

EFFECTO DE LOS ACEITES COMESTIBLES SOBRE
LAS PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE
LACTOBACILLUS PENTOSUS AISLADAS DE LA
FERMENTACIÓN NATURAL DE LA ACEITUNA
ALOREÑA



Universidad de Jaén

Memoria para optar al grado de Doctor

Esther Alonso García

Área de Microbiología
Dpto. de Ciencias de la Salud
Facultad de Ciencias Experimentales
Universidad de Jaén

2022

EFFECTO DE LOS ACEITES COMESTIBLES SOBRE
LAS PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE
LACTOBACILLUS PENTOSUS AISLADAS DE LA
FERMENTACIÓN NATURAL DE LA ACEITUNA
ALOREÑA

Memoria para optar al grado de Doctor

Jaén, 2022

Fdo: Esther Alonso García
Aspirante al Grado de Doctor

Los Directores del trabajo:

Fdo: Hikmate Abriouel Hayani

Fdo: Nabil Benomar El Bakali

*Área de Microbiología. Dpto. de Ciencias de la Salud
Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén*

La profesora D^a Hikmate Abriouel Hayani y el doctor D^a Nabil Benomar El Bakali, pertenecientes al Área de Microbiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén

CERTIFICAN:

Que el trabajo expuesto en la presente Tesis Doctoral: “EFECTO DE LOS ACEITES COMESTIBLES SOBRE LAS PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE LACTOBACILLUS PENTOSUS AISLADAS DE LA FERMENTACIÓN NATURAL DE LA ACEITUNA ALOREÑA” presentado por D^a. Esther Alonso García ha sido realizado bajo nuestra dirección y supervisión, cumpliendo así mismo todas las exigencias para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor.

Jaén, Abril de 2022

Fdo: Hikmate Abriouel Hayani

Fdo: Nabil Benomar El Bakali

Este trabajo ha sido subvencionado por las Estructuras de Investigación EI_BIO01_2017, EI_BIO1_2019 y EI_BIO1_2021.

ÍNDICE

Summary	9
Introducción	15
1. Probióticos.....	17
1.1. ¿Qué son, quiénes son y qué función desempeñan?.....	17
1.2. ¿Cómo actúan en la barrera intestinal?.....	30
1.3. Características de la cepa probiótica idónea según la FAO y OMS.....	33
2. <i>Lactobacillus</i> como probióticos.....	39
2.1. Generalidades.....	39
2.2. Características probióticas a nivel fenotípico y genotípico.....	48
2.3. <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> (anteriormente <i>Lactobacillus pentosus</i>) como candidata probiótica.....	54
3. Interacción de los probióticos con la dieta y el hospedador.....	57
3.1. Componentes alimenticios.....	57
3.2. Microbioma intestinal.....	66
4. Nuevas herramientas para el estudio de los probióticos.....	80
4.1. Genómica.....	81
4.2. Transcriptómica.....	84
4.3. Proteómica.....	88
4.4. Metabolómica.....	92
Objetivos	99
Trabajo Experimental y Resultados	103
Artículo I: New insights into the molecular effects and probiotic properties of <i>Lactobacillus pentosus</i> pre-adapted to edible oils.....	105
Artículo II: Transcriptomic Profile and Probiotic Properties of <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> pre-adapted to edible oils.....	117
Artículo III: Changes in resistome profile of potential probiotic <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> in response to edible oil adaptation.....	135

Discusión	177
Conclusiones	195
Conclusions	199
Referencias	203

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, he de dar las gracias a mis directores, Hikmate y Nabil, por confiar en mí para llevar a cabo este bonito proyecto. No puedo estar más agradecida por todo el apoyo que he recibido para completar esta tesis. Realmente aprecio su paciencia e inspiración, que me han dado espacio para cometer innumerables errores y pasar de ser un novato a un investigador experimentado. La finalización de esta tesis no habría sido posible sin su guía y conocimientos.

Muchas gracias también a Beatriz que me enseñó el trabajo de laboratorio desde el primer día en una época muy estresante para ella, pero siempre tuvo tiempo para mí. Y en especial muchas gracias a mi compañero Juanjo por su activa colaboración en esta tesis, sin él este trabajo no habría sido posible. Gracias a Gabi y Javi, que junto con Beatriz y Juanjo hicieron del laboratorio un sitio al que desear ir cada día.

I would also like to express my special appreciation and sincere gratitude to University of Strathclyde and Charles Knapp and his team. To start a new life and research in a foreign country is never easy, and he accepted me as part of his team and was supportive since the first day we knew each other.

Also thank Carla, Khalida and Tanya for all their support in the lab, and their help when things didn't go well. I am happy to say that I am taking away some good friends from my experience at Strathclyde University and hope to see them again.

Por último, gracias a mis padres que siempre me animaron a seguir estudiando, y en especial a mi hermana Irene que me ayudó y me apoyó siempre en todo lo que necesité.

SUMMARY

In this study, the survival and growth of seven probiotic *Lactiplantibacillus pentosus* strains isolated from Aloreña Green table olives in the presence of vegetable-based edible oils (i.e., sunflower, olive, linseed, soy, corn, almond and argan) and mint essential oil were determined for the first time. Slight decreases in bacterial viability were observed depending on the strain and oil exposure, mainly mint essential oil. However, pre-adapting the strains to the corresponding oils significantly increased their cell viabilities. As such, this study examined whether pre-adapting probiotic *L. pentosus* strains with oils will constitute a new strategy to increase stress resistance, e.g., acids (pH 1.5) or bile (up to 3.6%) in food production and/or during digestion, and improve functional probiotic properties. Improvements in stress resistance (acidic and bile conditions) were noticed in some pre-adapted strains with oils; further, pre-adaptations with olive, argan, sunflower and linseed oils induced gene expression (e.g., *fus*, *rpsL*, *pgm*, *groEL*, *enol* and *prep*) for moonlighting proteins involved in several stress responses and other functions. As such, pre-adaptation with vegetable edible oils may represent a novel approach for manufacturing probiotic products by improving the stability of bacteria during industrial processes that would otherwise reduce their viability and functionality.

We also determined whether pre-adapting *L. pentosus* strains, isolated from Aloreña green table olives, to vegetable-based edible oils improved their robustness and functionality; this may have great importance on their stress response during fermentation, storage, and digestion. Pre-adapting the strains to the corresponding oils significantly increased their probiotic functionality (e.g., auto-aggregation, co-aggregation with pathogens, and mucin adhesion), although results depended on the strain and the oil used for pre-adaptation. As such, we selected olive-adapted (TO) *L. pentosus* AP2-16, which exhibited improved functionality, and subjected it to transcriptomic profiling with the aim to understand the molecular mechanisms involved in the adaptation and the increased functionality. Global transcriptomic analysis of oil-adapted (olive or almond) and non-adapted (control) *L. pentosus* AP2-16 realized that 3,259 genes were expressed, with 2,779 mapped to the reference

database. Comparative transcriptomic analysis showed that 125 genes (olive vs. control) and 108 genes (olive vs. almond) became significantly differentially expressed. TO *L. pentosus* AP2-16 responded by rerouting its metabolic pathways to balance energy production and storage, cell growth and survivability, host interactions (glycoconjugates), and other physiological features. As such, the pre-adaptation of lactobacilli with olive oil switches their transcriptional network to regulate robustness and functionality, possibly representing a novel approach toward the design and manufacture of probiotic products with improved stability and functionality.

On the other hand, safety of *L. pentosus* strains pre-adapted to vegetable-based edible oils was investigated such as antibiotic resistance. Despite increasing interest to investigate horizontal gene transfer as a leading cause of antibiotic resistance spread, the resistome is not only influenced by the influx and efflux of genes in different environments. Rather, the expression of existing genes under different stress conditions requires special attention. This study determined whether pre-adapting *L. pentosus* strains, isolated from Aloreña green table olives, to vegetable-based edible oils influence their phenotypic and genotypic responses to antibiotics. This has significant diet, food matrix, gut health, and food safety concerns. Pre-adapting *L. pentosus* strains to oils significantly changed their susceptibility profile to antibiotics. However, results generally differed among the three strains; although changes in the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of antibiotics occurred, it depended on the *L. pentosus* strain and the oil used for adaptation. The pre-adaptation of *L. pentosus* strains with olive, sunflower, argan and linseed oils induced gene expressions (e.g., *rspL*, *recA* and *uvrB*) in several stress responses. Thus, to analyze this fact in-depth, transcriptional changes were reported in the selected potential probiotic *L. pentosus* CF2-10 adapted with olive or sunflower, rerouting its metabolic pathways to export toxic molecules through efflux pumps and ABC transporters. Pre-adaptation of some lactobacilli with olive or sunflower oils may represent a novel approach for manufacturing probiotic products with improved stability, functionality and

robustness. On the other hand, this finding must be considered in the control of resistance boosting related to horizontal gene transfer and the stress-induced expression of genes involved in the antimicrobial resistance of pathogenic bacteria.

INTRODUCCIÓN

1. PROBIÓTICOS

1.1. ¿Qué son, quiénes son y qué función desempeñan?

Los probióticos se definen como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped" (Hill *et al.*, 2014). A lo largo de los años, diversos alimentos han sido utilizados como vehículo para la entrega de probióticos. Tradicionalmente, se ha recurrido a la leche y los productos lácteos fermentados que contienen microorganismos vivos para restaurar la salud intestinal, considerándose pioneros en alimentación funcional. Este empleo de microorganismos vivos forma la base del concepto probiótico (Sánchez, de los Reyes-Gavilán, Margolles & Gueimonde, 2009). En particular, a principios del siglo pasado, el premio Nobel de inmunología ruso Élie Metchnikoff introdujo la idea de consumir microorganismos vivos beneficiosos para mejorar la salud. La tesis de Metchnikoff proponía que el consumo de leches fermentadas que contienen lactobacilos podría desplazar a los microorganismos intestinales putrefactivos y patógenos y aumentar la longevidad (Gordon, 2008), lo que podría considerarse como la primera referencia a nuestra comprensión actual del concepto probiótico.

El concepto de probiótico no se limita sólo a los alimentos, sino que permite otras opciones de entrega, como preparaciones farmacéuticas y otros escenarios, como ubicaciones extra-intestinales: vías respiratorias, piel, sangre, vías genitourinarias, etc. Tampoco implica una administración oral, permitiendo otras rutas de entrega y aplicación (Sánchez *et al.*, 2017). Además, según la definición actual, un probiótico debe ser un microorganismo vivo y viable, y no es aplicable a microorganismos muertos o componentes celulares. Esta definición de la FAO / OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud) ha sido adoptada por varias organizaciones como la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP), el Codex, el Instituto de

Tecnólogos de Alimentos (IFT), la Organización Mundial de Gastroenterología (WGO) o la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (Hill *et al.*, 2014).

Los principales microorganismos probióticos incluyen cepas de bacterias del ácido láctico mayoritariamente representados por los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y en menor medida *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Sporolactobacillus* y *Enterococcus* aunque también se han reportado como probióticos algunas cepas pertenecientes a especies de *Saccharomyces*, *Bacillus* *Brevibacillus* (Borchers, Selmi, Meyers, Keen & Gershwin, 2009). Según la definición aceptada de probiótico previamente mencionada, considerarse como un probiótico es una característica específica de la cepa. Por lo tanto, las propiedades de cada cepa probiótica deben estar bien definidas y no pueden extrapolarse a otras cepas. También es necesario demostrar científicamente la eficacia de la cepa para conferir un beneficio para la salud del huésped, pero este efecto no tiene que estar relacionado con ningún mecanismo de acción específico (Sánchez *et al.*, 2017). Estos probióticos se agregan a los alimentos, particularmente a los productos lácteos fermentados, ya sea solos o en combinaciones. Con el avance de la investigación, nuevos géneros y cepas de probióticos más desarrollados y centrados están emergiendo (Pandey *et al.*, 2015).

Los productos probióticos pueden contener una sola cepa o una mezcla de dos o más cepas. P.ej. # VSL3 es una mezcla de 8 cepas probióticas diferentes. Los efectos probióticos son muy específicos de cada cepa y no pueden generalizarse. Una sola cepa puede exhibir diferentes beneficios cuando se usa individualmente y en combinación. Los beneficios de una formulación probiótica también difieren según el grupo de pacientes. Los estudios limitados que se han realizado han demostrado una mayor eficacia con los probióticos de múltiples cepas (Chapman, Gibson & Rowland, 2011).

Algunos estudios preclínicos en modelos animales han demostrado que la introducción de cepas de *Bifidobacterium* o *Lactobacillus* en el entorno intestinal de ratones, utilizando diferentes modelos animales, impacta claramente en la composición de microbiota del intestino murino (Arthur *et al.*, 2013; Sugahara *et al.*, 2015; Turróni *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2015). Sin embargo, la literatura reciente

indica que estas modificaciones de la microbiota no son tan evidentes en los humanos, lo que sugiere que los cambios metabólicos bacterianos, en lugar de una representación diferente de las poblaciones microbianas, podrían desempeñar un papel fundamental en el resultado fisiológico final. En este sentido, los investigadores han aprovechado las nuevas técnicas ómicas incluyendo la metagenómica, metatranscriptómica y metabolómica para desentrañar los procesos fisiológicos y ecológicos subyacentes a los efectos probióticos observados en humanos (Sánchez *et al.*, 2017).

Uno de los estudios más relevantes fue realizado por McNulty *et al.* (2011), en cuyo trabajo, los microbiomas fecales y metatranscriptomas de gemelas monocigóticas hembras adultas se caracterizaron antes, durante y después del consumo de una leche fermentada disponible comercialmente que contiene, entre otros microorganismos, una cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* con efectos atribuidos a la salud. Sorprendentemente, la composición de especies bacterianas no cambió significativamente durante el curso del estudio. Sin embargo, se detectaron cambios importantes en el metatranscriptoma fecal humano durante el período de consumo de leche fermentada, especialmente los relacionados con el metabolismo de los polisacáridos vegetales. En contraste con estas observaciones, otros estudios han demostrado que los probióticos pueden causar modificaciones en poblaciones bacterianas específicas, con o sin cambios metabólicos asociados a la microbiota. Por ejemplo, usando secuenciación del gen de ARN ribosómico 16S de alto rendimiento, Plaza-Díaz *et al.* (2015) mostraron que la ingestión de cepas de *L. rhamnosus*, *L. paracasei* o *Bifidobacterium breve* por parte de una población adulta indujo cambios en la población bacteriana fecal. En otro estudio, la leche fermentada que contiene *B. animalis* subsp. *lactis* logró disminuir la abundancia de algunas bacterias dañinas y modificar la producción de ácidos grasos de cadena corta colónicos (Veiga *et al.*, 2014). Además, existe clara evidencia de que un cambio en el entorno intestinal local no implica necesariamente variaciones en las poblaciones bacterianas y, en algunas circunstancias, los efectos impulsados por los probióticos parecen estar relacionados

con un cambio metabólico de la microbiota intestinal (por ejemplo, aumentar la producción de ácidos grasos de cadena corta), en lugar de un cambio en el perfil de microbiota (Sánchez *et al.*, 2017).

Curiosamente, los probióticos desarrollan roles relevantes en términos de actividades de alimentación cruzada cuando entran en contacto con el resto de comunidades microbianas, influyendo en las capacidades metabólicas de otros miembros comensales. Se pueden encontrar grandes ejemplos de esto dentro del género *Bifidobacterium*, que son importantes intestinales comensales con algunos representantes probióticos. Las bifidobacterias pueden metabolizar diferentes carbohidratos originados de la dieta o de la mucosa del huésped, produciendo diferentes proporciones de ácido acético/láctico a través de su ruta fermentativa específica. La presencia de una especie de *Bifidobacterium* dada puede influir en la actividad metabólica de otras especies a través de mecanismos de alimentación cruzada y viceversa, como se observó en cocultivos de diferentes especies de bifidobacterias (Sanchez *et al.*, 2004). Este es un buen ejemplo de cómo las bifidobacterias administradas como probióticos pueden afectar la capacidad metabólica de las poblaciones intestinales comensales al perturbar la forma en que se metabolizan los glicanos del huésped. Además, los cambios en la producción de ácidos orgánicos afectarían el metabolismo de otros grupos microbianos, como las bacterias productoras de butirato (Rios-Covian *et al.*, 2015). Por último, un reciente estudio ha demostrado que los lactantes alérgicos alimentados con una fórmula complementada con *L. rhamnosus* GG aumentaron la población bacteriana productora de butirato en las heces (Canani *et al.*, 2016). Asimismo, la investigación de Ferrario *et al.* (2014) mostró un aumento de algunos productos de butirato después de la ingesta de una cepa de *L. paracasei*, y sugiere que las concentraciones de butirato fecal podrían representar un biomarcador importante para identificar sujetos que pueden beneficiarse del tratamiento con probióticos.

La FAO / OMS define los prebióticos como un componente alimenticio no viable que confiere beneficios para la salud del huésped asociados con la modulación de la

microbiota (Pandey *et al.*, 2015). Los prebióticos son principalmente fibras que constituyen ingredientes alimenticios no digeribles y afectan beneficiosamente a la salud del huésped al estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de algunos géneros de microorganismos en el colon, en general, lactobacilos y bifidobacterias (De Vrese & Schrezenmeir, 2008). Un prebiótico ideal debería ser, en primer lugar, resistente a las acciones de los ácidos en el estómago, las sales biliares y otras enzimas hidrolizantes en el intestino; en segundo lugar, no debe ser absorbido en el tracto gastrointestinal superior; y por último, ser fácilmente fermentable por la microbiota intestinal beneficiosa (Kuo, 2013).

Los prebióticos forman un grupo de diversos ingredientes de carbohidratos que se conocen poco con referencia a su origen, perfiles de fermentación y dosis requeridas para ejercer efectos en la salud. Algunas de las fuentes de prebióticos incluyen la leche materna, la soya, las fuentes de inulina (como la alcachofa de Jerusalén, las raíces de achicoria, etc.), la avena cruda, el trigo sin refinar, la cebada sin refinar, el yacón, los carbohidratos no digeribles y, en particular, los oligosacáridos no digeribles. Sin embargo, entre los prebióticos, solo los oligosacáridos bifidogénicos, no digeribles, particularmente la inulina, su producto de hidrólisis oligofruktosa y (trans) galactooligosacáridos, cumplen todos los criterios para la clasificación prebiótica (Pokusaeva *et al.*, 2011).

Los prebióticos como la inulina y la pectina exhiben varios beneficios para la salud, como la reducción de la prevalencia y la duración de la diarrea, el alivio de la inflamación y otros síntomas asociados con el trastorno intestinal, y los efectos protectores para prevenir el cáncer de colon (Peña, 2007). También están implicados en mejorar la biodisponibilidad y la absorción de minerales, reducir algunos factores de riesgo de enfermedad cardiovascular y promover la saciedad y la pérdida de peso, evitando así la obesidad (Pokusaeva *et al.*, 2011).

Los probióticos en combinación con otros componentes dietéticos activos representan una estrategia muy notable para afectar positivamente la salud del huésped. En este sentido, se han utilizado sinbióticos, es decir, combinaciones de

probióticos y prebióticos (Patel & DuPont, 2015). Un producto sinbiótico afecta beneficiosamente al huésped mejorando la supervivencia e implantación de suplementos dietéticos microbianos vivos en el tracto gastrointestinal al estimular selectivamente el crecimiento y/o activar el metabolismo de un número limitado de bacterias promotoras de la salud. Debido a que la palabra "sinbióticos" alude a la sinergia, este término debe reservarse para productos en los que los compuestos prebióticos favorecen selectivamente a los organismos probióticos (Cencic & Chingwaru, 2010).

Los sinbióticos se desarrollaron para superar posibles dificultades de supervivencia para los probióticos. Parece que la razón para usar sinbióticos se basa en observaciones que muestran la mejora de la persistencia de las bacterias probióticas durante el paso a través del tracto intestinal superior. Una implantación más eficiente en el colon, así como un efecto estimulante del crecimiento de probióticos y bacterias ubicuas, contribuyen a mantener la homeostasis intestinal y un cuerpo sano (Peña, 2007). Se ha afirmado que varios factores como el pH, H₂O₂, ácidos orgánicos, oxígeno, estrés por humedad, etc., afectan la viabilidad de los probióticos, especialmente en productos lácteos como los yogures (Romeo *et al.*, 2010).

Las cepas probióticas utilizadas en las formulaciones sinbióticas incluyen *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* spp., *S. boulardii*, *B. coagulans*, etc., mientras que los principales prebióticos utilizados comprenden oligosacáridos como fructooligosacáridos, galactooligosacáridos y xilooligosacáridos, inulina y fuentes naturales de las raíces naturales. Los beneficios para la salud por el consumo de sinbióticos en humanos incluyen, según Zhang (2010):

- 1) Aumento de los niveles de lactobacilos y bifidobacterias y microbiota intestinal equilibrada.
- 2) Mejora de la función hepática en pacientes cirróticos.
- 3) Mejora de la capacidad inmunomoduladora.
- 4) Prevención de la translocación bacteriana y reducción de la incidencia de infecciones nosocomiales en pacientes quirúrgicos.

Algunos de estos sinbióticos no afectan la composición de la microbiota, pero pueden modificar su perfil metabólico. Por ejemplo, *L. acidophilus* NCFM sinbiótico y la celobiosa no afectan la diversidad bacteriana intestinal humana, pero aumentan la concentración local de ácidos grasos de cadena ramificada, que desempeñan un papel en el mantenimiento de la fisiología intestinal (van Zanten *et al.*, 2014).

Durante los últimos años, numerosos estudios que utilizan modelos animales e intervenciones clínicas han explorado los beneficios potenciales de los probióticos en la salud humana, principalmente en la prevención y el tratamiento de varias enfermedades (Tojo *et al.*, 2014). A continuación, se explican las principales enfermedades del tracto gastrointestinal para las cuales el uso de probióticos ha demostrado efectos beneficiosos para la salud mediante la restauración del equilibrio microbiano: (i) diarrea infecciosa, (ii) diarrea asociada a antibióticos, (iii) enfermedad inflamatoria intestinal (EII), (iv) síndrome del intestino irritable (SII), (v) infección por *Helicobacter pylori*, y finalmente, (vi) intolerancia a la lactosa.

(i) **Diarrea infecciosa.** La razón para usar probióticos en esta patología es que estos actúan contra los patógenos entéricos al competir por los nutrientes disponibles y los sitios de unión, haciendo que el contenido intestinal sea ácido, produciendo una variedad de productos químicos y aumentando las respuestas inmunes específicas y no específicas (Sánchez *et al.*, 2017). Los probióticos se han probado en una gran cantidad de estudios clínicos como un suplemento a la terapia de rehidratación en el tratamiento de la diarrea infecciosa. Los resultados de dichos estudios han sido positivos y notablemente consistentes en acortar la duración y reducir la frecuencia de las heces (Allen *et al.*, 2010). Por último, la Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica, Hepatología y Nutrición (ESPGHAN) recomienda considerar la administración de probióticos además de la rehidratación como terapia para la gastroenteritis aguda en niños, según el informe ESPGHAN (Szajewska *et al.*, 2014).

(ii) **Diarrea asociada a antibióticos.** La terapia antimicrobiana perturba la microbiota gastrointestinal endógena, lo que con frecuencia resulta en diarrea.

Recientes revisiones sistemáticas con metaanálisis han mostrado la efectividad de la cepa *Lactobacillus* GG y la especie de levadura *Saccharomyces boulardii* como probióticos para prevenir esta diarrea tanto en niños como en adultos (Szajewska & Kołodziej, 2015).

(iii) Enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que incluye la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (CU). Se ha demostrado que tanto una alteración en la microbiota gastrointestinal como una respuesta inadecuada del huésped a la misma juegan un papel crítico en la patogénesis de la EII. Los probióticos pueden influir tanto en la microbiota intestinal como en el sistema inmunitario, y muchos expertos en el campo de la EII como mencionan Marteau, Sokol, Dray & Seksik (2009) están usando probióticos para tratar a los pacientes con EII. Los ensayos que examinan el uso de probióticos con la enfermedad de Crohn han sido bastante decepcionantes, mientras que la evidencia del beneficio de los probióticos en la CU es bastante prometedora (Marteau *et al.*, 2009).

(iv) Síndrome del intestino irritable (SII). Aunque sus causas no se comprenden completamente, la evidencia creciente sugiere un papel potencial de la microbiota intestinal en su fisiopatología y generación de síntomas de esta enfermedad. Para ello, se han realizado diferentes estudios de intervención probiótica en los últimos años y, aunque los resultados sugieren que el uso de probióticos es beneficioso para el alivio de los síntomas del SII (Moayyedi *et al.*, 2010; Ritchie & Romanuk, 2012), se recomiendan estudios bien diseñados y controlados con placebo, ya que cada cepa probiótica tiene características únicas y los pacientes con SII son heterogéneos (Spiller, 2008).

(v) *Helicobacter pylori*. Se trata de un patógeno altamente prevalente que además es una causa importante de gastritis crónica y úlceras pépticas, al mismo tiempo que un factor de riesgo de neoplasias gástricas. Los estudios de intervención con probióticos solos no han resultado en la erradicación de *H. pylori*. Sin

embargo, varios ensayos han encontrado que si los probióticos se usan junto con la terapia estándar, la tasa de erradicación mejora. Asimismo, los probióticos (como *S. boulardii*, *L. reuteri* y *L. rhamnosus* GG) pueden ayudar a prevenir los efectos secundarios asociados a los antibióticos gastrointestinales (Homan & Orel, 2015; Lesbros-Pantoflickova, Corthésy-Theulaz & Blum, 2007).

- (vi) Intolerancia a la lactosa. Esta se debe a bajos niveles de la enzima beta-galactosidasa (lactasa) en la mucosa del intestino delgado. Existe buena evidencia científica para el alivio de los síntomas de intolerancia a la lactosa mediante el consumo de yogur y productos lácteos fermentados que contienen bacterias convencionales de ácido láctico como cultivos iniciadores y bacterias probióticas (de Vrese *et al.*, 2001). Se cree que confieren efectos beneficiosos al proporcionar actividad microbiana de beta-galactosidasa que mejora la tolerancia y la digestibilidad de la lactosa.

Otros beneficios de los probióticos incluyen: (a) inmunomodulación, (b) enfermedades cardiovasculares y metabolismo lipídico, (c) cáncer, (d) obesidad, (e) y biodisponibilidad y captación de minerales (Pandey *et al.*, 2015).

- (a) Las bacterias probióticas tienen efectos inmunomoduladores, adyuvantes como propiedades y actividad antiinflamatorias y afectan la inmunidad humoral y celular. Se sabe que las bacterias probióticas secretan factores responsables de modular las respuestas inmunes. Por ejemplo, los factores secretados por *L. reuteri* disminuyen la expresión de genes dependientes de NF- κ B, lo que resulta en una proliferación celular disminuida y una proteína quinasa activada por mitógeno mejorada, un evento importante para inducir apoptosis (Delcenserie *et al.*, 2008). El mecanismo explica el efecto beneficioso de los probióticos sobre la función inmune en el intestino no ha sido bien establecido. Sin embargo, se han propuesto algunos posibles eventos celulares:

1. Las fibras prebióticas pueden regular a la baja las enzimas lipogénicas hepáticas, a través de una mayor producción de ácidos grasos de cadena corta como el propionato.
2. La producción de ácidos grasos de cadena corta a partir de la fermentación de fibras, especialmente el butirato, se ha identificado como un modulador de la acetilación de la cola de histonas y, en consecuencia, aumenta la accesibilidad de muchos genes a los factores transcripcionales.
3. La modulación de la producción de mucina.
4. Los fructooligosacáridos y algunos otros prebióticos han mostrado un aumento en el número de linfocitos y / o leucocitos en los tejidos linfoides asociados al intestino y en la sangre periférica.
5. La secreción mejorada de IgA por los tejidos linfoides asociados al intestino estimula la función fagocítica de los macrófagos intraperitoneales (Schley & Field, 2002).

Los sinbióticos parecen ser una propuesta bastante atractiva para mejorar la función inmune. Una combinación de *B. coagulans* con inulina en una dieta durante 6 semanas indujo una reducción significativa en los niveles de proteína C reactiva y también aumentó los niveles de glutatión (Panda, Rao, Raju & Sharma, 2006). En otro estudio, el tratamiento de ratas HLA-B27 propensas a la inflamación con sinbióticos similares mejoró los cambios histológicos debido a la inflamación (Erejuwa, Sulaiman & Wahab, 2014).

- (b) Mann y Spoerry fueron los primeros en sugerir los posibles efectos del consumo de probióticos sobre el metabolismo de los lípidos. Demostraron una reducción en los niveles de colesterol en suero en el pueblo Masai debida al consumo de leche fermentada (Watson & Preedy, 2010). Este informe generó interés en los efectos reductores del colesterol de la leche fermentada y las bacterias del ácido láctico (Sudha, Chauhan, Dixit, Babu & Jamil, 2009). *Lactobacillus bulgaricus*, *L. reuteri*, y *B. coagulans* son algunas de las cepas

probióticas con efectos hipocolesterolémicos reportados. Los estudios en humanos con leche adicionada de *L. acidophilus* L1 demostraron una reducción significativa en el colesterol sérico (Homayouni, Payahoo & Azizi, 2012). El efecto hipocolesterolémico de los probióticos podría deberse a:

1. Una disminución de la hidroxil-metil-glutaril-Coenzima-A reductasa en el hígado.
2. Una conversión significativa de colesterol en ácidos biliares. Además, la descontaminación enzimática de los ácidos biliares también es posible por la enzima de los probióticos. Una vez desconjugados, los ácidos biliares son fácilmente absorbidos por el intestino, lo que lleva a su eliminación en las heces y, por lo tanto, a la disminución del colesterol en suero (Teitelbaum & Walker, 2002).

Los probióticos pueden eliminar el colesterol mediante la incorporación a las membranas celulares durante el crecimiento. Se necesitan estudios *in vivo* para verificar tales afirmaciones que se basan en estudios *in vitro*. Los prebióticos parecen mejorar la actividad hipocolesterolémica. Un estudio con 40 ratas Sprague-Dawley machos mostró una reducción del 27% en los triglicéridos con XOS como prebiótico (Hsu *et al.*, 2004). El tratamiento crónico de la inulina de achicoria (20 g/día) durante 3 semanas redujo los triglicéridos séricos en hombres con hipercolesterolemia (Parnell & Reimer, 2010). Los sinbióticos también han demostrado ser prometedores en el control del perfil lipídico como lo confirma un estudio en el que ratas macho hipercolesterolémicas fueron alimentadas con salvado de arroz fermentado con *L. acidophilus* (Oberreuther-Moschner, Jahreis, Reckemmer & Pool-Zobel, 2004).

- (c) Se demostró que la alimentación basada en leche y calostro fermentado con *L. acidophilus* resultó en una reducción del 16–41% en la proliferación de tumores de colon (Andrews & Tan, 2012). También, se ha demostrado que el probiótico *L. bulgaricus* induce actividad antitumoral contra el sarcoma 180 y los tumores sólidos de ascitis de Ehrlich (Lee *et al.*, 2012). Los mecanismos

propuestos por los cuales los probióticos ejercen actividad antitumoral incluyen:

1. Alterar las funciones inmunes asociadas con la respuesta inmune.
2. Efectos antiproliferativos a través de la regulación de la apoptosis y la diferenciación celular.
3. Supresión de la producción de enzimas como la β -glucuronidasa, la ureasa, la hidrolasa de colilglicina, la azereductasa y la nitro-reductasa por enteropatógenos como *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens*.

La beta-glucosidasa y la ureasa convierten los procarcinógenos en carcinógenos próximos. Se demostró que *Propionibacterium freudenreichii* induce la muerte celular de las líneas celulares de cáncer gástrico y de colon humano mediante la secreción de ácidos grasos de cadena corta en los medios de cultivo (Lee *et al.*, 2012). Los probióticos de bifidobacterias redujeron la carcinogénesis de colon inducida por 1, 2-dimetilhidrazina en ratones cuando se usaban con fructooligosacáridos e inhibían tumores hepáticos y mamarios en ratas (Fotiadis, Stoidis, Spyropoulos & Zografos, 2008). La administración dietética de *B. longum* y oligofruktosa e inulina inhibe la formación de lesiones preneoplásicas. Además, *B. longum* suprimió el cáncer de mama y colon (Kaur & Gupta, 2002). En general, los estudios en sistemas *in vitro* y en una amplia gama de modelos animales proporcionan evidencia considerable de que los probióticos, prebióticos y sinbióticos ejercen efectos antineoplásicos (Fotiadis *et al.*, 2008).

- (d) Un artículo publicado en la revista científica “Nature” informó que la población microbiana presente en el intestino es diferente para las personas obesas y delgadas y que cuando las personas obesas perdieron peso, su microbiota se parecía a la de las personas delgadas. Las dietas que contienen alto contenido en fibras generalmente tienen grados más bajos de densidad de grasa y energía, y son útiles para reducir el riesgo de obesidad al promover la saciedad y la pérdida de peso (Ley, Turnbaugh, Klein & Gordon, 2006). Esto

está respaldado por estudios experimentales que demostraron que en los ratones delgados y obesos, la microbiota intestinal afecta el equilibrio energético al influir en la eficiencia de las calorías adquiridas de la dieta, así como en la utilización y el almacenamiento de la energía obtenida (Stienstra, Tack, Kanneganti, Joosten & Netea, 2012). Un estudio reciente en adultos con sobrepeso tratado con dextrina de trigo demostró un aumento progresivo y significativo de la saciedad y una disminución de la sensación de hambre (Erejuwa, Sulaiman & Wahab, 2014).

- (e) Minerales como Ca, Mg, Fe, K, etc. son los macronutrientes necesarios para el buen funcionamiento del cuerpo. Los estudios han demostrado una mejora de la absorción de Ca con la ingesta de prebióticos, principalmente fructanos. Un estudio de 12 meses de duración de 100 adolescentes que ingirieron 8 g/día de fructanos de inulina de cadena corta y larga mostró un aumento significativo en la absorción de Ca y mejoró la densidad mineral ósea (Abrams *et al.*, 2005). Las ratas ovariectomizadas se alimentaron con inulina y fructooligosacáridos, y mostraron una mayor absorción de Ca, aunque los resultados dependieron de la relación Ca/fructooligosacáridos en la dieta (Webb, 2011). Sin embargo, el consumo diario de cereal que contiene una combinación de fructooligosacáridos de cadena corta y larga (9 g/día) como parte de una dieta controlada no benefició la absorción o retención de calcio en las adolescentes (Whisner *et al.*, 2013). Se postula que en el colon la fibra sufre fermentación por la microbiota intestinal, lo que resulta en la formación de ácidos grasos de cadena corta que reduce el pH luminal. El calcio insoluble no absorbido se convierte en la forma iónica en el medio ácido. Tanto el pH bajo como los ácidos grasos de cadena corta provocan la hipertrofia de las células de la mucosa, lo que aumenta la superficie del intestino y, por lo tanto, aumenta la absorción de calcio. La ingesta de prebióticos también promueve la producción de mucina, lo que contribuye a una menor incidencia de translocación bacteriana a través de la barrera intestinal. Se presume que los oligosacáridos

no digeribles mejoran la permeabilidad de las uniones estrechas del íleon (Schley & Field, 2002). Por lo tanto, el aumento de la absorción de calcio probablemente está mediado por su mayor solubilidad en el colon debido a la fermentación del prebiótico y la posterior disminución del pH intraluminal (Cashman, 2003).

Nuestra comprensión de los mecanismos involucrados en los efectos beneficiosos de los probióticos, los prebióticos y los sinbióticos es bastante superficial. La información incompleta sobre las dosis de probióticos requeridas para efectos clínicos particulares aumenta la necesidad de caracterización molecular de los probióticos. La evidencia directa aún es limitada para comprender los mecanismos inmunes por los cuales los probióticos pueden ejercer los efectos beneficiosos. Esta sigue siendo el área gris que necesita ser explorada (Boyle *et al.*, 2006).

1.2. ¿Cómo actúan en la barrera intestinal?

Los probióticos ejercen sus beneficios a través de cuatro mecanismos de acción diferentes: (i) interferencia con bacterias patógenas al competir por nutrientes y sitios de adhesión, (ii) mejora de la función de barrera del revestimiento epitelial, (iii) inmunomodulación e (iv) influencia en otros órganos del cuerpo a través del sistema inmunitario y la producción de neurotransmisores [como el ácido alpha-aminobutírico (GABA) o la serotonina] (Hill *et al.*, 2014). Por ejemplo, los probióticos deben tener una alta capacidad de adherencia al epitelio intestinal, limitando el acceso de enteropatógenos a las moléculas diana presentes en las superficies de las células huésped que se utilizan para iniciar el proceso de invasión. Además, los probióticos producen sustancias antimicrobianas como bacteriocinas y ácidos grasos de cadena corta (SCFA), inhibiendo el crecimiento de posibles patógenos. La microbiota intestinal y algunos probióticos emergentes tienen genes que codifican proteínas responsables de las vías bioquímicas que no están presentes en el huésped humano, como la degradación de la fuente de carbono compleja o la producción de vitaminas y otros compuestos esenciales. Por ejemplo, algunas cepas producen butirato como

resultado de su metabolismo fermentativo, que es una molécula clave en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, especialmente a nivel de las células epiteliales (Sánchez *et al.*, 2017).

En cuanto al mecanismo de acción de los probióticos en la barrera intestinal, éstos interactúan con el huésped humano en tres niveles diferentes de la parte inferior del tracto gastrointestinal humano: (1) capa mucosa, (2) capa epitelial y (3) tejido linfoide asociado al intestino (Rijkers *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2017).

- (1) La capa de mucosa se subdivide en dos secciones, una subcapa externa en la que las moléculas de mucina forman un gel bastante relajado, que se caracteriza por la presencia de cantidades relativamente altas de bacterias, así como por la presencia de péptidos antimicrobianos e IgA secretada, cuyo objetivo es limitar la cantidad de bacterias comensales que colonizan esta ubicación. Contrariamente a esto, hay una subcapa de mucina interna, densa y compacta inmediatamente adyacente a las células epiteliales, lo que restringe el acceso a la bacteria y donde se observan pocos o ningún microorganismo (Johansson, Holmén Larsson & Hansson, 2011; Maynard, Elson, Hatton & Weaver, 2012).
- (2) El segundo nivel de interacción de los probióticos con el huésped humano son las células epiteliales. La interacción de los probióticos a este nivel es muy importante para mantener la función de barrera, esto se logra reforzando las llamadas uniones estrechas, ubicaciones especiales en las que las membranas de dos células epiteliales adyacentes se unen, sellando las superficies laterales de los enterocitos.
- (3) Finalmente, el tercer nivel es uno de los principales puntos de interacción entre los probióticos y el huésped humano: el tejido linfoide asociado al intestino. Este tejido, en la parte inferior del tracto gastrointestinal, está compuesto principalmente por parches de Peyer y células linfoides/plasmáticas que se distribuyen difusamente por la mucosa intestinal. Los parches de Peyer son ubicaciones especializadas en vigilancia

inmune donde las células presentadoras de antígeno interactúan con las células T y B después del muestreo del contenido intestinal (Kamada, Seo, Chen & Núñez, 2013). Los probióticos, como otras bacterias, tienen un conjunto de moléculas relativamente bien conservadas conocidas como patrones moleculares asociados a microbios. Los probióticos interactúan con receptores de reconocimiento de patrones específicos presentes en la superficie o en la membrana del orgánulo de las células epiteliales y dendríticas, esta interacción es responsable no solo de algunos de los efectos beneficiosos atribuidos a los probióticos, sino que también es clave para la interacción normal de la microbiota intestinal con el huésped humano (Bouskra *et al.*, 2008).

En conclusión, en la capa de la mucosa intestinal los probióticos interfieren en el crecimiento o la supervivencia de los patógenos al competir por los nutrientes y por los sitios de adhesión, y gracias a la producción de sustancias antimicrobianas; en la capa de células epiteliales, los probióticos mejoran la función de barrera epitelial e inhiben los patógenos; y finalmente, en el tejido linfoide asociado al intestino, los probióticos modulan el sistema inmunitario sistémico, así como la influencia sobre otros órganos del cuerpo a través del sistema inmunitario y la producción de neurotransmisores (incluidos el hígado y el cerebro).

Además del contacto directo con la mucosa, los factores solubles sintetizados por las bacterias probióticas pueden estimular las respuestas del huésped. En este sentido, los productores de butirato desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la barrera epitelial, ya que el butirato es una de las principales fuentes de energía de los enterocitos (Louis, Hold & Flint, 2014). Además, una proteína de 15 kDa secretada por *Faecalibacterium prausnitzii* es capaz de inhibir la vía NF- κ B en las células epiteliales intestinales y prevenir la colitis en un modelo animal (Quévrain *et al.*, 2016).

La investigación sobre enfermedades humanas revela los papeles vitales que desempeña la microbiota intestinal. Esta interacción no está restringida a la mucosa intestinal, sino a lugares distantes como el eje intestino-cerebro. Comprender el

impacto de la microbiota intestinal en la salud del huésped es esencial para diseñar estrategias enfocadas en su manipulación, especialmente en los casos en que están presentes patrones microbianos alterados. Los probióticos son herramientas importantes para producir beneficios específicos para el huésped a través de diferentes mecanismos, entre los cuales destaca la modificación de la microbiota intestinal (Sánchez *et al.*, 2017). Sin embargo, la literatura reciente sugiere que la modificación de la microbiota intestinal no es estrictamente necesaria para producir un efecto beneficioso (Kristensen *et al.*, 2016). De hecho, el efecto probiótico podría desencadenarse a través de una interacción con el sistema inmune, lo que no significa necesariamente una modificación del entorno microbiano local. En relación con esto, durante los últimos años, está quedando claro que algunas cepas probióticas más comúnmente utilizadas (pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) no colonizan el intestino y se liberan del intestino después de la intervención probiótica; por lo tanto, no podrían considerarse miembros estables de la microbiota intestinal. Por otro lado, a pesar de nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares que subyacen a algunos de los efectos beneficiosos de los probióticos, estamos lejos de demostrar clínicamente su eficacia en muchas enfermedades inflamatorias y autoinmunes. En el futuro, el conocimiento de las moléculas responsables del efecto probiótico nos permitirá diseñar nuevas estrategias que permitan el cultivo, los procedimientos de cocultivo y la propagación de estas bacterias a menudo sensibles al oxígeno (Sánchez *et al.*, 2017).

