

Artículo recibido 4 de agosto de 2023

Publicado 25 de septiembre de 2023

Efecto de adición de azúcares y presencia de oxígeno sobre el metabolismo de bacterias lácticas: soja y medio de cultivoRodríguez de Olmos, Antonieta¹; Nacchio, Bárbara L.²; Garro, Oscar A.³; Garro, Marisa S.²

1-Universidad Católica de Salta (UCASAL), Salta, Argentina

E-mail: anttorod@gmail.com

2-Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)-CONICET-CCT NOA Sur, Chacabuco 145, (T4000ILC) San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

E-mail: blnacchio@gmail.com; mgarro@cerela.org.ar

3- Universidad Nacional del Chaco Austral (UNCAUS)-INIPTA-CONICET

Cte. Fernandez 755 (3700)- Pcia. Roque Saenz Peña, Chaco, Argentina

E-mail: garro@uncaus.edu.ar

ORCID Antonieta Rodríguez de Olmos 0000-0002-0722-4141

ORCID Luciana Bárbara Nacchio 0009-0007-3665-286X

ORCID Oscar Garro 0000-0003-4106-2315

ORCID Marisa Selva Garro 0000-0003-4496-4584

Resumen

Estudios en pastas de soja (PS) sin adición de azúcar y baja concentración de humedad, mostraron que *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* CRL 207 produjo principalmente ácido acético y en menor proporción, ácido láctico y etanol, presentando un cambio en su vía metabólica normal. La cepa no utilizó los principales hidratos de carbono presentes por lo que se podría generar una condición de sustrato limitante con cambios en el uso del piruvato. El oxígeno es un factor importante en el metabolismo y destinos del piruvato, y se encuentra presente en sustratos sólidos principalmente en aquellos que contienen menor contenido de agua. En este trabajo se estudió el

crecimiento, consumo de sustrato y producción de ácidos orgánicos por la cepa en PS con 65% de humedad adicionadas con sacarosa, glucosa o fructosa, usando como control la PS basal. Además, se realizaron estudios en medio líquido adicionado con los mismos azúcares, en agitación para evaluar la influencia del oxígeno. Los resultados obtenidos demostraron un cambio en el metabolismo de la cepa bajo las condiciones estudiadas (diferentes fuentes de carbono y disponibilidad de oxígeno) por la baja humedad del sustrato sólido de soja.

Palabras clave: Bacterias lácticas, soja, fermentación en sustrato sólido, oxígeno, fuentes de carbono

Abstract

Effect of sugar addition and oxygen presence on the metabolism of lactic acid bacteria: soybean and culture medium

Studies in soybean pastes (PS) without added sugar and low moisture concentration, showed that *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* CRL 207 produced mainly acetic acid and, to a lesser extent, lactic acid and ethanol, presenting a change in its normal metabolic pathway. The strain did not use the main carbohydrates present, so a limiting substrate condition could be generated with changes in the use of pyruvate. Oxygen is an important factor in the metabolism and fate of pyruvate and it is present in solid substrates, mainly those with lower water content. In order to understand the behavior presented by the strain in the PS, in this work we studied the growth, consumption of substrate and production of organic acids by the strain in PS with 65% moisture added with sucrose, glucose or fructose, using basal PS as control. In addition, studies were carried out in a liquid medium added with the same sugars, under agitation to evaluate the influence of oxygen. The results obtained demonstrated a change in the metabolism of the strain under the studied conditions (different carbon sources and oxygen availability) due to the low moisture of the solid soybean substrate.

