se aisló el hongo del queso y se lo puso a otro producto que jamás se come fermentado por mohos: una manzana. Con los estos microorganismos se hacía mucho ese proceso: hacerlos crecer en un alimento y usarlos en otro. Por ejemplo el **tempeh**, que es un moho de *Rizopus* típico en los alrededores del Mar de Java, se prepara haciendo fermentar porotos, generando un bloque que luego se corta y sella a la sartén, y es muy famoso por ser un sustituto de la carne para los veganos. La innovación fue trasladarlo a una gelatina de kiwi y hacerle crecer los pelitos. Parecía que tenía plumas, porque le quedaban como unos pelos largos de tempeh, y era como un kiwi. Era un verdadero juego de palabras: kiwi fruto / kiwi ave, con sus plumas. Otro ejemplo de esta descontextualización puede ser la preparación de un kimchi de frutas, poniendo ananá y cáscara de sandía en salmuera. Aunque el sentido común haga pensar que las frutas se van a ablandar, lo que ocurre al cabo de la fermentación, es que las frutas quedan con una textura impecables, conservando cada fruta su propio sabor.

No puede dejar de mencionarse aquella que no programamos, aquella que simplemente ocurre, la que denominamos **serendipia**. Y en ese sentido, la fermentación es un proceso ideal, porque a lo largo del tiempo las materias primas se transforman de manera significativa e imprevista; y más todavía si uno olvida los fermentos por años. Una hidromiel de guayaba de sabor mediocre se volvió una bebida exquisita después de dos años de olvido en un estante. Allí la inteligencia no fue prepararla, sino simplemente no tirarla.

Figura 5. Manzanas fermentadas y vinos botritizados.

Manzana fermentada con Penicillium, rellena de mermelada de naranja y especias. Los vinos son botritizados que recuerdan a la naranja y a especias.

II.D. La estandarización como meta

Una de las cualidades principales de la producción de alimentos fermentados, es su **carácter artesanal**. Eso es un atributo magnífico, pues cada producto es único. Pero a la vez, conspira un poco contra la distribución de esos alimentos, y su circulación ahí por donde todavía no han llegado. En el fondo, la estandarización en la producción de alimentos fermentados, no deja de ser en sí misma un rasgo innovador.

Por eso, identificar los pasos más variables del proceso de producción de alimentos fermentados, es un aspecto crucial de la investigación en el tema. La identificación de los microorganismos responsables de la fermentación en cada etapa de producción permite corregir las fuentes de variabilidad –como los microorganismos nativos de las cáscaras, el ambiente y hasta la saliva de quien los prepara– por inóculos controlados, como son los denominados **cultivos iniciadores**. Así, es posible –por ejemplo– preparar **chicha** –una bebida que comienza con la fermentación de una masa de maíz "masticado"– empleando un cultivo iniciador conteniendo solo levadura de cerveza de algún tipo. En ese mismo sentido, la identificación de los microorganismos responsables de cada fermentación también permite su reemplazo por cepas de microorganismos locales, adaptados a las condiciones medio-ambientales de la región. La producción de sake, por caso, depende de un primer paso de producción de **kome koji**, que es ese arroz en el que el *Aspergillus* liberó sus enzimas, y luego hacen falta una nueva tanda de arroz cocido, agua y una levadura. Esta levadura, que fermenta las cadenas de almidón liberadas por el hongo, es originalmente una cepa de levadura japonesa, tal como se describe con detalle y profundidad en el Capítulo 3 de este libro, escrito por el Dr. Aikihito Endo. Pero para producir una versión local del sake, estandarizada, pueden probarse otras levaduras, como las de cerveza, las de sidra, las de *champagne* y por qué no con la *S. eubayanus* del Ipatec.

Más allá de la falta de estandarización y reproducibilidad de los alimentos fermentados artesanalmente, el principal enemigo es la **contaminación**. Los restaurantes son espacios en los que la asepsia es difícil de conseguir y preservar. Siempre hay mucho movimiento de cosas; se mueven cajas, frascos, estantes, llega un nuevo pedido de cajas de vino y hay que acomodarlas, y para la producción de fermentos ese movimiento implica un riesgo, y –en consecuencia– una lucha permanente. Afortunadamente, y sobre todo en las bebidas, las contaminaciones son relativamente fáciles de identificar. Las bebidas fermentadas tienen sabores y aromas sutiles, y –por lo tanto– es sencillo saber cuándo están alteradas. Por el contrario, los vegetales fermentados tienen sabores fuertes, ácidos, salados y picantes, que enmascaran otros sabores ocultos, como el de una contaminación. Pero no es nada que la experiencia no pueda resolver, pues inevitablemente, cuando un vegetal fermentado se contamina, aparece un sabor a cartón característico, una especie de astringencia particular que lo delata. Esa vigilancia es fundamental, porque apenas aparece un atisbo de duda, el alimento debe ser descartado.