1.3. Características de la cepa probiótica idónea según la FAO y OMS

La FAO y la OMS han presentado conjuntamente directrices para establecer un enfoque sistemático para una evaluación efectiva de los probióticos en los alimentos. Algunos de los requisitos previos de un organismo probiótico ideal se muestran en la Figura 1. Las directrices de la FAO / OMS sobre probióticos podrían utilizarse como un estándar global para evaluar los probióticos en los alimentos. Las pautas obligan a realizar las siguientes actividades (Pandey *et al.*, 2015):

1. Identificación de la cepa.
2. Caracterización funcional de la (s) cepa (s) por seguridad y atributos probióticos.
3. Validación de los beneficios para la salud en estudios en humanos.
4. Etiquetado honesto, no engañoso, de declaraciones de eficacia y contenido para toda la vida útil.

Para que un probiótico ejerza un efecto beneficioso para la salud humana, debe cumplir varios criterios. Debe sobrevivir al paso por el tracto gastrointestinal superior y llegar vivo a su sitio de acción, y debe poder funcionar en el entorno intestinal. Los requisitos funcionales de los probióticos incluyen tolerancia al jugo y bilis gástricos humanos, adherencia a superficies epiteliales, persistencia en el tracto gastrointestinal humano, estimulación inmunológica, actividad antagonista hacia patógenos intestinales (como *Helicobacter pylori*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Clostridium difficile*) y la capacidad de estabilizar y modular la microbiota intestinal (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002; Millette, Luquet, Ruiz & Lacroix, 2008; O'May & Macfarlane, 2005). Se deben considerar varios aspectos tecnológicos en la selección de probióticos. Estos incluyen buenas propiedades sensoriales, resistencia a los fagos, viabilidad durante el procesamiento y estabilidad en la producción y durante el almacenamiento. Los probióticos deben ser no patógenos y no tóxicos y no deben tener una resistencia adquirida a los antibióticos (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002; Ouwehand, Salminen & Isolauri, 2002).

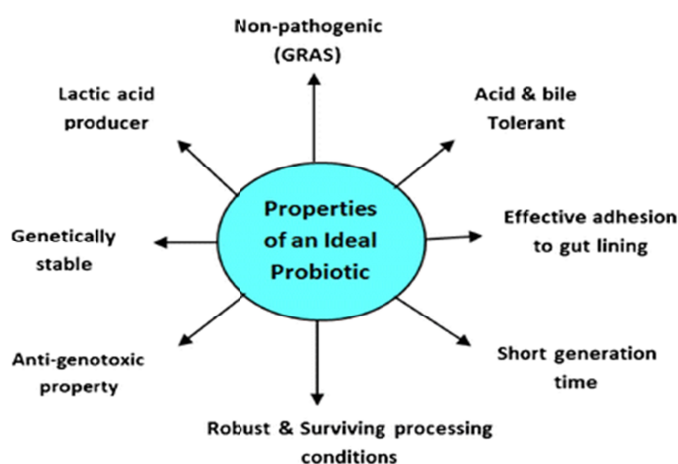


Figura 1. Características de una cepa probiótica idónea. Fuente: Pandey *et al.* (2015)

El uso inapropiado del término “probiótico” y la falta de reconocimiento de la importancia de la especificidad de la cepa y la especificidad de la dosis es una preocupación hoy en día. Cuando los probióticos se producen como suplementos nutricionales, y no como medicamentos, se someten a un escrutinio menos reglamentario, ya que no es obligatorio que el fabricante justifique las afirmaciones de eficacia o seguridad de los alimentos y suplementos nutracéuticos. Esta es la razón principal de la información de eficacia y seguridad deficiente o inexistente en la mayoría de los productos comerciales (Pandey *et al.*, 2015).

Otro posible problema importante de los probióticos es el mal uso del término. Esto puede deberse a que los productos están mal fabricados o que se denominan probióticos sin ninguna documentación relevante. El efecto neto, perjudicial para el campo general de los probióticos, podría ser que se descubra que tales productos son ineficaces, cuando en realidad ni siquiera eran probióticos en primer lugar (Reid, 2008). Es responsabilidad de los fabricantes y científicos utilizar únicamente el término "probiótico" como se describe en las Directrices de las Naciones Unidas y de la Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO, 2002). Esto describe los siguientes puntos clave:

- (a) Los probióticos son entidades bacterianas bien definidas que se administran al huésped en cantidades suficientes para conferir beneficios fisiológicos definidos y comprobados. No son organismos comensales que se encuentran en el intestino humano.
- (b) No se puede considerar a todos los representantes de una especie, como por ejemplo *L. acidophilus* o *L. rhamnosus*, como probióticos, ya que para considerar probiótico a un microorganismo, este debe demostrar que confiere un beneficio para la salud dependiente de la cepa, no de la especie. Por ejemplo, *L. rhamnosus* GR-1 sí se considera una cepa probiótica (Reid & Bruce, 2006), pero no todos los microorganismos pertenecientes a la especie *L. rhamnosus*.

- (c) Las cantidades de organismos probióticos viables utilizados en un producto deben ser consistentes con las probadas con éxito en un ensayo clínico. En otras palabras, no se pueden agregar 1000 colonias de *L. reuteri* SD2112 u otro probiótico conocido que se ha demostrado que la dosis que confiere beneficios es de mil millones de colonias, y luego llamar al nuevo producto probiótico. Además, si se combinan cepas, como *L. rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri* RC-14 (Reid & Bruce, 2006), la adición de la segunda cepa debe estar clínicamente justificada.
- (d) La bibliografía está repleta de experimentos sobre cepas "probióticas", muchos de los cuales utilizan ensayos de adhesión o inhibición *in vitro* que no prueban la funcionalidad *in vivo*. Hasta que se haya demostrado que estas cepas cumplen con las pautas y confieren beneficios para la salud de un huésped, deben denominarse cepas probióticas potenciales o simplemente cepas bacterianas.
- (e) Las bacterias modificadas genéticamente pueden ser probióticas si se documentan adecuadamente. Por ejemplo, varios estudios han demostrado que una vacuna producida utilizando construcciones que combinan epítomos de glucosiltransferasas de *Streptococcus mutans* (GTF) y proteína de unión a glucanos B (GbpB) tiene un gran potencial para interferir con el desarrollo de caries (Smith, King, Rivero & Taubman, 2005). Otro ejemplo es la modificación genética de una cepa de *Lactococcus lactis* LL-Thy12 que expresa interleucina-10 humana (IL-10) (Braat *et al.*, 2006), en la que se ha sustituido el gen de la timidilato sintasa por una secuencia sintética que codifica la IL-10 humana madura, proporcionando un medio para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal, así como para contener el organismo debido a su incapacidad para sobrevivir sin la adición de timidina exógena.

- (f) Para lograr una credibilidad más generalizada entre las comunidades científicas y clínicas, los productos deben contener cepas identificadas a nivel de especies, suficientemente viables al final de su vida útil y con declaraciones de etiqueta apropiadas (Reid, Kim & Kohler, 2006). Se observan diferencias en los parámetros de crecimiento y las respuestas al estrés entre las cepas probióticas de la misma especie. La tolerancia al calor y al oxígeno, la resistencia al estrés y otros factores afectan la viabilidad (Simpson *et al.*, 2005). Se necesitan estudios para evaluar las contribuciones que los diferentes vehículos de entrega hacen a la eficacia de los productos. Por ejemplo, los productos lácteos en los que crecen las cepas probióticas contendrán productos finales metabólicos, y podrían ser estas sustancias o compuestos prebióticos.

El desafío para los expertos que trabajan en el aspecto médico de alimentos funcionales y probióticos, prebióticos, sinbióticos y alimentos novedosos es aplicar el nuevo conocimiento generado por científicos básicos en el campo de la microbiota intestinal. Peña (2007) ha sugerido que la investigación probiótica se encuentra hoy en la intersección de la gastroenterología, la inmunología y la microbiología y es muy dinámica tanto en el campo básico como en el clínico. Una mayor comprensión de los complejos mecanismos moleculares que conducen a la efectividad de los probióticos también estimulará el desarrollo de formulaciones de probióticos más exitosas. Hay muchos informes publicados sobre el uso de probióticos en humanos, pero la información sobre prebióticos y sinbióticos es bastante escasa. Además, las declaraciones de propiedades saludables deben ser fundamentadas y establecidas firmemente mediante ensayos clínicos a gran escala diseñados adecuadamente (Pandey *et al.*, 2015).

Las dificultades y los defectos inherentes de los productos probióticos comerciales y las medidas correctivas son debidos a la entrega de una cantidad inadecuada de probióticos al tracto gastrointestinal inferior, específicamente al ambiente ácido del estómago (Pathak, 2011). Por lo tanto, es necesario desarrollar un sistema de entrega más específico junto con la dosis adecuada. Los desarrollos adicionales requeridos son:

1) la formulación probiótica debe tener una vida útil mejorada y debe entregar células probióticas activas vivas incluso después de un almacenamiento prolongado, 2) deben establecerse métodos de evaluación para asegurarse de que la formulación realmente contenga bacterias probióticas viables clínicamente probadas (Both *et al.*, 2012). En el ámbito del proceso de fabricación y la formulación posterior, existe una literatura publicada muy limitada y se necesita hacer mucho para mejorar la supervivencia de las cepas durante la formulación y el almacenamiento (Pandey *et al.*, 2015).

2. *LACTOBACILLUS* COMO PROBIÓTICOS

2.1. Generalidades

El género *Lactobacillus* pertenece al gran grupo de bacterias del ácido láctico (BAL) los cuales son todos organismos Gram-positivos que producen ácido láctico por fermentación (Kandler & Weiss, 1986). Los miembros del género *Lactobacillus* son bacilos o cocobacilos que no forman esporas (Hugenholtz, 1998), catalasa negativos (aunque algunas cepas poseen una pseudocatalasa), aerotolerantes o anaeróbicos, acidúlicos o acidófilos y son nutricionalmente exigentes (Hammes & Vogel, 1995). Generalmente tienen un metabolismo fermentativo, cuyo producto final de fermentación primario es el ácido láctico (Klaenhammer & De Vos, 2011; Tannock, 2004) además de otros productos como acetato, etanol, CO₂, formiato y succinato.

Lactobacillus considerado el género más grande entre las BAL (de acuerdo con su antigua clasificación) se caracteriza por un alto nivel de diversidad, que se refleja en su compleja filogenia (Schleifer & Ludwig, 1995). Los géneros de las BAL incluyen, entre otros, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* (Kandler & Weiss, 1986). El género *Lactobacillus* comprende 261 especies (en marzo 2020) que son extremadamente diversas a nivel fenotípico, ecológico y genotípico (Zheng *et al.*, 2020) y representa el grupo más grande dentro de la familia *Lactobacillaceae*. Los miembros del género tienen forma de varilla, a menudo organizados en cadenas. Son estrictamente fermentativos y aerotolerantes, pero crecen bien en condiciones anaeróbicas.

Existen dos grupos de especies según la capacidad de fermentar azúcares: especies homofermentativas, que convierten los azúcares principalmente en ácido láctico, y especies heterofermentativas, que convierten los azúcares en ácido láctico, ácido acético, etanol y CO₂. Debido a que el principal catabolito es el ácido láctico, los lactobacilos prefieren condiciones relativamente ácidas (pH 5,5-6,5) (Giorgio Giraffa, Chanishvili & Widyastuti, 2010). Recientemente, el género *Lactobacillus* ha sufrido una reclasificación en 25 géneros, incluyendo: el género enmendado *Lactobacillus* que

incluye organismos adaptados al hospedador que se han denominado grupo *Lactobacillus delbrueckii*, *Paralactobacillus* y 23 nuevos géneros (Zheng *et al.*, 2020), entre los cuales encontramos los géneros *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* y *Lentilactobacillus*. En esta introducción, hablaremos del género *Lactobacillus* refiriéndonos a su clasificación antigua

Las bacterias que pertenecen al género *Lactobacillus* (término genérico “lactobacilli”) se pueden encontrar en una variedad de nichos ecológicos como plantas, animales y leche cruda (Hammes & Vogel, 1995). Además, los lactobacilos se pueden encontrar en insectos. La capacidad de colonizar una variedad de hábitats es una consecuencia directa de la amplia versatilidad metabólica de este grupo de BAL. Por tanto, no es de extrañar que los lactobacilos se hayan utilizado durante décadas en la conservación de alimentos, como iniciadores de productos lácteos, verduras fermentadas, pescado y embutidos, así como inoculantes para ensilaje. Debido a sus potenciales atributos terapéuticos y profilácticos, los lactobacilos se han propuesto como probióticos (Giraffa *et al.*, 2010).

Los análisis filogenéticos y genómicos comparativos realizados por Zheng *et al.* (2020) confirmaron que *Leuconostocaceae* y *Lactobacillaceae* están estrechamente relacionados y entrelazados. Este resultado también está en línea con la Base de datos de Taxonomía del Genoma (<https://gtdb.ecogenomic.org/>; Capella-Gutiérrez, Silla-Martínez, & Gabaldón, 2009) en la que los miembros de la familia *Leuconostocaceae* fueron considerados miembros de *Lactobacillaceae*. El actual análisis realizado por Zheng *et al.* (2020) también indica que los lactobacilos heterofermentativos están más estrechamente relacionados con *Leuconostoc* y *Weissella* de lo que están con el grupo *L. delbrueckii*. Esto confirma que ambos metabolismos fermentativos,

homofermentativa y heterofermentativa, están estrechamente ligadas a la filogenia de los lactobacilos.

En general, la evidencias disponibles son muy consistentes y apoyan la clasificación taxonómica propuesta por (Zheng *et al.*, 2020). Además, las identidades de la secuencia del gen del ARNr 16S y los valores de AAI (Identidad de pares de aminoácidos “pairwise amino acid identity”) permiten fácilmente asignar nuevas especies a uno de los 26 géneros de *Lactobacillaceae*. Las especies que exhiben una identidad génica de ARNr 16S superior al 94,5% a la especie tipo de un género (Rosselló-Móra & Amann, 2015) y a un clúster de ese género cuando se utiliza la filogenia del gen ARNr 16S generalmente se asignan correctamente incluso en ausencia de análisis adicionales. Sin embargo, la identidad génica y la filogenia del ARNr 16S deben complementarse con la filogenia del genoma-núcleo (core genome) en combinación con métricas de similitud del genoma completo para validar la taxonomía a nivel de género (Chun *et al.*, 2018).

Como he mencionado anteriormente, en este trabajo se tendrá en cuenta la antigua clasificación del género *Lactobacillus*. Según la antigua clasificación, el grupo *L. plantarum* comprende los taxones *L. plantarum* subsp. *plantarum*, *L. plantarum* subsp. *argenteratensis*, *Lactobacillus paraplantarum* y *Lactobacillus pentosus*. El grupo *L. plantarum* se encuentra ampliamente en una variedad de alimentos como productos lácteos, cárnicos y vegetales. Se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal humano como consecuencia de su probada capacidad para sobrevivir al tránsito gástrico y colonizar el intestino. Los microorganismos pertenecientes al grupo *L. plantarum* se consideran microorganismos de calidad alimentaria debido a su largo y documentado historial de uso seguro en alimentos fermentados (de Vries, Vaughan, Kleerebezem & de Vos, 2006).

Los lactobacilos son los probióticos más estudiados y ampliamente utilizados dentro de las BAL. La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* pertenecen al grupo de *L. acidophilus*. Se sabe que *L. (para) casei*, *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. salivarius*, que representan los respectivos grupos filogenéticos, contienen cepas probióticas (Giraffa

et al., 2010). Los cultivos iniciadores son microorganismos que se agregan intencionalmente a la materia prima para crear un resultado deseado en el producto final, generalmente a través de sus actividades metabólicas. El uso más común de cultivos iniciadores es para la producción de ácido láctico a partir de lactosa (azúcar de la leche), que en la mayoría de los casos provoca o ayuda en la coagulación de la proteína de la leche al reducir su valor de pH (Giraffa *et al.*, 2010). El género *Lactobacillus* es uno de los más importantes en el desarrollo de iniciadores lácteos, que desempeñan un papel crucial para acidificar la leche cruda y en la producción de productos lácteos fermentados como quesos y leche fermentada (incluidos los probióticos) (Leroy & De Vuyst, 2004). Los lactobacilos se utilizan como cultivos iniciadores en la elaboración de yogur y queso mozzarella. También se utilizan como adyuvantes de iniciación para promover una maduración más rápida del queso cheddar y quesos similares, para reducir la incidencia de amargor y como probióticos en productos de tipo yogur (Parente, Cogan & Powell, 2017). En general, los lactobacilos se asocian con la producción de alimentos debido a la acción conservante debida a la acidificación y/o mejora del sabor, la textura y la nutrición.

Los lactobacilos se utilizan también como iniciadores o cultivos complementarios para alimentos vegetales fermentados, carnes fermentadas, en la producción de vino y cerveza, pan de masa madre y ensilaje. Provocan una rápida disminución del pH de la materia prima a través de la producción de ácido láctico como principal producto catabólico (Giraffa *et al.*, 2010). Además, la actividad proteolítica y producción de compuestos aromáticos, bacteriocinas y exopolisacáridos son relevantes para la calidad y valor nutricional del producto final y amplían el espectro de aplicaciones biotecnológicas de este importante grupo de las BAL (Leroy & De Vuyst, 2004). Algunos lactobacilos del tracto gastrointestinal (GIT) también se han asociado con beneficios para la salud, lo que ha dado lugar a su designación como probióticos. En la actualidad, el consumidor está prestando mucha atención a la relación entre alimentación y salud. Como consecuencia, la demanda de alimentos funcionales, es decir, alimentos que poseen propiedades que promueven la salud más allá de la

nutrición básica, ha aumentado drásticamente en los últimos años (Keohane, Ryan & Shanahan, 2009; O'May & Macfarlane, 2005; Ouwehand *et al.*, 2002).

La producción de bacteriocinas y exopolisacáridos son dos ejemplos significativos de aplicaciones funcionales de los lactobacilos en la industria alimentaria (Giraffa *et al.*, 2010). En las últimas dos décadas, varios estudios han demostrado el potencial de las bacteriocinas para controlar el crecimiento de microorganismos patógenos en productos alimenticios. Se han sugerido lactobacilos productores de bacteriocinas como cultivos protectores en carnes fermentadas, aceitunas fermentadas y productos lácteos (Hammes & Vogel, 1995; Leroy & De Vuyst, 2004). Los polisacáridos vegetales o microbianos se utilizan ampliamente en la industria alimentaria. Se sabe que aumentan la viscosidad y la firmeza, mejoran la textura y contribuyen al sabor de los productos bajos en grasa. Se ha demostrado la producción *in situ* de exopolisacáridos en varios lactobacilos (Leroy & De Vuyst, 2004).

La importancia de las BAL en la vida quizás se vea mejor en relación con la salud de las mujeres y los bebés. Las mujeres que carecen de lactobacilos en la vagina tienen una tasa de éxito reducida de la fertilización *in vitro* (Verstraelen & Senok, 2005). La causa puede ser un proceso inflamatorio que inhibe el movimiento de los espermatozoides o la unión óvulo-espermatozoide, pero parece haber pocas dudas de que las bacterias influyen en esta actividad. Una vez embarazada, la pérdida de lactobacilos de la vagina y el desarrollo subsiguiente de vaginosis bacteriana (VB) se asocia con un mayor riesgo de parto prematuro (Leitich & Kiss, 2007). Las pistas sobre el efecto de las bacterias en el desarrollo fetal provienen de grandes estudios epidemiológicos que muestran que la nutrición en las madres tiene consecuencias a largo plazo para el bebé (De Boo & Harding, 2006).

Otra característica de los lactobacilos a tener en cuenta es que a través de su actividad metabólica, los lactobacilos pueden actuar como "fábricas de células" para la generación de *novo* de biocompuestos activos a partir de una variedad de fuentes de proteínas alimentarias. Las actividades biológicas asociadas con tales péptidos incluyen propiedades inmunomoduladoras, antibacterianas, antihipertensivas y de tipo opioide.

Las proteínas de la leche se reconocen como una fuente primaria de péptidos bioactivos, que se pueden cifrar dentro de la secuencia de aminoácidos de las proteínas lácteas, lo que requiere proteólisis para su liberación y activación. Estas observaciones han resaltado el interés en desarrollar alimentos fermentados de valor agregado que se enriquezcan selectivamente con compuestos que se sabe que brindan un beneficio particular para la salud del consumidor, como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina antihipertensiva (ECA), que son producidos por los lactobacilos a través de sistema proteolítico (Broadbent, 2008; Hayes, Ross, Fitzgerald & Stanton, 2007).

La ingeniería metabólica puede ser una herramienta alternativa en la búsqueda de nuevas cepas con características biotecnológicas mejoradas. Las estrategias de ingeniería metabólica de las BAL pueden conducir a la redirección eficiente del metabolismo del azúcar a productos finales nutricionales distintos del ácido láctico, como compuestos aromáticos, azúcares bajos en calorías y edulcorantes naturales (Hugenholtz *et al.*, 2002). Se han modificado metabólicamente diferentes especies de *Lactobacillus* para la producción de ácido láctico L(+), manitol, piruvato y L-ribulosa (Aarnikunnas, von Weymarn, Rönnholm, Leisola & Palva, 2003; Helanto, Kiviharju, Leisola & Nyssölä, 2007; Kyla-Nikkila, Hujanen, Leisola & Palva, 2000).

De manera similar a otras BAL, los lactobacilos también pueden ser portadores de vacunas orales eficientes. La mayor parte de nuestro conocimiento actual sobre el uso de lactobacilos con fines de vacunación se ha obtenido con el fragmento de toxina tetánica Cas, el antígeno modelo. Este conocimiento, junto con nuestra creciente comprensión del sistema inmunológico y los avances recientes en las técnicas de clonación y expresión, harán que el desarrollo de lactobacilos como sistemas de administración de vacunas vivas sea una perspectiva realista (Seegers, 2002).

Los antibióticos se usan comúnmente en la cría de animales para curar o prevenir la aparición de infecciones bacterianas en la agricultura, pero los antibióticos también se usaron como promotores del crecimiento durante décadas (prohibidos como promotores del crecimiento en la UE desde enero de 2006 y en Corea del Sur desde

2011; todavía están permitidos en otros países de Asia y en Australia y EE. UU. entre otros), lo que podría haber ejercido una presión selectiva para la aparición y propagación de bacterias resistentes a los antibióticos (Abriouel *et al.*, 2015). La aparición de resistencia a los antibióticos es un fenómeno complejo, que involucra interacciones entre humanos, animales, bacterias, fármacos y el medio ambiente (Barbosa & Levy, 2000; Coast & Smith, 2003; O'Brien, 2002). El creciente cuerpo de evidencia que informa sobre la resistencia a los antibióticos en BAL de origen alimentario (Egervärn, Roos & Lindmark, 2009; Ge *et al.*, 2007; Marshall, Ochieng & Levy, 2009; Michael Teuber, Meile & Schwarz, 1999), aunque con una baja incidencia, ha reflejado la preocupación mundial por la resistencia a los antibióticos en la seguridad alimentaria y la salud pública.

Los lactobacilos eventualmente llegan al tracto gastrointestinal a través de la ingestión de un alto número de estas bacterias en los alimentos fermentados (típicamente en alimentos fermentados $>10^8$ UFC/ml) (Ali & Mustafa, 2009; Cadena, Villarraga, Luján & Salcedo, 2006); donde puede interactuar con la microbiota intestinal residente del huésped. Debido a la gran cantidad de microorganismos, las condiciones de confinamiento y el estrecho contacto de célula a célula en este entorno, el tracto gastrointestinal es un nicho caliente ideal para la transferencia de genes (Abriouel *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas de los alimentos fermentados, factores estresantes como la sal, el pH bajo y los aditivos podrían potenciar esta resistencia activando genes específicos (genes silenciosos), aumentando su expresión o facilitando su diseminación entre cepas que coexisten en un mismo lugar y en el mismo tiempo (Al-Nabulsi *et al.*, 2011; Ganjian *et al.*, 2012; McMahon, McDowell & Blair, 2007; Poole, 2014).

Hasta 1999, sólo había unos pocos estudios que evaluaban la resistencia a los antibióticos adquirida en lactobacilos (Teuber, 1999). Actualmente, hay varios estudios que informan sobre la resistencia a los antibióticos en especies de *Lactobacillus* (Casado Muñoz, Benomar, Lerma, Gálvez & Abriouel, 2014; Hummel, Hertel, Holzapfel & Franz, 2007; Kastner *et al.*, 2006; Klare *et al.*, 2007; Klein, 2011;

Liu, Zhang, Dong, Yuan & Guo, 2009; Zonenschain, Rebecchi & Morelli, 2009) y podría mostrarse una resistencia intrínseca a muchos antibióticos (Casado Muñoz *et al.*, 2014; Hummel *et al.*, 2007; Klein, 2011). Además, se identificaron y caracterizaron genes que codifican resistencias a antibióticos transferibles (Ammor *et al.*, 2008; Belletti *et al.*, 2009; Devirgiliis, Coppola, Barile, Colonna & Perozzi, 2009; Egervärn *et al.*, 2009; Feld, Bielak, Hammer & Wilcks, 2009).

Es necesario distinguir entre la resistencia intrínseca a los antibióticos comunes (resistencia no transmisible horizontalmente) y la resistencia adquirida (que se basa en elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones, integrones o mutaciones) en los lactobacilos (Abriouel *et al.*, 2015). En general, la mayoría de las especies de *Lactobacillus* son intrínsecamente resistentes a los aminoglucósidos (neomicina, kanamicina, estreptomina y gentamicina), glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina), inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (ciprofloxacina, enoxacina, pefloxacina, ácido norfloxacino, nalidtrón) e inhibidores de síntesis de ácido fólico (sulfametoxazol, trimetoprima y cotrimoxazol) (Charteris, Kelly, Morelli & Collins, 1998; Coppola *et al.*, 2005; Patel, Shah, & Prajapati, 2012; Zhou, Pillidge, Gopal & Gill, 2005). Sin embargo, son susceptibles a las penicilinas (ampicilina y penicilina G), cloranfenicol, estreptomina, clindamicina, tetraciclina, eritromicina, linezolid y quinupristina / dalfopristina (Ammor, Flórez & Mayo, 2007; Katla, Kruse, Johnsen & Herikstad, 2001; Luh *et al.*, 2000; Patel *et al.*, 2012). La susceptibilidad a la bacitracina varía mucho (Coppola *et al.*, 2005; Katla *et al.*, 2001).

Por lo tanto, las bacterias presentes de forma natural en los alimentos fermentados pueden representar un importante reservorio de genes de resistencia a los antibióticos. Esas bacterias se ingieren en grandes cantidades y posiblemente podrían transferir determinantes de resistencia a los antibióticos a la microbiota intestinal. La aparición de resistencia a los antibióticos en los lactobacilos de los alimentos fermentados, que históricamente se han considerado seguros, tiene un impacto profundo en las consideraciones de seguridad. Por lo tanto, se debe prestar mayor atención a las

evaluaciones de seguridad con respecto a las resistencias a los antibióticos de las BAL (Abriouel *et al.*, 2015).

Reclasificación de *Lactobacillus pentosus*. De acuerdo con Zheng *et al.*, (2020), *Lactobacillus pentosus* ha sido reclasificada como *Lactiplantibacillus pentosus*. *Lactiplantibacillus* (Lac.ti.plan.ti.ba.cil'lus. L. neut. N. Lactis milk; L. fem. N. Planta plant, refiriéndose a los lactobacilli del grupo *plantarum*; L. masc. N. *bacillus* a varilla; NL masc. n. *Lactiplantibacillus* una varilla derivada de la leche del grupo (*Lactobacillus*) *plantarum* (Figura 2). La especie tipo es *Lactiplantibacillus plantarum* comb. nov.; *Lactiplantibacillus* se denominaba anteriormente grupo *L. plantarum*.

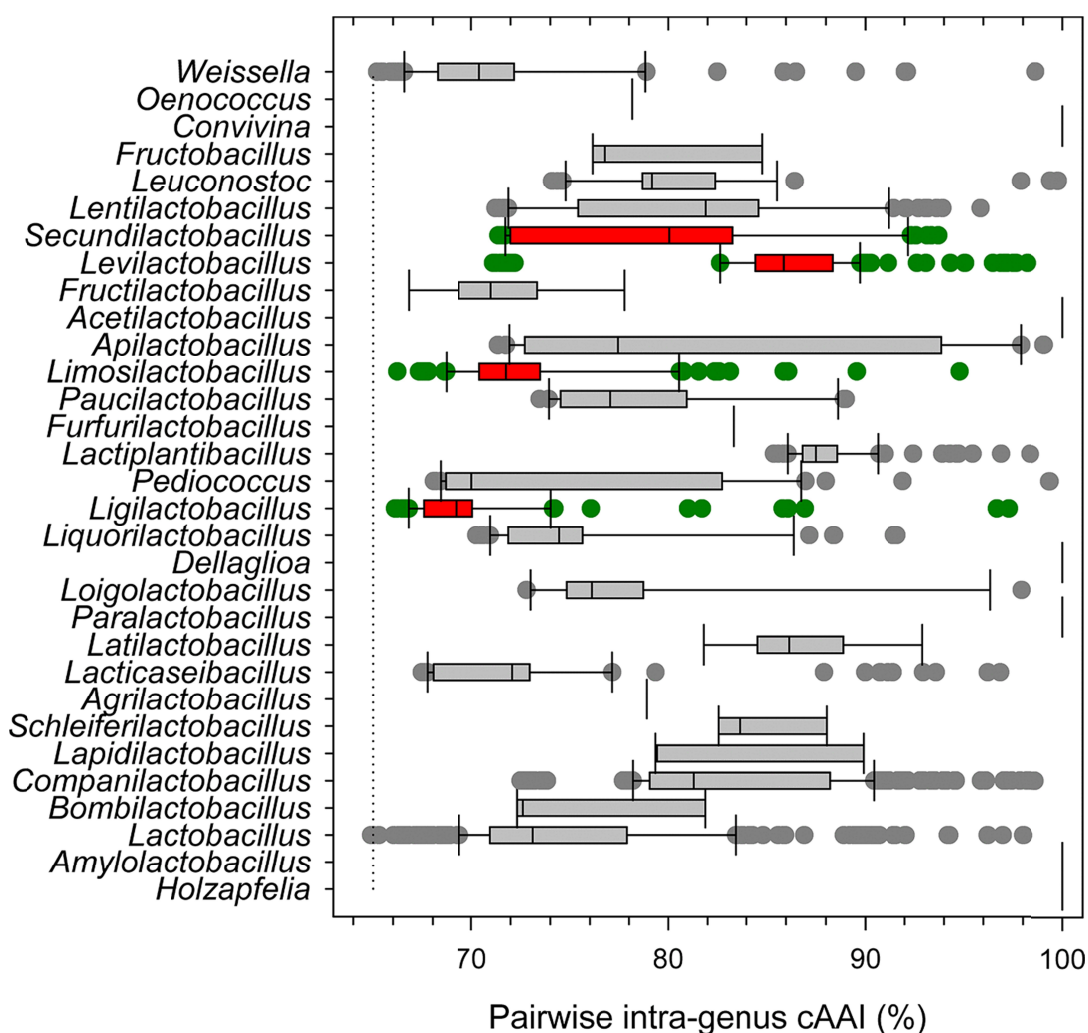


Figura 2. Rango de valores de cAAI (identidad de aminoácidos por pares de genes conservados) intragénero por pares para todos los géneros actuales y propuestos en las familias *Lactobacillaceae* y *Leuconostocaceae*. Fuente: Zheng *et al.*, (2020)

2.2. Características probióticas a nivel fenotípico y genotípico

La aparición de nuevos patógenos, el resurgimiento de los antiguos y el desarrollo de resistencia a los antibióticos han provocado un aumento de la investigación sobre un grupo de BAL conocidos como probióticos que podrían usarse potencialmente para combatir infecciones bacterianas (Soomro & Masud, 2012). Los probióticos, principalmente miembros de los géneros *Lactobacillus* (y los nuevos géneros surgidos a raíz de la reclasificación del género *Lactobacillus*) y *Bifidobacterium*, son residentes normales del complejo ecosistema del tracto gastrointestinal (Mitsuoka, 1992).

La selección de bacterias probióticas prometedoras debe cumplir con ciertos estándares, y se realizan muchas pruebas *in vitro* para detectar candidatos probióticos. Los principales criterios para la selección de cepas probióticas son su tolerancia ácida y biliar, supervivencia a través del tracto gastrointestinal, capacidad de adherirse al tejido epitelial intestinal, colonización temporal, antagonismo frente a patógenos y buenas propiedades tecnológicas (O'Sullivan, 2001; Tuomola, Crittenden, Playne, Isolauri & Salminen, 2001). Finalmente, para la evaluación de la seguridad de nuevos aislados de lactobacilos probióticos, también se recomienda una evaluación cuidadosa de sus patrones de resistencia a los antibióticos (Danielsen & Wind, 2003).

Muchos estudios informan de los efectos beneficiosos de los lactobacilos contra los microorganismos patógenos como virus, bacterias y hongos. Para prevenir la infección, el huésped puede secretar varios metabolitos para mantener la homeostasis del microbioma. Algunos lactobacilos muestran una acción sinérgica con el sistema inmunológico al mantener la integridad de la barrera intestinal, al inhibir los patógenos alimentarios o al descomponer las toxinas producidas por algunos de ellos (Turpin, Humblot, Thomas & Guyot, 2010).

- Lactobacilos y mejora de la barrera intestinal

Aunque no se hayan demostrado claramente los mecanismos implicados, se ha demostrado que los probióticos refuerzan la barrera intestinal y, por tanto, limitan la infección por patógenos. Por ejemplo, *L. plantarum* WCFS1 demostró ser capaz de

inducir genes implicados en la proliferación celular en la mucosa intestinal de sujetos sanos (Troost *et al.*, 2008). Las uniones estrechas evitan la entrada de factores potencialmente dañinos del lumen gastrointestinal al tejido del epitelio. Las uniones están formadas por la organización de diferentes proteínas como ocludina, E-cadherina y β -catenina. *L. rhamnosus* GG secreta dos proteínas capaces de reducir la alteración de la función de barrera inducida por H₂O₂ en las células Caco-2 (Seth, Yan, Polk & Rao, 2008). También se ha demostrado que la cepa DSM 16698T de *L. sobrius* previene el daño a la barrera de la membrana de las células IPEC-1 al prevenir la desfosforilación de ocludina causada por *Escherichia coli* K88 (Roselli *et al.*, 2007). La proteína Zonula occludens-1, que también participa en el ensamblaje de uniones estrechas, aumentó cuando se co-incubó *L. rhamnosus* OLL2838 en células epiteliales intestinales aisladas de ratones (Miyoshi, Okada, Uchimura & Satoh, 2006). MUC2 y MUC3 son mucinas ileocolónicas predominantes en humanos y los genes correspondientes se expresan principalmente en el colon y el intestino delgado. Se ha demostrado *in vitro* que *L. plantarum* 299v fue capaz de aumentar la síntesis de ARNm de MUC2 y MUC3 en células HT-29 y que se inhibió la unión de la cepa E2348/69 de *E. coli* en esas células (Mack, Michail, Wei, McDougall & Hollingsworth, 1999).

- Lactobacilos y exclusión competitiva

El principio de exclusión competitiva generalmente se define como un estado en el que dos especies que compiten por los mismos recursos no pueden coexistir de manera estable si otros factores ecológicos son constantes. Para unirse a la matriz intestinal, los probióticos poseen diferentes proteínas directamente responsables de la adhesión como las proteínas de unión al moco (Buck, Altermann, Svingerud & Klaenhammer, 2005), o proteínas del metabolismo central que también están involucradas en el fenómeno de adhesión. Entre estas proteínas, se ha demostrado que algunas tienen una función central en la glucólisis (Castaldo *et al.*, 2009; Kinoshita *et al.*, 2008), y en la síntesis de proteínas (Granato *et al.*, 2004) y estas proteínas también se han demostrado desempeñar un papel principal en la capacidad de unión de los

lactobacilos. El hecho de que los lactobacilos se unan a la mucina puede favorecer la eliminación del patógeno. Por ejemplo *L. johnsonii* NCC 533, que es capaz de unir mucina mediante la producción de GroEl extracelular, promovió la agregación de *H. pylori in vitro* (Bergonzelli *et al.*, 2006).

L. johnsonii NCC 533 es capaz de unirse a células Caco-2 y los dos componentes principales de unión a carbohidratos identificados fueron gangliotetraosilceramida glicolípido y oligomanósidos (Neeser *et al.*, 2000). Esto sugiere que esta cepa podría inhibir la adhesión de *E. coli* enterotoxigénica y enteropatógena (EPEC) que exhibe una actividad de unión similar en el mismo sitio. La pre-incubación de células Caco-2 con *L. plantarum* 299v también fue capaz de reducir la unión de EPEC E2348/69, mientras que no se observó inhibición cuando los probióticos se administraron simultáneamente o después de la incubación con EPEC (Michail & Abernathy, 2002). Estos resultados sugieren que la ingestión regular de probióticos podría ayudar a prevenir la adhesión de patógenos.

Varias especies de lactobacilos como *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. vaginalis*, *L. reuteri* y *L. salivarius* se encontraron *in vivo* en la mucosa gástrica humana (Ryan *et al.*, 2008; Valeur, Engel, Carbajal, Connolly & Ladefoged, 2004). Sin embargo, no se investigaron mecanismos de adherencia a la mucosa gástrica en estas cepas. Se considera que la capacidad de sobrevivir en este entorno hostil es beneficiosa para los seres humanos y puede inhibir *H. pylori* patógeno implicado en la colitis ulcerosa (Gotteland, Brunser & Cruchet, 2006).

- Lactobacilos e inhibición de hongos

Las propiedades antifúngicas y/o fungistáticas de los probióticos no deben ignorarse ya que se han detectado hongos en algunas enfermedades como úlceras gástricas o colitis. *L. pentosus* TV35b pudo producir una pentocina que inhibió *Candida albicans in vitro* (Okkers, Dicks, Silvester, Joubert & Odendaal, 1999). Las cepas de *L. plantarum* VTT E-78076 (E76) y VTT E-79098 (E98) mostraron una actividad antifúngica similar contra varias especies de *Fusarium in vitro* (Laitila, Alakomi, Raaska, Mattila-Sandholm & Haikara, 2002; Niku-Paavola, Laitila, Mattila-Sandholm

& Haikara, 1999). También se han demostrado amplias actividades anti-moho *in vitro* por *L. sanfrancisco* CB1 y la inhibición se atribuyó principalmente al ácido acético incluso si otros compuestos influyen en él (Corsetti, Gobbetti, Rossi & Damiani, 1998). Otro estudio reveló que *L. casei* subsp. *ramnosus* GG también ha demostrado ser capaz de reducir la colonización entérica de *Candida* en humanos, pero no se investigaron los mecanismos (Manzoni, 2007).

- Lactobacilos y actividad antiviral

Las infecciones por rotavirus son responsables de la deshidratación grave o la diarrea que causan 611.000 muertes en todo el mundo cada año (Parashar, Gibson, Bresee & Glass, 2006). El rotavirus es el patógeno más frecuente en la diarrea infantil (Lorrot & Vasseur, 2007). Se han realizado muchos estudios con el objetivo de disminuir la mortalidad, que afecta principalmente a los niños. Un meta-análisis reveló que el consumo de probióticos es eficaz para reducir la intensidad y duración de los episodios infecciosos en pacientes que padecen diarrea (Allen, Okoko, Martinez, Gregorio & Dans, 2004). Freitas *et al.* (2003) mostraron que los sobrenadantes del cultivo de *L. casei* DN-114 001 pudieron disminuir la infección de células HT-29 por rotavirus en un 80% (Freitas *et al.*, 2003). Estos autores sugieren que podría producirse un factor soluble capaz de cambiar la glicosilación o galactosilación del receptor de rotavirus en las células HT-29, dando como resultado diferentes conformaciones del receptor de rotavirus en la superficie intestinal que pueden inhibir las infecciones por virus (Freitas *et al.*, 2003).

Los sorprendentes resultados de un estudio revelaron que la bacteriocina bacST284BZ producida por *L. paracasei* ST284BZ tenía propiedades antivirales contra el virus del herpes simple tipo 1 (Todorov *et al.*, 2008). Sin embargo, los mecanismos involucrados siguen siendo desconocidos, aunque algunos autores sugieren que las bacteriocinas podrían facilitar la agregación de partículas de virus, bloqueando así los sitios receptores en la célula huésped o inhibiendo reacciones clave en el ciclo de multiplicación (Wachsman *et al.*, 2003).

- Lactobacilos y propiedades antibacterianas

La mayoría de las BAL son capaces de sintetizar diferentes metabolitos como H₂O₂, bacteriocinas, ácido acético, ácido láctico u óxido nítrico que son capaces de reducir el crecimiento bacteriano (Hammes & Tichaczek, 1994). *L. salivarius* CECT 5713 es capaz de producir ácido L-láctico, ácido acético y H₂O₂ e inhibe el desarrollo *in vitro* de *Listeria monocytogenes* Ohio y *Klebsiella oxytoca* CECT 860T (Martín *et al.*, 2006). El H₂O₂ también puede inhibir muchos patógenos (Servin, 2004; Spiegel, 1991). Esta capacidad se ha demostrado con sobrenadantes de *L. johnsonii* NCC533 o *L. gasseri* CRL1421 que pueden inhibir el crecimiento de patógenos, mientras que los sobrenadantes tratados con catalasa no lo hicieron, lo que sugiere la implicación del H₂O₂ (Otero & Nader-Macías, 2006; Pridmore, Pittet, Praplan & Cavadini, 2008).

El ácido láctico es un metabolito inhibidor importante ya que puede permeabilizar bacterias Gram-negativas *in vitro* y es responsable de un pH intracelular bajo (Alakomi *et al.*, 2000). Por ejemplo, *L. acidophilus* No 4356 produjo una gran cantidad de ácido láctico que inhibió completamente el crecimiento de *H. pylori* en un cultivo mixto (Aiba, 1998). La actividad ureasa permitió que patógenos como *Yersinia enterocolitica* o *H. pylori* se desarrollaran en un ambiente de pH bajo, sin embargo, los lactobacilos pudieron inhibir esta actividad mediante la producción de ácido láctico (Aiba, 1998; Lavermicocca, Valerio, Lonigro, Di Leo & Visconti, 2008; Sgouras *et al.*, 2004).