Keywords: Lactic acid bacteria, soy bean, solid state fermentation, oxygen, carbon source

INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas (BAL) no poseen un sistema respiratorio funcional por lo que deben obtener su energía a través de la fosforilación a nivel de sustrato. Los azúcares son la principal fuente de carbono y de energía para las BAL tanto para la producción de alimentos fermentados, como en los medios utilizados a escala laboratorio. Si bien las BAL prefieren la glucosa como fuente de carbono y energía, tienen la capacidad de metabolizar otras hexosas comunes; siendo un comportamiento dependiente de cepa. Las BAL asociadas a vegetales utilizan una gran variedad de hidratos de carbono, incluyendo los beta-glucósidos [1]. De acuerdo a las vías de degradación de azúcares que utilizan, las BAL se dividen en homofermentativas y heterofermentativas. Las bacterias homofermentativas utilizan la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) o glucólisis, para la fermentación de las hexosas, siendo el ácido láctico el principal producto de fermentación [2], [3]. En este metabolismo el piruvato es el intermediario clave en la vía para la producción de ácido láctico. Las bacterias homofermentativas pueden sufrir un cambio metabólico hacia una fermentación ácido-mixta cuando el flujo glicolítico es bajo, afectando los niveles de los intermediarios y posteriormente, las actividades de las enzimas que compiten por el piruvato, dando lugar a otros productos además de lactato, como acetato, formiato y etanol [2], [4]. Mientras que, las BAL heterofermentativas como *Leuconostoc*, *Oenococcus*, y ciertas especies de *Lactobacillus* en general no sólo fermentan las hexosas, sino también las pentosas a través de la vía 6-fosfogluconato-fosfocetolasa (PK), o vía de las pentosas fosfato, que permite la síntesis de otros productos además de ácido láctico como etanol, ácido acético y CO₂ [5], [6] [3]. Además, existen otros caminos alternativos en las BAL para el uso del piruvato que pueden conducir a la producción de distintos compuestos además de ácido láctico, los cuales pueden ser los principales metabolitos en condiciones limitantes de glucosa o en presencia de oxígeno como aceptor de electrones [7].

En condiciones de sustrato limitante o por la naturaleza del sustrato, las células responden regulando ciertas actividades enzimáticas para impedir parcialmente que el piruvato se reduzca a ácido láctico. En su lugar, se puede obtener energía utilizando

otras alternativas como la piruvato formato liasa o piruvato oxidasa, ya que existe un sitio de fosforilación a nivel de sustrato que implica la conversión de acetil-P por la enzima acetato quinasa dando lugar a la producción y acumulación de ácido acético y ganancia de ATP [5], [8].

La fermentación en sustrato sólido (FSS) es una metodología que se emplea desde tiempos remotos para la producción de diferentes tipos de productos como alimentos, medicamentos, compuestos de aroma, etc. [9]. Sin embargo, el estudio de las bacterias en este tipo de sistemas es escaso y existe poca información sobre la optimización de parámetros debido a que esta clase de fermentación ha sido utilizada principalmente en hongos y levaduras por su mayor tolerancia a menores contenidos de humedad [10], [11].

En trabajos previos se estudiaron los principales parámetros de fermentación de *Lactocaseibacillus (L. paracasei* subsp. *paracasei* CRL 207 sobre pasta de soja (PS) sin azúcar añadido y varias condiciones de temperatura y humedad [12].

Bajo condiciones de FSS con matriz soja se demostró que la cepa creció y su biomasa fue similar en todas las condiciones probadas, el pH tuvo poca reducción en PS con bajo contenido de humedad (65%, 55% y 50%) con respecto al control de PS sin inocular. El cambio de humedad afecta la transferencia de oxígeno en la FSS y podría tener un efecto en el uso del piruvato por parte de las BAL. En relación con estos resultados, en este trabajo se propone analizar el efecto de la adición de diferentes azúcares en matriz de soja sobre la producción de ácidos orgánicos por *L. paracasei* subsp. *paracasei*. Como estudio complementario se investigó el efecto de la adición de azúcar y la presencia de oxígeno usando medio de cultivo (MRS) y el mismo microorganismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y condiciones de cultivo

L. paracasei subsp. *paracasei* CRL 207 (*L. paracasei*), perteneciente a la Colección de cultivos (CRL) de CERELA-CONICET, se utilizó en todos los ensayos. Previo a su uso se activó y propagó en caldo MRS. Viabilidad celular se determinó por el método de recuento en placa usando diluciones seriales, los resultados fueron expresados como log UFC/g o ml. Se utilizaron dos tipos de fermentaciones: líquida en

caldo MRS base (sin azúcar), y sustrato sólido (FSS) usando PS con 65% de humedad [12]. En los diferentes ensayos se adicionó glucosa, fructosa o sacarosa (Britania).