III. Las fronteras: investigación y futuro de la fermentación gastronómica

La percepción acerca de qué alimentos fermentados consume la gente en la región no debería limitar las perspectivas ni los procesos investigativos. Siempre será útil traer fermentos e ideas de afuera, y seguir haciendo combinaciones novedosas, tomando el fermento de un alimento, y usándolo para fermentar otro. Pero, ¿con qué criterio? ¿Cómo elegir sobre qué indagar?

Definitivamente, la curiosidad es el motor principal. Las características de cada microorganismo, sus afinidades, sus capacidades, dan mucha idea de aquellos alimentos en los que podría crecer y desarrollarse. Después, queda intentar imaginar qué efectos podría provocar en los alimentos, y al fin, pensar qué platos o qué elaboraciones podrían hacerse a partir de ese alimento fermentado, o a partir de una técnica de fermentación. Allí, el conocimiento está antes de la necesidad del alimento fermentado.

No obstante, hay casos en los que la necesidad está antes, cronológicamente hablando, como cuando un cocinero tiene una urgencia por resolver un problema, y la fermentación aparece como herramienta y respuesta. Un ejemplo de esto fue la vez en que un cocinero necesitaba preparar un puré fermentado de maíz dulce para una prueba de carta, en menos de 48 hs (tiempo ridículamente corto para los ciclos de la fermentación salvaje) y la solución terminó apareciendo de la mano de la reinoculación, agregándole unas cucharadas de yogur de búfala a granos de maíz cocidos al vapor, dentro de un roner (un circulador de agua) a 43°C. Luego de 8 horas, ya era un yogur de maíz, que procesado tenía textura de puré, sabor a choclo cremoso y fermentado. También, al ser la fermentación una manera de preservación, es una excelente herramienta para almacenar productos o incluso para reciclarlos, como es el caso de los vinos abiertos convertidos en vinagre.

La fermentación, o cocina microbiológica, es el resultado de un enlace entre la ciencia y la gastronomía que hace décadas comenzó a formarse y día a día se fortalece. Esto, con la ayuda de paladares sensibles, puede derivar en un cambio cultural, un cambio en nuestra relación con los alimentos que exceda a lo fermentado y que es una parte crucial para todas las personas. La fermentación gastronómica es un laboratorio científico que a la vez funciona de canal de divulgación a través de los clientes. ¡Cuánto de lo que la ciencia facilita a los más osados cocineros fermentistas se refleja en las cocinas de los hogares! Es este necesario intercambio entre gastronomía y ciencia el que me hace sentir **un científico entre los cocineros y un verdadero cocinero entre los científicos.**

IV. Declaración de posibles conflictos de interés

Los autores no declaran poseer conflictos de interés.

V. Bibliografía citada

[1] Sandor Ellix Katz. "El Arte de la Fermentación", Gaia Ediciones, 2016, España.

[2] Sandor Ellix Katz. "Pura Fermentación", Gaia Ediciones, 2013, España.

[3] René Redzepi y David Zilber. "La Guía de Fermentación de Noma", Editorial Neo Person, España.

Fotografía de los participantes del Workshop

Este libro es el resultado de un Taller organizado por el Instituto Danone del Cono Sur, que reunió en Buenos Aires el 18 de octubre de 2019 a numerosos expertos, de Argentina y del mundo, para abordar la temática de los alimentos fermentados y el fenómeno de la fermentación desde una perspectiva múltiple. En este Taller participaron, en representación del resto de los autores:

Analía Abraham
Lucía Álvarez
Jésica Blajman
Esteban Carmuega
Akihito Endo
Silvina Fadda
Alejandro Ferrari
Carlos Gómez-Gallego
Juan Martín Oteiza
Carolina Maldonado
Gabriela Perdigón
Gonzalo Pérez-Marc
Micaela Pescuma
Martín Rumbo
Martín Russo
Patricia Schneider
Gabriel Vinderola
Federico Weill
Ricardo Weill
Gabriela Zárate

INSTITUTO DANONE
ARGENTINA, CHILE, URUGUAY
CONO SUR