El óxido nítrico (NO) también puede inhibir el crecimiento bacteriano. Los lactobacilos pueden aumentar la producción de NO por los macrófagos o pueden producirlo directamente *in vitro*, por ejemplo *L. fermentum* LF1 (Ivec *et al.*, 2007; Karahan, Çakmakçi, Cicioğlu-Aridoğan & Kart-Gündoğdu, 2005; Morita, Yoshikawa, Sakata, Nagata & Tanaka, 1997; Xu & Verstraete, 2001). Esta capacidad generalmente se debe a una vía de NO sintasa que oxida la L-arginina a L-citrulina y NO. Como esto también podría conducir a la producción de compuestos de amina peligrosos, el beneficio dependerá del equilibrio entre la inhibición de patógenos y la producción de aminas nocivas (Turpin *et al.*, 2010).

Muchas especies de las BAL son capaces de producir bacteriocinas con espectros de acción específicos (Deegan, Cotter, Hill & Ross, 2005; Nes *et al.*, 1996). Se reconoce generalmente que las bacteriocinas son eficaces contra especies estrechamente relacionadas. Las bacteriocinas se han estudiado ampliamente y existen dos bancos de datos dedicados: BACTIBASE (Hammami, Zouhir, Ben Hamida & Fliss, 2007) y BAGEL (de Jong, van Hijum, Bijlsma, Kok & Kuipers, 2006). Generalmente, las BAL que producen bacteriocinas contienen el gen que codifica la propia bacteriocina, uno o varios genes que permiten el transporte de este péptido, y finalmente un gen que le confiere inmunidad. Por ejemplo, un mutante del gen que codifica la bacteriocina Abp118 en *L. salivarius* UCC118 da como resultado la pérdida de inhibición de *L. monocytogenes*, EGDe y LO28 *in vivo*. Los autores también revelaron que cuando *L. monocytogenes* expresó la proteína de inmunidad ABP118 heteróloga, se obtuvo el mismo resultado, lo que indica que la bacteriocina ABP118 es responsable de la inhibición de *L. monocytogenes* (Corr *et al.*, 2007). También se encontraron genes que codifican plantaricina y pediocina en varios lactobacilos (Ben Omar *et al.*, 2008; Omar *et al.*, 2006; Papagianni & Anastasiadou, 2009; Rojo-Bezares *et al.*, 2008; Todorov, 2009).

A medida que se dispone de un número cada vez mayor de datos genómicos y proteómicos sobre las BAL y la relación entre la microbiota colónica y el estado del hospedador a nivel metabólico (Cani & Delzenne, 2009; Turnbaugh *et al.*, 2006), podríamos esperar comprender mejor algunos mecanismos subyacentes a los efectos probióticos. Más particularmente, los trabajos sobre análisis transcriptómico y proteómico de las BAL probióticas en modelos *in vivo* (Roy, Meyrand, Corthier, Monnet & Mistou, 2008; Sonnenburg, Chen & Gordon, 2006) abren una vía de investigación para identificar los genes involucrados en las funciones probióticas y profundizar en estudios más mecanicistas.

2.3. *Lactiplantibacillus pentosus* (anteriormente *Lactobacillus pentosus*) como candidata probiótica

Las cepas de *L. pentosus* son bacterias versátiles, miembros del grupo de las BAL, distribuidas de forma ubicua en la naturaleza (medio ambiente, membranas mucosas de animales y humanos, así como material vegetal) y están asociadas en gran medida con alimentos fermentados y productos alimenticios (Todorov & Dicks, 2004).

De acuerdo con el enfoque de Presunción Cualificada de Seguridad (QPS) establecido por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2008), algunas especies de *Lactobacillus* tienen el estatus de “QPS” y podrían usarse como probióticos, como *L. acidophilus*, *L. plantarum* y *L. pentosus* entre 35 especies (EFSA, 2012, 2015), aunque se requiere una evaluación de seguridad *in vitro* completa para cada cepa destinada a ser utilizada en alimentos para asegurar la ausencia de determinantes de virulencia y genes de resistencia a antibióticos transferibles.

La alta prevalencia de *L. pentosus* en aceitunas Aloreña naturalmente fermentadas (Abriouel *et al.*, 2012; Abriouel, Benomar, Lucas & Gálvez, 2011) y aceitunas verdes de mesa estilo español (Maldonado-Barragán, Caballero-Guerrero, Lucena-Padrós & Ruiz-Barba, 2011) y su historia prolongada de uso seguro en otros productos fermentados son el origen de su merecida reputación como cultivos iniciadores ideales para la fermentación (Anukam & Olise, 2012; Garrigues, Johansen & Crittenden, 2013; Giraffa, Chanishvili & Widyastuti, 2010; Holzapfel, 2002; Rodríguez-Gómez, Romero-Gil, García-García, Garrido-Fernández & Arroyo-López, 2014; Ruiz-Barba & Jiménez-Díaz, 2012).

Como tales, *L. pentosus* y *L. plantarum*, frecuentemente aislados de aceitunas de mesa fermentadas, se han caracterizado por sus propiedades probióticas y su papel como cultivos iniciadores en la fermentación de la aceituna (Abriouel *et al.*, 2012a; Blana, Grounta, Tassou, Nychas & Panagou, 2014; Grounta, Doulgeraki, Nychas & Panagou, 2016; Hurtado, Reguant, Bordons & Rozès, 2010; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2014). Además, *L. pentosus* también exhibe propiedades probióticas (Izumo *et al.*, 2011; Kotani *et al.*, 2010), y al ser de origen vegetal, ha ganado más atención en la

última década como una especie capaz de adaptarse a los tractos gastrointestinales y a las condiciones ambientales cambiantes (Abriouel *et al.*, 2012, 2017; Granato, Branco, Nazzaro, Cruz & Faria, 2010; Montoro *et al.*, 2016; Ranadheera, Baines & Adams, 2010), además de adaptarse a las preferencias dietéticas del organismo huésped.

Pérez Montoro *et al.* (2016) realizaron un análisis en profundidad de las características probióticas de 31 cepas de *L. pentosus* aisladas de la fermentación de aceitunas de mesa Aloreña (Abriouel *et al.*, 2012), mostrando que algunas cepas tienen un futuro prometedor para ser utilizadas como probióticos en aceitunas de mesa u otras matrices alimentarias. Las cepas de *L. pentosus* analizadas mostraron una buena capacidad de crecimiento y supervivencia en diferentes condiciones ambientales y gastrointestinales, buena capacidad de autoagregación y coagregación con bacterias patógenas, adherencia a los intestinos y células vaginales, actividad antagónica, y además exhibieron diferentes propiedades funcionales determinando su eficacia no solo en el tracto gastrointestinal sino también en matrices alimentarias (Pérez Montoro *et al.*, 2016).

Pérez Montoro *et al.* (2018) utilizaron la proteómica comparativa para estudiar los mecanismos moleculares empleados por las cepas de *L. pentosus* para sobrevivir a los ácidos gástricos en condiciones estándar y de estrés ácido. Las proteínas identificadas como biomarcadores candidatos para la resistencia a los ácidos en *L. pentosus* incluyeron el factor de elongación G y la fosfoglicerato mutasa 2 dependiente de 2,3-bisfosfoglicerato responsable de la biosíntesis de proteínas y la producción de energía (proceso gluconeogénesis-glucolítico), respectivamente. No solo eran abundantes constitutivamente en el proteoma del fenotipo resistente, sino que también se producían en exceso después de la exposición al ácido. Además, las cepas de *L. pentosus* pre-expuestas al ácido mostraron una mejor función probiótica, incluida una mayor capacidad de autoagregación, por medio de proteínas multifuncionales (como el factor de elongación G y el fosfoglicerato dependiente de 2,3-bisfosfoglicerato mutasa 2 en el caso del fenotipo resistente) u otras proteínas no determinadas en el estudio. Se puede concluir, por lo tanto, que la pre-exposición de cepas probióticas de

L. pentosus a ácidos en el estómago o en matrices alimentarias, puede mejorar estratégicamente su desempeño como probiótico y también como cultivo iniciador (Pérez Montoro *et al.*, 2018).

Pérez Montoro *et al.* (2018) examinaron el proteoma de superficie de cepas potencialmente probióticas de *L. pentosus* aisladas de aceitunas verdes de mesa Aloreña fermentadas naturalmente (Abriouel *et al.*, 2012; Montoro *et al.*, 2016) para determinar los mecanismos moleculares involucrados en su adhesión al moco. Por primera vez, se identificaron proteínas que pueden servir como biomarcadores de adhesión para discriminar cepas de *L. pentosus* con respecto a su potencial probiótico, y además, exploraron si la interacción de las cepas de *L. pentosus* con la mucina afectaba otras características probióticas. Los resultados revelaron la presencia, en cantidades mayores, de cuatro proteínas multifuncionales en *L. pentosus* CF1-43N, con gran capacidad de adhesión. Los genes que codifican estas proteínas fueron regulados positivamente en respuesta a la mucina en *L. pentosus* CF1-43N con gran capacidad de adhesión, lo que indica claramente el papel significativo de los genes *nagB*, *greA*, *pgm* y *shsp* en la capacidad de adhesión de *L. pentosus*. Estas proteínas estaban involucradas en la vía glucolítica (PGM y GNPDA), la respuesta al estrés (proteína de choque térmico pequeña) y la transcripción (GreA). Por lo tanto, estas proteínas podrían usarse como biomarcadores para la adhesión de las cepas de *L. pentosus* y, probablemente, también para otros efectos probióticos, como la coagregación con patógenos, que se incrementó después de la exposición a la mucina (Pérez Montoro *et al.*, 2018).

3. INTERACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS CON LA DIETA Y EL HOSPEDADOR

3.1. Componentes alimenticios

Desde la teoría de la longevidad de Metchnikoff, la búsqueda continúa para comprender el papel de una amplia gama de componentes alimenticios y nutrientes para mejorar la salud o prevenir enfermedades crónicas. La investigación en este campo ha dado como resultado una gran cantidad de nuevas etiquetas para alimentos que han indicado beneficios distintos y dichos alimentos se denominan alimentos funcionales (Webb, 2011). El concepto de alimentos funcionales enfatiza que los alimentos no solo son vitales para ganarse la vida, sino que también juegan un papel en la prevención y reducción de los factores de riesgo de varias enfermedades y también son capaces de mejorar ciertas funciones fisiológicas vitales. Los alimentos funcionales también proporcionan al cuerpo la cantidad requerida de vitaminas, grasas, proteínas, carbohidratos, etc. (Cencic & Chingwaru, 2010).

El papel principal de la dieta es proporcionar suficientes nutrientes para cubrir los requerimientos metabólicos mientras brinda al consumidor una sensación de satisfacción y bienestar. Sin embargo, el conocimiento reciente respalda la hipótesis de que, más allá de satisfacer las necesidades nutricionales, la dieta puede modular varias funciones fisiológicas y puede desempeñar funciones perjudiciales o beneficiosas en algunas enfermedades (Koletzko *et al.*, 1998). Existe el umbral de una nueva frontera en las ciencias de la nutrición y, de hecho, al menos en el mundo occidental, los conceptos de nutrición se están expandiendo desde el énfasis pasado en la supervivencia, la satisfacción del hambre y la prevención de efectos adversos a un énfasis en el uso de alimentos para promover un estado de bienestar, mejorar la salud y reducir el riesgo de enfermedades. Estos conceptos son particularmente importantes a la luz del costo creciente de la atención médica, el aumento constante de la esperanza de vida y el deseo de las personas mayores de una mejor calidad de vida (Roberfroid, 2000).

Históricamente, el estado nutricional de las poblaciones se ve afectado por una alta ingesta de azúcares, sal, ácidos grasos saturados y trans, una baja ingesta de fibras, vitaminas y minerales esenciales. Estos hábitos son los principales causantes de problemas de enfermedades crónico-degenerativas no transmisibles. Por lo tanto, para reducir el riesgo de dichas enfermedades, se ha propuesto el desarrollo de nuevos productos alimenticios que contengan sustancias biológicamente activas (Roberfroid, 2002). De acuerdo con la definición aceptada en todo el mundo, los alimentos funcionales se acuñan para describir alimentos o nutrientes cuya ingestión conduce a cambios fisiológicos importantes en el cuerpo que son separados y distintos de los asociados con su función como nutrientes (Daniel Granato, Branco, Cruz, Faria & Shah, 2010).

Todos los alimentos son funcionales en algún nivel fisiológico porque proporcionan nutrientes u otras sustancias que proporcionan energía, sostienen el crecimiento o mantienen/reparan procesos vitales. Sin embargo, los alimentos funcionales van más allá de estas necesidades y brindan beneficios adicionales para la salud que pueden reducir el riesgo de enfermedades y/o promover una salud óptima. Los alimentos funcionales incluyen alimentos convencionales, alimentos modificados (fortificados, enriquecidos o mejorados), alimentos médicos y alimentos para dietas especiales (Hasler & Brown, 2009).

Los alimentos funcionales son aquellos que contienen 1 o más compuestos que brindan funciones importantes o limitadas en el organismo, promoviendo el bienestar y la salud, o para una reducción del riesgo y protección de la hipertensión, diabetes, cáncer, osteoporosis y enfermedades cardíacas (Arihara, Nakashima, Ishikawa & Itoh, 2004). Estos alimentos generalmente contienen uno o más compuestos beneficiosos como prebióticos, probióticos, polifenoles y esteroides antioxidantes, carotenoides y otros (Andlauer & Fürst, 2002; Granato, Branco, Nazzaro, Cruz & Faria, 2010; Shah, 2001).

Usando las regulaciones de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos como modelo, Hasler & Brown (2009) categorizaron los alimentos funcionales de acuerdo con sus propiedades:

- (i) Los alimentos convencionales, que son alimentos integrales sin modificar o alimentos convencionales, como frutas y verduras, representan la forma más simple de alimento funcional. Por ejemplo, los tomates, las frambuesas, la col rizada o el brócoli se consideran alimentos funcionales porque son ricos en componentes bioactivos como licopeno, ácido eláxico, luteína y sulforafano, respectivamente.
- (ii) Los alimentos modificados son alimentos funcionales que incluyen aquellos que han sido modificados mediante fortificación, enriquecimiento o mejora. Estos incluyen jugo de naranja fortificado con calcio (para la salud de los huesos), panes enriquecidos con folato (para un desarrollo fetal adecuado) o alimentos enriquecidos con componentes bioactivos, como las margarinas que contienen estanoles vegetales o ésteres de esteroides (para reducir el colesterol alto) y bebidas mejoradas con ingredientes que promueven la energía, comercializados para los consumidores, como ginseng, guaraná o taurina.
- (iii) Un alimento médico representa un alimento que está formulado para ser consumido o administrado por vía enteral bajo la supervisión de un médico y que está destinado al manejo dietético específico de una enfermedad o afección para la cual los requisitos nutricionales distintivos están establecidos por evaluación médica. Los ejemplos de alimentos médicos incluyen suplementos orales en forma de fórmulas de fenilcetonuria sin fenilalanina y formulaciones para diabéticos, renales y hepáticos.
- (iv) Por último, los alimentos para dietas especiales tienen un uso particular para el cual un alimento pretende o se representa para ser utilizado, que incluye, entre otros, los siguientes: suplir una necesidad dietética especial que existe debido a una condición física, fisiológica o patológica; suministrar una vitamina, mineral

u otro ingrediente para que los humanos los utilicen como complemento de la dieta aumentando la ingesta dietética total; suplir una necesidad dietética especial por ser alimento para uso como único elemento de la dieta. Ejemplos de tales alimentos incluyen alimentos para bebés, alimentos hipoalergénicos como alimentos sin gluten y alimentos sin lactosa, y alimentos ofrecidos para bajar de peso.

El objetivo final de una intervención dietética probiótica es tener un efecto positivo en la salud de la población objetivo. Esto podría lograrse mediante diferentes acciones, como la modulación de las respuestas inmunológicas, la mejora del estado nutricional del huésped o las derivadas de la modulación de la microbiota intestinal. Durante muchos años, se aceptó en general que la mayoría de los efectos probióticos deseados se asociaron con cambios ecológicos microbianos en el intestino (Sánchez *et al.*, 2017).

Entre los alimentos cuyas supuestas declaraciones de propiedades saludables han sido ampliamente promocionadas en los medios de comunicación durante los últimos años, se destacan los que contienen cepas probióticas (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001). El sector lácteo, que está fuertemente vinculado a los probióticos, es el mercado de alimentos funcionales más grande y representa casi el 33% del mercado en general (Leatherhead Food International, 2006). Además, en los últimos años, el consumo per cápita de yogur ha aumentado drásticamente porque muchos consumidores asocian el yogur con la buena salud (Hekmat & McMahon, 1992).

En la industria alimentaria se han empleado diferentes especies de microorganismos probióticos, como *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus*, *L. thermophilus*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. brevis*, *B. infantis* y *B. animalis* (Knorr, 1998). *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* se encuentran en una serie de preparaciones, como yogures tradicionales, yogures congelados y postres en algunos lugares (Senok, 2009). Es importante enfatizar que se han probado otras bacterias para verificar el potencial probiótico, como *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*,

Saccharomyces boulardii y *Pediococcus acidilactici*, entre otros. Es discutible si los cultivos iniciadores de yogur (*S. thermophilus* y *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) deben considerarse probióticos (Pestka, Ha, Warner, Lee & Ustunol, 2001; Tejada-Simon, Lee, Ustunol & Pestka, 1999). Es importante mencionar que estas bacterias deben estar presentes en un alimento lácteo a un nivel mínimo de 10^6 UFC/g o la ingesta diaria debe ser alrededor de 10^8 UFC/g, con el objetivo de compensar la posible reducción en el número de los microorganismos probióticos durante el paso por el intestino (Shah, 2007).

Los productos lácteos son los transportadores de alimentos más utilizados para la entrega de probióticos. Una amplia gama de productos lácteos probióticos está disponible en diferentes mercados; los ejemplos típicos incluyen leche pasteurizada, helado, leche fermentada, quesos y leche en polvo para alimentos de bebés. El yogur es el ejemplo clásico de leche fermentada probiótica. Las etapas de fabricación del yogur probiótico son muy similares al yogur "clásico", pero el tiempo de fermentación es un poco más largo en comparación con el producto "clásico" (Tamime *et al.*, 2005). Debido a su acidez limitada, bajo nivel de oxígeno, alto contenido de lípidos y baja temperatura de almacenamiento, el queso también parece ser un portador adecuado para transportar bacterias probióticas vivas (Grattepanche, Miescher-Schwenninger, Meile & Lacroix, 2008). Por ejemplo, los probióticos *L. paracasei* y *L. rhamnosus* GG se han utilizado en la fabricación de queso cheddar y requesón. Por lo general, las bacterias probióticas se introducen en el queso como cultivos adjuntos junto con los cultivos iniciadores lácticos (Tamime *et al.*, 2005).

El consumo de **leche fermentada** que contiene múltiples cepas probióticas condujo al enriquecimiento de enzimas que catalizan carbohidratos en propionato tanto en gemelos monocigóticos como en ratones gnotobióticos que contienen una comunidad modelo de microbiota humana (McNulty *et al.*, 2011).

Aunque se ha demostrado ampliamente que los productos lácteos fermentados son las mejores matrices para administrar probióticos, existe una creciente evidencia de la posibilidad de obtener alimentos probióticos a partir de matrices no lácteas.

Recientemente, se han investigado varias materias primas (como cereales, frutas y verduras) para determinar su idoneidad para diseñar nuevos alimentos probióticos no lácteos (Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010).

Existe un interés creciente en el desarrollo de productos probióticos no lácteos debido a la aparición del vegetarianismo, la intolerancia a la lactosa, la colesterolemia y la alergia (Granato, Branco, Nazzaro *et al.*, 2010; Ranadheera *et al.*, 2010). Recientemente, varias investigaciones se centraron en la selección de probióticos no lácteos, especialmente de verduras, frutas y cereales (Martins *et al.*, 2013; Peres, Peres, Hernández-Mendoza & Malcata, 2012). De esta forma, las aceitunas de mesa Aloreña fermentadas espontáneamente se consideran una fuente natural de microorganismos activos y viables (BAL y levaduras) (Abriouel, Benomar, Lucas *et al.*, 2011) y un vehículo prometedor de BAL probióticas a partir de las pruebas preliminares (Abriouel *et al.*, 2011, 2012). Además, algunos estudios demostraron que las especies de *Lactobacillus* se adhieren eficazmente a la superficie de las aceitunas durante el almacenamiento como biopelículas que protegen a los frutos de la alteración y colonización por microorganismos planctónicos indeseables como los hongos (Faten *et al.*, 2016). Además de su valor nutricional (ácidos grasos insaturados, fibra, vitaminas, minerales, flavonoides y polifenoles), la presencia de BAL probióticas capaces de sobrevivir durante el almacenamiento aporta un valor añadido a la aceituna de mesa Aloreña. Además, la fortificación de aceitunas previamente fermentadas con los supuestos lactobacilos probióticos autóctonos puede ser una buena estrategia debido a la adherencia de los lactobacilos a la superficie de los frutos que son el alimento real finalmente ingerido por los consumidores (Rodríguez-Gómez, Romero-Gil, García-García, Garrido-Fernández & Arroyo-López, 2014).

Los alimentos fermentados de origen vegetal se han considerado cada vez más como vectores para la incorporación de cultivos probióticos (Soccol *et al.*, 2010), siguiendo el conocimiento mundial bien establecido en la fabricación de vegetales fermentados a través de las BAL. A pesar de que la mayoría de las cepas probióticas empleadas comercialmente se originan en el tracto gastrointestinal (Haller *et al.*,

2001), las matrices vegetales pueden constituir una fuente alternativa de probióticos. Desafortunadamente, solo unos pocos cultivos probióticos usados con éxito en productos lácteos exhiben viabilidades aceptables en matrices de plantas en el momento del consumo. Por lo tanto, el cribado de cepas de BAL de origen vegetal en busca de posibles características probióticas puede ayudar a superar estos desafíos tecnológicos (Karasu, Şimşek & Çon, 2010).

La mayoría de las superficies de las plantas en la naturaleza están ocupadas por microbiota productora de ácido láctico que cambia gradualmente durante la fermentación, con una tendencia a que las especies de *Lactobacillus* se vuelvan predominantes (Kamble & Pathade, 2010). Sin embargo, numerosos factores (por ejemplo, la acidez, la concentración de sal y el tipo de planta en sí) influyen en el desarrollo y crecimiento de las BAL (Fleming & McFeeters, 1981). En los últimos tiempos, se han probado cultivos potencialmente probióticos de *Lactobacillus* para la fermentación de aceitunas de mesa; cepas específicas de BAL toleran la acidez y la salinidad relativamente altas de las verduras fermentadas, por lo que pueden adherirse eficazmente a la superficie de la aceituna. Esta "probioticación" de la aceituna puede ayudar a mejorar los procesos de fabricación y almacenamiento al extender la vida útil y mantener las propiedades sensoriales deseadas, además de ofrecer resultados beneficiosos para la salud de los consumidores (Peres, Peres, Hernández-Mendoza & Malcata, 2012).

La fermentación es el método biotecnológico más antiguo para conservar vegetales; es responsable de muchas características alimentarias favorables, por ejemplo sabor, vida útil y textura (Çetin, 2011). La elaboración de verduras fermentadas se ha aprovechado tradicionalmente de la microbiota beneficiosa que se establece espontáneamente sobre el material vegetal; las BAL responsables de la fermentación del material vegetal suelen pertenecer a los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* (Chiu, Tsai, Hsih & Tsen, 2007; Fleming & McFeeters, 1981). Higashikawa *et al.* (2010) concluyeron que algunas BAL de origen vegetal son tan resistentes (o incluso más que) que las BAL de origen animal a los jugos gástricos

artificiales y la bilis. Por lo tanto, estas bacterias parecen probióticos prometedores para el consumo humano.

Debido al creciente interés mencionado anteriormente en los probióticos de fuentes alternativas, los esfuerzos se han centrado en aislar BAL con características potencialmente probióticas de vegetales fermentados (por ejemplo, aceitunas, pepino, rábano y chucrut). De hecho, estudios previos han identificado bacterias productoras de bacteriocinas a partir de chucrut - producción de nisina por *Lactococcus lactis* (Harris, Fleming & Klaenhammer, 1992), pepinos - plantaricina C19 contra *Listeria grayi* IP 6818 (Atrih, Rekhif, Milliere & Lefebvre, 1993) y aceitunas - compuestos similares a bacteriocinas contra *Weissella mesenteroides* y bacteriocinas de *Lactobacillus plantarum* contra bacterias Gram-positivas y negativas (Delgado, Brito, Peres, Noé-Arroyo & Garrido-Fernández, 2005; Mourad & Nour-Eddine, 2006). Las pruebas *in vivo* han abarcado la cepa MP12 de *Pediococcus pentosaceus* y la cepa LAP6 de *L. plantarum*, previamente aisladas de repollo en escabeche, con respecto a su actividad antagonista contra *Salmonella* spp. en ratones (Chiu, Tsai, Hsih & Tsen, 2008); ambas cepas fueron capaces de adherirse y sobrevivir en el epitelio intestinal del ratón, donde mostraron un fuerte efecto antagónico. Incluso cepas de BAL aisladas de encurtidos vegetales fermentados han sido efectivas para mejorar las alergias de tipo 1, mediante la mejora del equilibrio Th1/Th2 (células T auxiliares) y la disminución de la producción de Ig E (Masuda, Kimura, Okada & Yasui, 2010). Estos hallazgos sugieren que cepas específicas de BAL recolectadas de fermentaciones espontáneas de plantas son muy prometedoras como probióticos; también se ha sugerido que las tasas de supervivencia de las cepas probióticas BAL en vegetales fermentados (por ejemplo, aceitunas de mesa y alcachofas) son bastante comparables o incluso superiores a las de los probióticos de origen lácteo (Ranadheera *et al.*, 2010).

De particular interés con respecto a la fermentación de alimentos es el caso de las aceitunas de mesa, que sigue siendo una de las industrias alimentarias más importantes de la cuenca mediterránea, siendo España, Italia, Grecia, Portugal y Francia los principales productores (Ann Patterson, Josling Professor & Fellow, 2005). A pesar de

sus impactos económicos locales y globales, la mayor parte de la salmuera de aceitunas todavía se realiza siguiendo prácticas artesanales, con un grado moderado de innovación tecnológica. Sin embargo, la singularidad de las aceitunas fermentadas las ha convertido en ingredientes ineludibles de recetas gourmet y excelencia gastronómica (Peres *et al.*, 2012).

Hay tres categorías principales de aceitunas de mesa comerciales: verde o estilo español (sevillano), ennegrecidas o estilo californiano y negras naturales o estilo griego. La elaboración de aceitunas verdes incluye el tratamiento con hidróxido de sodio y fermentación en salmuera; el método californiano comprende un tratamiento con lejía y sal de hierro, seguido de oxidación de aceitunas mediada por aire; y el método de estilo griego incluye una fermentación natural en salmuera, complementada con oxidación mediada por aire para mejorar el color (Pereira, Pereira, Bento & Estevinho, 2008).

La fermentación de aceitunas de mesa verdes y negras es típicamente un proceso espontáneo en el que coexisten BAL y levaduras. Las BAL que se encuentran en las aceitunas pertenecen predominantemente a especies como *L. plantarum*, *L. casei*, *L. mesenteroides* y *P. pentosaceus* (Randazzo, Restuccia, Romano & Caggia, 2004), mientras que las levaduras incluyen principalmente *Pichia membranaefaciens*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida oleophila*, *Candida silvae* y *Cystofilobasidium capitatum* (Nisiotou, Chorianopoulos, Nychas & Panagou, 2010; T. Silva *et al.*, 2011).

Recientemente, se ha experimentado un cambio de interés por las cepas que se volvieron preferidas por sus características probióticas. Una nueva frontera denominada tentativamente "ortobiótica", o gastronomía vegetal probiótica (Perricone, Bevilacqua, Corbo & Sinigaglia, 2010) ha revelado a las aceitunas como un candidato prometedor. Los estudios *in vitro* han indicado que algunas de las cepas BAL aisladas de aceitunas de mesa en salmuera pueden adherirse a las células epiteliales de yeyuno porcino IPEC-J2 (Bevilacqua, Altieri, Corbo, Sinigaglia & Ouoba, 2010) y producir metabolitos antimicrobianos (es decir, bacteriocinas) que

inhiben *Helicobacter pylori*, *Propionibacterium* spp. y *Clostridium perfringens* (Brito *et al.*, 2007; Cross, 2002; Delgado *et al.*, 2005; Ruiz-Barba, Cathcart, Warner & Jiménez-Díaz, 1994; Ruiz-Barba, Caballero-Guerrero, Maldonado-Barragán & Jiménez-Díaz, 2010). Dichos estudios también indicaron que esas cepas pueden resistir un pH bajo, así como sobrevivir en presencia de bilis en concentraciones similares a las que prevalecen en el duodeno (Mokhbi, Kaid-Harche, Lamri, Rezki & Kacem, 2009; Mourad & Nour-Eddine, 2006). Por lo tanto, se espera que el potencial probiótico aumente en gran medida el ya importante valor nutricional de las aceitunas de mesa e, originariamente debido a que son fuente de fibra, ácidos orgánicos, vitaminas y minerales. El desarrollo de productos de aceitunas probióticos puede tener un impacto económico favorable (Peres *et al.*, 2012).

Una nueva generación de alimentos saludables está ganando importancia estos últimos años, y las funciones de cultivo iniciador y probiótico que surgen de una serie de rasgos fisiológicos y metabólicos de los cocultivos de las BAL deben combinarse para garantizar el mejor efecto posible sobre el alimento de origen vegetal. Específicamente en el caso de las aceitunas de mesa obtenidas mediante el enriquecimiento con probióticos, deben realizarse estudios comparativos que se centren en los efectos sobre la salud derivados de los componentes funcionales de la aceituna y cepas probióticas. Los estudios futuros deberían recopilar datos para evaluar definitivamente (por ejemplo, mediante estudios *in vivo*) si las bacterias vivas y la matriz alimentaria poseen componentes beneficiosos que mejoran significativamente la salud de los consumidores. Si este es el caso, se pueden proponer declaraciones de propiedades saludables, como seguramente sucederá con ciertos tipos de aceitunas de mesa, que eventualmente pueden ganar el estatus de alimentos probióticos (Peres *et al.*, 2012).

3.2. Microbioma intestinal

El cuerpo humano alberga más de un trillón de microorganismos (Johnson & Versalovic, 2012). En particular, los seres humanos tienen una microbiota intestinal

compleja formada por microorganismos de los tres dominios: Archaea, Bacteria y Eukarya (Donaldson, Lee & Mazmanian, 2016). La microbiota intestinal se forma inicialmente con el contacto con la microbiota vaginal maternal durante el nacimiento (Dominguez-Bello *et al.*, 2010) y se va modificando debido a varios factores como la dieta (la leche materna juega un papel crucial al transmitir la microbiota de la leche al bebé (Fernández *et al.*, 2013), el desarrollo del sistema inmune, la exposición a químicos y los efectos de los colonizadores iniciales que tienen consecuencias a largo plazo en el establecimiento de la microbiota (Donaldson *et al.*, 2016).

La microbiota intestinal adulta está formada por cientos de miles de especies, principalmente pertenecientes a los filos Bacteroidetes y Firmicutes (Huttenhower *et al.*, 2012), y su composición es parcialmente estable: tras perturbaciones como un tratamiento antibiótico, la diversidad de la microbiota intestinal disminuye, pero tras un periodo de recuperación se restablece la diversidad inicial (Dethlefsen & Relman, 2011). La composición de la microbiota es diferente a lo largo del tracto gastrointestinal: el intestino delgado, el ciego y el intestino grueso tienen variaciones fisiológicas como el gradiente de pH, de oxígeno y la carga de antimicrobianos (sales biliares, por ejemplo) que influyen en dicha composición (Figura 3).

Por ejemplo, el intestino delgado es un entorno muy ácido con altos niveles de sales biliares y oxígeno, por lo que están presentes microorganismos anaerobios facultativos de rápido crecimiento que toleran estas condiciones, como son las familias *Lactobacillaceae* y *Enterobacteriaceae* (Donaldson *et al.*, 2016; Gu, Chen, Zhang, Lv & Wang, 2013). Las comunidades microbianas en el intestino delgado han recibido mucha menos atención que la microbiota del colon, pero es probable que se vean proporcionalmente mucho más afectadas tras el consumo de probióticos (Booijink, Zoetendal, Kleerebezem & de Vos, 2007).

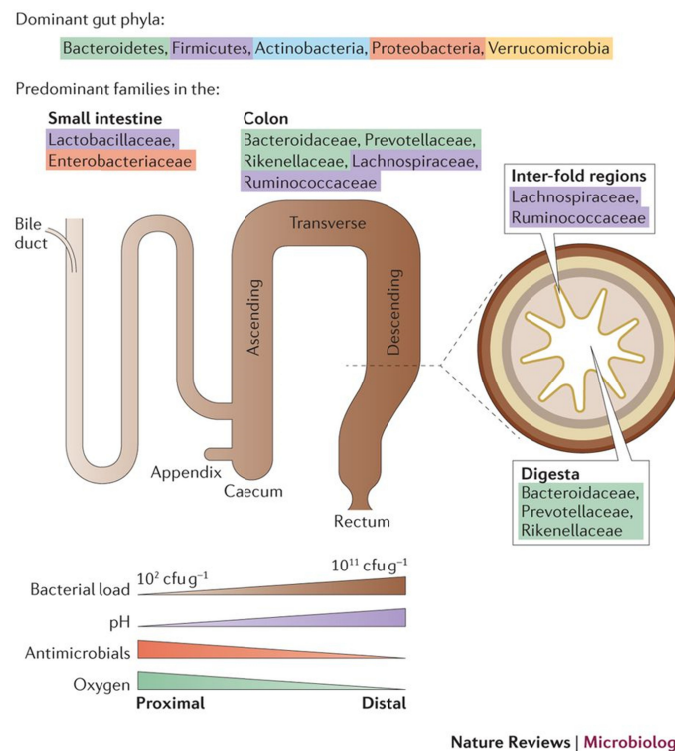


Figura 3. Hábitats microbianos en el tracto gastrointestinal inferior humano. Fuente: Donaldson *et al.* (2016)

La microbiota intestinal realiza una serie de funciones protectoras, estructurales y metabólicas esenciales para la salud del huésped, incluido (i) el mantenimiento de la barrera epitelial, (ii) el procesamiento de alimentos incluida la digestión de polisacáridos complejos no digeribles por el huésped, (iii) la inhibición de la adhesión de patógenos a las superficies intestinales, (iv) la modulación y la apropiada maduración del sistema inmune, y finalmente, (v) la síntesis de diferentes metabolitos como las vitaminas y los ácidos grasos de cadena corta (Grenham, Clarke, Cryan & Dinan, 2011; Neish, 2014; Sánchez *et al.*, 2017; Trompette *et al.*, 2014).

Los metabolitos producidos por el microbioma intestinal son de naturaleza hormonal y ejercen una acción directa sobre la mucosa intestinal y el sistema nervioso entérico (SNE). Sin embargo, esta producción metabólica tiene un alcance mucho más allá del compartimento gastrointestinal local, ya que estos metabolitos se liberan en el torrente sanguíneo y actúan en sitios distales. El objetivo de estas sustancias no es solo el SNE local, sino muchos otros órganos, incluido el cerebro (Clarke *et al.*, 2014). Por lo tanto, considerando la capacidad de influir en la función de los órganos y sistemas

distales, en muchos aspectos, la microbiota intestinal se asemeja a un órgano endocrino (Evans, Morris & Marchesi, 2013; Forsythe, Sudo, Dinan, Taylor & Bienenstock, 2010). La microbiota también desempeña un papel indirecto en la regulación de redes endocrinas complejas. Además, miembros específicos de la comunidad microbiana en general pueden responder a las hormonas secretadas por el huésped (Freestone, Sandrini, Haigh & Lyte, 2008; Lyte, 2004). Su capacidad de funcionar como un colectivo para influir en otros órganos dentro del huésped y, a su vez, responder a las secreciones de otros órganos del huésped satisface las condiciones más importantes de cualquier definición conceptual de un órgano (Lyte, 2010).

A diferencia de otros sistemas u órganos endocrinos, que secretan como máximo un pequeño número de agentes humorales, la microbiota intestinal tiene el potencial de producir cientos de productos (Russell, Duncan & Flint, 2013), y muchas de las hormonas producidas por la microbiota también son neurotransmisores dentro del sistema nervioso central (SNC). Por ejemplo, el ácido gamma-aminobutírico (GABA), el transmisor inhibitorio más importante en el cerebro, es producido por varios lactobacilos (Barrett, Ross, O'Toole, Fitzgerald & Stanton, 2012), mientras que las monoaminas como la noradrenalina, la dopamina y la serotonina también son producidas por ciertas cepas de bacterias (Lyte, 2011, 2013).

En cuanto al metabolismo, el rango endocrino de la microbiota intestinal puede explicar al menos parcialmente los vínculos entre esta comunidad microbiana y el desarrollo de obesidad, enfermedades cardiovasculares y síndromes metabólicos (Tremaroli & Bäckhed, 2012). Por ejemplo, Bäckhed *et al.* (2004) mostraron que los ratones criados en ausencia de microorganismos, denominados libres de gérmenes (GF), tenían menos grasa corporal total que los ratones criados convencionalmente, a pesar del hecho de que los animales GF tenían una mayor ingesta calórica (Figura 4A). Curiosamente, los ratones GF muestran un fenotipo obeso al recibir un trasplante de microbiota de ratones obesos (Turnbaugh *et al.*, 2006; Turnbaugh, Bäckhed, Fulton & Gordon, 2008) y pierden peso al recibir una transferencia de microbiota de animales

que habían mostrado una pérdida de peso rápida después de una cirugía de bypass gástrico (Figura 4B) (Liou *et al.*, 2013).

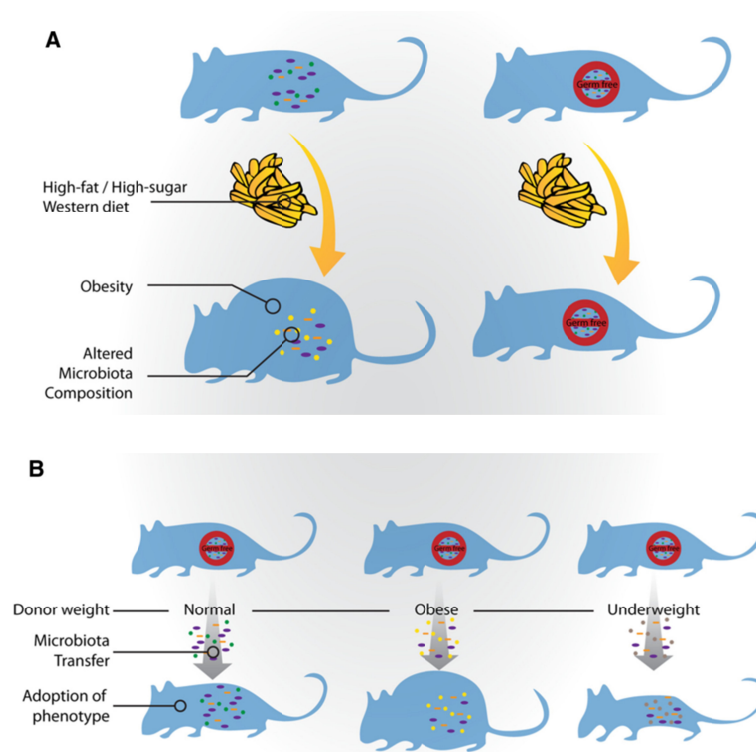


Figura 4. La microbiota intestinal y el metabolismo del huésped. A: los animales GF están protegidos de la obesidad inducida por una dieta alta en grasas. B: los animales GF adoptan el fenotipo del donante de microbiota. Fuente: Clarke *et al.* (2014)

Se ha demostrado que los probióticos reducen el tamaño de los adipocitos en diferentes depósitos adiposos (Sato *et al.*, 2008; Takemura, Okubo & Sonoyama, 2010), lo que se considera un parámetro importante para evaluar su potencial antiobesidad. Los supuestos mecanismos presentados son el aumento de la excreción fecal de esteroides neutros y los ácidos biliares, la disminución de la absorción linfática de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol (Hamad *et al.*, 2009), o el aumento de la lipólisis (Kadooka, Ogawa, Ikuyama & Sato, 2011).

Sin embargo, es importante reconocer que la obesidad es probablemente multifactorial, con mecanismos centrales y periféricos subyacentes a su patogénesis, incluida la disfunción hipotalámica (Schellekens, Finger, Dinan & Cryan, 2012). Actualmente no está claro si el control del SNC de la ingesta de alimentos está sujeto a influencias microbianas, endocrinas o de otro tipo, en los centros cerebrales relevantes

(Cryan & Dinan, 2012). Se requieren estudios futuros orientados a identificar genes microbianos importantes en lugar de centrarse únicamente en caracterizar la composición de la microbiota intestinal para describir con mayor precisión el microbioma obeso y predecir su respuesta después de la intervención terapéutica (Clarke *et al.*, 2014).

La capacidad de la microbiota intestinal para influir en el cerebro y el comportamiento se considera una nueva frontera de investigación (Collins, Surette & Bercik, 2012; Cryan & Dinan, 2012). Por ejemplo, las concentraciones circulantes de triptófano, el precursor de aminoácidos de la molécula de señalización 5-HT, parecen estar bajo la influencia de la microbiota intestinal (Clarke *et al.*, 2014). El 5-HT es un neurotransmisor clave en el eje intestino-cerebro, tanto a nivel de SNE (Mawe & Hoffman, 2013) como en el SNC (Ruddick *et al.*, 2006). Además, su repertorio fisiológico es extenso con una distribución generalizada de receptores y se extiende a la función cardiovascular, incluida la regulación de la presión arterial (Watts, Morrison, Davis & Barman, 2012), el control de la vejiga y la agregación plaquetaria (Watts *et al.*, 2012).