Efecto de la adición de azúcar

Con el objeto de seleccionar la concentración inicial de azúcar a adicionar se realizó un ensayo preliminar. Se usó MRS base agregando glucosa, fructosa o sacarosa en diferente concentración: 0,5; 1; 2; 4 y 6% (p/v), se inoculó la cepa seleccionada (DO_{560} inicial de 0,1) en cada condición, y se colocó en microplaca. Se utilizó un lector de microplacas que permite medir el crecimiento microbiano por densidad óptica (DO_{560}) a 37 °C cada 30 min durante 24 h (VERSAmax, Sunnyvale, CA, EEUU).

Luego, se investigó el agregado de estos azúcares (concentración seleccionada por ensayo anterior) al medio MRS base en condiciones estáticas y con agitación (150 rpm). Los medios se inocularon con la cepa seleccionada (DO_{560} inicial de 0,1) y se incubaron a 37 °C durante 24 h, tomándose muestras a diferentes tiempos (0, 2, 3, 4, 6, 8 y 24 h). El crecimiento se estudió mediante medidas de absorbancia a 560 nm (Lector Tubos Spectronic 20, Bausch & Lomb) y medidas de pH. Se calculó la diferencia de DO y pH (0 y 24h), y la velocidad específica de crecimiento.

Al mismo tiempo, se evaluó la adición de sacarosa y sus productos de hidrólisis (glucosa y fructosa) en PS. Se inoculó al 2% y se incubó a 37 °C. Se tomaron muestras en diferentes tiempos de fermentación (0, 4, 8, 12 y 24 h) y se determinó pH (pHmetro Sartorius, PT10), ácidos orgánicos y azúcares por técnicas de HPLC [13].

RESULTADOS Y DISCUSION

Selección de la concentración inicial de azúcar en medio de cultivo

En Figura 1 se muestran las curvas de crecimiento en microplaca (DO_{560}) de *L. paracasei* en caldo MRS base con glucosa (Figura 1A), fructosa (Figura 1B) y sacarosa (Figura 1C) en diferentes concentraciones. La cepa fue capaz de crecer en todas las condiciones. En glucosa y fructosa mostró un mayor desarrollo ($DO_{560} \sim 1,4-1,2$) en contraste con las condiciones de sacarosa ($DO_{560} \sim 0,6$). En el estudio realizado en MRS

se pudo observar que la cepa no fue capaz de utilizar la sacarosa de manera eficiente como sus monómeros, glucosa y fructosa, presentando un crecimiento menor. Este crecimiento fue similar con el desarrollo de la cepa en el medio basal sin azúcar (datos no mostrados), lo que significa que la cepa podría crecer utilizando otra fuente de carbono y energía, pero en menor medida con respecto a la presencia de azúcares fermentables como la glucosa y la fructosa. Para todas las condiciones probadas la cepa creció mejor en 2 % de azúcar añadida, como se puede observar en Figura 1D. Seleccionando esta concentración (2%) para los ensayos en MRS base con y sin agitación y en PS.

Crecimiento de L. paracasei en medio MRS base con adición de 2% de azúcares en condiciones estáticas y de agitación

Se evaluó el desarrollo de la cepa en medio líquido con adición de diferentes azúcares (2%) con y sin agitación para analizar los cambios en presencia de oxígeno (aerobiosis) ya que este es un factor importante en la FSS [14].

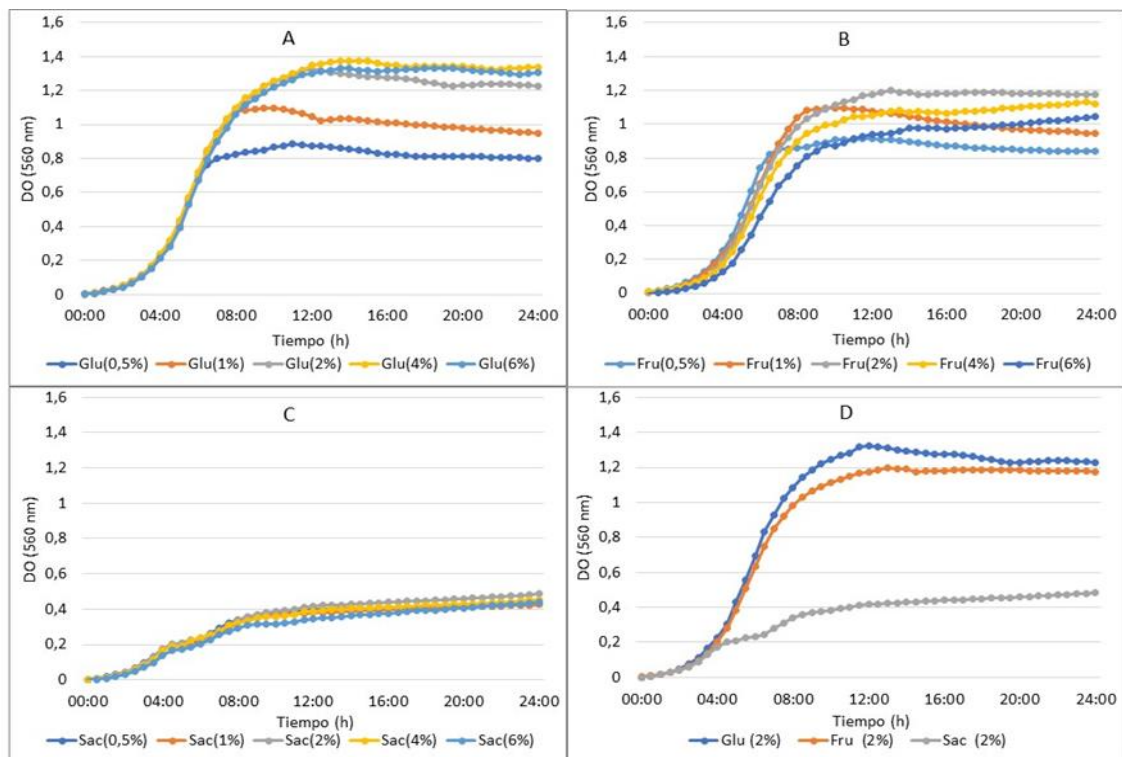


Figura 1. Curvas de crecimiento en microplaca (DO_{560}) de *L. paracasei* en caldo MRS base con diferentes concentraciones de azúcares. A: glucosa; B: fructosa; C: sacarosa; D: crecimiento en caldo MRS agregado con 2% de cada azúcar.

En la Tabla 1 se muestran los parámetros de crecimiento de la cepa en condiciones estáticas y en agitación. La presencia de oxígeno por proceso de agitación produjo un aumento de los valores de biomasa y pH en todas las condiciones en comparación con el proceso estático. La velocidad específica (μ), el $\Delta \log$ UFC/ml y el pH mostraron un ligero incremento, demostrando un efecto positivo por presencia de oxígeno en los parámetros de crecimiento de esta cepa.