Los estudios en animales GF indican que la disponibilidad periférica de triptófano en la circulación, crítica para la síntesis de 5-HT del SNC, está regulada por la microbiota intestinal, y estas concentraciones elevadas de triptófano en plasma pueden normalizarse después de la colonización intestinal de los animales GF (Clarke *et al.*, 2013). Por ejemplo, el aumento de triptófano es posible tras la administración del probiótico *Bifidobacterium infantis* (Desbonnet, Garrett, Clarke, Bienenstock & Dinan, 2008). Aún no está claro el mecanismo que sustenta la regulación de las concentraciones circulantes de triptófano por las bacterias en nuestro intestino, pero puede implicar el control sobre la degradación del triptófano junto con una ruta metabólica alternativa y fisiológicamente dominante: la vía de la kinurenina (Schwarcz, Bruno, Muchowski & Wu, 2012; Stone, Stoy & Darlington, 2013). También ciertas bacterias son capaces de biosintetizar el triptófano a través de enzimas como la triptófano sintasa (Raboni, Bettati & Mozzarelli, 2009; Yanofsky,

2007) mientras que algunas cepas bacterianas también son competentes en la producción de serotonina a partir de triptófano, al menos *in vitro* (Jiménez *et al.*, 2013; Lyte, 2011; Shishov, Kirovskaya, Kudrin & Oleskin, 2009).

No solo la microbiota intestinal tiene capacidad para influir en el cerebro, sino que también tiene capacidad para responder potencialmente a las secreciones hormonales del huésped. Por ejemplo, las elevaciones en las concentraciones de noradrenalina después del estrés agudo pueden estimular el crecimiento de *Escherichia coli* comensal no patógena (Freestone *et al.*, 2002), así como otras bacterias Gram-negativas (Lyte & Ernst, 1992). Además, estudios preclínicos sugieren la presencia de microorganismos con la capacidad de influir en trastornos psiquiátricos como la depresión y la ansiedad (Dinan & Cryan, 2013; Park *et al.*, 2013). Claramente, la conversación entre el huésped y el microbioma intestinal es compleja, y no debemos considerar la contribución de ninguno de los dos de forma aislada.

Para entender mejor el microbioma intestinal, es importante conocer su distribución dentro del intestino. Varios factores influyen en esta distribución, como la dieta, los antimicrobianos, el mucus, la adherencia y el sistema inmunitario del huésped (Donaldson *et al.*, 2016).

En cuanto a la dieta, es probable que el metabolismo bacteriano en el intestino contribuya a la localización de grupos particulares de microorganismos. Los ácidos grasos y los carbohidratos simples de los alimentos se absorben y agotan durante el tránsito a través del intestino delgado, por lo que es necesaria la fermentación de polisacáridos complejos para mantener el ecosistema bacteriano del intestino. Son estos polisacáridos derivados de la dieta los que controlan la composición de la comunidad microbiana en la luz del colon (Donaldson *et al.*, 2016). Un estudio en humanos, basado en cambios entre dietas de origen vegetal y animal, mostró que el microbioma cambia abruptamente con la dieta (David *et al.*, 2014); sin embargo, este efecto es reversible, por lo tanto estos cambios son adaptaciones transitorias del ecosistema mediante el desarrollo de especies concretas en el lumen, mientras que el reservorio bacteriano de la mucosa permanece sin cambios.

A diferencia de las condiciones variables en lumen intestinal, los mamíferos mantienen un equilibrio de nutrientes más consistente en la mucosa, que sirve como un factor de selección positivo estable para ciertas especies de bacterias. La degradación del mucus y el metabolismo por microorganismos intestinales proporciona acceso a nichos espaciales privilegiados y, por lo tanto, una ventaja competitiva sobre otras especies (Donaldson *et al.*, 2016). Por ejemplo, varios estudios han demostrado que la capacidad de crecer en un cultivo de mucina *in vitro* generalmente predice la capacidad de una especie bacteriana de colonizar el intestino del ratón (Gries, Pultz & Donskey, 2005; Wadolkowski, Laux & Cohen, 1988).

Con respecto a los antimicrobianos, son secretados en el intestino delgado por las células de Paneth, localizadas en la base de las criptas, y su presencia restringe el crecimiento de las bacterias presentes cerca de la superficie de la mucosa intestinal (Bevins & Salzman, 2011). La mayoría de estos antimicrobianos son péptidos que interactúan y alteran las membranas bacterianas cargadas negativamente. Como se mencionó anteriormente, la concentración de antimicrobianos es mayor en el tramo proximal del intestino delgado, lo que crea un gradiente de antimicrobianos que permite una mayor diversidad y carga bacteriana en el extremo distal del intestino delgado. Además de estos antimicrobianos, las bacterias intestinales deben lidiar con especies reactivas del oxígeno producidas por el metabolismo aerobio del huésped, pues la mayoría de bacterias intestinales son anaerobias. Este oxígeno secretado por el tejido del huésped se diluye rápidamente generando un gradiente que disminuye de concentración desde el tejido hacia el lumen. En consecuencia, las bacterias de la mucosa intestinal están enriquecidas en genes necesarios para la resistencia de especies reactivas del oxígeno (Donaldson *et al.*, 2016).

Con relación al moco intestinal, para acceder al epitelio, tanto los patógenos como los comensales deben lidiar con la barrera del moco y el sistema inmune. La sustancia MUC2 secretada por el epitelio forma una sustancia viscosa similar al gel (Johansson *et al.*, 2011), lo que constituye la principal barrera para que la microbiota se asocie al tejido (Pelaseyed *et al.*, 2014). Sin embargo, ciertas bacterias pueden penetrar el moco

nadando o nutriéndose a través de él. Por ejemplo, el patógeno entérico *Salmonella enterica* subsp. *enterica* depende de los flagelos y la quimiotaxis para penetrar la capa de moco y llegar al tejido huésped (Stecher *et al.*, 2004). Otro mecanismo para abrirse camino a través del moco es su degradación por peptidasas: una familia de peptidasas tipo M60 que degradan el moco se conservan en patógenos y bacterias comensales de la mucosa pertenecientes a *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y otros filos (Nakjang, Ndeh, Wipat, Bolam & Hirt, 2012).

Además de la capacidad para penetrar la capa del moco, la adhesión bacteriana al epitelio también influye en la composición microbiana del intestino, sobretodo en el intestino delgado (Donaldson *et al.*, 2016). Los mecanismos moleculares implicados en la unión de microorganismos al tejido del huésped han sido bien estudiados en patógenos (Sansonetti, 2004), sin embargo también se han encontrado en muchas especies comensales. Las bacterias se adhieren al moco y a las superficies epiteliales mediante el despliegue de proteínas de la membrana externa, cápsulas, lectinas, adhesinas y fimbrias (Donaldson *et al.*, 2016). Por ejemplo, *E. coli* posee una gran cantidad de lectinas que le permiten unirse a las mucinas y a otras glucoproteínas y componentes de la matriz extracelular de las células epiteliales (Mouricout, 1997).

Los microorganismos beneficiosos también se adhieren a regiones particulares del epitelio y pueden servir para excluir a los patógenos adherentes al ocupar sitios de unión limitados: los primeros estudios de imagen revelaron que *Lactobacillus* spp., que forma capas adherentes al epitelio del estómago de la rata, previene la adhesión de levaduras (Savage, 1969) y estafilococos (Morotomi *et al.*, 1975) al epitelio. Miembros de la familia *Lactobacillaceae* (como *Lactobacillus*) que colonizan el intestino delgado y el estómago se han convertido en sistemas modelo para estudiar la adhesión por comensales, y se ha descubierto que los exopolisacáridos, pili y proteínas ancladas a la pared celular están involucrados en la interacción con el moco, con proteínas de la matriz extracelular y con otros dianas moleculares en la superficie de las células epiteliales (Sengupta *et al.*, 2013).

Por último, para persistir en el intestino, el sistema inmunitario debe tolerar las bacterias no patógenas que se asocian íntimamente con el tejido del huésped (Donaldson *et al.*, 2016). La mucosa está inundada con grandes cantidades de sIgA, que interactúa con la microbiota: muchas bacterias en el intestino están cubiertas de sIgA (Kubinak *et al.*, 2015). La unión de sIgA a bacterias comensales puede contribuir a la formación de biopelículas en la mucosa, que sirve como barrera para la adherencia del patógeno (Mathias & Corthésy, 2011). Los ejemplos de cómo el sistema inmunitario puede distinguir de manera confiable entre microorganismos dañinos y beneficiosos siguen siendo limitados. Uno de ellos es el caso de *B. fragilis*, que a través de un componente de su cápsula, el polisacárido A (PSA), induce un perfil inmune antiinflamatorio que facilita su propia colonización (Round *et al.*, 2011; Round & Mazmanian, 2010). Varias señales inespecíficas en el intestino también promueven la tolerancia hacia los microorganismos beneficiosos. Los ácidos grasos de cadena corta como el butirato, el propionato y el acetato son los productos finales de la fermentación anaeróbica de azúcares, que es el metabolismo dominante en el colon. Estas moléculas estimulan el desarrollo de las células T reguladoras, por lo que esta podría ser una forma más general para que el sistema inmunitario reconozca las bacterias beneficiosas (Arpaia *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2013).

Los desafíos ambientales que pueden ocurrir en el intestino, como las perturbaciones de la dieta, el consumo de antibióticos o las anomalías en la motilidad gastrointestinal, alteran masivamente la comunidad de microorganismos del lumen, y la disminución de especies beneficiosas podría ser catastrófica sin un mecanismo para reponer la comunidad. Las regiones protegidas y por lo tanto menos sensibles a los cambios en las condiciones del intestino, como las criptas de la mucosa, pueden servir como reservorios de microorganismos para repoblar el lumen intestinal después de una perturbación ambiental (Figura 5) (Donaldson *et al.*, 2016). Por ejemplo, en el caso de *B. fragilis*, los mutantes que no pueden colonizar las criptas del colon son menos resistentes a las perturbaciones intestinales, como el tratamiento con antibióticos y la infección entérica (Lee *et al.*, 2013).

Se ha propuesto que el apéndice humano también cumple esta función de reservorio bacteriano, ya que contiene un lumen lleno de moco y bacterias y está protegido de la corriente fecal (Lee *et al.*, 2013). El apéndice está también ampliamente extendido filogenéticamente y evolucionó de forma independiente al menos dos veces, lo que proporciona una fuerte evidencia de que esta no es una estructura vestigial como se creía (Lee *et al.*, 2013). Por ejemplo, en el apéndice del conejo las bacterias coordinan la inducción de las células B y las células T, lo que sugiere que estos nichos asociados con los tejidos son lugares para la inmunomodulación (Hanson & Lanning, 2008). Por lo tanto, los microhábitats en el intestino, como las criptas de la mucosa y el apéndice, es muy probable que contribuyan al desarrollo y la estabilidad de las comunidades microbianas.

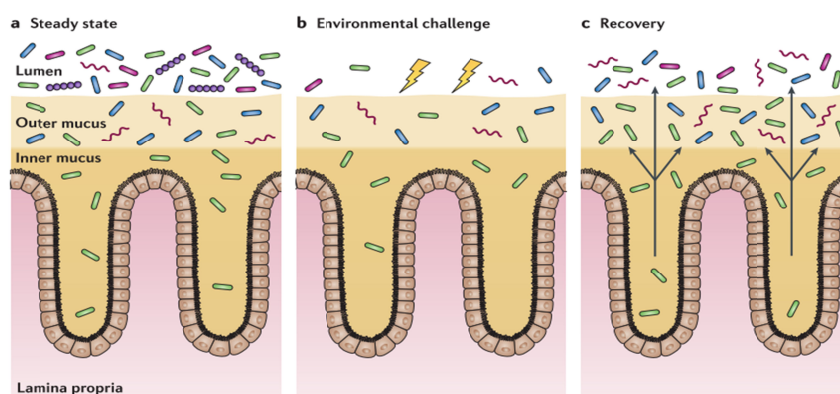


Figura 5. Microhábitats intestinales como reservorios de diversidad bacteriana. Fuente: Donaldson *et al.* (2016)

La disbiosis es una desviación de una comunidad microbiana normal, como un desequilibrio en la abundancia o localización de microorganismos. Los efectos adversos de la disbiosis en la salud del huésped se han estudiado durante mucho tiempo, aumentando la evidencia clínica que vincula la disbiosis con diversos trastornos inmunes, metabólicos y neurológicos en los sitios intestinales y extra intestinales (Donaldson *et al.*, 2016). Por ejemplo, la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) se asocia con cambios en la microbiota intestinal, caracterizada por una disminución de la abundancia de Clostridia (Gophna *et al.*, 2006; Manichanh *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 2011) y una reducción general de la diversidad bacteriana

(Manichanh *et al.*, 2006; Ott *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2011). Otro ejemplo es la obesidad, en cuyo caso la microbiota se caracteriza por una diversidad microbiana reducida y, en algunos estudios, un aumento de la relación Firmicutes/Bacteroidetes (Ley, Turnbaugh, Klein & Gordon, 2006). Además, en los últimos años se ha estudiado en modelos animales y humanos el papel de la disbiosis intestinal en la patogénesis de las enfermedades hepáticas crónicas (Garcovich, Zocco, Roccarina, Ponziani & Gasbarrini, 2012; Henao-Mejia *et al.*, 2012), el cáncer colorrectal (Wu *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2013) e incluso las disfunciones neuropsiquiátricas (Collins *et al.*, 2012). A continuación, se detalla el ejemplo de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) que muestra la importancia de las alteraciones en la microbiogeografía de la microbiota intestinal durante la enfermedad.

La EII se caracteriza por la inflamación del tracto gastrointestinal, que produce dolor, vómitos, diarrea y otras complicaciones, como pérdida de peso severa y cambios de comportamiento. En general, la EII se clasifica en dos síndromes: enfermedad de Crohn, que puede implicar inflamación en todo el tracto gastrointestinal (boca a ano); y colitis ulcerosa, en la cual la patología está restringida al intestino grueso (Donaldson *et al.*, 2016). Durante más de una década, los estudios han intentado definir un patrón de disbiosis asociado con la EII (Petersen & Round, 2014). Los estudios en humanos basados en muestras de biopsia muestran que, en comparación con los controles, los pacientes con EII tenían una mayor concentración de bacterias en la superficie de la mucosa (Swidsinski *et al.*, 2002), una disminución de la diversidad microbiana (Ott *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2011), una disminución de la abundancia de *Clostridium* spp. (Gophna *et al.*, 2006) y un mayor número de *Enterobacteriaceae* (especialmente *E. coli* invasiva adherente) en su mucosa del íleon (Baumgart *et al.*, 2007).

La manipulación deliberada de la microbiota intestinal es una estrategia terapéutica atractiva y podría considerarse una opción viable para tratar enfermedades psiquiátricas relacionadas con el estrés, así como disfunción metabólica y trastornos alimentarios (Clarke *et al.*, 2014). Ciertamente, parece que la microbiota intestinal es muy maleable, y la composición puede alterarse rápidamente cuando se cambia la

dieta. Por ejemplo, Turnbaugh *et al.* (2014) mostraron que cambiar de una dieta baja en grasas y rica en polisacáridos a una dieta alta en grasas y azúcar cambió la estructura de la microbiota en un solo día y cambió la representación de las vías metabólicas en el microbioma intestinal.

Los probióticos también han mostrado utilidad en el tratamiento de algunas características del SII (Clarke, Cryan, Dinan & Quigley, 2012) y cuentan con un perfil de seguridad favorable (Shanahan, 2012). Los prebióticos también pueden modular la producción hormonal y también se han considerado en el tratamiento de los trastornos gastrointestinales (Guarner *et al.*, 2012; Quigley, 2012). Los trasplantes de microbiota fecal actualmente atraen mucha atención para el tratamiento de infecciones recurrentes por *Clostridium difficile*, y este enfoque también puede filtrarse en el tratamiento de otros trastornos (Borody & Khoruts, 2012; Kelly, 2013; Smits, Bouter, De Vos, Borody & Nieuwdorp, 2013).

En conclusión, la microbiota intestinal está estratificada biogeográficamente dentro del intestino, este presenta ubicaciones protegidas y estables que actúan de reservorio de microorganismos, como las criptas de la mucosa o el ciego, que permiten a la microbiota persistir ante condiciones adversas en el lumen intestinal. Además, el sistema inmunitario tiene un papel activo al permitir que solo las especies beneficiosas accedan a estos microhábitats durante la homeostasis. Por lo tanto, el huésped mantiene la estabilidad de una comunidad diversa de simbiontes microbianos (Donaldson *et al.*, 2016).

En cuanto a su función, la microbiota tiene la capacidad de producir una amplia gama de compuestos que juegan un papel importante en la regulación de la actividad de órganos distales, incluido el cerebro, así como en la regulación de la actividad metabólica a través de la glucosa y la regulación del peso, ya que hay determinados microorganismos, por ejemplo, que aumentan el riesgo de diabetes mellitus y obesidad.

Asimismo, se ha establecido una función para la microbiota en la regulación del sistema serotoninérgico a través de la modulación de la disponibilidad de triptófano. A diferencia de otros órganos endocrinos, la microbiota tiene una plasticidad intensa y puede alterarse dramática y rápidamente en respuesta a la dieta. Con una mayor comprensión de los genes clave de la microbiota involucrados en la regulación endocrina, es posible utilizar probióticos u otros medios moduladores para tratar o prevenir patologías (Clarke *et al.*, 2014).

4. NUEVAS HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE LOS PROBIÓTICOS

En los últimos años, el desarrollo y la financiación de una mayor cantidad de grandes proyectos de secuenciación (como el Proyecto Genoma Humano, http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml) ha llevado al aumento y mejora de nuevas tecnologías para la obtención de información a gran escala en los campos de la Biología y la Bioinformática. Los avances logrados en estas áreas han provocado un nuevo paradigma en la investigación biológica que propone una visión global de los procesos biológicos; este concepto se refleja en el surgimiento de la "Era Ómica" (Mozzi, Ortiz, Bleckwedel, De Vuyst & Pescuma, 2013).

“Omics” deriva de la voz latina -omne que significa “todo, totalidad, todo”. Este neologismo en realidad se usa como sufijo para referirse a aquellas disciplinas como Genómica, Proteómica, Transcriptómica y Metabolómica, que estudian un determinado conjunto de moléculas de manera global -genes, proteínas, transcripciones o metabolitos, respectivamente- o incluso buscan definir las relaciones entre ellos. Las ciencias “ómicas” se basan en el análisis de un gran volumen de información y utilizan la bioinformática para la interpretación de datos. La integración de los datos analizados genera grandes aportes al conocimiento de la versatilidad y funcionalidad de las células y sus aplicaciones biotecnológicas (Mozzi *et al.*, 2013).

Múltiples estudios ómicos están proporcionando una mejor plataforma para la optimización de cepas probióticas, que son beneficiosas para las industrias de alimentos y suplementos en términos de especificidad, precisión y sensibilidad (Isaac *et al.*, 2019). En esta época revolucionaria, la biología de sistemas juega un gran papel en enrollar los enormes datos proporcionados por diferentes experimentos ómicos como proteómica, metabolómica, transcriptómica y genómica con la ayuda de diversas herramientas matemáticas y computacionales para la ingeniería microbiana y su uso en probióticos (Yadav & Shukla, 2019). Las técnicas analíticas avanzadas que se encuentran dentro de las tecnologías "ómicas" e incluyen metagenómica,

metatranscriptómica, (meta) proteómica y metabolómica se muestran en la Figura 6 (Day, Harper, Woods, Davies & Heaney, 2019).

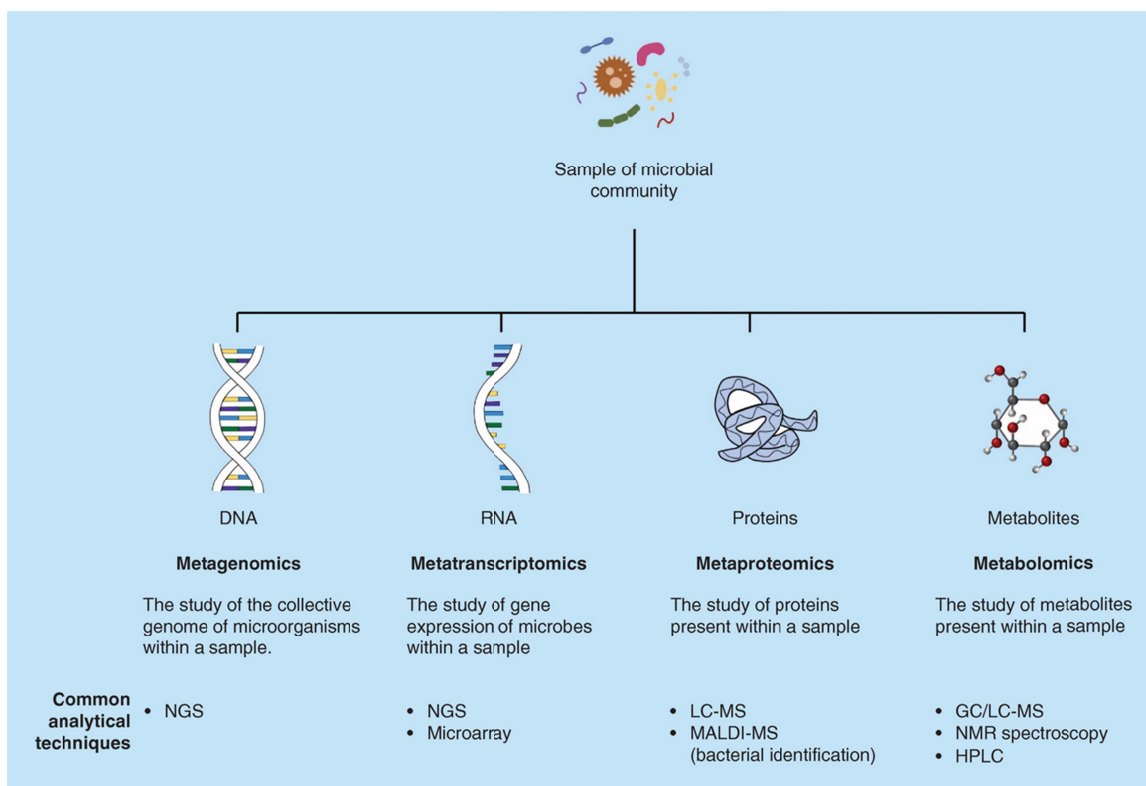


Figura 6. Las diferentes técnicas ómicas. Fuente: Day, Harper, Woods, Davies & Heaney (2019)

4.1. Genómica

La metagenómica nos permite investigar la composición de una comunidad microbiana. Los estudios genómicos consideran el material genético de un organismo específico, mientras que la metagenómica (meta-significado más allá) se refiere a estudios del material genético de comunidades enteras de organismos. Este proceso generalmente implica la secuenciación de nueva generación (NGS) después de que se extrae el ADN de las muestras. NGS produce un gran volumen de datos en forma de lecturas breves, a partir de las cuales se puede reconstruir un perfil de comunidad microbiana u otra información, al igual que se recopila información de las piezas de un rompecabezas (Aguiar-Pulido *et al.*, 2016).

Se ha desarrollado una variedad de herramientas y canales de análisis para analizar datos metagenómicos (Kim *et al.*, 2013), entornos de resolución de problemas (PSE)

(Gallopoulos *et al.*, 1994) que proporcionan bancos de trabajo fáciles de usar para desarrollar canales de análisis científicos flexibles utilizando un menú de herramientas disponibles. Estos bancos de trabajo incorporan diferentes rangos de generalidad. Por ejemplo, QIIME (Caporaso *et al.*, 2010) proporciona un conjunto de scripts integradores para analizar muestras de ADN microbiano en bruto, incluida la clasificación taxonómica utilizando genes marcadores, como el ARNr 16S, pero permite la construcción de conductos flexibles. Pathoscope (Hong *et al.*, 2014) proporciona una canalización que puede identificar cepas bacterianas presentes en una serie de secuencias sin procesar y generar informes de estadísticas, como porcentajes, ubicaciones de genes y productos proteicos.

La secuenciación del ADN de la comunidad microbiana total (metagenómica), ha proporcionado información sobre los genes presentes en los ecosistemas microbianos (Barberán, Fernández-Guerra, Bohannan & Casamayor, 2012; Knief *et al.*, 2012; Xu, Hansen, Hansen, Jacquiod & Sørensen, 2014). La información metagenómica puede permitir la identificación de genes o rutas genéticas asociadas con funciones específicas y, por lo tanto, puede proporcionar información útil sobre las capacidades funcionales potenciales de las comunidades microbianas. Por ejemplo, los enfoques metagenómicos en sistemas sinbióticos marinos han revelado algunas de las capacidades de los simbiontes bacterianos que son importantes para la interacción con sus huéspedes, como los genes implicados en la disponibilidad de nutrientes y el reciclaje de los productos de desecho del huésped (Grzymiski *et al.*, 2008; Woyke *et al.*, 2006).

Debido a la gran diversidad de comunidades bacterianas intestinales, hubo confusión entre la microbiota intestinal y su estado de salud. Las nuevas técnicas de ADN basadas en la secuenciación del gen ARNr 16S han mejorado enormemente nuestro conocimiento de la microbiota intestinal (Vinusha, Deepika, Johnson, Agrawal & Rakwal, 2018). Los análisis comparativos de secuencias genómicas han llevado a enfoques metagenómicos que han ofrecido nuevos conocimientos sobre la diversidad genética de este ecosistema. Sin embargo, los datos genéticos por sí mismos

no ayudan a dilucidar las funciones de las comunidades microbianas en este ecosistema. La funcionalidad microbiana se puede caracterizar mediante el análisis de transcripciones de ARNm (es decir, transcriptómica) o análisis de proteínas (es decir, proteómica). Durante la última década, el progreso en el análisis de proteínas ha estimulado el interés en los análisis proteómicos. Dado que las proteínas están implicadas en los procesos de biotransformación, los análisis de proteomas constituyen una forma adecuada de caracterizar la dinámica de las funciones microbianas. Utilizados tradicionalmente para el estudio de cultivos puros, los análisis proteómicos ahora se están aplicando para detectar perfiles de expresión y proporcionar información funcional directamente a partir de muestras ambientales microbianas mixtas (metaproteómica).

A pesar del número limitado de investigaciones sobre la microbiota intestinal, estos enfoques ya han demostrado su potencial para proporcionar conocimientos funcionales. Por lo tanto, los enfoques metaproteómicos pueden convertirse en una herramienta útil para monitorear los productos funcionales de la microbiota intestinal en relación con las intervenciones dietéticas, la duración de la vida, la salud y las enfermedades.

Los probióticos se han utilizado para prevenir varias enfermedades y ahora existe un interés creciente en su uso. Sin embargo, todavía se debate su eficacia real en términos de beneficios para la salud. Es necesario avanzar en el conocimiento básico de las cepas probióticas, en la selección de cepas y en la comprensión de sus mecanismos de acción para dar credibilidad a las declaraciones de propiedades saludables de los probióticos. En este sentido, los análisis proteómicos de posibles cepas de probióticos, así como los análisis metaproteómicos de muestras fecales o intestinales a lo largo de los estudios clínicos, pueden proporcionar información útil sobre los posibles beneficios de la suplementación con probióticos (Vinusha *et al.*, 2018).

4.2. Transcriptómica

Los enfoques genómicos tradicionales describieron previamente el perfil del ADN acumulativo total presente en una muestra. Esto, sin embargo, nos dice poco sobre los factores epigenéticos, como qué genes se expresan, cuáles se suprimen y en qué proporciones. Para responder a estas preguntas, podemos aplicar la metatranscriptómica. Este enfoque analiza la expresión de ARNm en el microbioma a través de la secuenciación de alto rendimiento de meta-ADNc (Gosalbes *et al.*, 2011). Por lo tanto, la metatranscriptómica es el análisis de los perfiles de expresión de ARNm en una comunidad y es relevante para identificar genes o vías genéticas que están reguladas hacia arriba o hacia abajo en respuesta a la infección por patógenos (Rebollar *et al.*, 2016).

Al centrarse en los genes que expresa toda la comunidad microbiana, la metatranscriptómica arroja luz sobre el perfil funcional activo de una comunidad microbiana (Moran, 2009). El metatranscriptoma proporciona una instantánea de la expresión génica en una muestra determinada en un momento dado y en condiciones específicas al capturar el ARNm total. Los estudios pioneros que tienen como objetivo identificar genes expresados en muestras ambientales representan el comienzo de la metatranscriptómica. Sin embargo, estos se limitaron a un grupo relativamente estrecho de genes. En cuanto a la metagenómica, ahora es posible realizar una secuenciación completa de metatranscriptómica. Esta expresión de (meta)genoma completo proporciona la expresión y el perfil funcional de un microbioma (Carvalhais, Dennis, Tyson & Schenk, 2012; Frias-Lopez *et al.*, 2008; Gilbert *et al.*, 2008).

Al analizar específicamente los genes que se expresan activamente en el microbioma, es posible compilar una imagen funcional de la actividad metagenómica. En consecuencia, esta forma de análisis puede proporcionar información adjunta a los datos metagenómicos existentes y lo convierte en una herramienta poderosa para distinguir los cambios dinámicos en la expresión génica que resultan de factores ambientales que impactan en el microbioma, como los cambios en la dieta (Franzosa *et al.*, 2014). Además, los resultados de los análisis metatranscriptómicos tienen la

capacidad de distinguir los desarrollos coevolutivos, que son importantes para mejorar nuestra comprensión de la relación simbiótica entre el microbioma y el huésped (Aguiar-Pulido *et al.*, 2016). La transcriptómica también puede desentrañar las respuestas funcionales implicadas en las interacciones bacteriano-huésped, como la expresión de genes de adhesina o rasgos adicionales asociados con la colonización bacteriana y la unión a huéspedes eucariotas (Chagnot, Zorgani, Astruc & Desvaux, 2013; Dale & Moran, 2006; Klemm & Schembri, 2000; Kline, Fälker, Dahlberg, Normark & Henriques-Normark, 2009).

Gosalbes *et al.* (2011) analizaron la microbiota intestinal funcional humana mediante un enfoque metatranscriptómico. Estos autores realizaron un estudio metatranscriptómico en diez voluntarios sanos para dilucidar los miembros activos del microbioma intestinal y su funcionalidad en condiciones de salud. Primero, los ADNc microbianos obtenidos de cada muestra se secuenciaron usando la tecnología 454. El análisis de las transcripciones del ARNr 16S mostró la estructura filogenética de la comunidad microbiana activa. *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* y *Rickenellaceae* fueron las familias predominantes detectadas en la microbiota activa. La caracterización de los ARNm reveló un patrón funcional uniforme en individuos sanos. Las principales funciones de la microbiota intestinal fueron el metabolismo de los carbohidratos, la producción de energía y la síntesis de componentes celulares. Por el contrario, las actividades de mantenimiento como el metabolismo de aminoácidos y lípidos estaban sub-representadas en el metatranscriptoma. Estos resultados proporcionaron nuevos conocimientos sobre la funcionalidad de la microbiota intestinal compleja en individuos sanos (Gosalbes *et al.*, 2011).

En cuanto al análisis de la transcriptómica, cuando se procesan las lecturas, una canalización típica de análisis de metatranscriptómica (1) mapeará las lecturas a un genoma de referencia o (2) realizará el ensamblaje de *novο* de las lecturas en contigs y supercontigs de transcripción. La primera estrategia, de manera similar a los métodos basados en alineación en WMS, asigna lecturas a bases de datos de referencia,

reuniendo así información para inferir la expresión relativa de genes individuales. La segunda estrategia infiere lo mismo, pero con secuencias ensambladas. La primera estrategia está limitada por la información en la base de datos de genomas de referencia. La segunda estrategia está limitada por la capacidad de los programas de software para ensamblar contigs y supercontigs correctamente a partir de datos de lecturas cortas (Aguiar-Pulido *et al.*, 2016).

La aplicación de la metatranscriptómica al estudio del microbioma es mucho menos común en comparación con otras ómicas revisadas en esta tesis. La mayoría de los canales de análisis descritos en la literatura se construyeron *ad hoc*. La mayoría de estos métodos siguen la primera estrategia antes mencionada basada en el mapeo de lectura (Duran-Pinedo *et al.*, 2014; Jorth *et al.*, 2014; Leimena *et al.*, 2013; Xiong *et al.*, 2012; Yost, Duran-Pinedo, Teles, Krishnan & Frias-Lopez, 2015). En este caso, las lecturas metatranscriptómicas generalmente se asignan a bases de datos especializadas (generalmente descargadas del NCBI) utilizando herramientas de alineación, como Bowtie2, BWA y BLAST. Luego, los resultados se anotan utilizando recursos, como GO, KEGG, COG y Swiss-Prot. Finalmente, se llevan a cabo diferentes tipos de análisis posteriores según el objetivo del estudio (por ejemplo, análisis filogenético basado en PCA o análisis de enriquecimiento). Las últimas técnicas de metatranscriptómica incluyen el sondeo de isótopos estables (SIP), que se ha utilizado para recuperar transcriptomas específicos de microbios aeróbicos en el sedimento del lago (Dumont, Pommerenke & Casper, 2013). Esto no solo ayuda a apuntar a organismos específicos, sino que también contribuye significativamente a los estudios de metabolómica.

La segunda estrategia requiere ensamblar lecturas metatranscriptómicas en fragmentos más largos llamados contigs. Para ello, se encuentran disponibles numerosos paquetes de software. Celaj *et al.* (2014) compararon ensambladores de secuencias *de novo* con herramientas de mapeo basadas en referencias. Las herramientas incluían Trinity (Grabherr *et al.*, 2011), MetaVelvet (Namiki, Hachiya, Tanaka & Sakakibara, 2012), Oases (Schulz, Zerbino, Vingron & Birney, 2012), AbySS,

Trans-Abyss y SOAPden-ovo (Birol *et al.*, 2009; R. Li *et al.*, 2010; Robertson *et al.*, 2010), así como herramientas como Scripture y Cufflinks (Guttman *et al.*, 2010; Trapnell *et al.*, 2010). Se encontró que en comparación con otras herramientas, Trinity no solo superó a todas ellas, sino que también pareció estar mejor ajustada para la sensibilidad en la gama más amplia de niveles de expresión. Esto fue particularmente notable en la reconstrucción de transcripciones dentro de los quintiles de expresión más altos, en los que otras estrategias *de novo* no funcionaron bien (Grabherr *et al.*, 2011). Li y Dewey (2011) desarrollaron RNA-Seq por Expectation-Maximization (RSEM), un proceso cuantitativo para el análisis transcriptómico que actualmente se proporciona como software independiente o como complemento dentro de Trinity. RSEM toma como entrada un transcriptoma o ensamblaje de referencia (muy probablemente obtenido a través de Trinity) junto con las lecturas de RNA-Seq generadas a partir de la muestra y calcula la abundancia de transcripción normalizada (es decir, el número de lecturas de RNA-Seq correspondientes a cada transcriptoma o ensamblaje de referencia) (De Bona, Ossowski, Schneeberger & Räscht, 2008; Haas *et al.*, 2013). Aunque tanto Trinity como RSEM fueron diseñados para conjuntos de datos transcriptómicos (es decir, obtenidos de un solo organismo), es posible aplicarlos a datos metatranscriptómicos (es decir, obtenidos de una comunidad microbiana completa). MEGAN anota los resultados con GO para realizar análisis de enriquecimiento (Cao *et al.*, 2015).

Aunque las técnicas metatranscriptómicas actuales son prometedoras, todavía existen varios obstáculos que limitan su aplicación a gran escala. Primero, gran parte del ARN recolectado proviene del ARN ribosómico, y su abundancia dominante puede reducir drásticamente la cobertura del ARNm, que es el foco principal de los estudios transcriptómicos. Se han realizado algunos esfuerzos para eliminar eficazmente el ARNr (Peano *et al.*, 2013). En segundo lugar, el ARNm es notoriamente inestable y compromete la integridad de la muestra antes de la secuenciación. En tercer lugar, diferenciar entre el ARN del huésped y el microbiano puede ser un desafío, aunque se encuentran disponibles kits comerciales de

enriquecimiento. Esto también puede hacerse *in silico* si un genoma de referencia está disponible para el huésped, como en el trabajo de Pérez-Losada *et al.* (2015) quienes consideran el impacto de las interacciones huésped-patógeno en el microbioma de las vías respiratorias humanas. Por último, las bases de datos de referencia de transcriptomas tienen una cobertura limitada (Aguiar-Pulido *et al.*, 2016).

4.3. Proteómica

En la investigación de la biología molecular de los probióticos, una técnica importante es la proteómica. La proteómica, inicialmente definida por los microbiólogos como el estudio de todas las proteínas expresadas por un solo organismo, está en plena emergencia gracias a su aplicación a comunidades bacterianas complejas. Como resultado, el análisis del contenido de proteínas de las comunidades microbianas, como la microbiota intestinal, ahora se denomina "metaproteómica" (Schneider & Riedel, 2010). La proteómica ayuda a comprender el funcionamiento biológico de una célula; nos proporciona un breve conocimiento de la expresión de proteínas y la función de las modificaciones postraduccionales.

La investigación proteómica de las BAL es relativamente reciente. La proteómica de las BAL se ha utilizado: i) para mapear el proteoma de una bacteria, que es una descripción general del contenido de proteína bacteriana, ii) para estudiar y comprender la adaptación de las condiciones intestinales como el pH bajo y los ácidos biliares y diversas condiciones de estrés, iii) para estudiar proteínas localizadas en la superficie celular, y iv) como una herramienta para responder preguntas especiales sobre la biología molecular de las bacterias (Vinusha *et al.*, 2018). La proteómica de las BAL ofrece el mapa de proteomas de las bacterias, lo que confiere la idea general del contenido de proteínas en bacterias (Yadav & Shukla, 2019). Esto ayudará a comprender la adaptación del intestino microbiano en condiciones adversas como el pH bajo y la presencia de ácidos biliares, y a estudiar la localización de proteínas en la superficie o dentro de la célula (Vinusha *et al.*, 2018).

Un análisis metaproteómico generalmente comprende 4 pasos: 1) extracción y purificación de proteínas, 2) digestión enzimática de proteínas en péptidos, 3) separación de péptidos, generalmente por cromatografía, seguida de análisis espectrométrico de masas e 4) identificación de proteínas por comparación con secuencias de base de datos (Kolmeder & de Vos, 2014; Petriz & Franco, 2017).

En la última década, la proteómica se ha utilizado para estudiar las respuestas fisiológicas bacterianas a diferentes factores estresantes; esto ha progresado significativamente con la disponibilidad de secuencias de genoma completo, el progreso en espectrometría de masas y bioinformática. La proteómica, como clave en la era posgenómica, proporciona datos útiles para identificar nuevos marcadores de diagnóstico y dianas terapéuticas en enfermedades (Casado Muñoz, Benomar, Ennahar, *et al.*, 2016). Recientemente, los análisis genómicos y proteómicos del género *Lactobacillus* se han expandido rápidamente, especialmente con *Lactiplantibacillus pentosus* (anteriormente *Lactobacillus pentosus*) que tiene uno de los genomas más grandes conocidos entre las BAL (Abriouel, Benomar, Pulido, Cañamero & Gálvez, 2011; Maldonado-Barragán *et al.*, 2011); sin embargo, se sabe poco sobre los mecanismos adoptados por *L. pentosus* para tolerar o resistir varios factores estresantes. Esta información debería ser motivo de gran preocupación, ya que el conocimiento de estos mecanismos podría aprovecharse para mejorar la funcionalidad de las cepas probióticas y, por tanto, sus beneficios para la salud (Casado Muñoz, Benomar, Ennahar, *et al.*, 2016a).

Inicialmente, los estudios de proteómica dependían de la electroforesis unidimensional (1D) para generar las huellas dactilares de las proteínas, y el inconveniente de esta técnica es que no es capaz de reconocer las proteínas individuales (Aires & Butel, 2011). Después de eso, se utilizó la tecnología proteómica basada en electroforesis en gel bidimensional (2-D); en este, según el punto isoeléctrico, las proteínas se separan. El mapeo de proteínas en el gel 2-D es el inicio de los estudios de proteomas, y esto ayudará en más estudios de proteómica. El mapeo general del proteoma 2-D se lleva a cabo para las cepas probióticas *Lactobacillus casei*

Zhang, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* 299 V (Hamon *et al.*, 2011; Lee, Lee & Choi, 2008; Wu *et al.*, 2009). Las interacciones de una sola cepa en cocultivo se han representado mediante proteómica y también describen cambios en las proteínas asociadas a la superficie.

El estudio del proteoma de *Lactobacillus casei* Zhang para representar una respuesta de pH bajo se puede realizar mediante DIGE (electroforesis diferencial "en gel"). DIGE se utiliza para estudiar las acidemias orgánicas y principalmente la acidemia metilmalónica (MMA) (Imperlini *et al.*, 2016). Esta técnica también permite detectar diferencias en la abundancia de proteínas en la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG cultivada en medios de tipo industrial o de laboratorio en etapas variables de la fase de crecimiento. En el siguiente nivel del estudio de proteómica, los procedimientos utilizados son sin gel o de perfiles de masas, como la separación en cromatografía líquida (LC) y la identificación de proteínas se realiza mediante espectrometría de masas (MS) o mediante desorción/ionización láser asistida por matriz MALDI-TOF (Choi *et al.*, 2019).

El mapa de proteomas de bacterias probióticas facilita el estudio de sus respuestas al estrés, tolerancia al estrés, comparación de cepas y fases de crecimiento. Esto también se utiliza para la diferenciación y caracterización entre los trastornos congénitos de la glicosilación (CDG) utilizando desorción/ionización láser mejorada en la superficie (SELDI-TOF-MS) (Mills *et al.*, 2006). El mapeo de todas las proteínas en un gel 2-D es el comienzo de los estudios del proteoma de un organismo porque facilita más estudios proteómicos. Se realizó un mapeo básico 2-D del proteoma para *L. casei* Zhang, una cepa probiótica aislada del koumiss de productos lácteos fermentados de Mongolia (Wu *et al.*, 2009). A partir de geles 2-D que cubrían el rango de pI de 4 a 7, se identificaron 131 spots de proteínas, que representaban varios grupos de proteínas, siendo las proteínas del metabolismo de los carbohidratos un grupo principal. Las proteínas identificadas cubrieron el 4% del número total de marcos de lectura abiertos predichos en el genoma y desde entonces el mapa del proteoma se ha utilizado para estudios sobre las respuestas al estrés de *L. casei* Zhang. Un extenso mapeo de

proteoma 2-D de la cepa probiótica *B. longum* NCC2705 reveló las diversas rutas de carbohidratos, aminoácidos y peptidoglicanos, que estaban activas en el crecimiento de células bifidobacterianas. Las 369 proteínas identificadas también incluyen varias proteínas de estrés, así como proteínas sin ninguna función conocida, y en total, las proteínas identificadas representan el 21% de las 1727 ORF predichas en el genoma. Este mapa de proteoma presumiblemente se ha utilizado en estudios proteómicos posteriores de *B. longum* NCC2705 que examinaron la respuesta de la bacteria a diferentes condiciones de crecimiento (Yuan *et al.*, 2006). Después de utilizar diferentes métodos de proteómica, podemos evaluar con datos *in silico* del proteoma. Las herramientas *in silico* como la herramienta SurfG se utilizan para agrupar la proteína identificada según: la membrana (MEM), la proteína potencialmente expuesta a la superficie (PSE), citoplasmática (CYT) y secretada (SEC). Además, podemos utilizar el análisis de enriquecimiento de KEGG de proteínas expresadas (Da Silva *et al.*, 2019).