Tabla 1. Parámetros de crecimiento de *L. paracasei* en MRS base adicionado de 2% de glucosa, fructosa o sacarosa en condiciones estáticas y aeróbicas

Estático	μ_{max} (h^{-1})	ΔDO_{560nm}	ΔpH
MRS Glucosa 2%	0,48	5,25	2,77
MRS Fructosa 2%	0,47	3,52	2,75
MRS Sacarosa 2%	0,10	0,66	1,11
Con Agitación			
MRS Glucosa 2%	0,51	5,58	2,63
MRS Fructosa 2%	0,52	4,60	2,60
MRS Sacarosa 2%	0,13	0,89	0,48

Efecto de la adición de azúcares (sacarosa, glucosa o fructosa) a la pasta de soja sobre el crecimiento, pH y producción de ácidos orgánicos por L. paracasei

En Figura 2 se muestra el comportamiento de *L. paracasei* en la PS basal (sin azúcar adicional), y en las PS adicionadas con 2% de los distintos azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa). En las cuatro condiciones ensayadas la cepa presentó buen desarrollo alcanzando valores entre $9,75 \pm 0,34$ y $10,14 \pm 0,38$ log UFC/g a las 24 h de fermentación, mostrando el mayor valor para la PS adicionada de glucosa. Se observó descenso del pH hasta las 8 h, luego de ese tiempo en PS basal y PS con sacarosa el pH incrementó levemente. Este efecto, podría estar relacionado a la producción de amoníaco proveniente del catabolismo de aminoácidos por presencia de enzimas proteolíticas [15]. Los pH finales de fermentación (24 h) tuvieron un comportamiento diferente que no se correlacionó con la producción de biomasa. En las PS sin adición de azúcar y con sacarosa no tuvieron tanta acidificación (pH $5,92 \pm 0,60$ y $5,40 \pm 0,17$

respectivamente), mientras que las PS adicionadas con glucosa o fructosa la acidificación fue mayor ($\text{pH} \sim 4,50 \pm 0,06$) a las 24 h. Por otra parte, los diferentes valores de pH alcanzados en las muestras podrían estar relacionados con la capacidad de la cepa para metabolizar cada azúcar en la matriz compleja soja en condiciones de FSS. En la PS basal la sacarosa presente no mostró variaciones, la cepa no fue capaz de utilizarla como fuente de carbono, sin embargo se observó formación de ácido acético ($133,27 \mu\text{mol/g}$ a las 24h) como principal producto de fermentación, mientras que la producción de ácido láctico fue menor con un valor de $33,03 \mu\text{mol/g}$ (Figura 2A). En la PS adicionada de sacarosa ($133,41 \mu\text{mol/g}$) se observó una disminución del contenido de este azúcar en las primeras horas de fermentación, manteniéndose luego sin cambios hasta el final de la misma. La glucosa presente en la pasta ($31,90 \mu\text{mol/g}$) fue consumida completamente por la cepa. El ácido láctico fue el principal producto de fermentación con valores próximos a $150 \mu\text{mol/g}$ antes de las 24 h, sin embargo, se observó una disminución del mismo con un valor final de $95,82 \pm 10,86 \mu\text{mol/g}$. Además, la cepa también produjo ácido acético incrementado su valor ($115,76 \pm 17,63 \mu\text{mol/g}$) al final de la fermentación (Figura 2B).

Este resultado podría estar relacionado a la capacidad que tienen ciertas BAL de utilizar el ácido láctico para obtener energía adicional luego del agotamiento de la glucosa obtenida y en condiciones aeróbicas, con la producción de ácido acético y ATP [16]–[19]. Por otra parte, en estas dos condiciones ensayadas se observó buena formación de biomasa con producción de ácidos orgánicos, estos resultados podrían sugerir que la bacteria podría usar otras fuentes de carbono de la matriz compleja soja para su desarrollo. Una posibilidad es que la cepa utilice la glucosa adicional proveniente de las IS glicosiladas, por acción de la enzima β -glucosidasa. Rodríguez de Olmos y col. [12] mostraron incremento en esta enzima y en las IS agliconas trabajando en condiciones similares. Otra posibilidad podría estar relacionada con el estrés osmótico que se genera en la matriz con el mayor contenido de sacarosa presente que no es consumida. En la PS adicionada de glucosa la cepa presentó un metabolismo homoláctico con alta producción de ácido láctico y escasa producción de ácido acético (Figura 2C). Un comportamiento similar se presentó cuando la PS fue adicionada con

fructosa (188 $\mu\text{mol/g}$), observándose el consumo total de este carbohidrato y la glucosa presente (38,33 $\mu\text{mol/g}$) en esta matriz, al final de la fermentación. *L. paracasei* subsp. *paracasei* CRL 207 produjo ácido láctico como principal producto de fermentación (418 $\mu\text{mol/g}$), con una menor producción de ácido acético (32,60 $\mu\text{mol/g}$) (Figura 2 D).

En estas últimas dos condiciones, los valores obtenidos de ácido láctico fueron próximos a los teóricos esperados, considerando que la glucosa y fructosa estarían siendo metabolizados por medio de la vía EMB, por cada mol de azúcar utilizado se obtienen 2 moles de ácido láctico [2], [4].

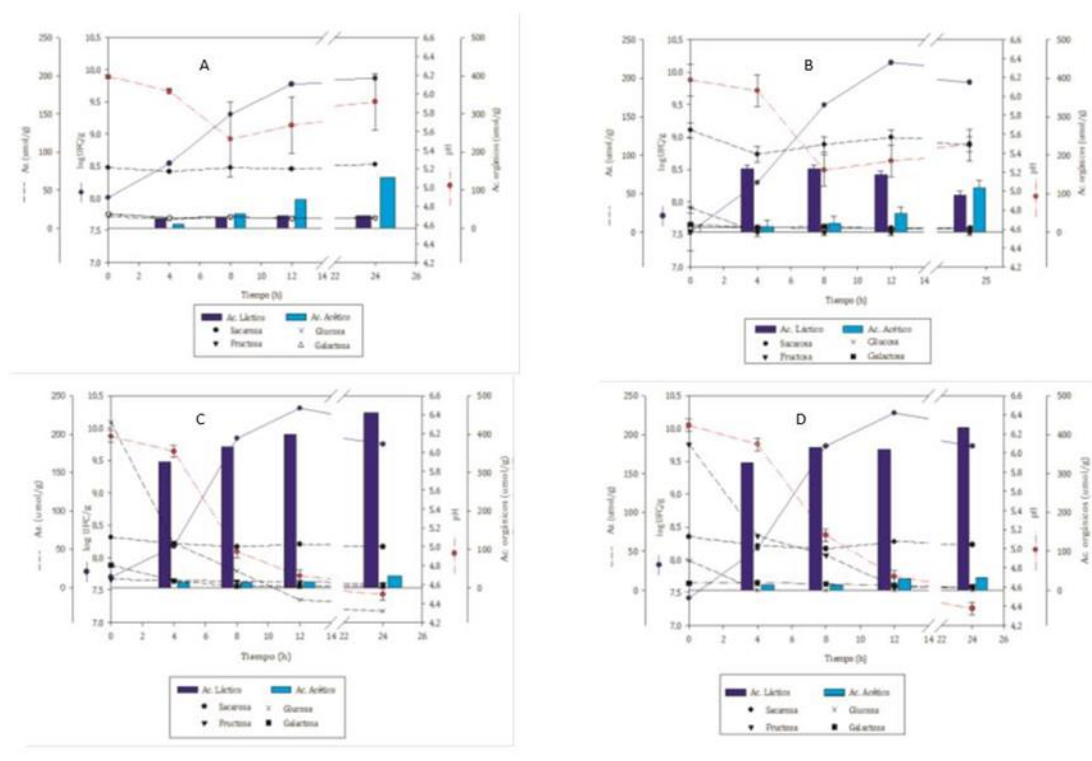


Figura 2. Comparación del desarrollo de *L. paracasei* en pastas de soja (PS). A: PS base sin azúcar; B: PS adicionada con sacarosa 2%; C: PS con glucosa 2%; D: PD con fructosa 2%. Crecimiento (log UFC/g), pH, consumo de azúcares y producción de ácidos orgánicos ($\mu\text{mol/g}$).