A continuación, se exponen algunos ejemplos recientes de aplicaciones de la proteómica en el estudio de probióticos. Pérez Montoro *et al.* (2018) analizaron la capacidad de adhesión al moco de 31 cepas de *Lactiplantibacillus pentosus* (anteriormente *Lactobacillus pentosus*) aisladas de aceitunas verdes de mesa Aloreña fermentadas de forma natural utilizando un modelo de mucina inmovilizada. Sobre la base de su capacidad adhesiva a la mucina, se seleccionaron tres fenotipos para el análisis proteómico de proteínas de la pared celular para identificar las proteínas involucradas en el proceso de adhesión: *L. pentosus* CF1-43N, con gran capacidad de adhesión (73,49%), *L. pentosus* CF1-37N con capacidad moderada de adhesión (49,56%) y *L. pentosus* CF2-20P, con poca capacidad de adhesión (32,79%). Los resultados revelaron cuatro proteínas multifuncionales sobreproducidas en *L. pentosus* CF1-43 N con gran capacidad de adhesión, que se produjeron insuficientemente o no se produjeron en las otras dos cepas de *L. pentosus* (CF1-37N y CF2-20P). Estas proteínas estaban involucradas en la vía glucolítica (fosfoglicerato mutasa y glucosamina-6-fosfato desaminasa), respuesta al estrés (proteína de choque térmico

pequeña) y transcripción (factor de elongación de la transcripción GreA). Por tanto, estas proteínas podrían usarse como biomarcadores para la adhesión de *L. pentosus* al moco intestinal.

Pérez Montoro *et al.* (2018) también investigaron la resistencia a los ácidos de las cepas de *L. pentosus* mediante un enfoque proteómico comparativo, utilizando tres cepas que representan los fenotipos: resistente (AP2-15), intermedio (AP2-18) y sensible (LP-1) a condiciones ácidas. El análisis proteómico de los fenotipos constitutivos reveló que la resistencia intrínseca de *L. pentosus* está asociada con la sobreproducción de tres proteínas principales: fosfoglicerato mutasa 2 dependiente de 2,3-bisfosfoglicerato (PGAM-d), factor de elongación G y proteína L10 de la subunidad ribosómica 50S, y adicionalmente en la subunidad beta de la ATP sintasa y la proteína chaperona DnaK; están asociados con rutas metabólicas de proteínas y carbohidratos, producción de energía y respuestas al estrés. Los biomarcadores de proteínas sugeridos para la resistencia a los ácidos en *L. pentosus* incluyen el factor de elongación G y PGAM-d, ambos se encuentran abundantemente en el proteoma constitutivo del fenotipo resistente en condiciones estándar y ácidas. Además, las cepas de *L. pentosus* pre-expuestas a ácidos mostraron una función probiótica mejorada, como la capacidad de autoagregación a través de proteínas de superficie.

4.4. Metabolómica

La metabolómica es un campo emergente dentro de las ciencias "ómicas" que comenzó hace poco más de diez años; también se conoce como análisis del metaboloma, metabonomía (Nicholson, Lindon & Holmes, 1999) o perfil metabólico (Niwa, 1986). La metabolómica se ocupa de la determinación simultánea y el análisis cuantitativo de metabolitos intracelulares, que se han definido como compuestos de baja masa molecular (<1500 Da) que no están codificados genéticamente y que son producidos y modificados por el metabolismo de organismos vivos (es decir, microorganismos). Estos compuestos incluyen pequeñas moléculas endógenas y exógenas como péptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, ácidos

orgánicos, vitaminas, polifenoles, alcaloides, minerales, etc. (Jewett, Hofmann & Nielsen, 2006; Wishart, 2008).

La huella metabólica o exometabolómica se centra en lo que la célula excreta en condiciones definidas y tiene la intención de definir un patrón de metabolitos extracelulares. Aunque la huella metabólica proporciona información importante sobre solo una pequeña parte de todo el metaboloma bacteriano, proporciona información clave que puede contribuir a la comprensión de los mecanismos de comunicación celular (Mapelli, Olsson & Nielsen, 2008).

Como hemos mencionado anteriormente, los alimentos funcionales contienen compuestos o ingredientes que pueden ayudar a reducir el riesgo de enfermedades o promover una mejor salud más allá de proporcionar efectos nutricionales adecuados. Los alimentos funcionales, que incluyen probióticos, prebióticos y sinbióticos, tienen un mercado global importante y en crecimiento, especialmente en Europa, Australia y Japón (Stanton, Ross, Fitzgerald & Van Sinderen, 2005).

El efecto de los probióticos en el intestino humano se ha estudiado mediante diferentes enfoques, como la genómica, la transcriptómica, la proteómica y, más recientemente, la metabolómica. Al aplicar la metabolómica, se puede analizar la respuesta metabólica multiparamétrica de un organismo a los estímulos biológicos (Martin *et al.*, 2007). Por lo tanto, esta metodología puede dilucidar si los metabolitos liberados o degradados por las cepas probióticas tienen un efecto sobre la expresión de citocinas y también puede brindar información sobre cambios en las concentraciones de metabolitos beneficiosos en diferentes órganos cuando los probióticos están presentes en el intestino.

La metabolómica nos ayuda a determinar diferentes cambios metabólicos en el huésped dependiendo de la ingeniería metabólica de los probióticos y también revela reacciones que limitan la velocidad para la producción de sustancias químicas útiles (Ohtake *et al.*, 2017). La metabolómica también se conoce como perfil metabólico, que se ocupa del análisis cuantitativo y determina las moléculas de diferente masa molecular. Esta técnica es muy crucial para estudiar los niveles de metabolitos en

condiciones meticulosas y también se ha utilizado para la optimización de cepas (Khangwal & Shukla, 2019). El desarrollo de la espectrometría de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN) facilita el campo de la metabolómica para funcionar con éxito en vastas áreas de la ciencia de los alimentos (Kumar *et al.*, 2018). Esto también representa el estado patológico o fisiológico de un organismo, lo que es útil en el estudio de la toxicología, la patología molecular y el diagnóstico de enfermedades. El análisis metaómico de la microbiota intestinal nos ayuda a revelar los objetivos de las acciones probióticas. Entre todos los estudios ómicos, un análisis fluxómico proporciona la descripción más cercana de una célula y se usa ampliamente para desarrollar varias cepas (Kambouris *et al.*, 2018). Utilizando todos estos enfoques, se han extraído muchos conocimientos, como la secuenciación de clones de ADN_r16S, microarrays de ADN, técnicas de huellas dactilares de amplicones de ADN_r16S, secuenciación de alto rendimiento e hibridación *in situ* fluorescente. Se han realizado menos estudios sobre el análisis metabolómico de las respuestas bacterianas inducidas por el estrés y, por lo tanto, los enfoques integrados se utilizan particularmente en sistemas bacterianos probióticos (Zhu *et al.*, 2015).

Técnicas como UPLC, HRMAS-NMR, LC-MS, etc., unidas a un análisis de datos estadísticos complejos, permiten medir múltiples concentraciones de metabolitos, lo que permite dilucidar los efectos de los probióticos sobre el huésped y sobre el metabolismo de otros microorganismos presentes en el intestino (Mozzi *et al.*, 2013).

Se han publicado varios informes que utilizan modelos animales en los que se utilizaron ratones libres de gérmenes como hospedadores (Martin *et al.*, 2010; Matsumoto *et al.*, 2012; Sonnenburg, Chen & Gordon, 2006). Estos métodos permiten la colonización directa del sujeto experimental con cepas probióticas o el establecimiento de diferentes microbiotas, simulando el intestino humano adulto o infantil, y aportando diferentes probióticos y/o cepas patógenas.

Martin *et al.* (2007) confirmaron el efecto de algunas cepas probióticas en el huésped, analizando diferentes partes de los intestinos de ratones libres de gérmenes mediante HRMAS NMR. Los autores encontraron que la administración de *L.*

paracasei NCC2461 podría aumentar la concentración de lactato en el yeyuno, lo que sugiere que esta cepa procesa los nutrientes. Además, las concentraciones de colina, glicerofosforilcolina (GPC) y acetato se redujeron en el yeyuno y el íleon; estos componentes son intermediarios clave del metabolismo de los lípidos, lo que indica que esta cepa de BAL podría modular el metabolismo de las grasas intestinales. Además, los autores demostraron que las concentraciones de taurina y creatina, que regulan la hipercontractilidad intestinal, disminuyeron en presencia de *L. paracasei* NCC2461 y que las concentraciones de glutatión (un potente antioxidante) y sus precursores se redujeron, lo que indica que esta cepa probiótica podría regular el metabolismo del glutatión de los enterocitos, que podría estar relacionado con el cáncer gastrointestinal.

Los mismos autores, Martin *et al.* (2008) realizaron estudios similares utilizando ratones libres de gérmenes colonizados por una microbiota infantil y las cepas probióticas *L. paracasei* NCC2461 y *L. rhamnosus* NCC4007. En este trabajo, se analizaron metabolitos en intestino, plasma, orina y extractos fecales mediante HRMAS-NMR. Los resultados mostraron que estas cepas probióticas podrían alterar el metabolismo de los lípidos hepáticos, disminuir el nivel de lipoproteínas plasmáticas y estimular la glucólisis. La presencia de probióticos influyó también en el catabolismo de aminoácidos y las concentraciones de metilaminas y ácidos grasos de cadena corta.

En otro estudio, Wikoff *et al.* (2009) analizaron el efecto del microbioma intestinal sobre los metabolitos sanguíneos de ratones convencionales y libres de gérmenes mediante el uso de LC-MS, confirmando una cooperación significativa entre el metabolismo bacteriano y de mamíferos. Los autores demostraron que los microorganismos en el intestino podrían influir en el metabolismo de los aminoácidos, así como en la síntesis del antioxidante ácido indol-3-propiónico.

Matsumoto *et al.* (2012) analizaron el metaboloma del ratón usando CE-TOFMS; Se describieron las diferencias entre el perfil metabolómico de ratones libres de gérmenes y ratones ex-libres de gérmenes colonizados con bacterias de las heces de ratones convencionales. Los autores demostraron que la prostaglandina E2, un

inmunosupresor innato independiente de la interleucina (IL) -10, estaba presente solo en ratones ex-libres de gérmenes, lo que indica que la microbiota intestinal contiene factores de activación para la inmunidad innata, similar a la inflamación.

Otro modelo útil para estudiar el efecto de los probióticos en la salud humana es mediante el uso de sujetos que padecen el síndrome del intestino irritable (SII). Esta enfermedad es un trastorno común que afecta al 5-10% de la población; sus síntomas incluyen dolor abdominal, deposiciones irregulares, estreñimiento y/o diarrea (Madsen, 2011). Hong *et al.* (2011) analizaron mediante HRMAS-NMR suero y heces de individuos que padecían esta enfermedad antes y después de ser tratados durante 2 meses con leches fermentadas que contienen cepas de lactobacilos y bifidobacterias. Tras la administración de probióticos, se normalizaron las alteraciones en los niveles sanguíneos de glucosa, tirosina y lactato. Alternativamente, Ponnusamy, Choi, Kim, Lee & Lee (2011) mostraron diferencias entre los metabolitos presentes en los intestinos de individuos que padecían SII y adultos sanos y establecieron una correlación entre los metabolitos encontrados y los microorganismos presentes en el intestino. Las heces de los individuos que padecían IBS tenían concentraciones más altas de acetato de hidroxifenilo y propionato de hidroxifenilo, que son producidos a partir de fenilalanina por *Clostridium* sp., y mostraron concentraciones aumentadas de ácido aminobutírico, que se correlaciona con la presencia de *Faecalibacterium prausnitzii*. Se encontró una correlación entre las concentraciones de alanina, ácido glutámico y ácido piroglutámico y la presencia de lactobacilos; sin embargo, el recuento de células de estas bacterias en los intestinos fue mayor en sujetos que padecían IBS. Por el contrario, los recuentos de células de las cepas de *Bifidobacterium* fueron más altos en adultos sanos.

La metabolómica es una herramienta interesante para estudiar el efecto de los probióticos en la salud del huésped. Esta "ómica" junto con el estudio de la proteómica y genómica del huésped puede proporcionar nueva información relacionada con los efectos de los probióticos en la salud del consumidor. Además, la metabolómica puede dar información sobre el efecto de la administración de una cepa probiótica sobre el

comportamiento metabólico de la microbiota residente de sujetos sanos y de aquellos que padecen diferentes enfermedades como el SII (Mozzi *et al.*, 2013).

Como conclusión, cabe resaltar que la biología de sistemas es un enfoque emergente que tiene un potencial colosal para estudios avanzados de bacterias probióticas. Esto juega un papel esencial en el diagnóstico y tratamiento de diversos tipos de enfermedades y trastornos humanos. Este estudio es beneficioso para la producción de productos biomédicos eficaces y eficientes. La biología de sistemas crea una nueva era de probióticos diseñados con aplicaciones terapéuticas para mejorar el sistema inmunológico y el metabolismo. También es necesario autenticar modelos predictivos sobre datos importantes, pero los métodos de validación actuales se basan en datos simulados para verificar la precisión de sus métodos. La simulación de los datos es el enfoque inicial para la optimización del método; esto rara vez se parece a la realidad. Además, en la perspectiva del futuro, el concepto de probióticos evoluciona en paralelo con el conocimiento sobre el microbioma intestinal funcional, un área de investigación que se ha desarrollado enormemente con el uso de la metagenómica, la metabolómica proteómica y otras herramientas ómicas. Todas estas herramientas y técnicas son necesarias para conocer los estudios de redes metabólicas y bioquímicas de una cepa de importancia industrial (Yadav & Shukla, 2019).

OBJETIVOS

Las cepas de *Lactiplantibacillus pentosus* (anteriormente *Lactobacillus pentosus*) aisladas de la fermentación natural y espontánea de la aceituna Manzanilla Aloreña (Abriouel *et al.*, 2012) han mostrado un gran potencial probiótico *in vitro* según los resultados previos (Montoro *et al.*, 2016). Además, los análisis de las propiedades probióticas y de seguridad llevadas a cabo *in vitro* e *in silico* en *L. pentosus* revelaron aspectos de gran interés en cuanto a su prometedora aplicación como probiótico de origen vegetal. En ese sentido, los resultados previos indicaron su gran capacidad de supervivencia bajo condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, capacidad de autoagregación y coagregación con diferentes patógenos, adhesión con las células epiteliales intestinales.

Teniendo en cuenta estos resultados, nuestro objetivo principal es determinar el efecto de los aceites comestibles –como parte de la dieta– sobre las propiedades funcionales y probióticas de estas cepas y cómo lograr obtener cepas más robustas tras someterlas a un estrés previo usando dichos aceites. En ese sentido, nuestros objetivos en esta tesis doctoral se enmarcan en lo siguiente:

1. Determinar *in vitro* el efecto de los aceites comestibles sobre la supervivencia y el crecimiento, así como las propiedades probióticas de cepas con potencial probiótico de *L. pentosus* pre-adaptadas o no en presencia de diferentes aceites vegetales comestibles.
2. Analizar a nivel molecular los efectos de los aceites sobre la funcionalidad de las cepas con potencial probiótico de *L. pentosus*.
3. Analizar a nivel molecular los efectos de los aceites sobre la seguridad de las cepas con potencial probiótico de *L. pentosus* en relación con la resistencia a los antibióticos.
4. Elaborar estrategias para potenciar el efecto probiótico de las cepas de *L. pentosus* mediante el uso de aceites vegetales comestibles.

TRABAJO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS



ARTÍCULO I

NEW INSIGHTS INTO THE MOLECULAR
EFFECTS AND PROBIOTIC PROPERTIES OF
LACTOBACILLUS PENTOSUS PRE-
ADAPTED TO EDIBLE OILS



New insights into the molecular effects and probiotic properties of *Lactobacillus pentosus* pre-adapted to edible oils

Esther Alonso García^a, Beatriz Pérez Montoro^a, Nabil Benomar^a, Sonia Castillo-Gutiérrez^b,
María D. Estudillo-Martínez^b, Charles W. Knapp^c, Hikmate Abriouel^{a,*}

^a Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, 23071, Jaén, Spain

^b Área de Estadística e Investigación Operativa, Departamento de Estadística e Investigación Operativa, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, Jaén, Spain

^c Centre for Water, Environment, Sustainability, and Public Health, Department of Civil and Environmental Engineering, University of Strathclyde, Glasgow, Scotland, United Kingdom



ARTICLE INFO

Keywords:

Lactobacillus pentosus
Probiotics
Vegetable edible oils
Sub-lethal stress
qRT-PCR

ABSTRACT

In this study, the survival and growth of seven probiotic *Lactobacillus pentosus* strains isolated from Aloreña green table olives in the presence of vegetable-based edible oils (i.e., sunflower, olive, linseed, soy, corn, almond and argan) and mint essential oil were determined for the first time. Slight decreases in bacterial viability were observed depending on the strain and oil exposure, mainly mint essential oil. However, pre-adapting the strains to the corresponding oils significantly increased their cell viabilities. As such, this study examined whether pre-adapting probiotic *L. pentosus* strains with oils will constitute a new strategy to increase stress resistance, e.g., acids (pH 1.5) or bile (up to 3.6%) in food production and/or during digestion, and improve functional probiotic properties. Improvements in stress resistance (acidic and bile conditions) were noticed in some pre-adapted strains with oils; further, pre-adaptations with olive, argan, sunflower and linseed oils induced gene expression (e.g., *fus*, *rpsL*, *pgm*, *groEL*, *enol* and *prep*) for moonlighting proteins involved in several stress responses and other functions. As such, pre-adaptation with vegetable edible oils may represent a novel approach for manufacturing probiotic products by improving the stability of bacteria during industrial processes that would otherwise reduce their viability and functionality.

1. Introduction

Probiotics of vegetable origin have been increasingly gaining interest in the last ten years due to the demand for alternatively sourced probiotics from vegetarians and individuals with lactose intolerance, allergies, and dyslipidemia (Granato, Branco, Nazzaro, Cruz, & Faria, 2010), and by food manufacturers seeking different probiotics than those isolated from conventional sources (e.g., dairy products, human feces and breast milk). Lactic acid bacteria (LAB) represent a major group of probiotic bacteria including *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp., the most commonly used probiotics besides yeasts (Nousiainen, Javaninen, Setälä, & von Wright, 2004; Saulnier, Spinler, Gibson, & Versalovic, 2009). The autochthonous LAB isolated from vegetables have the capacity to survive under extreme environmental conditions such as acids, fluctuations of physical and nutritional conditions, high concentration of indigestible nutrients and anti-nutritional

factors (Buckenhüskes, 1997; Rossi et al., 2005). In particular, the versatile species *L. pentosus* and *L. plantarum* have been found in a variety of environmental niches including naturally-fermented olives, which have been carriers of beneficial probiotic microorganisms capable to improve microbial balance in gastrointestinal tracts (Abriouel et al., 2012; Argyri, Panagou, & Tassou, 2016; Bautista-Gallego et al., 2013; Pérez Montoro et al., 2016).

Probiotics are defined by FAO/WHO (2002) as live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit to the host. Thus, to biologically function, probiotics must remain viable during the processing, storage and transmission through the gastrointestinal tract (da Silva, de Fátima Bezerra, dos Santos, & Correia, 2015). Taking into account that viability is the most important parameter, there have been several strategies and approaches aimed to improve their survivability, such as immobilization in edible films or enclosed matrix (Ebrahimi et al., 2018; Nualkaekul, Cook,

* Corresponding author. Área de Microbiología. Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Edif. B3. Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, 23071, Jaén, Spain.

E-mail address: hikmate@ujaen.es (H. Abriouel).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.028>

Received 14 November 2018; Received in revised form 4 April 2019; Accepted 8 April 2019

Available online 10 April 2019

0023-6438/ © 2019 Published by Elsevier Ltd.

Khutoryanskiy, & Charalampopoulos, 2013). However, other methods could be used, including stress-adaptation of probiotic bacteria, which may trigger the induction of proteins known to improve their survivability and resistance to forthcoming environmental, technological and gastrointestinal conditions (Casado Muñoz et al., 2016; De Angelis & Gobbetti, 2011, Pérez Montoro et al., 2018).

On the other hand, questions usually arise regarding the effect of diet or probiotics on the microbial diversity of the gut; however, the effect of diet on probiotic functionality should also be considered. As such, probiotics should include the exogenous bacteria administered and also those autochthonous, or indigenous, of the gut. Overall, diets can contain several substances that can enhance the activity of probiotics, such as prebiotics, and compounds that can inhibit or decrease (i.e., stress) the probiotic activity of some strains (Markowiak & Śliżewska, 2017; Ranadheera, Baines, & Adams, 2010). Treatments have been strategically sought to improve the stability of probiotics in terms of survivability and activity, since probiotics are fastidious and nutritionally exigent and sensitive to environmental conditions. Thus, dietary components such as edible oils could play an important role to change probiotic activities. In this sense, several reports described the use of some edible oils (e.g., fish oil, olive oil, rice-bran oil, and soybean oil) in prebiotic formulations that provided long-term protection to the organism and help maintain their proven probiotic properties and increased life span and shelf life (Baksh, 2014). Vegetable edible oils such as olive oil, sunflower oil, linseed, soy, corn, almond and argan are common in several diets depending on the geographical region; however, there remains a knowledge gap on their effect on probiotics of vegetable origin such as *Lactobacillus* sp.

Several reports describe the responses of lactobacilli to stresses such as extreme temperature, pH, osmotic pressure, oxygen, and starvation, which physiologically affects the cells. Their physiological and molecular mechanisms involved in stress response include the induction of a specific proteins leading to possible increases in specific (i.e., a targeted response) or multiple stress (generic response) tolerances. Among the overexpressed proteins in lactobacilli include DnaK, GroEL, 30S-ribosomal proteins S1 and S6, ATP synthase subunit beta, MetK, phosphopyruvate hydratase, phosphoglycerate kinase, elongation factor Tu, putative manganese-dependent inorganic pyrophosphatase, D-lactate dehydrogenase, triosephosphate isomerase, fructosebiphosphate aldolase, and nucleoside-diphosphate kinase, related to quorum sensing (QS) and stress response mechanisms have been induced following exposure to several stressors (De Angelis & Gobbetti, 2011). Here, new insights into the molecular responses of *L. pentosus* pre-adapted with vegetable edible oils were also provided and attempt to determine whether edible oil adaptation influence their probiotic activities.

Specifically, this study assessed (for the first time) the effect of vegetable edible oils on seven probiotic *L. pentosus* strains isolated from naturally-fermented Aloreña green table olives (Abriouel et al., 2012; Pérez Montoro et al., 2016) with the aim to use the prebiotic oils in microencapsulation-based formulations. Furthermore, the possibility whether one could pre-adapt probiotics with oils to enhance their probiotic activities, such as tolerance to acids and bile salts and thus improve their stability in food production and effectiveness within the intestinal tract, was investigated.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

Seven *Lactobacillus pentosus* strains, isolated from naturally-fermented Aloreña green table olives (Abriouel et al., 2012) with probiotic potentials (Pérez Montoro et al., 2016), were used in this study. These strains were routinely cultured at 37 °C in de Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Fluka, Madrid, Spain) or agar under aerobic conditions for 24–48 h. Cultures were maintained in 20% glycerol at –20 °C and –80 °C for short- and long-term storage, respectively.

2.2. The effect of oils on survival and growth of *L. pentosus* strains

To determine the effect of different vegetable edible oils (i.e., sunflower, olive, linseed, soy, corn, almond and argan) and the essential mint oil on survival and growth of *L. pentosus* strains, an overnight culture of each strain grown in MRS broth at 37 °C was inoculated at 2% v/v in fresh MRS broth added with 2% v/v of each oil. Growth monitoring was done in a 96-well plate (200 µl per well) by measuring the optical density at 600 nm each hour for 23 h while incubating at 37 °C. To verify, serial dilutions of the samples were plated onto MRS agar plates at different time intervals (0, 8 and 24 h) to determine viable bacterial counts (\log_{10} CFU/ml) following incubation at 37 °C for 48 h. Furthermore, pH monitoring was conducted in all treatments after 24 h of growth. Each experiment was done in triplicate.

2.3. Acid and bile tolerance in oil-adapted *Lactobacillus pentosus* strains

Overnight culture of each strain was inoculated (2% v/v) into fresh MRS broth and with different oils added at 2% v/v. Samples were incubated under aerobic conditions for 24 h at 37 °C, and they were then re-cultured three times in the same concentration of oil. On the fourth day, adapted-strains were re-cultured into fresh MRS broth without any oils and then kept in 20% glycerol at –20 °C and –80 °C for short- and long-term storage, respectively.

To compare the effect of adaptation on growth and survival in the presence of different oils, overnight cultures of each adapted *L. pentosus* strain from each oil was cultured in MRS broth with and without different oils added. Growth and survival rates of each adapted strains were measured.

Assays to determine whether oil adaptation had an effect on survivability under gastric conditions, including acidity (pH 1.5–2) and bile salts (1.8 and 3.6%). were done according to methods described by Millette et al. (2008). Simulated gastric fluid (SGF) was formulated (U.S. Pharmacopeia): 3.2 g/liter of pepsin (Sigma), 2.0 g/liter of NaCl, and pH adjusted to 1.5 or 2.0 by the addition of HCl (10 N). Volumes (0.5 ml) of overnight cultures in MRS broth were added to 9.5 ml of SGF and then incubated at 37 °C under mild agitation (200 rpm) in a G24 environmental incubator shaker (New Brunswick Scientific Co. Inc., NJ). After 30 min of incubation, 10 ml of culture were harvested, centrifuged and resuspended in 1 ml of sterile phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4). Immediately, culture suspensions were serially diluted in 0.85% NaCl solution and plated onto MRS agar. Plates were incubated under aerobic conditions at 37 °C for 48 h, and they were then examined visually for bacterial growth. As a control, PBS was used instead of SGF to determine the initial CFU/ml for each strain.

Regarding bile-salt tolerance, MRS broths amended with 0%, 1.8% or 3.6% w/v bile-salt mixture (Sigma B-3426) were inoculated with 2% v/v overnight cultures, and the growth and survival rates were then obtained by measuring the absorbance at 600 nm for 23 h in parallel with viable counts at different time intervals (0, 8 and 24 h) onto MRS agar. Plates were incubated at 37 °C for 24–48 h for \log_{10} CFU/ml determinations.

2.4. Stress/tolerance genes in oil-adapted *L. pentosus* strains

2.4.1. Detection of stress/tolerance genes

Total genomic DNA was isolated from *L. pentosus* strains using DNA Extraction Kit (Xtrem Biotech SL, Granada, Spain) according to the manufacturer's instructions. DNAs were frozen at –20 °C until required. The detection of selected genes (*gapD*, coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *tuf*, coding for elongation factor Tu; *fus*, coding for elongation factor G; *prep*, coding for prepilin; *groEL*, coding for heat shock protein GroE; *enol*, coding for enolase; *adhes*, coding for adhesin; *pgm*, coding for phosphoglycerate mutase; and *rpsL*, coding for 30S ribosomal subunit protein S12) was done by PCR using primers designed in this study based on *L. pentosus* MP-10 genome

Table 1
Primers and PCR conditions used in this study.

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Annealing Temperature (°C)	PCR product size (bp)	Reference
<i>gapd</i>	<i>gapd-F</i>	TCAAGAAGCATACTGAAGG	52	165	This study
	<i>gapd-R</i>	TATCGTACCAAGCAACAGTC			
<i>tuf</i>	<i>tuf-F</i>	TCCACAATTCTACTTCCACAC	58	176	This study
	<i>tuf-R</i>	TATGACCACCTTCACGAACC			
<i>fus</i>	<i>fus-F</i>	AGGTTTGAAGGAAGCTATGG	58	274	This study
	<i>fus-R</i>	TTCCATACCTTCGATGTTACC			
<i>prep</i>	<i>prep-F</i>	TACAATCTAGTC TAGTTGAAG	55	172	This study
	<i>prep-R</i>	AGCACTGCAGGTGTAATGA			
<i>groEL</i>	<i>groEL-F</i>	TTACAAGAACGTTTGTAGCTA	50	187	This study
	<i>groEL-R</i>	ATGCAGCAACGTCCTTTGA			
<i>enol</i>	<i>enol-F</i>	AGTACCCAATCGTTTCCAT	51	134	This study
	<i>enol-R</i>	AAGGTAGTCCGTGTTTCGTA			
<i>adhes</i>	<i>adhes-F</i>	AATCACGATACGACCGCA	51	176	This study
	<i>adhes-R</i>	ATTGACAACTGTTGCCCA			
<i>pgm</i>	<i>pgm-F</i>	ATGGCGCAATTTTCAATTTACT	54	274	Pérez Montoro et al. (2018)
	<i>pgm-R</i>	AGCCGTAGAAGACTTCCCG			
<i>rpsL</i>	<i>rpsMP-10-Fw</i>	ATTAATTCGTAAGGCGCGT	55	176	Casado Muñoz et al. (2016)
	<i>rpsMP-10-Rv</i>	ACTTCCGTAAGCGGAGTTA			
<i>pheS</i>	<i>pheS-21F</i>	CAYCCNGCHCGYAYATGC	60	411	Naser et al. (2005)
	<i>pheS-23R</i>	GGRTGRACCATVCCNGCHCC			

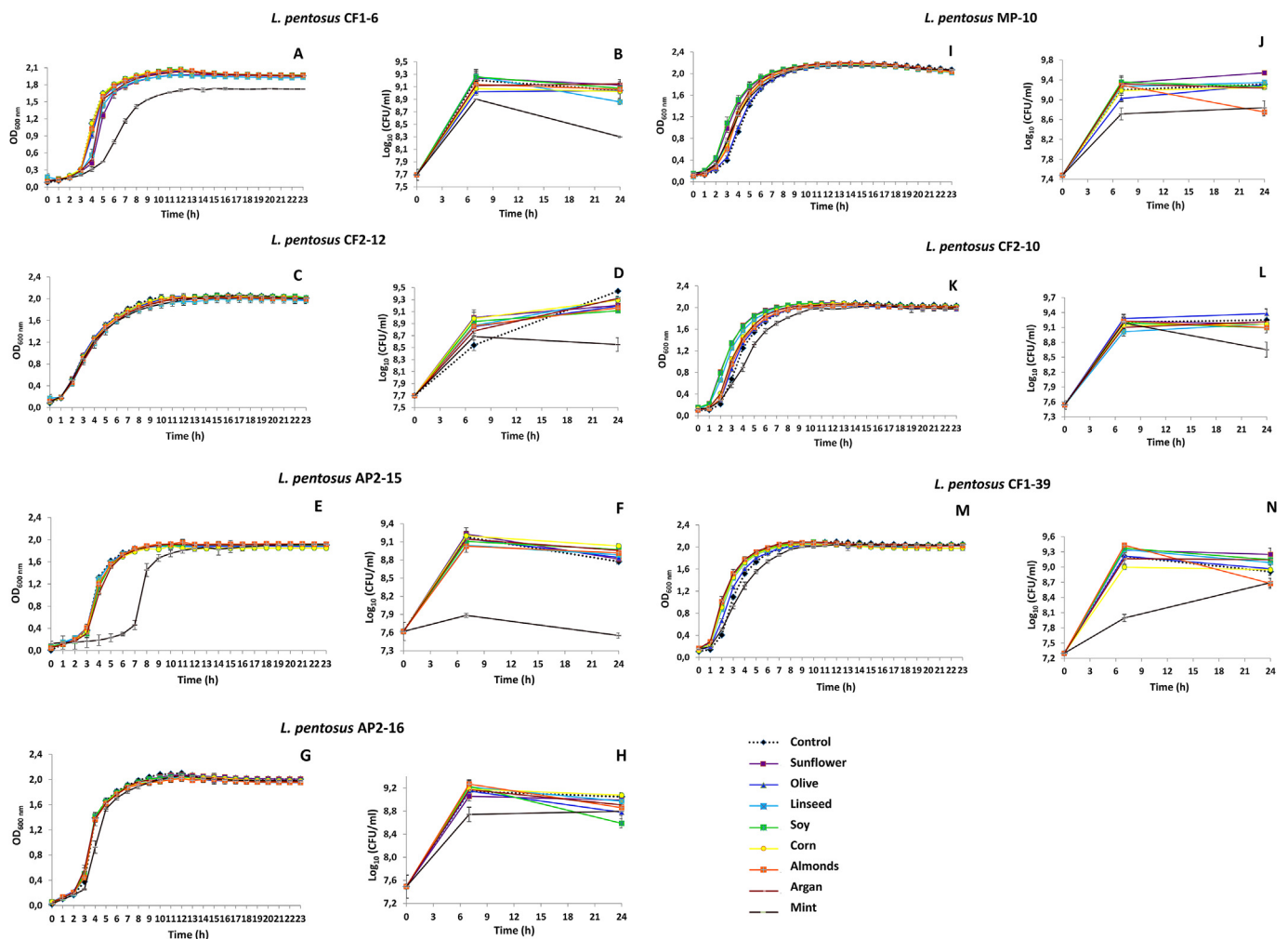


Fig. 1. Viability of *L. pentosus* strains in the presence of edible oils and mint essential oil during incubation at 37 °C in MRS broth for 24 h. Optical density at 600 nm was monitored (A, C, E, G, I, K and M) each hour, and the count of viable cells (CFU/ml) was determined (B, D, F, H, J, L and N) after 7 and 24 h for each strain. Values are expressed as the mean of the \log_{10} (CFU/ml) of three independent experiments; error bars represent standard deviations.

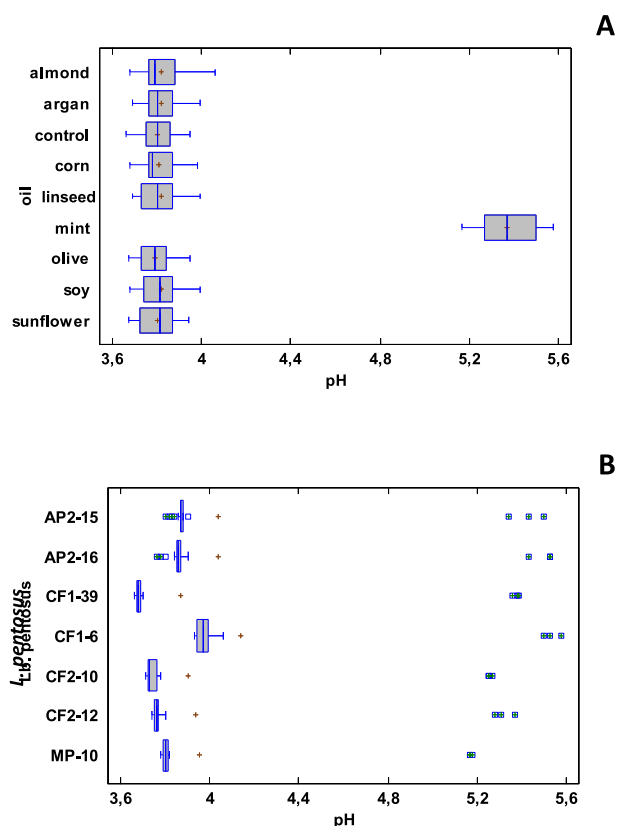


Fig. 2. Acidification capacity of *L. pentosus* strains grown in the presence of vegetable edible oils and mint essential oil in MRS broth at 37 °C for 24 h. Significant differences ($p < 0.05$) in acidification capacity revealed by two-way ANOVA were dependent on the variable oil (A) and *L. pentosus* strain (B).

sequence (Abriouel et al., 2016). Primers and annealing temperatures are described in Table 1.

2.4.2. Quantitative reverse-transcriptase PCR of stress/tolerance genes

RNA extractions were done using Direct-zol™ RNA Miniprep (Zymo Research, California, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA quantification and quality assessment were carried out using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). RNAs were adjusted to a concentration of 500 ng/ml and frozen at -80°C until required for analysis.

The expression of selected genes (Table 1) was analysed by quantitative, real-time PCR (qRT-PCR) using SensiFAST™ SYBR & Fluorescein One-Step Kit (BIOLINE). Phenylalanyl-tRNA synthase alpha-subunit (*pheS*) gene was used as a housekeeping gene (Naser et al., 2005), and a no-template control (NTC) was used as a negative control. Quantitative PCRs (qPCRs) were performed in triplicate on a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System from BioRad using 2 Power SYBR green chemistry.

2.5. Statistical analysis

All analyses were done in triplicate. Statistical analyses of data were accomplished using Excel 2007 program to determine the average data \pm standard deviations. Statistical treatment of pH data was conducted by analysis of variances (ANOVA) in Statgraphics Centurion XVI, software using Shapiro–Wilk test and the Levene test to check data normality; the two-sided Tukey's Test determined the significance of differences among strain or oil treatments, where a P -value of < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Evaluation of the protective/inhibitory effect of vegetable oils on *L. pentosus* strains

The influence of vegetable edible oils and mint (an essential oil) on the growth of potentially probiotic *L. pentosus* strains in MRS broth medium was examined. Based on the growth kinetics and survival ability, each *L. pentosus* strain responded differently to oils. Overall, the essential mint oil inhibited all *L. pentosus* strains by decreasing bacterial counts $\leq 1.2 \log_{10}$ units after 24 h incubation at 37 °C, while almond, linseed or sunflower oils had antimicrobial effect against some *L. pentosus* strains (Fig. 1).

pH were recorded as a possible indicator of the impact from vegetable oils (edible and essential) on growing *L. pentosus*. After 24 h growth at 37 °C, individual *L. pentosus* strains did not exhibit any pH differences with each oil (pH 3.6–4.0) except mint essential oil, which resulted in pH 5.1–5.5 values (Fig. 2A). However, significant differences were detected between the seven *L. pentosus* strains representing 5 dissimilar groups, with strains *L. pentosus* MP-10/*L. pentosus* CF2-12 and *L. pentosus* AP2-15/*L. pentosus* AP2-16 (each pair) belonging to the same homologous groups (Fig. 2B).

3.2. Influence of oil-adaptation on survival and growth of *L. pentosus* strains

Oil-adapted *L. pentosus* strains exhibited an improvement in their survival and growth kinetics (Fig. S1). In fact, oils such as mint or almond, which previously decreased the growth of *L. pentosus* strains, did not exhibit any inhibitory effect on pre-adapted cells. All bacteria experienced improved growth capacity throughout their incubation period (23 h), as observed by monitoring their absorbance at 600 nm and bacterial enumeration (Fig. S1). When the survival and growth of each adapted strain (with each oil) were evaluated against the eight oil treatments used in the present study, it was observed that pre-adaptation with some oils improved growth of *L. pentosus* strains in the presence of the same oil and others (Table 2); this highly depended on the *L. pentosus* strain and the oil used. However, overall soy, olive, corn and argan induced growth improvements for most *L. pentosus* strains (Table 2).

3.3. Evaluation of probiotic features in oil-adapted *L. pentosus* strains

Clear differences in acid tolerance were observed among oil-adapted *L. pentosus* strains, depending on the pH tested and the oil used for adaptation. At pH 2.0 all bacteria similarly grew (whether pre-adapted or not with oil) regardless of the oil used for adaptation, and similarly as those in PBS (Table 3). However, treatment-related statistically significant differences were detected at pH 1.5, at which *L. pentosus* strains adapted with corn and argan (5/7 strains), and soy (4/7 strains) exhibited increased growth capacity than the non-adapted cells by 0.31–6.45 \log_{10} units after 24-h incubation at 37 °C. However, other oils such as olive almonds, sunflower and linseed provided protection against acidity for some *L. pentosus* strains (2–3/7 strains), increasing their counts by 0.26–5.2 \log_{10} units after 24-h incubation at 37 °C (Table 3).

With regards to bile salts, olive, linseed and argan oils increased bile tolerance (statistically significant with P -value of < 0.05) of some *L. pentosus* strains at both concentrations (1.8 and 3.6%), increasing bacterial counts by 0.16–0.76 \log_{10} units after 8/24-h incubation at 37 °C, followed by other oils such as sunflower, almonds or corn, which increased bacterial counts of few strains by 0.18–0.89 \log_{10} units after 8/24-h incubation at 37 °C (Table 4).

Table 2
Growth of oil-adapted *Lactobacillus pentosus* strains in the presence of different oils.

Oil-adapted strains ^a		Growth in presence of oils (24 h) ^a									
0 h		Control	Control (no oil)	Sunflower (SF)	Olive (O)	Linseed (L)	Soya (SY)	Corn (C)	Almonds (AL)	Argan (AR)	Mint (M)
<i>L. pentosus</i> CF1-6	SF	7.6 ± 0.0	9.0 ± 0.02 ^e	8.7 ± 0.03 ^{bcd}	8.5 ± 0.06 ^{bc}	8.9 ± 0.07 ^{de}	8.3 ± 0.18 ^b	8.6 ± 0.18 ^{bcd}	8.7 ± 0.03 ^{cde}	8.9 ± 0.08 ^{de}	7.8 ± 0.10 ^a
	O	7.8 ± 0.16	9.3 ± 0.11 ^d	8.8 ± 0.05 ^{bc}	9.0 ± 0.03 ^{bc}	9.0 ± 0.11 ^d	9.0 ± 0.21 ^{bc}	9.1 ± 0.12 ^c	9.1 ± 0.03 ^{cd}	9.0 ± 0.07 ^{cd}	7.7 ± 0.08 ^a
	L	6.7 ± 0.12	9.5 ± 0.05 ^f	9.4 ± 0.02 ^e	9.1 ± 0.10 ^{cd}	9.1 ± 0.01 ^c	9.0 ± 0.15 ^b	9.2 ± 0.06 ^d	9.2 ± 0.06 ^d	9.2 ± 0.03 ^{cd}	8.0 ± 0.02 ^a
	SY	7.3 ± 0.04	9.1 ± 0.01 ^{bc}	9.0 ± 0.11 ^b	9.1 ± 0.03 ^{bc}	9.1 ± 0.03 ^{bc}	9.0 ± 0.17 ^b	9.2 ± 0.02 ^c	9.1 ± 0.11 ^{bc}	9.1 ± 0.05 ^{bc}	4.4 ± 0.03 ^a
	C	6.6 ± 0.16	9.3 ± 0.02 ^c	9.0 ± 0.04 ^b	9.1 ± 0.04 ^b	9.1 ± 0.03 ^{bc}	9.0 ± 0.04 ^b	9.0 ± 0.08 ^b	9.0 ± 0.08 ^{bc}	9.2 ± 0.06 ^c	9.1 ± 0.08 ^{bc}
<i>L. pentosus</i> CF2-12	AR	7.5 ± 0.21	9.2 ± 0.01 ^{bc}	9.1 ± 0.06 ^{bc}	9.1 ± 0.11 ^{bc}	9.0 ± 0.08 ^b	9.2 ± 0.01 ^c	9.1 ± 0.01 ^{bc}	9.2 ± 0.04 ^{bc}	9.2 ± 0.14 ^{bc}	8.3 ± 0.01 ^a
	AL	7.7 ± 0.06	9.0 ± 0.06 ^{bc}	8.9 ± 0.13 ^b	8.9 ± 0.09 ^b	9.0 ± 0.07 ^{bc}	9.0 ± 0.04 ^{bc}	9.1 ± 0.01 ^{cd}	9.2 ± 0.03 ^{de}	9.3 ± 0.02 ^e	8.3 ± 0.07 ^a
	SF	6.4 ± 0.12	9.4 ± 0.02 ^b	9.9 ± 0.06 ^d	9.7 ± 0.16 ^c	9.7 ± 0.05 ^c	10.4 ± 0.03 ^e	9.4 ± 0.06 ^b	9.4 ± 0.06 ^b	9.6 ± 0.04 ^c	5.2 ± 0.07 ^a
	O	7.4 ± 0.05	9.3 ± 0.03 ^c	9.2 ± 0.03 ^c	9.2 ± 0.05 ^{de}	9.0 ± 0.1 ^b	9.2 ± 0.04 ^{bc}	9.1 ± 0.05 ^{bc}	9.1 ± 0.10 ^{bc}	7.5 ± 0.15 ^a	7.6 ± 0.11 ^a
	L	7.4 ± 0.10	8.6 ± 0.09 ^{cd}	8.4 ± 0.05 ^b	8.8 ± 0.05 ^{de}	8.8 ± 0.08 ^e	8.7 ± 0.09 ^{cde}	8.6 ± 0.13 ^c	9.5 ± 0.08 ^f	8.7 ± 0.02 ^{cde}	7.2 ± 0.04 ^a
<i>L. pentosus</i> AP2-15	SY	7.6 ± 0.04	10.8 ± 0.01 ^e	10.6 ± 0.02 ^b	11.0 ± 0.01 ^d	11.0 ± 0.01 ^d	11.2 ± 0.01 ^e	11.2 ± 0.01 ^e	11.3 ± 0.01 ^e	11.3 ± 0.01 ^e	6.4 ± 0.04 ^a
	C	7.4 ± 0.09	11.2 ± 0.01 ^e	11.1 ± 0.03 ^{cd}	11.0 ± 0.03 ^{cd}	10.8 ± 0.07 ^c	11.6 ± 0.01 ^f	11.1 ± 0.0de	9.1 ± 0.02 ^b	8.9 ± 0.14 ^b	6.6 ± 0.01 ^a
	AL	7.2 ± 0.09	9.1 ± 0.08 ^c	9.0 ± 0.07 ^{cde}	9.0 ± 0.15 ^{de}	8.9 ± 0.09 ^{bc}	8.9 ± 0.06 ^{bc}	9.1 ± 0.08 ^{de}	8.7 ± 0.09 ^b	8.9 ± 0.05 ^{bcd}	7.9 ± 0.04 ^a
	AR	7.8 ± 0.18	9.3 ± 0.07 ^f	9.0 ± 0.16 ^{cd}	8.8 ± 0.02 ^b	8.7 ± 0.15 ^b	9.1 ± 0.06 ^{ab}	8.9 ± 0.02 ^{de}	9.0 ± 0.14 ^{cd}	9.4 ± 0.08 ^f	7.2 ± 0.01 ^a
	SF	7.3 ± 0.10	9.1 ± 0.08 ^b	9.0 ± 0.02 ^{ab}	9.1 ± 0.06 ^{ab}	9.1 ± 0.06 ^{ab}	9.0 ± 0.07 ^{ab}	9.1 ± 0.02 ^{ab}	9.0 ± 0.01 ^a	9.1 ± 0.10 ^{ab}	8.3 ± 0.06 ^c
<i>L. pentosus</i> AP2-16	O	7.3 ± 0.05	8.7 ± 0.09 ^b	9.0 ± 0.01 ^{de}	8.9 ± 0.05 ^{cde}	8.8 ± 0.18 ^{bcd}	8.7 ± 0.12 ^{bc}	9.1 ± 0.10 ^c	8.9 ± 0.09 ^{bcd}	9.0 ± 0.14 ^{cde}	8.4 ± 0.10 ^a
	L	7.3 ± 0.07	8.8 ± 0.0 ^{abc}	8.9 ± 0.11 ^{bcd}	8.9 ± 0.01 ^{cd}	8.7 ± 0.05 ^{ab}	8.8 ± 0.07 ^{abc}	8.9 ± 0.13 ^{bcd}	9.0 ± 0.16 ^d	8.9 ± 0.09 ^{cd}	8.6 ± 0.19 ^a
	SY	7.3 ± 0.04	9.1 ± 0.05 ^c	9.2 ± 0.03 ^c	9.1 ± 0.11 ^c	8.8 ± 0.19 ^b	9.2 ± 0.06 ^c	9.2 ± 0.04 ^c	9.1 ± 0.06 ^{bc}	9.5 ± 0.12 ^d	6.1 ± 0.09 ^a
	C	7.1 ± 0.19	8.7 ± 0.14 ^a	9.6 ± 0.02 ^d	9.4 ± 0.11 ^c	8.6 ± 0.06 ^a	9.9 ± 0.02 ^{ef}	9.8 ± 0.03 ^e	9.0 ± 0.04 ^b	10 ± 0.07 ^f	9.3 ± 0.10 ^c
	AL	7.3 ± 0.14	9.3 ± 0.08 ^d	9.2 ± 0.09 ^{cd}	8.5 ± 0.15 ^a	9.2 ± 0.03 ^{cd}	9.0 ± 0.03 ^{bc}	8.9 ± 0.17 ^b	9.3 ± 0.09 ^{cd}	8.5 ± 0.09 ^a	8.7 ± 0.04 ^{ab}
<i>L. pentosus</i> MP-10	AR	7.5 ± 0.15	9.2 ± 0.01 ^e	9.7 ± 0.01 ⁸	8.9 ± 0.07 ^{cd}	8.6 ± 0.05 ^c	8.2 ± 0.08 ^b	8.2 ± 0.14 ^b	8.3 ± 0.03 ^b	9.5 ± 0.05 ^f	7.4 ± 0.07 ^a
	SF	7.3 ± 0.12	9.3 ± 0.01 ^c	9.1 ± 0.07 ^b	9.1 ± 0.05 ^{bc}	9.0 ± 0.09 ^b	9.2 ± 0.09 ^{bc}	9.1 ± 0.26 ^b	9.2 ± 0.09 ^{bc}	9.0 ± 0.04 ^b	6.9 ± 0.06 ^a
	O	7.3 ± 0.01	9.7 ± 0.02 ^e	8.8 ± 0.1 ^d	8.5 ± 0.03 ^c	8.8 ± 0.0 ^d	8.2 ± 0.03 ^b	8.2 ± 0.07 ^b	8.8 ± 0.12 ^d	8.7 ± 0.04 ^{cd}	7.5 ± 0.06 ^a
	L	7.3 ± 0.07	8.7 ± 0.02 ^e	8.6 ± 0.05 ^{de}	8.4 ± 0.15 ^{cd}	8.2 ± 0.12	7.7 ± 0.05	8.5 ± 0.03	8.4 ± 0.03	7.9 ± 0.03	6.0 ± 0.18
	SY	7.2 ± 0.02	9.2 ± 0.12 ^d	9.0 ± 0.15 ^d	8.7 ± 0.12 ^d	7.3 ± 0.07 ^b	8.2 ± 0.07 ^b	7.3 ± 0.06 ^b	7.3 ± 0.02 ^b	7.3 ± 0.01 ^b	6.9 ± 0.11 ^a
<i>L. pentosus</i> CF2-10	C	7.6 ± 0.11	8.8 ± 0.13 ^{bc}	8.5 ± 0.08 ^c	8.7 ± 0.11 ^{bc}	8.9 ± 0.05 ^c	8.8 ± 0.04 ^{bc}	8.8 ± 0.06 ^c	8.8 ± 0.03 ^c	8.7 ± 0.12 ^{bc}	5.3 ± 0.01 ^a
	AL	7.4 ± 0.10	8.6 ± 0.17 ^b	8.9 ± 0.08 ^{cd}	8.7 ± 0.02 ^{bc}	9.1 ± 0.07 ^d	8.8 ± 0.10 ^{bcd}	8.6 ± 0.08 ^b	8.5 ± 0.20 ^b	8.9 ± 0.10 ^{cd}	5.9 ± 0.0 ^a
	AR	7.4 ± 0.06	8.6 ± 0.22 ^{bcd}	8.8 ± 0.04 ^{cd}	8.6 ± 0.20 ^{bcd}	8.4 ± 0.31 ^b	8.6 ± 0.10 ^{bcd}	8.8 ± 0.02 ^{bcd}	8.5 ± 0.01 ^{bc}	8.8 ± 0.06 ^d	5.7 ± 0.13 ^a
	SF	7.7 ± 0.13	9.0 ± 0.03 ^d	8.9 ± 0.05 ^{cd}	8.8 ± 0.07 ^{bc}	8.6 ± 0.09 ^b	8.7 ± 0.05 ^{bc}	8.8 ± 0.04 ^{bc}	9.0 ± 0.14 ^d	8.9 ± 0.06 ^{cd}	7.3 ± 0.02 ^a
	O	8.0 ± 0.07	9.2 ± 0.05 ^b	9.4 ± 0.06 ^c	9.3 ± 0.12 ^{bc}	9.3 ± 0.04 ^{bc}	9.4 ± 0.03 ^c	9.4 ± 0.05 ^{bc}	9.3 ± 0.07 ^{bc}	9.4 ± 0.01 ^c	5.8 ± 0.07 ^a
<i>L. pentosus</i> CF1-39	L	7.5 ± 0.20	8.9 ± 0.06 ^{bcd}	9.1 ± 0.07 ^{cd}	9.1 ± 0.07 ^{cd}	8.9 ± 0.04 ^{bcd}	9.1 ± 0.06 ^d	8.7 ± 0.14 ^b	9.0 ± 0.02 ^{bcd}	8.8 ± 0.15 ^{bc}	6.6 ± 0.08 ^a
	SY	7.3 ± 0.16	8.9 ± 0.04 ^{bc}	9.1 ± 0.05 ^{cd}	8.8 ± 0.14 ^{bc}	9.0 ± 0.05 ^{bcd}	9.1 ± 0.08 ^{bcd}	9.2 ± 0.09 ^d	8.8 ± 0.04 ^b	8.9 ± 0.09 ^{bcd}	6.3 ± 0.24 ^a
	C	7.4 ± 0.05	9.1 ± 0.04 ^{de}	9.1 ± 0.12 ^e	8.8 ± 0.28 ^b	8.8 ± 0.13 ^{bc}	9.1 ± 0.06 ^{de}	9.0 ± 0.05 ^{cde}	8.9 ± 0.00 ^{bcd}	9.1 ± 0.07 ^{de}	4.0 ± 0.05 ^a
	AL	7.5 ± 0.06	9.0 ± 0.15 ^{cd}	8.8 ± 0.07 ^{bc}	8.7 ± 0.14 ^b	8.8 ± 0.14 ^{bc}	9.0 ± 0.10 ^{cd}	9.1 ± 0.02 ^d	9.0 ± 0.06 ^{cd}	8.9 ± 0.05 ^{bcd}	7.5 ± 0.03 ^a
	AR	7.5 ± 0.03	9.2 ± 0.06 ^d	9.1 ± 0.12 ^{cd}	9.0 ± 0.03 ^{bcd}	9.1 ± 0.03 ^{bc}	9.1 ± 0.05 ^{bcd}	9.0 ± 0.10 ^{bc}	8.9 ± 0.08 ^b	9.1 ± 0.06 ^{cd}	7.0 ± 0.07 ^a

Numbers represent \log_{10} values, their mean ± standard deviations (± SD).

^a: Different lowercase letters represent significant differences according to 2-sided Tukey's HSD between strains ($p < 0.05$).

^a Oil-adapted *L. pentosus* strains with sunflower oil (SF), olive oil (O), linseed (L), soya (SY), corn (C), almonds (AL), argan (AR).

Table 3
Viable counts of oil-adapted *L. pentosus* strains after exposure to acidic and standard conditions.

Strains	Viability of oil-adapted <i>L. pentosus</i> strains (Log ₁₀ CFU/ml)*			
	Oil-adapted strains ^a	pH 1.5	pH 2	PBS
<i>L. pentosus</i> CF1-6	Control	0.00 ± 0.00 ^a	9.00 ± 0.00 ^a	9.16 ± 0.09 ^c
	Sunflower	0.00 ± 0.00 ^a	9.08 ± 0.00 ^a	8.60 ± 0.00 ^a
	Olive	3.71 ± 0.11 ^{cd}	9.06 ± 0.15 ^a	9.08 ± 0.09 ^{bc}
	Linseed	4.46 ± 0.06 ^d	8.92 ± 0.15 ^a	9.18 ± 0.09 ^c
	Soy	1.53 ± 1.33 ^b	9.02 ± 0.10 ^a	9.14 ± 0.10 ^c
	Corn	1.53 ± 1.33 ^b	9.08 ± 0.00 ^a	8.99 ± 0.05 ^{bc}
	Almonds	3.08 ± 0.07 ^c	8.99 ± 0.09 ^a	9.11 ± 0.11 ^{bc}
	Argan	0.00 ± 0.00 ^a	9.04 ± 0.06 ^a	8.85 ± 0.11 ^b
	Control	1.63 ± 1.42 ^b	8.83 ± 0.02 ^d	9.22 ± 0.03 ^c
<i>L. pentosus</i> CF2-12	Sunflower	0.00 ± 0.00 ^a	8.73 ± 0.07 ^{cd}	9.06 ± 0.08 ^{abc}
	Olive	0.00 ± 0.00 ^a	8.39 ± 0.08 ^a	8.96 ± 0.09 ^a
	Linseed	0.00 ± 0.00 ^a	8.53 ± 0.05 ^b	8.96 ± 0.09 ^a
	Soy	0.00 ± 0.00 ^a	8.33 ± 0.06 ^a	8.99 ± 0.05 ^{ab}
	Corn	0.00 ± 0.00 ^a	8.65 ± 0.10 ^{bc}	8.98 ± 0.05 ^a
	Almonds	0.00 ± 0.00 ^a	8.73 ± 0.03 ^{cd}	9.18 ± 0.03 ^{bc}
	Argan	0.00 ± 0.00 ^a	8.60 ± 0.11 ^{bc}	9.14 ± 0.04 ^{abc}
	Control	2.69 ± 0.12 ^b	9.22 ± 0.08 ^d	9.13 ± 0.08 ^d
	Sunflower	4.02 ± 0.10 ^d	8.90 ± 0.03 ^b	9.05 ± 0.02 ^{cd}
<i>L. pentosus</i> AP2-15	Olive	4.60 ± 0.00 ^c	8.93 ± 0.03 ^{bc}	8.90 ± 0.02 ^{ab}
	Linseed	0.00 ± 0.00 ^a	8.77 ± 0.07 ^a	8.85 ± 0.01 ^a
	Soy	4.48 ± 0.09 ^c	8.88 ± 0.09 ^b	9.00 ± 0.01 ^{bc}
	Corn	4.55 ± 0.03 ^c	9.02 ± 0.12 ^{bc}	8.82 ± 0.03 ^a
	Almonds	3.99 ± 0.09 ^d	9.07 ± 0.10 ^c	8.85 ± 0.03 ^a
	Argan	3.37 ± 0.14 ^c	8.95 ± 0.04 ^{bc}	8.86 ± 0.02 ^a
	Control	4.84 ± 0.09 ^d	9.03 ± 0.05 ^{bc}	9.14 ± 0.04 ^b
	Sunflower	5.10 ± 0.08 ^e	9.02 ± 0.12 ^{bc}	9.06 ± 0.15 ^{ab}
	Olive	4.77 ± 0.04 ^d	8.94 ± 0.06 ^b	9.06 ± 0.08 ^{ab}
<i>L. pentosus</i> AP2-16	Linseed	4.18 ± 0.09 ^b	9.18 ± 0.04 ^c	9.10 ± 0.07 ^{ab}
	Soy	4.07 ± 0.10 ^b	9.05 ± 0.08 ^{bc}	9.04 ± 0.12 ^{ab}
	Corn	4.52 ± 0.04 ^c	9.05 ± 0.08 ^{bc}	8.87 ± 0.03 ^a
	Almonds	3.74 ± 0.05 ^a	9.07 ± 0.10 ^{bc}	9.09 ± 0.11 ^{ab}
	Argan	5.15 ± 0.13 ^c	8.69 ± 0.12 ^a	8.94 ± 0.04 ^{ab}
	Control	0.00 ± 0.00 ^a	9.07 ± 0.10 ^{ab}	9.25 ± 0.03 ^c
	Sunflower	0.00 ± 0.00 ^a	8.99 ± 0.12 ^a	8.99 ± 0.06 ^{ab}
	Olive	0.00 ± 0.00 ^a	9.20 ± 0.08 ^{abc}	9.22 ± 0.05 ^{bc}
	Linseed	0.77 ± 1.33 ^a	9.10 ± 0.14 ^{abc}	9.20 ± 0.03 ^{bc}
<i>L. pentosus</i> MP-10	Soy	5.48 ± 0.00 ^c	9.25 ± 0.10 ^{abc}	9.19 ± 0.14 ^{bc}
	Corn	6.45 ± 0.03 ^d	9.12 ± 0.07 ^{abc}	9.23 ± 0.03 ^{bc}
	Almonds	5.17 ± 0.03 ^c	9.32 ± 0.09 ^c	8.84 ± 0.04 ^a
	Argan	3.07 ± 0.10 ^b	9.29 ± 0.13 ^{bc}	9.18 ± 0.09 ^{bc}
	Control	0.00 ± 0.00 ^a	9.37 ± 0.02 ^c	9.12 ± 0.02 ^b
	Sunflower	0.00 ± 0.00 ^a	9.14 ± 0.09 ^b	9.04 ± 0.11 ^b
	Olive	0.00 ± 0.00 ^a	8.89 ± 0.16 ^a	9.18 ± 0.03 ^b
	Linseed	0.00 ± 0.00 ^a	9.24 ± 0.06 ^{bc}	9.05 ± 0.04 ^b
	Soy	0.00 ± 0.00 ^a	9.19 ± 0.11 ^{bc}	8.76 ± 0.10 ^a
<i>L. pentosus</i> CF2-10	Corn	3.71 ± 0.20 ^c	9.16 ± 0.07 ^b	9.22 ± 0.05 ^b
	Almonds	0.00 ± 0.00 ^a	9.15 ± 0.15 ^b	8.60 ± 0.00 ^a
	Argan	2.45 ± 0.21 ^b	8.84 ± 0.09 ^a	9.09 ± 0.05 ^b
	Control	0.00 ± 0.00 ^a	8.94 ± 0.06 ^{bc}	9.05 ± 0.04 ^a
	Sunflower	0.93 ± 1.60 ^a	8.50 ± 0.17 ^a	9.14 ± 0.04 ^{ab}
	Olive	3.14 ± 0.12 ^{bc}	9.00 ± 0.20 ^{bcd}	9.09 ± 0.05 ^a
	Linseed	3.94 ± 0.06 ^c	9.18 ± 0.06 ^d	9.12 ± 0.06 ^{ab}
	Soy	4.10 ± 0.08 ^c	8.82 ± 0.07 ^b	9.28 ± 0.04 ^c
	Corn	2.45 ± 0.21 ^b	9.09 ± 0.15 ^{cd}	9.29 ± 0.02 ^c
<i>L. pentosus</i> CF1-39	Almonds	0.00 ± 0.00 ^a	9.02 ± 0.12 ^{bcd}	9.07 ± 0.10 ^a
	Argan	2.69 ± 0.12 ^b	9.07 ± 0.12 ^{cd}	9.23 ± 0.06 ^{bc}

Numbers represent log₁₀ values, their mean ± standard deviations (± SD).

*: Different lowercase letters represent significant differences according to 2-sided Tukey's HSD between strains ($p < 0.05$).

^a Oil-adapted *L. pentosus* strains with sunflower, olive, linseed, soya, corn, almonds and argan oils. Control, non-adapted strain.

3.4. Analysis of stress/tolerance gene expression in oil-adapted *L. pentosus* strains

qRT-PCR was used to evaluate the differences between oil-adapted *L. pentosus* strains (which showed an increase bile tolerance and/or acid

resistance) and wild-type strains (non adapted) in their expression of stress/tolerance genes: *gapd*, *tuf*, *fus*, *prep*, *groEL*, *enol*, *adhes*, *pgm* and *rpsL*. Firstly, screening of *L. pentosus* strains for all nine genes by conventional PCR was done, and the results (data not shown) showed only eight genes detected in all *L. pentosus* strains, while the *adhes* gene was only detected in two strains: *L. pentosus* MP-10 and *L. pentosus* CF2-10N.

Differential expression analyses (RT-qPCR) revealed that *fus*, *rpsL*, *groEL* and *pgm* became over-induced in oil-adapted *L. pentosus* strains (Fig. 3); however, the repertoire of genes induced in oil-adapted strains differed from each other. Genes *fus*, *rpsL* and *pgm* of *L. pentosus* CF1-6 were over-expressed in sunflower- and argan-adapted cells that became bile-tolerant (Fig. 3A). Furthermore, *gapd* and *fus* genes were over-expressed in sunflower- (bile tolerant) and olive-adapted (bile and acid tolerant) *L. pentosus* CF1-6, respectively (Fig. 3A). However, *L. pentosus* CF2-12 revealed that *prep*, *enol*, *groEL*, *gapd* and *rpsL* genes became over-expressed in linseed-adapted cells, and only *prep* gene was over-expressed in olive-adapted cells; all aforementioned oil adaptations created bile tolerance in this strain (Fig. 3B). Regarding *L. pentosus* AP2-15, *groEL*, *enol*, *pgm* and *rpsL* genes were over-expressed in oil-adapted cells exhibiting acid resistance (Fig. 3C). However, *L. pentosus* AP2-16 adapted with sunflower or argan oils showed an increase in the expression of *rpsL*, *pgm*, and *fus* genes, and exhibited acid resistance (Fig. 3D). On the other hand, *L. pentosus* MP-10 adapted with olive oil exhibited bile tolerance, and their over-expressed genes were *groEL*, *enol*, *fus*, *pgm* and *rpsL*; however, adaptations with other oils such as soy, almond or argan induced an over-expression of *groEL*, *pgm* and *enol*, respectively in acid-tolerant cells (Fig. 3E). Concerning *L. pentosus* CF2-10N, *pgm*, *fus* and *rpsL* genes were over-expressed in olive or linseed-adapted cells, which exhibited bile tolerance (Fig. 3F). Furthermore, over-expressed *prep* gene was also observed in linseed-adapted cells that were bile tolerant (Fig. 3F). *L. pentosus* CF1-39 adapted with linseed, soy, corn or argan oils exhibited an over-expression of *gapd*, *prep*, *tuf*, and *enol*; adapted cells were acid-resistant (Fig. 3G).

Quantification of gene expression revealed that some genes were over-expressed up to 37–303 times when compared with controls: e.g., 9–61 fold change in argan-adapted *L. pentosus* CF1-6, 2–60 fold change in linseed-adapted *L. pentosus* CF2-12, 2–37 fold change in argan-adapted *L. pentosus* AP2-15, 11–70 in sunflower-adapted *L. pentosus* AP2-16, 23–303 fold change in olive-adapted *L. pentosus* MP-10, 3–95 fold change in linseed-adapted *L. pentosus* CF2-10 and 2–4 fold change in argan-adapted *L. pentosus* CF1-39 (Fig. 3).

4. Discussion

Vegetable edible oils have been proposed for centuries as food-grade ingredients, condiments, cosmetics and also as therapeutic agents due to their antimicrobial and/or anti-inflammatory activities (Gurib-Fakim, 2006; Riechart, 2002). Furthermore, vegetable oils have been used as components for emulsions carrying microorganisms, genes, antigenic proteins and drugs (Nam, Park, Kim, Kwon, & Jeong, 2009; Ying et al., 2010). However, as a dietary component, little information remains available about their effects on probiotics and other healthy bacteria in food products and the gut (Shahdadi et al., 2015). To ensure the functionality of probiotics, microorganisms must remain viable throughout the shelf-life of the products, in which they are incorporated, and within the gastrointestinal tract (Galdeano & Perdígón, 2004). As such, vegetable edible oils added to probiotic foods, or as part of diet, may affect their viability and functionality; they constitute a source of potent natural biologically active agents unable to discriminate between beneficial and pathogenic bacteria (Nychas, Tassou, & Skandamis, 2003). On the other hand, essential oils have been reported to inhibit pathogens, and against some probiotic bacteria (Mahmoudi, Payman, Parviz, & Soma, 2014; Nychas, 1995). Taking into consideration these reports, the current study had two main goals: firstly, *in vitro* evaluation of how dietary oils affect the growth of probiotic bacteria, and secondly, how pre-adaptation with vegetable edible

Table 4
Viable counts of oil-adapted *L. pentosus* strains after exposure to bile salts.

Oil-adapted strains ^a		Viability of oil-adapted <i>L. pentosus</i> strains (Log ₁₀ CFU/ml) in the presence of different bile concentration*					
		1.8%			3.6%		
		0 h	8 h	24 h	0 h	8 h	24 h
<i>L. pentosus</i> CF1-6	Control	5.39 ± 0.03 ^a	5.83 ± 0.18 ^c	7.56 ± 0.05 ^{cd}	5.06 ± 0.08 ^a	5.20 ± 0.03 ^{abc}	7.18 ± 0.10 ^b
	Sunflower	5.39 ± 0.03 ^a	6.72 ± 0.17 ^c	7.73 ± 0.04 ^c	5.06 ± 0.08 ^a	5.80 ± 0.17 ^c	7.18 ± 0.05 ^b
	Olive	5.39 ± 0.03 ^a	6.36 ± 0.10 ^d	7.50 ± 0.10 ^{bc}	5.06 ± 0.08 ^a	5.47 ± 0.05 ^d	6.91 ± 0.17 ^a
	Linseed	5.39 ± 0.03 ^a	5.50 ± 0.17 ^{ab}	7.69 ± 0.09 ^{de}	5.06 ± 0.08 ^a	5.01 ± 0.20 ^a	7.22 ± 0.08 ^{bc}
	Soy	5.39 ± 0.03 ^a	5.76 ± 0.14 ^c	7.35 ± 0.02 ^{ab}	5.06 ± 0.08 ^a	5.19 ± 0.11 ^{abc}	7.24 ± 0.02 ^{bc}
	Corn	5.39 ± 0.03 ^a	5.39 ± 0.10 ^a	7.29 ± 0.15 ^a	5.06 ± 0.08 ^a	5.27 ± 0.09 ^{bcd}	7.19 ± 0.05 ^{bc}
	Almonds	5.39 ± 0.03 ^a	5.69 ± 0.09 ^{bc}	7.42 ± 0.06 ^{abc}	5.06 ± 0.08 ^a	5.09 ± 0.09 ^{ab}	7.15 ± 0.05 ^b
<i>L. pentosus</i> CF2-12	Control	7.17 ± 0.15 ^a	7.16 ± 0.05 ^{abc}	7.62 ± 0.27 ^{bc}	7.14 ± 0.08 ^a	7.05 ± 0.10 ^{ab}	7.85 ± 0.05 ^{cd}
	Sunflower	7.17 ± 0.15 ^a	7.07 ± 0.10 ^a	7.46 ± 0.04 ^{ab}	7.14 ± 0.08 ^a	6.97 ± 0.12 ^a	7.79 ± 0.10 ^c
	Olive	7.17 ± 0.15 ^a	7.56 ± 0.07 ^e	7.94 ± 0.03 ^e	7.14 ± 0.08 ^a	7.63 ± 0.13 ^d	8.25 ± 0.13 ^e
	Linseed	7.17 ± 0.15 ^a	7.40 ± 0.03 ^d	7.80 ± 0.03 ^{cde}	7.14 ± 0.08 ^a	7.17 ± 0.02 ^{bc}	8.00 ± 0.06 ^{de}
	Soy	7.17 ± 0.15 ^a	7.14 ± 0.09 ^{abc}	7.44 ± 0.05 ^{ab}	7.14 ± 0.08 ^a	6.96 ± 0.16 ^a	7.67 ± 0.09 ^{bc}
	Corn	7.17 ± 0.15 ^a	7.19 ± 0.11 ^{bc}	7.32 ± 0.01 ^a	7.14 ± 0.08 ^a	7.06 ± 0.09 ^{abc}	7.02 ± 0.05 ^a
	Almonds	7.17 ± 0.15 ^a	7.10 ± 0.09 ^{ab}	7.83 ± 0.15 ^{de}	7.14 ± 0.08 ^a	6.96 ± 0.16 ^a	7.77 ± 0.10 ^c
<i>L. pentosus</i> AP2-15	Control	7.14 ± 0.02 ^a	7.39 ± 0.04 ^{bc}	7.78 ± 0.00 ^{bc}	7.08 ± 0.15 ^a	7.09 ± 0.09 ^b	7.44 ± 0.04 ^{ab}
	Sunflower	7.14 ± 0.02 ^a	7.41 ± 0.02 ^{bc}	7.84 ± 0.03 ^{bc}	7.08 ± 0.15 ^a	6.99 ± 0.12 ^{ab}	7.55 ± 0.02 ^b
	Olive	7.14 ± 0.02 ^a	7.31 ± 0.16 ^{ab}	7.99 ± 0.06 ^c	7.08 ± 0.15 ^a	7.07 ± 0.15 ^{ab}	7.51 ± 0.02 ^{ab}
	Linseed	7.14 ± 0.02 ^a	7.38 ± 0.11 ^{bc}	7.54 ± 0.04 ^a	7.08 ± 0.15 ^a	7.01 ± 0.15 ^{ab}	7.49 ± 0.06 ^{ab}
	Soy	7.14 ± 0.02 ^a	7.46 ± 0.04 ^c	7.92 ± 0.01 ^c	7.08 ± 0.15 ^a	7.08 ± 0.15 ^b	7.36 ± 0.03 ^a
	Corn	7.14 ± 0.02 ^a	7.34 ± 0.08 ^{abc}	7.52 ± 0.06 ^a	7.08 ± 0.15 ^a	7.23 ± 0.00 ^b	7.52 ± 0.07 ^{ab}
	Almonds	7.14 ± 0.02 ^a	7.22 ± 0.10 ^a	7.57 ± 0.08 ^a	7.08 ± 0.15 ^a	6.90 ± 0.09 ^a	7.39 ± 0.02 ^{ab}
<i>L. pentosus</i> AP2-16	Control	7.14 ± 0.02 ^a	7.27 ± 0.01 ^{ab}	7.62 ± 0.08 ^{ab}	7.08 ± 0.15 ^a	7.01 ± 0.09 ^{ab}	7.38 ± 0.05 ^{ab}
	Sunflower	7.11 ± 0.10 ^a	7.56 ± 0.07 ^{ab}	7.24 ± 0.09 ^a	7.16 ± 0.11 ^a	7.51 ± 0.15 ^b	7.08 ± 0.07 ^a
	Olive	7.11 ± 0.10 ^a	7.77 ± 0.10 ^b	7.26 ± 0.08 ^a	7.16 ± 0.11 ^a	7.36 ± 0.02 ^a	7.15 ± 0.02 ^a
	Linseed	7.11 ± 0.10 ^a	7.64 ± 0.19 ^b	7.31 ± 0.04 ^a	7.16 ± 0.11 ^a	7.50 ± 0.05 ^b	7.16 ± 0.07 ^a
	Soy	7.11 ± 0.10 ^a	7.39 ± 0.12 ^a	7.25 ± 0.00 ^a	7.16 ± 0.11 ^a	7.51 ± 0.03 ^b	7.32 ± 0.10 ^b
	Corn	7.11 ± 0.10 ^a	7.74 ± 0.13 ^b	7.32 ± 0.00 ^a	7.16 ± 0.11 ^a	7.49 ± 0.04 ^b	7.11 ± 0.02 ^a
	Almonds	7.11 ± 0.10 ^a	7.73 ± 0.05 ^b	7.16 ± 0.09 ^a	7.16 ± 0.11 ^a	7.49 ± 0.04 ^b	7.34 ± 0.02 ^b
<i>L. pentosus</i> MP-10	Control	7.11 ± 0.10 ^a	7.65 ± 0.07 ^b	7.19 ± 0.01 ^a	7.16 ± 0.11 ^a	7.52 ± 0.02 ^b	7.13 ± 0.03 ^a
	Sunflower	7.11 ± 0.10 ^a	7.68 ± 0.14 ^b	7.19 ± 0.13 ^a	7.16 ± 0.11 ^a	7.52 ± 0.02 ^b	7.11 ± 0.05 ^a
	Olive	7.22 ± 0.06 ^a	7.65 ± 0.16 ^b	7.89 ± 0.06 ^{ab}	7.18 ± 0.09 ^a	7.44 ± 0.04 ^a	8.04 ± 0.04 ^{abc}
	Linseed	7.22 ± 0.06 ^a	7.36 ± 0.10 ^a	7.90 ± 0.07 ^{ab}	7.18 ± 0.09 ^a	7.44 ± 0.10 ^a	7.93 ± 0.10 ^a
	Soy	7.22 ± 0.06 ^a	7.52 ± 0.07 ^{ab}	8.05 ± 0.04 ^c	7.18 ± 0.09 ^a	7.43 ± 0.03 ^a	8.25 ± 0.03 ^d
	Corn	7.22 ± 0.06 ^a	7.49 ± 0.09 ^{ab}	7.98 ± 0.15 ^{ab}	7.18 ± 0.09 ^a	7.41 ± 0.05 ^a	7.94 ± 0.13 ^{ab}
	Almonds	7.22 ± 0.06 ^a	7.53 ± 0.11 ^{ab}	8.03 ± 0.02 ^{ab}	7.18 ± 0.09 ^a	7.42 ± 0.05 ^a	7.90 ± 0.05 ^a
<i>L. pentosus</i> CF2-10	Control	7.22 ± 0.06 ^a	7.52 ± 0.03 ^{ab}	7.81 ± 0.11 ^a	7.18 ± 0.09 ^a	7.43 ± 0.03 ^a	8.18 ± 0.04 ^{bc}
	Sunflower	7.22 ± 0.06 ^a	7.48 ± 0.07 ^{ab}	7.88 ± 0.03 ^{ab}	7.18 ± 0.09 ^a	7.46 ± 0.08 ^a	7.94 ± 0.11 ^{ab}
	Olive	7.22 ± 0.06 ^a	7.38 ± 0.06 ^a	7.87 ± 0.19 ^{ab}	7.18 ± 0.09 ^a	7.38 ± 0.04 ^a	8.14 ± 0.09 ^{abc}
	Linseed	7.17 ± 0.10 ^a	7.80 ± 0.08 ^{bcd}	7.93 ± 0.10 ^b	7.36 ± 0.08 ^a	7.59 ± 0.16 ^a	7.89 ± 0.11 ^a
	Soy	7.17 ± 0.10 ^a	7.69 ± 0.12 ^{bc}	8.11 ± 0.02 ^{cd}	7.36 ± 0.08 ^a	7.95 ± 0.05 ^{cd}	8.36 ± 0.04 ^{cd}
	Corn	7.17 ± 0.10 ^a	7.83 ± 0.13 ^{cde}	8.26 ± 0.04 ^c	7.36 ± 0.08 ^a	7.90 ± 0.09 ^{bcd}	8.46 ± 0.08 ^{cd}
	Almonds	7.17 ± 0.10 ^a	7.94 ± 0.12 ^{de}	8.31 ± 0.11 ^c	7.36 ± 0.08 ^a	7.80 ± 0.04 ^{abc}	8.48 ± 0.01 ^d
<i>L. pentosus</i> CF1-39	Control	7.17 ± 0.10 ^a	7.65 ± 0.16 ^{bc}	7.69 ± 0.09 ^a	7.36 ± 0.08 ^a	7.65 ± 0.07 ^{ab}	7.98 ± 0.15 ^{ab}
	Sunflower	7.17 ± 0.10 ^a	7.98 ± 0.03 ^e	7.98 ± 0.02 ^{bc}	7.36 ± 0.08 ^a	8.03 ± 0.14 ^d	8.11 ± 0.07 ^b
	Olive	7.17 ± 0.10 ^a	7.64 ± 0.06 ^{ab}	8.01 ± 0.06 ^{bc}	7.36 ± 0.08 ^a	7.64 ± 0.19 ^a	8.32 ± 0.05 ^c
	Linseed	7.17 ± 0.10 ^a	7.47 ± 0.10 ^{de}	8.18 ± 0.10 ^{de}	7.36 ± 0.08 ^a	7.62 ± 0.15 ^a	8.07 ± 0.07 ^b
	Soy	7.25 ± 0.06 ^a	7.48 ± 0.06 ^b	7.36 ± 0.02 ^c	7.18 ± 0.12 ^a	7.43 ± 0.02 ^{ab}	7.15 ± 0.06 ^a
	Corn	7.25 ± 0.06 ^a	7.37 ± 0.13 ^{ab}	7.22 ± 0.05 ^{bc}	7.18 ± 0.12 ^a	7.40 ± 0.12 ^{ab}	7.05 ± 0.13 ^a
	Almonds	7.25 ± 0.06 ^a	7.49 ± 0.08 ^b	7.12 ± 0.13 ^{ab}	7.18 ± 0.12 ^a	7.49 ± 0.04 ^b	7.19 ± 0.09 ^a
<i>L. pentosus</i> CF2-10	Control	7.25 ± 0.06 ^a	7.43 ± 0.02 ^{ab}	7.36 ± 0.01 ^c	7.18 ± 0.12 ^a	7.33 ± 0.12 ^a	7.09 ± 0.02 ^a
	Sunflower	7.25 ± 0.06 ^a	7.46 ± 0.14 ^b	7.23 ± 0.05 ^{bc}	7.18 ± 0.12 ^a	7.31 ± 0.04 ^a	7.13 ± 0.16 ^a
	Olive	7.25 ± 0.06 ^a	7.31 ± 0.08 ^a	7.23 ± 0.03 ^{bc}	7.18 ± 0.12 ^a	7.36 ± 0.09 ^{ab}	7.06 ± 0.03 ^a
	Linseed	7.25 ± 0.06 ^a	7.31 ± 0.08 ^a	7.19 ± 0.08 ^{abc}	7.18 ± 0.12 ^a	7.31 ± 0.10 ^a	7.02 ± 0.05 ^a
	Soy	7.25 ± 0.06 ^a	7.50 ± 0.03 ^b	7.19 ± 0.08 ^{abc}	7.18 ± 0.12 ^a	7.31 ± 0.10 ^a	7.02 ± 0.05 ^a
	Corn	7.25 ± 0.06 ^a	7.46 ± 0.05 ^b	7.04 ± 0.12 ^a	7.18 ± 0.12 ^a	7.33 ± 0.01 ^a	7.07 ± 0.06 ^a
	Almonds	7.25 ± 0.06 ^a	7.46 ± 0.05 ^b	7.04 ± 0.12 ^a	7.18 ± 0.12 ^a	7.33 ± 0.01 ^a	7.07 ± 0.06 ^a

Numbers represent \log_{10} values, their mean \pm standard deviations (\pm SD).

*: Different lowercase letters represent significant differences according to 2-sided Tukey's HSD between strains ($p < 0.05$).

^a Oil-adapted *L. pentosus* strains with sunflower, olive, linseed, soya, corn, almonds and argan oils.

oils increase probiotic bacteria robustness and improved probiotic features.