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la cepa de *L. paracasei* subsp. *paracasei* CRL 207 utilizada cambia su perfil metabólico en la PS de acuerdo a los azúcares presentes en la matriz, las cepas del grupo *Lacticaseibacillus* poseen un metabolismo homofermentativo, pero bajo ciertas condiciones como por ejemplo azúcar limitante, presencia de oxígeno pueden presentar una desviación de la

vía glicolítica normal (EMB) pudiendo generar otros productos de fermentación [3], [4], observándose diferencias en la producción de ácidos orgánicos y, en consecuencia del pH de la matriz. El efecto de la presencia de oxígeno se estudió en medio de cultivo (MRS) observando un incremento en la biomasa y el pH en todas las condiciones ensayadas, poniendo en evidencia que el oxígeno podría ser responsable en parte, del comportamiento que la cepa presentó en las pastas de soja sin azúcar adicional.

Algunas de las enzimas presentes en esta cepa podrían estar afectadas por la presencia de oxígeno, como la activación de la piruvato oxidasa que permite metabolizar el piruvato a acetyl-P (susceptible de fosforilación a nivel de sustrato), CO₂ y H₂O₂. Esta acción enzimática permite la obtención de una cantidad de energía suplementaria (en forma de ATP) en condiciones de sustrato limitante gracias a la producción de acetyl-P para la fosforilación a nivel de sustrato por la acetato quinasa [2]. La actividad aumenta en presencia de oxígeno y se reduce en presencia de glucosa. Este mecanismo podría ser responsable, en parte, de la energía adicional que obtiene *L. paracasei* para poder desarrollar en las PS en donde no se observaron cambios significativos en la concentración de los azúcares. Se ha demostrado en bacterias del grupo *Lacticaseibacillus*, la incidencia del oxígeno sobre el aumento de la biomasa y aumento del pH del medio por activación de la enzima piruvato oxidasa en condiciones de baja concentración de glucosa y agitación [20], que podría ser un mecanismo presente en la cepa bajo estudio en condiciones de sustrato limitante y presencia de oxígeno, tanto en medio líquido como en las PS.

En los últimos años se han desarrollado trabajos donde se evaluó el efecto de la presencia de oxígeno en condiciones de respiración, donde el suplemento de hemina y vitamina k2 permite a las bacterias utilizar la respiración como alternativa para la obtención de energía en condiciones de sustrato limitante y presencia de oxígeno en distintos géneros de BAL [20]–[24]. Sería interesante evaluar en *L. paracasei* subsp. *paracasei* CRL 207 la posibilidad de respirar bajo las condiciones estudiadas y utilizar la energía obtenida a partir de este mecanismo, debido a que se ha demostrado que en condiciones de respiración, las bacterias lácticas presentaron mayor tolerancia a diferentes condiciones de estrés [25], [26], resultando interesante como estrategia para

umentar la viabilidad, la seguridad y las propiedades tecnológicas y funcionales de los alimentos fermentados con BAL [26], [27].

CONCLUSIONES

Lacticaseibacillus paracasei subsp. *paracasei* CRL 207 no fue capaz de utilizar sacarosa (azúcar principal de la soja) como fuente de carbono fermentativo en la PS ni en el caldo MRS. A diferencia de MRS, en la PS base y las adicionadas de diferentes azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa) la cepa alcanzó un alto crecimiento, alcanzando diferentes pH finales y producción de ácidos orgánicos desviando el metabolismo homofermentativo. Este comportamiento podría estar relacionado con la presencia de oxígeno en la matriz de soja tal como se evidenció en el caldo MRS. Sin embargo, la PS es un sustrato complejo que puede tener otras fuentes de carbono que podrían ser utilizadas por este microorganismo para lograr una alta biomasa en las PS fermentadas. Además, el hecho de que la cepa no sea capaz de utilizar la sacarosa produciría una condición de sustrato limitante, junto con la presencia de oxígeno, redirigiendo los futuros de piruvato a la obtención de otros productos finales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero a ANPCyT-FONCYT (PICT 2014 N° 1949; PICT2019 N° 3316) y CONICET (PIP2020 N° 062; PUE2017-0035).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] T. Aleksandrak-Piekarczyk, in *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, 2013.
- [2] L. Axelsson, in *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects, Third Edition: Revised and Expanded*, 2004.
- [3] J. Zheng *et al*, *Int J Syst Evol Microbiol*, 70, 4, 2020.

-
- [4] M. G. Gänzle, *Current Opinion in Food Science*, 2. 2015.
- [5] T. Zaunmüller, M. Eichert, H. Richter, and G. Unden, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 3. 2006.
- [6] E. Årsköld, E. Lohmeier-Vogel, R. Cao, S. Roos, P. Rådström, and E. W. J. Van Niel, *J Bacteriol*, 190, 1, 2008.
- [7] M. G. Gänzle, N. Vermeulen, and R. F. Vogel, *Food Microbiol*, 24, 2, 2007.
- [8] E. Pessione, *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2. 2012.
- [9] U. Hölker and J. Lenz, *Current Opinion in Microbiology*, 8, 3. pp. 301–306, Jun. 2005.
- [10] S. R. Couto and M. Á. Sanromán, *J Food Eng*, 76, 3, pp. 291–302, Oct. 2006.
- [11] A. Rodríguez de Olmos, O. A. Garro, and M. S. Garro, *LWT*, 157, 2022.
- [12] A. R. de Olmos, E. Bru, and M. S. Garro, *Int J Food Microbiol*, 196, pp. 16–23, 2015.
- [13] J. A. Marazza, M. S. Garro, and G. Savoy de Giori, *Food Microbiol*, 26, 3, 2009.
- [14] K. S. M. S. Raghavarao, T. V. Ranganathan, and N. G. Karanth, *Biochem Eng J*, 13, 2–3, pp. 127–135, Mar. 2003.

-
- [15] L. Aguirre, E. M. Hebert, M. S. Garro, and G. Savoy de Giori, *LWT*, 59, 2P1, 2014.
- [16] M. V. Da Cunha and M. A. Foster, *J Bacteriol*, 174, 3, 1992.
- [17] S. J. W. H. Oude Elferink, E. J. Krooneman, J. C. Gottschal, S. F. Spoelstra, F. Faber, and F. Driehuis, *Appl Environ Microbiol*, 67, 1, 2001.
- [18] F. Lorquet *et al.*, *J Bacteriol*, 186, 12, 2004
- [19] S. D. Johanningsmeier and R. F. McFeeters, *Food Microbiol*, 35, 2, 2013.
- [20] T. Zotta *et al.*, *PLoS One*, 9, 6, 2014,
- [21] R. Brooijmans, B. Smit, F. Santos, J. van Riel, W. M. de Vos, and J. Hugenholtz, *Microb Cell Fact*, 8, 2009.
- [22] D. Lechardeur *et al.*, *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 2. 2011.
- [23] M. B. Pedersen, P. Gaudu, D. Lechardeur, M. A. Petit, and A. Gruss, *Annu Rev Food Sci Technol*, 3, 1, 2012.
- [24] T. Zotta, A. Ricciardi, R. G. Ianniello, L. V. Storti, N. A. Glibota, and E. Parente, *Food Microbiol*, 76, 2018.
- [25] A. Ricciardi, M. A. Castiglione Morelli, R. G. Ianniello, E. Parente, and T. Zotta, *Ann Microbiol*, 65, 3, 2015.
- [26] A. Reale *et al.*, *LWT*, 60, 2, 2015.

- [27] B. Lee, S. Tachon, R. A. Eigenheer, B. S. Phinney, and M. L. Marco, *J Proteome Res*, 14, 8, pp. 3136–3147, Aug. 2015.