In this study, the effect of edible oils on the growth of probiotic *L. pentosus* strains isolated from Aloreña green table olives was examined *in vitro*, since there is great interest in developing probiotic foods containing oils. As such, the viability (i.e., survivability and optimal growth) of probiotic cells must be ensured during food processing and storage, as well as within the gastrointestinal tract where they promote

health benefits (Ranadheera et al., 2010). This study indicates that the tested vegetable oils (at 2% as an adequate concentration to test all oils) promoted varying levels of growth inhibition of probiotic *L. pentosus*, and each probiotic *L. pentosus* strain responded differently although the cell counts were often greater than the minimum 10^8 CFU/ml requirement for a product to be considered probiotic. Furthermore, mint essential oil showed the greatest inhibitory effect when compared with the other oils (i.e., sunflower, olive, linseed, soy, corn, almond and

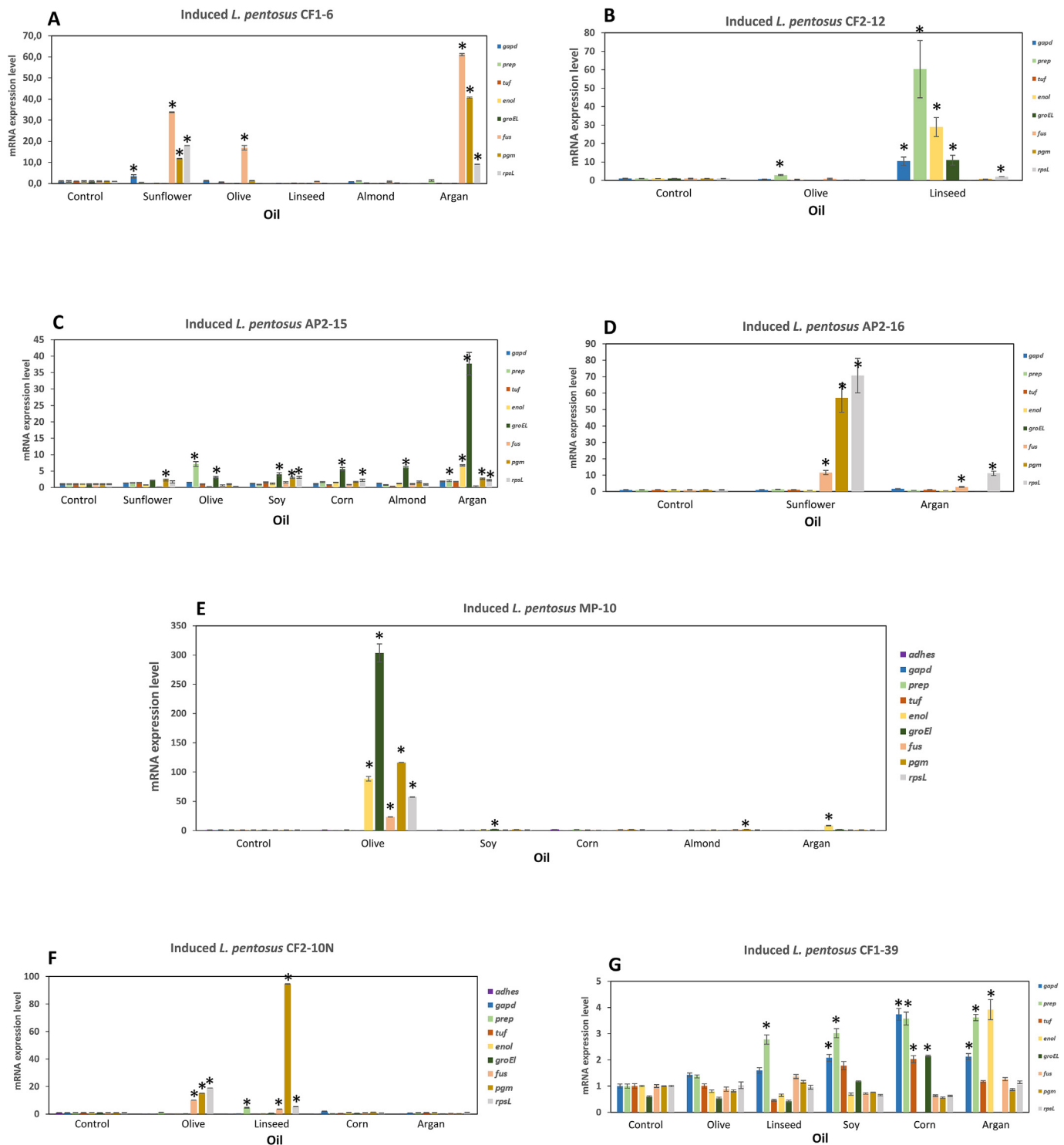


Fig. 3. Analysis of the expression of *gapd*, *tuf*, *fus*, *prep*, *groEL*, *enol*, *adhes*, *pgm* and *rpsL* genes in oil-adapted *L. pentosus* strains. The relative expression level in control (non-adapted *L. pentosus* strains) was set to one for fold expression analysis in other experimental groups. Each bar represents mean value and standard deviation as error bar of three independent experiments. * denotes significant differences in gene expression between controls and oil-adapted *L. pentosus* strain ($P < 0.05$).

argan), decreasing bacterial viability up to 1.2 \log_{10} units following a 24-h incubation, with cell counts in most cases remaining $> 10^8$ CFU/ml. In a similar manner, Feniman Moritz, Mores Rall, Júri Saeki, and Fernandes Júnior (2012) reported that mint essential oil only caused sublethal stress to a probiotic *L. rhamnosus* in fermented milk during its shelf-life period; however, Shahdadi et al. (2015) indicated that mint essential oil decreased the viability of probiotic *L. acidophilus* and inhibited pH reduction during the storage of drinking yoghurt. The fatty

acids, present as triglycerides in these oils, and polyphenols directly inhibit the viability of probiotic bacteria depending on the type of oil and reactions by the exposed strain. Here, both the growth and capacity to acidify were relatively affected by the oils treatments, especially by mint essential oil, although they often did not decrease cell viabilities below the minimum count required to be considered a probiotic. In light of these findings, the ingestion of some oils may affect the viability of some beneficial bacteria, but could aid in the reduction of pathogens

in both food products and the gut.

Considering that the viability of probiotic bacteria and their functionality depend on the strain and the oil used, second-generation probiotics were obtained by pre-adapting probiotic *L. pentosus* strains with the different oils. The use of second-generation probiotics may have additional positive effects, including enhanced probiotic activities compared to the parental *L. pentosus* strains. The results showed improved growth rate of adapted bacteria (versus non-adapted bacteria) once exposed to oils, reaching similar or greater viable counts (up to 9 \log_{10} units) than controls grown in the absence of oils. In this sense, probiotic bacteria respond to stress by producing specific substances, such as exopolysaccharides and proteins which may protect cells from further stressors (Nguyen et al., 2016). Furthermore, this adaptation had a great impact on their probiotic features as detected *in vitro*, such as tolerance to low pH and bile salts. On the other hand, it has been widely reported that probiotic features are highly linked to strain and their produced substances; however, exposure conditions to the probiotic strain are crucial to determine their functionality such as responses to different environmental (including gastrointestinal) or technological stresses. Pre-exposing probiotic bacteria to stress can affect their robustness as reported previously by Casado Muñoz et al. (2016), which indicated that pre-exposure of probiotic *L. pentosus* to acids enhanced probiotic functions such as auto-aggregation via surface proteins. Other studies revealed that probiotics pre-adapted to multiple stress factors such as acids, bile or temperature are more robust under simulated gastrointestinal conditions than their parental counterparts, and exhibit enhanced antagonistic actions against pathogens (Mathipa & Thantsha, 2015). Following on these studies, the survivability of oil-adapted *L. pentosus* strains under low pH and high bile concentration was compared; the results demonstrated that pre-adaptation of probiotics with some oils improved their acid and bile tolerance. Acid tolerance of the non-adapted and the adapted *L. pentosus* strains was similar at pH 2.0, however evident differences were detected at pH 1.5, depending on the oil used and the strain tested. Overall, corn, argan, sunflower and soy most effectively induced acid tolerance in almost all *L. pentosus* strains, followed by olive, almond and linseed oils. However, olive, linseed and argan oils increased bile tolerance in most *L. pentosus* strains. These results suggest that different mechanisms were used to withstand both stresses applied in this study.

To gain a greater insight into molecular mechanisms involved in acid/bile tolerance after oil adaptation, the expression of genes involved in stress/tolerance response was compared. Previous studies (e.g., Pérez Montoro et al., 2016), using comparative proteomic analysis, determined that the protein markers involved in acid resistance in *L. pentosus* were 2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase 2 (PGAM-d) and elongation factor G, which were both over-produced under standard and acidic conditions. As such, analyses of *pgm*, coding for phosphoglycerate mutase; *fus*, coding for elongation factor G; and other genes such as *gapd*, coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *tuf*, coding for elongation factor Tu; *prep*, coding for prepilin; *groEL*, coding for heat shock protein GroEL; *enol*, coding for enolase; *adhes*, coding for adhesin; and *rpsL*, coding for 30S ribosomal subunit protein S12 revealed that oil-adapted *L. pentosus* strains exhibited a different repertoire of gene over-expression, depending on the strain and the oil used for adaptation. Comparing with the parental strains, the adaptive responses of each *L. pentosus* strain was related with different sets of genes (i.e., *groEL*, *pgm*, *rpsL*, *fus*, *gapd*, *tuf*, *prep*, and *enol*) over-expressed to maintain intracellular pH homeostasis, energy production, protein and carbohydrate metabolism, and secretion. In each adapted *L. pentosus* strain, depending on the oil used, a balance of different responses was involved in tolerance/resistance which is a stable and irreversible trait. Regarding bile tolerance, different sets of genes (*fus*, *pgm*, *gapd*, *prep*, *groEL*, *enol* and *rpsL*) were over-expressed. Overall, independently of the strain and the oil treatment, *fus*, *rpsL*, *pgm*, *groEL*, *enol* and *prep* genes were over-induced in oil-adapted *L. pentosus* strains involved in acid/bile tolerance. The response

to oils especially olive, argan, sunflower and linseed oils triggered the induction of genes involved in metabolism to ensure survival under oil stress, and consequently, they were also involved in acid and/or bile tolerance. Pérez Montoro et al. (2016) reported that *L. pentosus* strains pre-exposed to acids displayed better probiotic function, including increased auto-aggregation ability, by means of moonlighting proteins such as elongation factor G (encoded by *fus* gene) and 2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase 2 (encoded by *pgm* gene). As such, both genes coding for moonlighting proteins, which were involved in acid tolerance, were also induced by oils. Furthermore, Pérez Montoro et al. (2018) found that the genes coding for some of the biomarker proteins involved in mucin adhesion of *L. pentosus* were also induced by oils; thus, we can suggest that this pre-adaptation may be involved also in improving the adhesion ability of probiotic *L. pentosus* in the gut besides their acid tolerance.

5. Conclusions

This study's novelty lies in the fact that it investigated whether probiotic *L. pentosus* strains of vegetable origin could become affected by vegetable edible oils, and further how pre-exposure to such oils contribute to their robustness. Pre-adaptation of probiotic *L. pentosus* strains with oils constitute a possible new strategy to: 1) increase their viability and growth, 2) their capacity to withstand several stresses such as acids or bile in food products/gut, and also 3) to improve their functional properties as a probiotic. Pre-adaptation with olive, argan, sunflower and linseed oils induced the expression of genes (i.e., *fus*, *rpsL*, *pgm*, *groEL*, *enol* and *prep*) coding for moonlighting proteins that are involved in several stress responses and other functions. Furthermore, pre-adaptation with oils may represent a new approach for probiotic product manufacture, thus improving the stability of bacteria during industrial processing that often risk compromising the viability and functionality of the strains.

Acknowledgments

We acknowledge Research Team (EI_BIO01_2017).

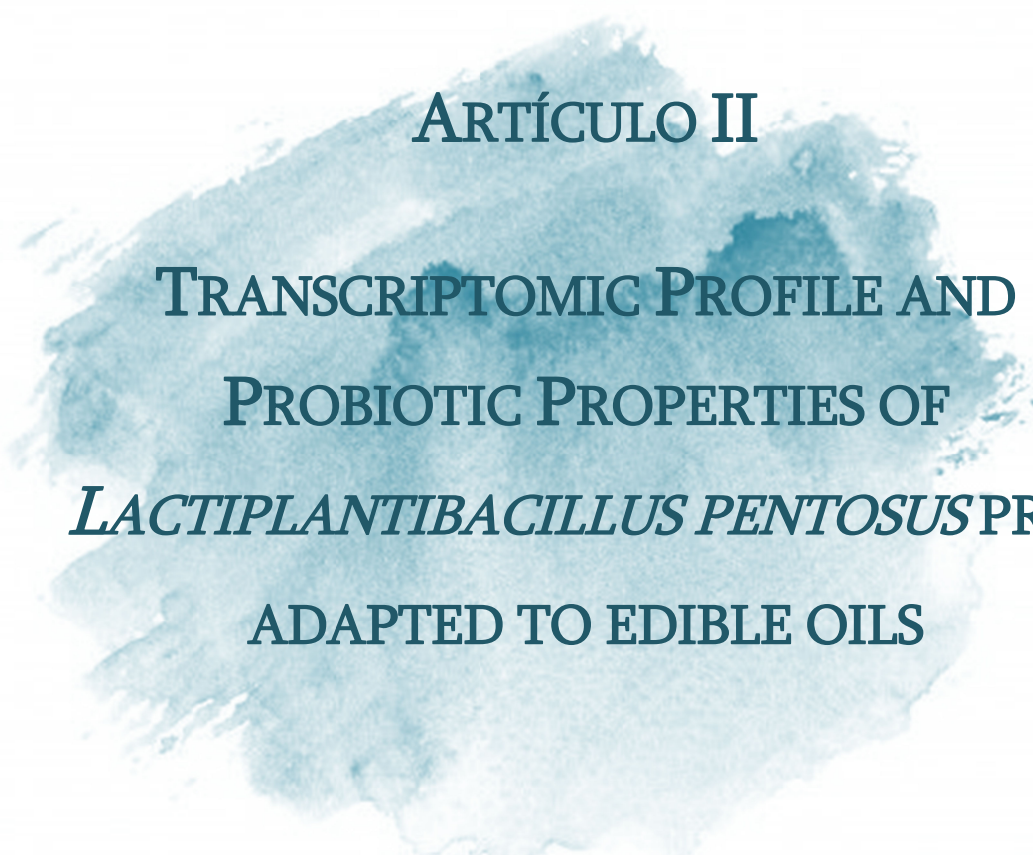
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.028>.

References

- Abriouel, H., Benomar, N., Cobo, A., Caballero, N., Fernández Fuentes, M.Á., Pérez-Pulido, R., et al. (2012). Characterization of lactic acid bacteria from naturally-fermented Manzanilla Aloreña green table olives. *Food Microbiology*, 32(2), 308–316.
- Abriouel, H., Pérez Montoro, B., Casado Muñoz, M. D. C., Lavilla Lerma, L., Hidalgo Pestaña, M., Caballero Gómez, N., et al. (2016). Complete genome sequence of a potential probiotic, *Lactobacillus pentosus* MP-10, isolated from fermented Aloreña table olives. *Genome Announcements*, 4(5) e00854-16.
- Argyri, A. A., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2016). Probiotics from the olive microbiota. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. In E. R. Farnworth, & C. P. Champagne (Eds.). *Bioactive foods in health promotion* (pp. 371–389). London: Academic Press.
- Baksh, B. (2014). *Probiotic and preservative uses of oil-emulsified probiotic encapsulations*. Patent No.: US 8,846,082 B2.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., Cocolin, L., et al. (2013). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International*, 50, 135–142.
- Buckenhuskes, H. J. (1997). Fermented vegetables. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.). *Food microbiology: Fundamentals and frontiers* (pp. 595–609). Washington: ASM Press.
- Casado Muñoz, M. C., Benomar, N., Lavilla Lerma, L., Knapp, C. W., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2016). Biocide tolerance, phenotypic and molecular response of lactic acid bacteria isolated from naturally-fermented Aloreña table to different physico-chemical stresses. *Food Microbiology*, 60, 1–12.
- De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2011). Stress responses of lactobacilli. In E. Tsakalidou, & K. Papadimitriou (Eds.). *Stress responses of lactic acid bacteria* (pp. 219–248). Boston: Springer US.
- Ebrahimi, B., Mohammadi, R., Rouhi, M., Mortazavian, A. M., Shojaee-Aliabadi, S., &

- Koushki, M. R. (2018). Survival of probiotic bacteria in carboxymethyl cellulose-based edible film and assessment of quality parameters. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 54–60.
- Feniman Moritz, C. M., Mores Rall, V. L., Júri Saeki, M., & Fernandes Júnior, A. (2012). Inhibitory effect of essential oils against *Lactobacillus rhamnosus* and starter culture in fermented milk during its shelf-life period. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 1147–1156.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization (Ed.). (2002). *Report of a Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food*.
- Galdeano, C. M., & Perdígón, 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), 673–681.
- Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G., & Faria, J. A. F. (2010). Functional foods and non dairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 292–302.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1–93.
- Mahmoudi, R., Payman, Z., Parviz, H., & Soma, N. (2014). Effect of *Teucrium polium* essential oil on the physicochemical and sensory properties of probiotic yoghurt: Use of the essential oil in probiotic yoghurt. *Journal of Food Processing and Preservation*, 3, 880–888.
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), 1021.
- Mathipa, M. G., & Thantsha, M. S. (2015). Cocktails of probiotics pre-adapted to multiple stress factors are more robust under simulated gastrointestinal conditions than their parental counterparts and exhibit enhanced antagonistic capabilities against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Gut Pathogens*, 7, 5.
- Millette, M., Cornut, G., Dupont, C., Shareck, F., Archambault, D., & Lacroix, M. (2008). Capacity of human nisin- and pediocin-producing lactic acid bacteria to reduce intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), 1997–2003.
- Nam, H. Y., Park, J. H., Kim, K., Kwon, I. C., & Jeong, S. Y. (2009). Lipid-based emulsion system as non-viral gene carriers. *Archives of Pharmacal Research*, 32, 639–646.
- Naser, S. M., Thompson, F. L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M., et al. (2005). Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology*, 151(Pt 7), 2141–2150.
- Nguyen, H. T., Truong, D. H., Kouhouné, S., Ly, S., Razafindralambo, S., & Delvigne, F. (2016). Biochemical engineering approaches for increasing viability and functionality of probiotic bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 867.
- Nousiainen, J., Javaninen, P., Setälä, J., & von Wright, A. (2004). Lactic acid bacteria as animal probiotics. In S. Salminen, A. von Wright, & A. Ouwehand (Eds.). *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (pp. 547–580). (3rd ed.). New York: Marcel Dekker.
- Nuolkaekul, S., Cook, M. T., Khutoryanskiy, V. V., & Charalampopoulos, D. (2013). Influence of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in fruit juices. *Food Research International*, 53, 304–311.
- Nychas, G. J. E. (1995). Natural antimicrobials from plants. In G. W. Gould (Ed.). *New methods of food preservation* (pp. 51–58). London: Blackie Academic Professional.
- Nychas, G. J. E., Tassou, C. C., & Skandamis, P. (2003). Antimicrobials from herbs and spices. In S. M. Roller (Ed.). *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods* (pp. 176–200). New York: CRC Press and Wood head Publishers.
- Pérez Montoro, B., Benomar, N., Caballero Gómez, N., Ennahar, S., Horvatovich, P., Knapp, C. W., et al. (2018). Proteomic analysis of *Lactobacillus pentosus* for the identification of potential markers of adhesion and other probiotic features. *Food Research International*, 111, 58–66.
- Pérez Montoro, B., Benomar, N., Lavilla Lerma, L., Castillo Gutiérrez, S., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2016). Fermented Aloréña table olives as a source of potential probiotic *Lactobacillus pentosus* strains. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1583.
- Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., & Adams, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43, 1–7.
- Riechart, R. D. (2002). Oilseed medicinals in natural drugs and dietary supplements - new functional foods. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 353–360.
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S., et al. (2005). Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: A comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6150–6158.
- Saulnier, D. M. A., Spinler, J. K., Gibson, G. R., & Versalovic, J. (2009). Mechanisms of probiosis and prebiosis: Considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 135–141.
- Shahdadi, F., Mirzaie, H., Kashaninejad, M., Khomeiri, M., Ziaifar, A. M., & Akbarian, A. (2015). Effects of various essential oils on chemical and sensory characteristics and activity of probiotic bacteria in drinking yoghurt. *Agricultural Communications*, 3(1), 16–21.
- da Silva, P. D., de Fátima Bezerra, M., dos Santos, K. M. O., & Correia, R. T. P. (2015). Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 62, 452–457.
- Ying, D. Y., Phoon, M. C., Sanguansri, L., Weerakkody, R., Burgar, I., & Augustin, M. A. (2010). Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: Relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. *Journal of Food Science*, 75, E588–E595.



ARTÍCULO II

TRANSCRIPTOMIC PROFILE AND
PROBIOTIC PROPERTIES OF
LACTIPLANTIBACILLUS PENTOSUS PRE-
ADAPTED TO EDIBLE OILS



Transcriptomic Profile and Probiotic Properties of *Lactiplantibacillus pentosus* Pre-adapted to Edible Oils

Esther Alonso García¹, Juan José de la Fuente Ordoñez¹, Leyre Lavilla Lerma¹, María D. Estudillo-Martínez², Sonia Castillo-Gutiérrez², Nabil Benomar¹, Charles W. Knapp³ and Hikmate Abriouel^{1*}

¹ Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, Jaén, Spain, ² Área de Estadística e Investigación Operativa, Departamento de Estadística e Investigación Operativa, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, Jaén, Spain, ³ Centre for Water, Environment, Sustainability and Public Health, Department of Civil and Environmental Engineering, University of Strathclyde, Glasgow, United Kingdom

OPEN ACCESS

Edited by:

Joaquín Bautista-Gallego,
University of Extremadura, Spain

Reviewed by:

Huaxi Yi,
Ocean University of China, China
Raul Raya,
CONICET Centro de Referencia para
Lactobacilos (CERELA), Argentina

*Correspondence:

Hikmate Abriouel
hikmate@ujaen.es

Specialty section:

This article was submitted to
Food Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 25 July 2021

Accepted: 10 September 2021

Published: 14 October 2021

Citation:

Alonso García E,
de la Fuente Ordoñez JJ,
Lavilla Lerma L,
Estudillo-Martínez MD,
Castillo-Gutiérrez S, Benomar N,
Knapp CW and Abriouel H (2021)
Transcriptomic Profile and Probiotic
Properties of *Lactiplantibacillus*
pentosus Pre-adapted to Edible Oils.
Front. Microbiol. 12:747043.
doi: 10.3389/fmicb.2021.747043

In this study, we determined whether pre-adapting *Lactiplantibacillus pentosus* strains, isolated from Aloreña green table olives, to vegetable-based edible oils improved their robustness and functionality; this may have great importance on their stress response during fermentation, storage, and digestion. Pre-adapting the strains to the corresponding oils significantly increased their probiotic functionality (e.g., auto-aggregation, co-aggregation with pathogens, and mucin adhesion), although results depended on the strain and the oil used for pre-adaptation. As such, we selected olive-adapted (TO) *L. pentosus* AP2-16, which exhibited improved functionality, and subjected it to transcriptomic profiling with the aim to understand the molecular mechanisms involved in the adaptation and the increased functionality. Global transcriptomic analysis of oil-adapted (olive or almond) and non-adapted (control) *L. pentosus* AP2-16 realized that 3,259 genes were expressed, with 2,779 mapped to the reference database. Comparative transcriptomic analysis showed that 125 genes (olive vs. control) and 108 genes (olive vs. almond) became significantly differentially expressed. TO *L. pentosus* AP2-16 responded by rerouting its metabolic pathways to balance energy production and storage, cell growth and survivability, host interactions (glycoconjugates), and other physiological features. As such, the pre-adaptation of lactobacilli with olive oil switches their transcriptional network to regulate robustness and functionality, possibly representing a novel approach toward the design and manufacture of probiotic products with improved stability and functionality.

Keywords: *Lactiplantibacillus pentosus*, probiotics, vegetable edible oils, transcriptomics, metabolic pathways

INTRODUCTION

Lactobacillus genus comprises a phenotypically and genetically diverse group of species able to colonize several nutrient-rich ecosystems associated with humans, animals, plants, soil, and foods (Bernardeau et al., 2006; Duar et al., 2017). Their role in food fermentation (e.g., dairy, meat, and vegetables), their GRAS (Generally Recognized As Safe) or QPS (a Qualified Presumption of Safety)

Abbreviations: TO, olive-adapted strain; TA, almond-adapted strain; C, control; DEG, differentially expressed genes.

status, and their preservative property make them potential candidates as starter and protective cultures in many artisanal and industrial applications (Bernardeau et al., 2008; Bintsis, 2018). Furthermore, some lactobacilli strains are potential probiotics, which are defined as “live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host” (Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization, 2002; Hill et al., 2014). Lactobacilli and bifidobacteria are dominant groups in the global probiotic market¹ since they exhibit health benefits beyond their basic nutritional value. However, lactobacilli of vegetable origin deserve special attention since their novelty and their singular functionality remain yet under-exploited (Granato et al., 2010; Ranadheera et al., 2010; Abriouel et al., 2012; Pérez Montoro et al., 2016).

Recently, a polyphasic approach based on whole genome sequences reclassified *Lactobacillus* genus into 25 genera, including the emended genus *Lactobacillus* (including host-adapted organisms; e.g., *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus apis*, and *Lactobacillus bombicola*), *Paralactobacillus*, and 23 novel genera (Zheng et al., 2020). This new reclassification reflects the phylogenetic position of lactobacilli groups into robust clades with shared ecological and metabolic properties, with probiotics largely distributed in the new different genera separated from the original *Lactobacillus* genus; yet, they remained within the family *Lactobacillaceae* and “lactobacilli.” The high heterogeneity of lactobacilli is of great importance for the probiotics industry, since health benefits are inherently specific to the strain and host response. As such, health benefits associated with homeostasis maintenance and disease prevention may be disclosed in the specific cross-talk between the probiotic and the host, which is potentiated by the colonization of the gastrointestinal tract (GIT) and adherence to mammalian cells (Corthésy et al., 2007; Bienenstock et al., 2013; Kemgang et al., 2014; Marchix et al., 2018). Furthermore, specific probiotic features of each strain may be potentiated by several factors before and after consumption; in this sense, several studies aimed to increase the stress response in lactobacilli to stressors, such as extreme temperature, pH, osmotic pressure, oxygen, and starvation, during which multiple physiological and molecular mechanisms become involved (De Angelis and Gobbetti, 2011). Diet affects probiotic functionality; thus, substances in the diet can enhance the activity of probiotics, such as prebiotics, and conversely there are also compounds that inhibit or decrease (i.e., stress) the probiotic activity of some strains (Ranadheera et al., 2010; Markowiak and Śliżewska, 2017). Vegetable edible oils are widely consumed as a component of the diet, and some oils are extensively used in the Mediterranean diet, such as olive oil; however, argan oil is only consumed in a few regions (i.e., Morocco). In this sense, Piekarska-Radzik and Klewicka (2021) recently reported a mutual influence of polyphenols (present in oils) and *Lactobacillus* sp. in foods, by which the adaptations in *Lactobacillus* genome (under the

influence of polyphenols) occur and the influence of *Lactobacillus* spp. bacteria to generate antimicrobial properties of polyphenols becomes possible.

This work explored the impact of edible oils (e.g., olive, argan, soy, linen, corn, sunflower, and almond) on probiotic features of *Lactiplantibacillus pentosus* (formerly *Lactobacillus pentosus*) isolated from naturally fermented Aloreña table olives (Abriouel et al., 2012; Pérez Montoro et al., 2016), which with further adaptations may improve food production. Up to now, *L. pentosus* has been currently investigated for its role in food fermentation—as the most commonly isolated bacteria from vegetables—and also for its probiotic benefits as a starter culture for the production of foods of dairy origin (Escobar-Ramírez et al., 2020). Thus, the aim of the present study is the application of oil-adapted *L. pentosus* with added value in foods either as starter or protective culture or as a probiotic adjunct in different foods (dairy and non-dairy) and the eventual use of the probiotic oils as a microencapsulation-based formulation. Pre-adaptation with the mentioned oils showed, in a previous study by Alonso García et al. (2019), that the corresponding oils significantly increased cell viabilities and also induced gene expression (e.g., *fus*, *rpsL*, *pgm*, *groEL*, *enol*, and *prep*) for moonlighting proteins involved in several stress responses and other functions. Furthermore, increasing robustness and functionality of adapted strains may improve the lactic acid fermentation food production as starter cultures with greater resistance to acids and resilience to less-optimal environmental conditions. As such, this study examined the impact of oils (before and after pre-adaptation) on probiotic activities such as adhesion, auto-aggregation, and antimicrobial activity. Furthermore, here we aimed to decipher the molecular mechanisms underlying oil effects on *L. pentosus* probiotic activity at transcriptomic level and identify the bacterial effectors involved.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and Growth Conditions

Seven strains of *L. pentosus* (previously *L. pentosus*) isolated by Abriouel et al. (2012) from naturally fermented Aloreña green table olives, developed by four small–medium enterprises from Malaga (Spain), were used in this study. Strains were adapted to different oils: sunflower, olive, linen, soy, corn, almond, and argan according to methods by Alonso García et al. (2019). Strains were routinely cultured at 30°C in Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Fluka, Madrid, Spain) for 24 h and kept in 20% glycerol at –80°C for long-term storage.

Effect of Oils on Probiotic Properties

All probiotic properties were studied under the following conditions: (1) strains in the presence of 2% of different vegetable edible oils (sunflower, olive, linen, soy, corn, almond, and argan), (2) strains pre-adapted with oils according to Alonso García et al. (2019) and comparing in all cases with (3) strains never exposed to oils (controls).

¹<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/probiotic-market-advanced-technologies-and-global-market-69.html>

Auto-Aggregation

The auto-aggregation capacity of lactobacilli was determined as reported by Vizoso Pinto et al. (2007). Overnight cultures of lactobacilli strains were grown in the presence or the absence of 2% oil; strains were harvested, washed, and resuspended in sterile Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS). After 2 h at room temperature, 100 μ l of the suspension was removed and transferred to 900 μ l DPBS, and the OD580 (optical density at 580 nm) was measured at times 0 and 2 h. The percentage of auto-aggregation was calculated as follows:

$$\frac{\text{OD at time 0} - \text{OD at time 2 h}}{\text{OD at time 0}} \times 100$$

Co-aggregation

The co-aggregation capacity of lactobacilli (strains grown in the presence or the absence of 2% oil and strains pre-adapted with oils) with pathogenic bacteria (*Listeria innocua* CECT 910 and *Salmonella* Enteritidis UJ3449) was carried out according to Vlková et al. (2008). First, 10 ml of overnight cultures of lactobacilli, grown in the presence of 2% oil, and pathogenic bacteria were each harvested, twice washed with sterile DPBS, and then resuspended in DPBS to OD₆₀₀ = 1.0. In new tubes, 3 ml of each suspension (*L. pentosus* and one pathogenic bacteria) were mixed, and the OD_{600 nm} of upper suspension were measured at time = 0 and time = 1 h.

The percentage of co-aggregation was calculated as follows:

$$1 - \frac{\text{OD at time 1 h}}{\text{OD at time 0}} \times 100$$

Mucin Adhesion

In vitro evaluation of the mucin adhesion was performed according to Pérez Montoro et al. (2018) in 96-well plates. One hundred microliters of a mucin solution (1 mg/ml in sterile DPBS, previously filtered and stored at -20°C) was added. The immobilized mucin remained for 1 h at room temperature and was then incubated overnight at 4°C ; after this, the wells were washed twice with 200 μ l of sterile DPBS (pH 7.2) before adding 100 μ l of overnight bacterial suspension in DPBS. Plates were incubated for 1 h at 37°C , washed five times with 200 μ l of citrate buffer to remove non-adhered bacteria, and finally resuspended in 200 μ l of 0.5% Tween to harvest the adhered bacteria. Viable counts were determined by plating onto MRS agar, and the percentage of mucin-adhered bacteria was calculated as follows:

$$\% \text{ Relative adhesion} = \frac{\frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \text{ after adhesion}}{\frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \text{ before adhesion}} \times 100.$$

Transcriptomic Analysis of Oil Pre-adapted vs. Non-adapted Strains

RNA Extraction

RNA were extracted from the non-adapted and the *L. pentosus* AP2-16 adapted with two oils (almond and olive); extractions started with the addition of 500 μ l of TESL (25 mM Tris, 10 mM EDTA, 20% sucrose, and 20 mg/ml lysozyme; all from Sigma) and 20 μ l mutanolysin (20 U) to cell pellets, followed by incubation at 37°C for 60 min with slight shaking. After this,

300 μ l of Tri Reagent was added to the lysates and centrifuged to separate cellular debris, and then the supernatants were transferred into an RNase-free tube before proceeding to RNA purification using Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research, CA, United States) according to the manufacturer's instructions. RNA quantification and quality assessment were carried out using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific), and TapeStation. RNA concentrations were adjusted to 2 $\mu\text{g/ml}$ per sample for sequencing.

RNA Sequencing and Bioinformatic Analysis

The Illumina TruSeq Stranded Total RNA Kit (Illumina, Inc., San Diego, CA, United States) was used to prepare the RNA samples for the reduction of bacterial rRNA and sequencing according to the manufacturer's instructions. Sequencing was done on the Illumina NovaSeq platform (2 \times 150 bp read lengths) at Lifesequencing S.L. (Valencia, Spain).

Raw sequencing reads were processed with the "reformat.sh" script from the BBTtools suite (Bushnell; sourceforge.net/projects/bbmap/) to remove low quality bases (Q20) from both ends and short sequences (40 nucleotides). Filtered reads were then scanned for traces of ribosomal RNA with "sortmerna" v2.1 (Kopylova et al., 2012), parameters and databases by default. Resulting reads were aligned to the protein-coding transcriptome of *L. pentosus* BGM48 (GCA_002850015.1) using "Salmon" v1.1 (Patro et al., 2017), with default parameters. Counts were collapsed with "tximport" v1.12.3 (Soneson et al., 2015) and analyzed with "DESeq2" v1.24.0 (Love et al., 2014) packages on R v3.6. Only genes with 10 or more counts across all samples were kept for further comparisons. $p_{adj} < 0.05$ and $|\log_2 FC| > 1.5$ (where FC represents "fold change") was requested for considering whether a gene was differentially expressed between the studied groups. Gene ontology (GO) terms were obtained from the *L. pentosus* BGM48 page of Uniprot. Only terms with two or more counts across differentially expressed genes (DEG) of at least one comparison were used to generate the figures. Metabolic pathways images were generated with the "Pathview" v1.24.0 (Luo and Brouwer, 2013) R package, and nodes were colored by adding $\log_2 FC$ of its genes for each comparison. Volcano plots were generated with the Enhanced Volcano v1.2 (Blighe et al., 2020) R package.

Quantitative Real-Time PCR Validation of the Transcriptome Data

To validate the transcriptome data, four genes were selected for real-time PCR (RT-PCR) experiments with *pheS* gene as internal reference (Table 1). Total RNA was extracted from *L. pentosus* AP2-16 strains pre-adapted with either olive or almond oil and non-adapted strain (control) as described above. RNAs were adjusted to a concentration of 500 ng/ml and frozen at -80°C until required for analysis.

The expression of selected genes (Table 1) was analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) using SensiFASTTM SYBR & Fluorescein One-Step Kit (BIOLINE). Phenylalanyl-tRNA synthase alpha-subunit (*pheS*) gene was used as a housekeeping gene (Naser et al., 2005), and a no-template

TABLE 1 | Primers and PCR conditions used in this study.

Gene (product)	Primer	Sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	PCR product size (bp)	References
<i>greA</i> (Transcription elongation factor GreA)	<i>greAF</i>	TAACCGCGATCACCTTAAC	56	212	This study
	<i>greAR</i>	ACTGGATATTGGCAAGTTTCG			
BB562_01140 (Cysteine synthase)	<i>cysF</i>	ATGCTCGTACCCATATCCA	56	200	This study
	<i>cysR</i>	TCAATGATGGTGGTCGTGG			
BB562_00810 (PTS beta-glucoside transporter subunit EIIBC)	<i>ptsF</i>	TTATAAATTAACCGCGGCAG	56	200	This study
	<i>ptsR</i>	ATCAAGGTGACTTACTCGGT			
BB562_11880 (Transketolase)	<i>trakF</i>	ATGAACTTAA GCTGAAAGCG	56	199	This study
	<i>trakR</i>	ACCGCATGGCCTTTCGATT			
<i>pheS</i> (Phenylalanyl-tRNA synthase alpha subunit)	<i>pheS-21F</i>	CAYCCNGCHCGYGAYATGC	60	411	Naser et al., 2005
	<i>pheS-23R</i>	GGRTGRACCATVCCNGCHCC			

control was used as a negative control. Quantitative PCRs (qPCRs) were performed in triplicate 20- μ l reactions on a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System from BioRad. The qPCR conditions were as follows: pre-denaturation at 95°C for 10 min, denaturation at 95°C for 15 s, annealing at X°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s (Table 1); fluorescence signals were collected during annealing and extension, and the whole process was repeated for 40 cycles. Melting-curve analysis included 95°C for 10 s, 65°C for 5 s, and 95°C for 50 s.

Statistical Analysis

Except for transcriptome analysis (as described in section “RNA Sequencing and Bioinformatic Analysis”), statistical analyses were conducted using Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, United States) program to determine averages and standard deviations. All analyses were performed in triplicate. Statistical treatment of data was done by analysis of variances in XLStat by Addinsoft 2020.2.2 (New York, United States) software, using Shapiro–Wilk test and Levene test to check data normality and Tukey honestly significant difference test to determine the significance of differences between strains, where $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Principal component analysis (PCA) was used to examine variation and highlight correlations between probiotic properties (e.g., auto-aggregation, co-aggregation, and mucin adhesion capacity); *L. pentosus* strains and oils were appraised by Pearson’s correlation coefficient. This multivariate statistical projection method (PCA) was also applied to reduce the dimensionality and analyze the data. Furthermore, dendrograms were designed following a

hierarchical analysis according to Ward’s method and the squared Euclidean distance.

RESULTS

Probiotic Profile of Grown or Pre-adapted *L. pentosus* Strains With Edible Oils

Figure 1A presents the auto-aggregation, co-aggregation of *L. pentosus* with pathogens and mucin adhesion in the absence and the presence of different oils. Results were analyzed by PCA to reduce the number of dimensions to two principal components (F1 and F2), which together explained 72.85% of the total variance. In this context, F1 represented 45.93% variability and comprised co-aggregation variables; however, F2 represented 26.92% variability containing mainly auto-aggregation and mucin adhesion variables (Figure 1A). PCA biplot highlighted the dissimilarity of probiotic *L. pentosus* strains regardless of the oils used; however, PCA highlighted the high correlation between mucin adhesion and auto-aggregation, which did not correlate well with co-aggregation properties (Figure 1A). Furthermore, high correlation of co-aggregation with *Listeria innocua* CECT 910 and *Salmonella* Enteritidis UJ3449 was detected. PCA of strains showed four defined groups regardless of the oils used: G1 (high F1 and F2 components) containing CF1-6, AP2-15, and AP2-16; G2 (high F2) represented by *L. pentosus* CF2-10; G3 (low F1 and F2 components) contained *L. pentosus* CF1-39 and MP-10 strains; and G4, with low mucin adhesion, represented by *L. pentosus* CF2-12. Regarding oils, no differentiated groups were established; however, almond oil

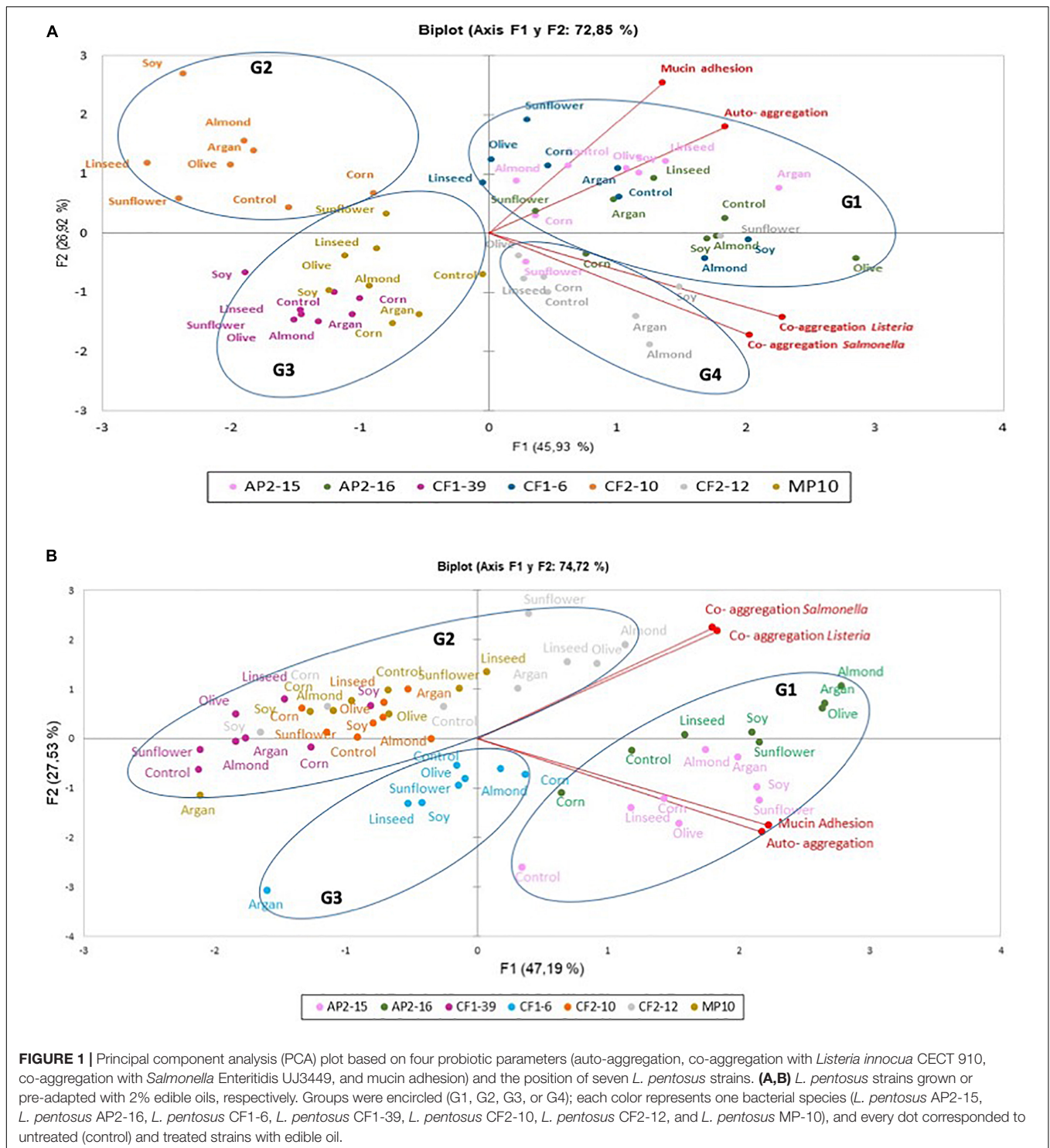


FIGURE 1 | Principal component analysis (PCA) plot based on four probiotic parameters (auto-aggregation, co-aggregation with *Listeria innocua* CECT 910, co-aggregation with *Salmonella* Enteritidis UJ3449, and mucin adhesion) and the position of seven *L. pentosus* strains. **(A,B)** *L. pentosus* strains grown or pre-adapted with 2% edible oils, respectively. Groups were encircled (G1, G2, G3, or G4); each color represents one bacterial species (*L. pentosus* AP2-15, *L. pentosus* AP2-16, *L. pentosus* CF1-6, *L. pentosus* CF1-39, *L. pentosus* CF2-10, *L. pentosus* CF2-12, and *L. pentosus* MP-10), and every dot corresponded to untreated (control) and treated strains with edible oil.

showed negative values for auto-aggregation and mucin adhesion variables (**Figure 1A**).

Oil-adapted *L. pentosus* strains had different induction responses, in respect to probiotic properties, when compared with those grown in the presence of oils (**Figure 1**). In this sense, PCA biplot showed that the two principal components

(F1 and F2) together explained 74.73% of the total variance (**Figure 1B**). Thus, F1 explained 46.61% of the variability and mainly represented auto-aggregation and mucin adhesion variables; however, F2 represented 28.12% variability with co-aggregation variables (**Figure 1B**). Pearson correlations indicated highly positive and statistically significant correlation between

co-aggregation with *Listeria innocua* CECT 910 and *Salmonella* Enteritidis UJ3449, and (with PCA) between auto-aggregation and mucin adhesion (**Figure 1B**).

Principal component analysis biplot analysis determined three defined groups of *L. pentosus* strains: G1 represented by *L. pentosus* AP2-15 and AP2-16 strains being *L. pentosus* AP2-16 with high values in both F1 and F2 factors (i.e., olive, argan, and almond adapted strain) and thus represented the best candidate for further study; G2 represented by *L. pentosus* CF1-39, CF2-10, CF2-12, and MP-10 with positive values for co-aggregation variables for *L. pentosus* CF2-12 the best strain with these traits; and G3 represented by *L. pentosus* CF1-6 with negative F1 and F2 variables (**Figure 1B**).

Hierarchical clustering was used to identify similarities using Euclidean distances between the oil treatments used in the adaptation of the selected *L. pentosus* AP2-16 on the basis of its probiotic properties (**Figure 2**). The oil-adapted *L. pentosus* AP2-16 with almond, argan, and olive oils were characterized by highly exhibited probiotic properties (i.e., auto-aggregation, co-aggregation with *Listeria innocua* CECT 910 and *Salmonella* Enteritidis UJ3449, and mucin adhesion) and high values in F1 and F2 components in PCA analysis (**Figure 1B**). According to cluster analysis, olive and almond oils were clearly distinguished (**Figure 2**) belonging to different groups related to auto-aggregation (**Figure 2A**), co-aggregation with *L. innocua* CECT 910 (**Figure 2B**), co-aggregation with *S. Enteritidis* UJ3449 (**Figure 2C**), and mucin adhesion capacity (**Figure 2D**).

Global Transcriptomic Analysis of the Oil-Adapted *Lactiplantibacillus pentosus*

Pre-adapted *L. pentosus* AP2-16 with almond and olive oils were selected on the basis of their high values of all probiotic properties and their dissimilarity in hierarchical clustering of oils (**Figure 2**). They were subjected to transcriptomic analysis, via Illumina Novaseq platform, to compare gene expressions with those of non-adapted control. Raw data could be downloaded from ENA European Nucleotide Archive Database under accession numbers ERR5262947 to ERR5262954, and correlation of gene expression levels between three independent biological replicates was shown by the Pearson correlation coefficient. Clean reads of the three libraries were mapped to *L. pentosus* BGM48 reference genome. Among these reads, about 2,779 genes from 3,259 (85.27%) were successfully mapped (**Supplementary Table 1**). The degrees of similarity were evaluated between the different samples using a PCA plot (**Supplementary Figure 1A**) and a heat map (**Supplementary Figure 1B**); the condition with greatest difference from the control was TO (Olive Treatment), while TA (Almond Treatment) did not seem different from the “control” condition (**Supplementary Figure 1**). Comparative analysis showed TO *L. pentosus* AP2-16 had 125 and 108 DEGs vs. control (C) and almond-adapted (TA) *L. pentosus* AP2-16, respectively (**Figure 3**). However, no differential expressed genes (\log_2 “fold change” > 1.5 at statistically significance level $p < 0.05$) were detected between TA and control (C) of *L. pentosus* AP2-16 (**Figure 3**). GO terms analysis was used to decipher the biological processes involved in the adaptation of

L. pentosus AP2-16 to each oil comparing with (non-adapted) controls. While adaptation with almond oil did not produce significant changes in gene expression, the olive-oil adaptation upregulated genes whose putative functions were classified (by GO terms) as biological processes, molecular function, and cellular component (**Figure 4**).

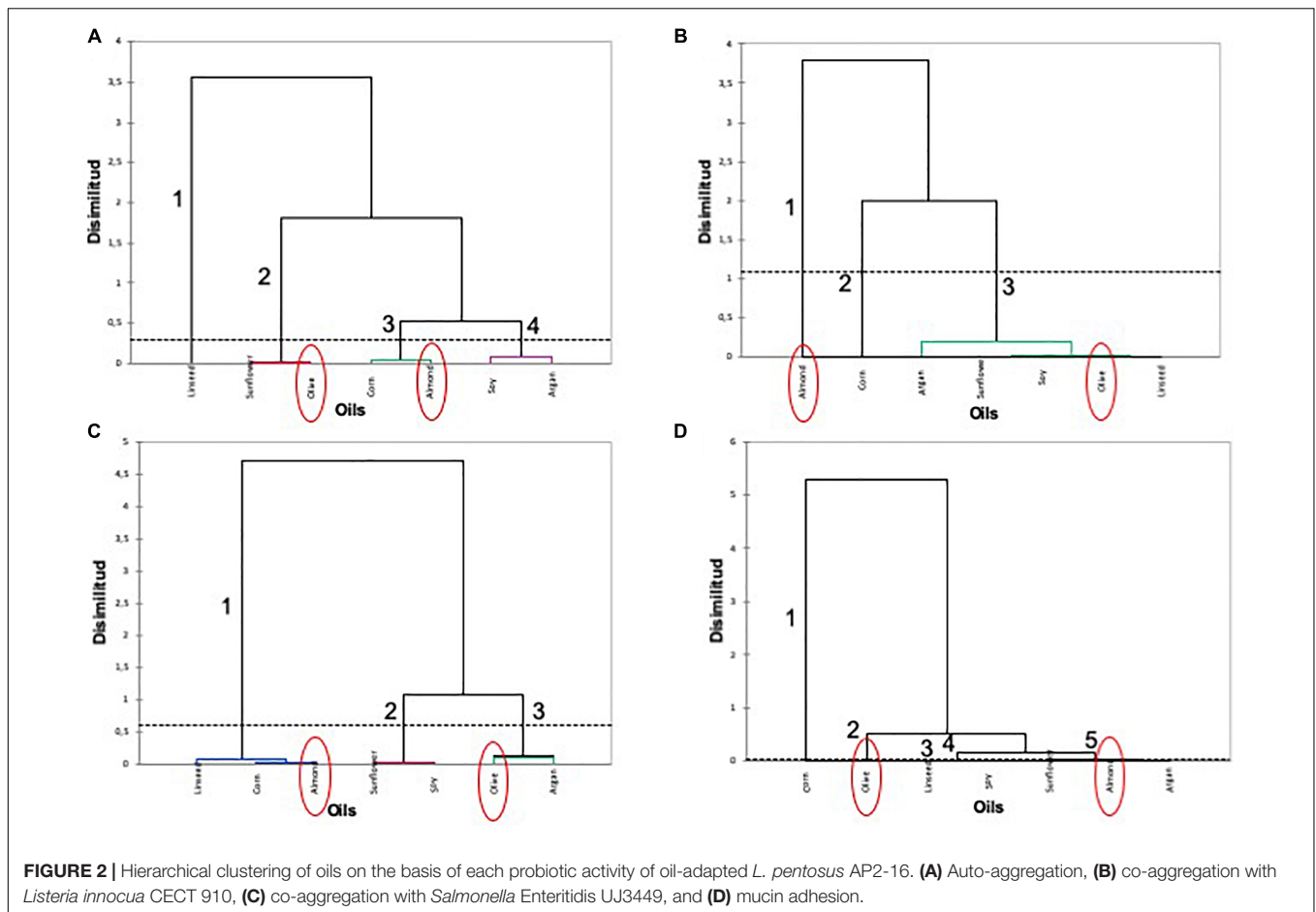
Figure 4 clearly shows the number of DEGs up-regulated in TO vs. C, and TO vs. TA, were related with carbohydrate metabolism, amino acid biosynthesis, membrane and cytoplasm components, and several other metabolic activities. However, the down-regulated DEGs corresponded to genes involved in translation and ribosome components and activity (**Figure 4**).

Analysis of TO vs. C

Comparative transcriptomics of TO vs. C indicated that among 2,779 genes, 125 genes were differentially expressed ($p < 0.05$): 60 genes were up-regulated and 65 were down-regulated, involving 18 pathways (**Figure 3** and **Supplementary Table 1**). GO term analysis revealed that adaptation with olive oil up-regulated metabolic pathways: glycogen biosynthetic process, carbohydrate metabolism, amino acid biosynthesis, membrane and cytoplasm components, and several other metabolic activities (e.g., DNA binding transcription factor, kinase activity, catalytic activity, hydrolase activity, oxidoreductase activity, and metal ion binding; **Figure 4A**). However, the downregulation of translation, ribosome (small and large subunit), organic phosphonate catabolic process, rRNA binding, tRNA binding, and magnesium ion binding metabolic pathways was detected in the adapted strain (**Figure 4A**). Other genes involved in ATP binding, ATPase activity, and DNA binding were up-regulated and down-regulated (**Figures 4A, 5**).

Olive Oil Adaptation Changes Carbohydrate Metabolism in *L. pentosus* AP2-16

Glycolysis/gluconeogenesis, galactose metabolism, pentose phosphate pathway (PPP), and starch and sucrose metabolism were increased in TO *L. pentosus* AP2-16 (**Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**). In this sense, the gene encoding 6-phospho-beta-glucosidase (BB562_01895 = BB562_02820) became up-regulated by 1.65-fold (**Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**); this is involved in glycolysis/gluconeogenesis and also in starch or glycogen storage (**Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**). Similarly, the transketolase coding gene (BB562_03115 = BB562_11880) involved in PPP was up-regulated by 2.04-fold (**Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**), and enhanced galactose metabolism was mediated by the over-expression of genes coding for sucrose-6-phosphate hydrolase (BB562_00815) and beta-galactosidase (BB562_13280; **Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**). Regarding starch and sucrose metabolism, up-regulated genes coding for 1,4-alpha-glucan branching enzyme (BB562_00085), glucose-1-phosphate adenylyltransferase (BB562_00090), phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside transporter subunit EIIBC



(BB562_00810), sucrose-6-phosphate hydrolase (BB562_00815), and alpha, alpha-phosphotrehalase (BB562_01175) were detected (**Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**).

Olive Oil Adaptation Changes Nucleotide and Amino Acid Metabolism in *L. pentosus* AP2-16

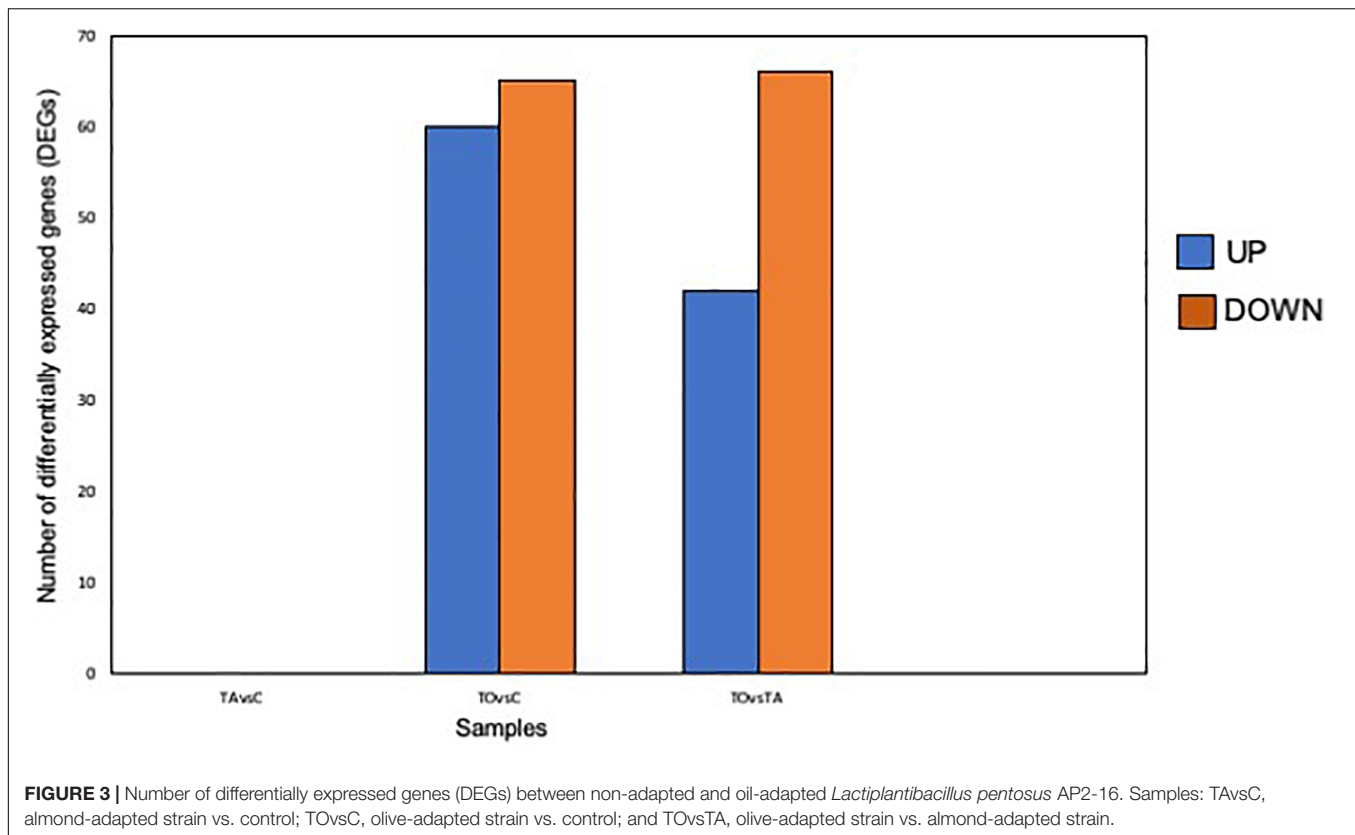
Pathway analysis revealed that purine metabolism was down-regulated including the expression of genes coding for adenylate kinase (BB562_12000) and 3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase (BB562_14870) decreasing by 1.91- and 1.67-fold, respectively (**Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**). However, pyrimidine metabolism was enhanced, and the corresponding up-regulated genes were those encoding for aspartate carbamoyltransferase (BB562_04230) and dihydroorotase (BB562_04235; **Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**).

Several genes involved in amino acid metabolism were up-regulated such as cysteine and methionine; phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis; and histidine metabolism. However, thiamine metabolism decreased, and alanine, aspartate, and glutamate metabolism was down-regulated and up-regulated (**Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**). The up-regulated genes were aspartate carbamoyltransferase

(BB562_04230; alanine, aspartate, and glutamate metabolism); cysteine synthase (BB562_01140; cysteine and methionine metabolism); histidinol-phosphatase (BB562_04885; histidine metabolism); and genes coding for chorismate synthase (BB562_07540), 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase (BB562_07550), and shikimate dehydrogenase (BB562_11875), representing phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosyntheses, respectively. However, the down-regulated genes corresponded to asparagine synthase (BB562_02530; asparagine synthesis and glutamine hydrolysis; **Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**) and adenylate kinase thiamine metabolism (BB562_12000; thiamine metabolism; **Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**). On the other hand, amino sugar and nucleotide sugar metabolism was increased with up-regulated glucose-1-phosphate adenyltransferase (BB562_00090; **Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**).

Olive Oil Adaptation Changes Other Metabolic Pathways in *L. pentosus* AP2-16

In metabolic pathways involved in the transport of a variety of substrates, such as ATP-binding cassette (ABC) transporters and PTS, various upregulations and downregulations were



observed (**Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**). The genes encoding spermidine/putrescine ABC transporter permease (BB562_01450) and spermidine/putrescine ABC transporter ATP-binding protein (BB562_01455) were up-regulated in response to olive adaptation in *L. pentosus* AP2-16 (**Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**). However, the genes coding for an iron ABC transporter ATP-binding protein (BB562_08670), glycerol-3-phosphate ABC transporter permease (BB562_10810 and BB562_10815), glycerol-3-phosphate ABC transporter ATP-binding protein (BB562_10820), phosphate ABC transporter substrate-binding protein (BB562_13370 = 13420), phosphonate ABC transporter ATP-binding protein (BB562_13485), phosphonate ABC transporter permease protein PhnE (BB562_13490 gene was 4.29-fold down-regulated; **Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**). With respect to PTS, PTS beta-glucoside transporter subunit EIIBCA was up-regulated (BB562_00810 gene), and PTS sugar transporter subunit IIB was down-regulated (BB562_02830 = BB562_16190; **Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**).

On the other hand, metabolic pathways involved in regulatory systems such as two-component system were mainly up-regulated, such as genes phosphatase (BB562_00305 = BB562_06980), antiholin LrgB (BB562_06180), and a hypothetical protein (BB562_06185; **Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**). However, a phosphate ABC transporter substrate-binding protein was down-regulated (BB562_13370 = BB562_13420). The genes (BB562_11985,

BB562_12020, BB562_12025, BB562_12030, BB562_12035, BB562_12040, BB562_12045, BB562_12050, BB562_12055, BB562_12060, BB562_12065, BB562_12070, BB562_12080, BB562_12085, BB562_12090, BB562_12095, and BB562_12100), and the genes encoding 30S and 50S ribosomal proteins involved in nucleic acid and protein synthesis were down-regulated (**Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**). With respect to other metabolic pathways, phosphonate and phosphinate metabolism was down-regulated, while sulfur metabolism was up-regulated (**Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**). The down-regulated genes and encoding for phosphonoacetaldehyde hydrolase (BB562_13500) and 2-aminoethylphosphonate-pyruvate transaminase (BB562_13505) are involved in phosphonate catabolism (**Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**). Nevertheless, a cysteine synthase gene (BB562_01140) involved in sulfur metabolism and cysteine synthesis was up-regulated (**Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 2**).

Analysis of TO vs. TA

Comparative transcriptomics of TO vs. TA (those pre-adapted with olive and almond oils, respectively) indicated that among 2,779 genes, 108 genes were differentially expressed ($p < 0.05$): 42 genes up-regulated and 66 down-regulated, involving 21 pathways (**Figures 3, 5, Supplementary Figure 3, and Supplementary Table 2**). GO terms analyses between TO vs. C (**Figure 4A**) and TO vs. TA (**Figure 4B**) indicated similar results, although differences in the level of DEGs were detected

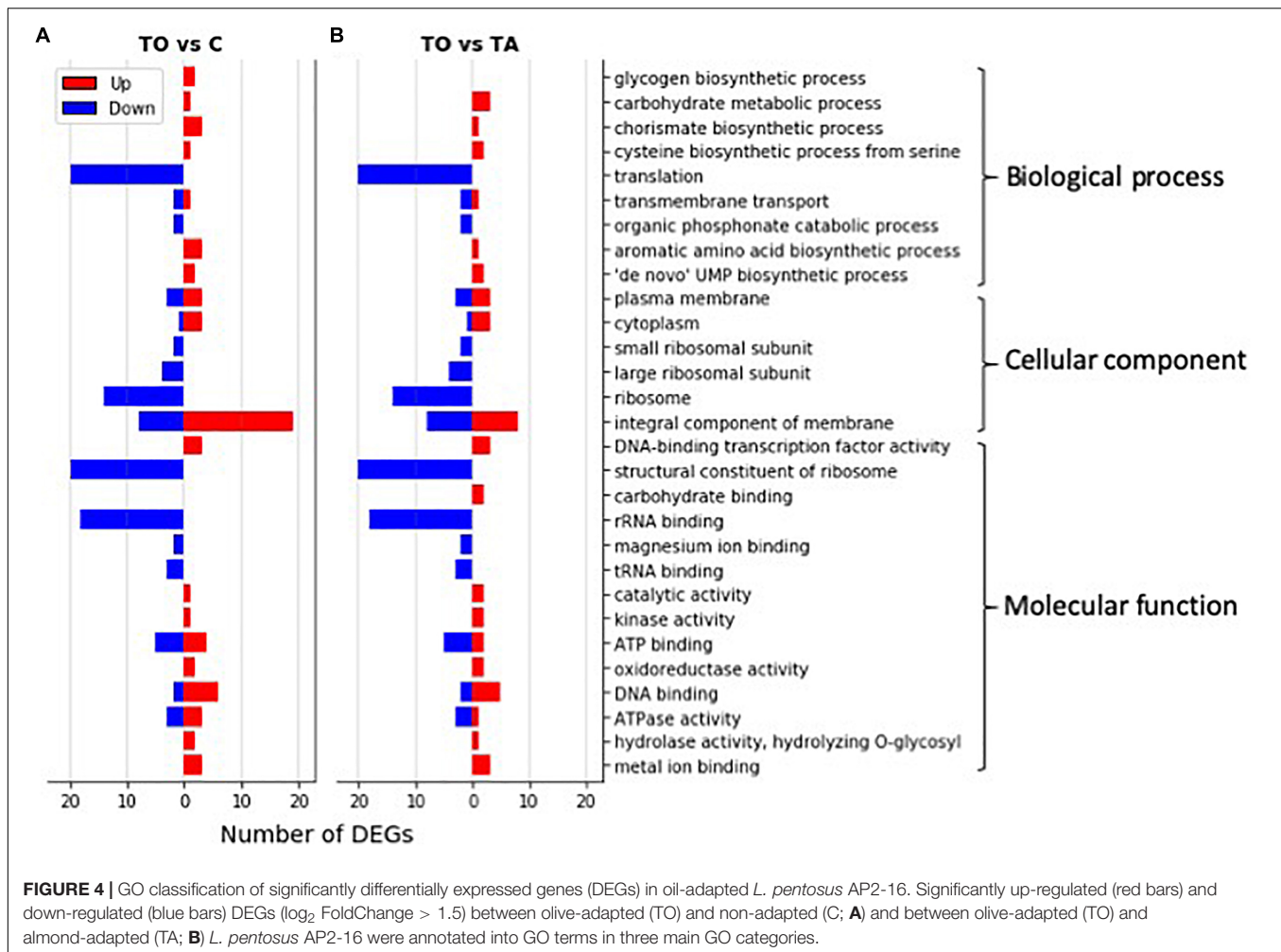


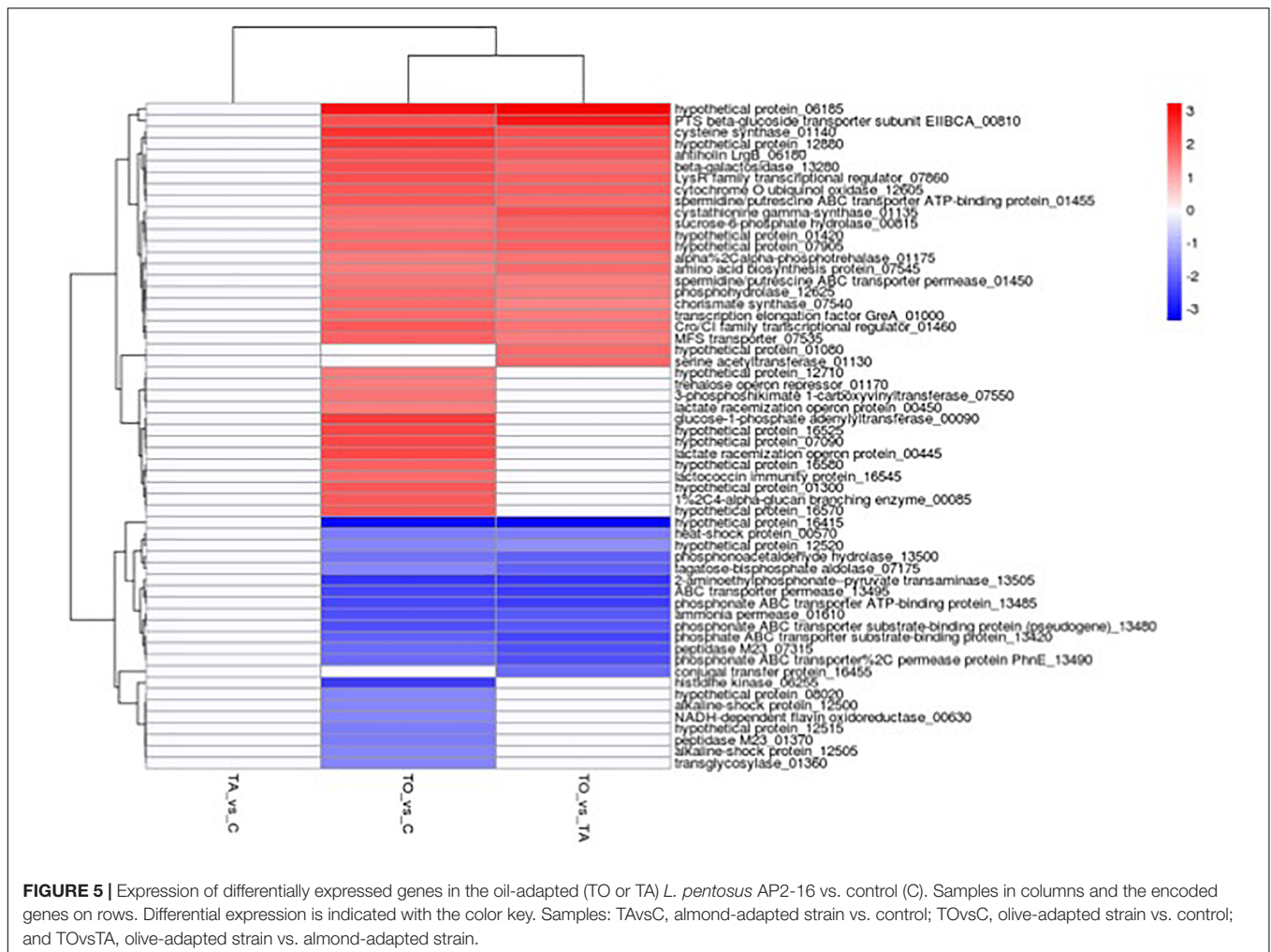
FIGURE 4 | GO classification of significantly differentially expressed genes (DEGs) in oil-adapted *L. pentosus* AP2-16. Significantly up-regulated (red bars) and down-regulated (blue bars) DEGs (\log_2 FoldChange > 1.5) between olive-adapted (TO) and non-adapted (C; **A**) and between olive-adapted (TO) and almond-adapted (TA; **B**) *L. pentosus* AP2-16 were annotated into GO terms in three main GO categories.

(Figure 4). Thus, several pathways were similarly regulated; no significant changes were described between control and TA *L. pentosus* AP2-16. However, few changes were recorded, and here, we will highlight these changes with respect to the data analyzed in the previous section.

With respect to changes in carbohydrate metabolism (Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 3) produced by olive-oil adaptation vs. almond-oil adaptation of *L. pentosus* AP2-16, additional genes involved in glycolysis/gluconeogenesis were up-regulated in comparison with TO vs. C, such as genes encoding galactose mutarotase (BB562_08780) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (BB562_15510; Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 3). Furthermore, phosphoenolpyruvate carboxykinase (BB562_15510) was also involved in citrate-cycle metabolism (Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 3) and pyruvate metabolism (Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 3), and galactose mutarotase was also involved in galactose metabolism (Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 3). The up-regulated genes encoding proteins involved in PPP were the same as reported in TA vs. C (Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 3).

Regarding starch and sucrose metabolism, all the genes up-regulated in the case of TO vs. C were detected, except two genes coding for 1,4- α -glucan branching enzyme (BB562_00085) and glucose-1-phosphate adenylyltransferase (BB562_00090; Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 3).

Regarding changes in nucleotide metabolism, upregulation and downregulation of genes encoding proteins involved in purine and pyrimidine metabolism were the same as in TO vs. C (Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 3). Amino acid metabolism (Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 3) exhibited similarity in alanine, aspartate, glutamate, and thiamine metabolism (Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 3); however, few changes were detected in other amino acid metabolic pathways. In this manner, additional up-regulated genes included cysteine and methionine metabolism such as serine acetyltransferase (BB562_01130; Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 3). On the other hand, we detected the absence of up-regulated genes coding histidinol-phosphatase (BB562_04885) involved in histidine metabolic pathway, glucose-1-phosphate adenylyltransferase (BB562_00090) involved in amino sugar and nucleotide sugar metabolism, and 3-phosphoshikimate



1-carboxyvinyltransferase (BB562_07550) and shikimate dehydrogenase (BB562_11875) implicated in phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis (Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 3).

Concerning other metabolic pathways (Supplementary Figure 3), similar behaviors were observed in the induction of genes coding for PTS, two-component system, and phosphonate and phosphinate metabolism (Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 3). On the other hand, ABC transporters, ribosome, and sulfur metabolism exhibited some changes regarding the genes up-regulated or down-regulated in TO vs. TA, when comparing with TO vs. C (Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 3). In this case, we observed the absence of down-regulated gene BB562_10815 encoding glycerol-3-phosphate ABC transporter permease (ABC transporters), down-regulation of two additional genes coding for ribosome proteins (BB562_12015 and BB562_11990; Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 3), and encoding serine acetyltransferase (BB562_01130) involved in sulfur metabolism (Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 3). Other new metabolic pathways were differentially repressed or induced between TO and TA, such as bacterial secretion system through

upregulation of a gene encoding a conjugal-transfer protein (BB562_16455; Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 3), RNA polymerase via downregulation of DNA-directed RNA polymerase subunit alpha gene (BB562_11980; Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 3), and sulfur relay system by the upregulation of a gene coding for molybdopterin biosynthesis protein MoeB (BB562_09880; Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 3).

Analysis of TA vs. C

Comparative transcriptomics of TA vs. C indicated that among 2,779 genes, no genes were differentially expressed [$p < 0.05$ and $|\log_2FC| > 1.5$ (where FC represents “fold change”)] (Figures 3, 5 and Supplementary Table 3). Thus, no metabolic pathways were up-regulated or down-regulated according to mapped known genes.

Quantitative Real-Time PCR Validation of Differential Expression

To verify the RNA-Seq results, qRT-PCR was used to compare the expression activity of non-adapted cells (control) and

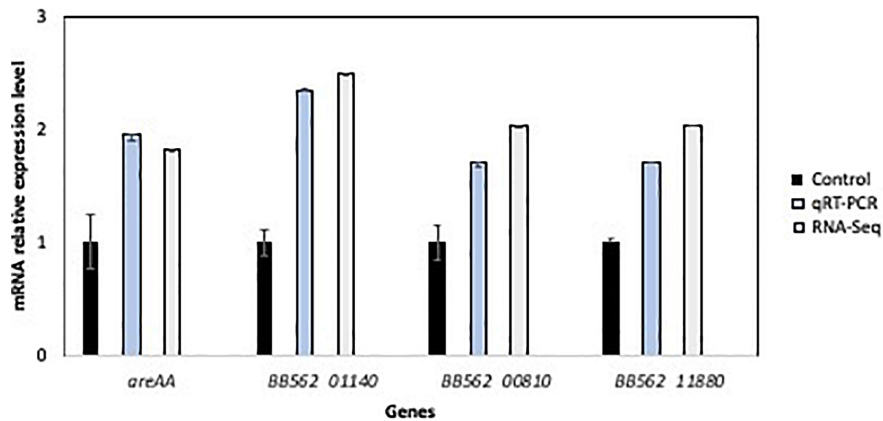


FIGURE 6 | Validation of relative RNA sequence results of four selected genes in the non-adapted cells (control) and olive-adapted *L. pentosus* AP2-16, by comparing with qRT-PCR results. All values were normalized to “control” values.

TO *L. pentosus* AP2-16. In general, gene expressions in the TO bacteria were higher for the following genes: *greA* (1.95- and 1.82-fold higher, as determined by qPCR and RNA-seq, respectively), *BB562_01140* (2.35- and 2.49-fold), *BB562_00810* (1.7- and 2.04-fold), and *BB562_11880* (1.7- and 2.04-fold higher; **Figure 6**). The qRT-PCR validates the differential expression, and it was consistent with the RNA-Seq; thus, the transcriptomics results were considered representative.

DISCUSSION

Under environmental, diet, and digestive conditions, probiotic bacteria encounter several stressors including temperature, acid, bile, dietary components, oxidative and osmotic stresses, and antimicrobials, among others. To counteract the detrimental effects of hostile conditions and stress, probiotic responses resultant from adaptation mechanisms induce biochemical and physiological changes to assure survivability or even enhanced probiotic activity. In this sense, several reports focused on the search for new strategies to increase the robustness of beneficial bacteria, taking advantage of the natural adaptations under adverse conditions. Previous studies (e.g., Desmond et al., 2001; Corcoran et al., 2006; Mills et al., 2011; Pérez Montoro et al., 2018; Gaucher et al., 2019) showed that adaptation to different stresses (e.g., salt, low pH, bile, and high temperature) could be strategically used to enhance the technological performance of probiotic lactobacilli. Furthermore, Casado Muñoz et al. (2016) indicated that adaptation to sub-lethal concentrations of antimicrobials could be a good way to achieve desirable robustness of the probiotic *L. pentosus* MP-10 to various environmental and gastrointestinal conditions (e.g., acid and bile stresses), as revealed by proteomic analysis. Similarly, Pérez Montoro et al. (2018) showed that *L. pentosus* strains pre-exposed to acids further displayed enhanced probiotic function, such as auto-aggregation ability via surface proteins. Furthermore,

Alonso García et al. (2019) demonstrated that pre-adaptation of probiotic lactobacilli to edible oils increased their survivability and stress resistance. Taking these reports into consideration, the current study had two main goals: first, to evaluate *in vitro* how dietary oils affect probiotic activities, and second, to determine how pre-adaptation with vegetable edible oils increases the functionality of probiotic lactobacilli and which molecular mechanisms are involved.

Here, we analyzed the impact of edible oils (sunflower, olive, linen, soy, corn, almond, and argan) on the probiotic activities of *L. pentosus* strains isolated from Aloreña green table olives (Abriouel et al., 2012; Pérez Montoro et al., 2016), and the results showed that their growth in the presence of some edible oils may decrease probiotic properties in several cases, depending on the strain and also the oil used. However, an increase in the auto-aggregation and mucin adhesion capacities of probiotic bacteria was also observed, which also depended on the strain tested and the oil used. On the other hand, previous adaptations of *L. pentosus* strains with oils improved their response, and thus probiotic activities increased in some cases, which were strain and oil dependent. In fact, a previous study carried out with the same *L. pentosus* strains by Alonso García et al. (2019) showed that the survival and growth of these strains in the presence of vegetable-based edible oils (i.e., sunflower, olive, linseed, soy, corn, almond, and argan) exhibited a slight decrease in viability. However, pre-adaptation increased their viability and resistance to acidic and bile conditions, including the induction of genes (e.g., *fus*, *rpsL*, *pgm*, *groEL*, *enol*, and *prep*) for moonlighting proteins related to several stress responses and functions. As such, this study confirms that pre-adaptation of probiotic *L. pentosus* strains with oils constitutes a new strategy to increase their robustness and functionality. Multivariate analysis of probiotic properties in both exposure cases (i.e., either with oils in growth media or after previous adaptation with oils) suggest that the response of *L. pentosus* strains displayed dissimilarities; however, mucin adhesion and auto-aggregation were highly correlated, suggesting commonality in the molecular mechanisms involved in such

activities. On the basis of this analysis, we selected *L. pentosus* AP2-16, with the best probiotic profile, and subjected their results to PCA and hierarchical clustering to determine dissimilarity between oils among the same strain and ascertain the best strategy for determining their molecular responses for probiotic properties. As such, taking into consideration the varied adaptive responses between strain and conditions, it was decided that TO and TA *L. pentosus* AP2-16 were to be analyzed at transcriptomic level against those under control conditions (i.e., without oil adaptation) to explore the underlying bacterium-mediated mechanisms responsible for improving probiotic properties (i.e., auto-aggregation, co-aggregation, and mucin adhesion) under oil adaptation conditions. However, the same strain (*L. pentosus* AP2-16) did not exhibit enhanced acid resistance and bile tolerance after olive and almond pre-adaptation, whereas sunflower-adapted *L. pentosus* AP2-16 showed improved acid resistance and bile tolerance, involving different molecular mechanisms such as the over-expression of genes inducing several moonlighting proteins related with stress response and other functions (Alonso García et al., 2019).

This is the first study to focus on the transcriptomic analysis of the impact of edible oils on probiotics, especially the responses of a potentially probiotic bacteria of vegetable origin. The results showed no changes exhibited between control and TA *L. pentosus* AP2-16; however, the TO strain showed significant differences vs. control (125 significantly DEGs) and also vs. the TA strain (108 significantly DEGs). In this case, the enhanced probiotic properties, shown by pre-adapted almond strain, may rely on changes in structural properties of the cell surface induced by oil adaptation. Among the 125 DEGs in TO *L. pentosus* AP2-16, 60 genes were up-regulated involving the glycogen-biosynthesis process, carbohydrate metabolism, amino acid biosynthesis, membrane and cytoplasm components, and several metabolic activities. However, genes involved in translation, organic phosphonate catabolic process, ribosome (small and large subunit), rRNA binding, tRNA binding, and magnesium-ion binding were down-regulated. These results shed light on the applicability of -omics to decipher the molecular mechanisms behind probiotic activity enhancement. Oil exposure and adaptation of probiotics in different environments (e.g., probiotic preparation, food matrix, or gut) may induce several responses responsible for affecting the host. Thus, depending on the probiotic strain, environment, and stressor, different responses will be obtained, and an in-depth analysis will be necessary to achieve the desirable probiotic effects of strains.

With respect to carbohydrate metabolism, the upregulation of genes coding for proteins participating in glycolysis/gluconeogenesis, galactose metabolism, PPP, and starch and sucrose metabolism were detected. This metabolic shift in carbohydrate was employed by *L. pentosus* to enhance energy production to resist olive oil adaptation. In this sense, glycoside hydrolase enzymes represented by 6-phospho- β -glucosidase and beta-galactosidase (Family 1), alpha, alpha-phosphotrehalase (Family 13) and sucrose-6-phosphate hydrolase (Family 32) were over-produced; these catalyze the hydrolysis of the glycosidic bond between

two or more carbohydrates, or between a carbohydrate and a non-carbohydrate moiety of β -glycosides, to yield monosaccharides. Furthermore, the over-expression of genes coding for glycosyltransferases, such as glucose-1-phosphate adenylyltransferase and 1,4-alpha-glucan branching enzyme which potentiate the biosynthesis of glycoconjugates by the transfer of sugar moieties from an activated donor to a specific substrate (Lairson et al., 2008), contribute to the biosynthesis of disaccharides, oligosaccharides, and polysaccharides like glycogen (storage function). On the other hand, substrate transport was increased by means of the over-production of PTS-beta-glucoside transporter subunit EIIBCA, involved in the uptake of carbohydrates necessary for growth.

Overall, the over-produced proteins participating in carbohydrate metabolism and transport may contribute a key role in the adaptation of *L. pentosus* AP2-16 to olive oil but also create an advantage in its adaptation during fermentation of plant-based foods and also GIT environments (Corcoran et al., 2005). In food fermentation, the increased carbohydrate metabolism is a desirable trait, and the upregulation of transketolase (enzyme of the PPP) encoding gene may give to the TO strain a competitive advantage in plant-based foods and also in GIT since ribose is abundant in plant materials and also in the diet.

Furthermore, as a probiotic, the specific interaction with the host may be facilitated and enhanced by glycoconjugates (Kay et al., 2010). This was previously reported in *L. pentosus* MP-10 (Abriouel et al., 2017) and also in other probiotics (Kim et al., 2009). On the other hand, transcriptomes of TO *L. pentosus* AP2-16 showed additional differences when compared with TA strain, since other genes were also up-regulated being involved in galactose metabolism, citrate cycle, and pyruvate metabolism. All adaptive mechanisms triggered by TO *L. pentosus* AP2-16 with respect to carbohydrate metabolism showed a coherent picture of changes in gene expression expected to result in energy production, energy storage, and other biological processes to help the bacteria adapt to the new environment by enhancing its capacity to auto-aggregate, co-aggregate to pathogenic bacteria, and also to adhere to mucin.

Transcriptomic profiling provided evidence that *L. pentosus* AP2-16 also responded to olive oil adaptation by regulating nucleotide and amino acid metabolism. Upregulation and downregulation of genes involved in nucleotide metabolism showed that olive oil adaptation of *L. pentosus* AP2-16 induced downregulation of adenylate kinase involved in adenine synthesis and conversion of AMP to ADP (Sanchez et al., 2005), catalyzing the reversible interconversion of ATP and AMP into two ADP molecules, and 3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase involved in the phosphodiester bond degradation in the second messenger molecules cAMP and cGMP. Therefore, both enzymes related with ATP synthesis were regulated to control energy balance in the adapted strain. However, enzymes involved in *de novo* pyrimidine biosynthesis were induced, such as aspartate carbamoyltransferase and dihydroorotase, suggesting that adaptation to olive oil may be advantageous for probiotic lactobacilli in terms of adhesion to the host; Vogel-Scheel et al. (2010) showed that purine and pyrimidine

synthesis are necessary for a successful colonization of mouse intestine by *E. coli*. On the other hand, previous adaptation of *L. pentosus* AP2-16 with olive oil induced a reverse transcriptional response of genes involved in purine and pyrimidine metabolism since Piekarska-Radzic and Klewicka (2021) reported that the exposure of *Lactobacillus* to polyphenols (present in olive oil) can cause increased expression of the genes responsible for the biosynthesis of purines and contribute to the reduced transport of pyrimidines. Thus, the adaptive response may highly rely on the strain and the polyphenol used, which in turn depend on the oil composition suggesting by the way that the adaptation strategy used to optimize the functionality of probiotics should be investigated case by case. The genes coding for sugar nucleotides and amino sugars were up-regulated including proteins precursors for extracellular exopolysaccharide (EPS) biosynthesis (Boels et al., 2001). This carbon flux toward polymer production from glucose is supported by the fact that glycosyltransferases (glucose-1-phosphate adenylyltransferase and 1,4- α -glucan branching enzyme) were up-regulated. The role of EPS in probiotic lactobacilli was largely reported due to their benefits and health potential (Angelin and Kavitha, 2020).

Concerning amino acid biosynthesis, the over-production of some key enzymes (e.g., proteins involved in cysteine, methionine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, and histidine biosynthesis) by the TO *L. pentosus* AP2-16 is an interesting avenue for probiotic bacteria since phenylalanine, methionine, and tryptophan are among the essential amino acids for humans. Furthermore, histidine, cysteine, and tyrosine required by children (Joint WHO/FAO/UNU, 2007) also increased. These data suggest that the adaptation of lactobacilli strain with olive oil is of great biotechnological importance to increase its use as a starter culture and also as a probiotic, supplying valuable human amino acids. The role of these amino acids in the adaptation of *L. pentosus* AP2-16 to olive oil seems to be related with cell growth and survivability, playing a key role in bacterium physiology such as intracellular pH control, generation of metabolic energy or redox power, and stress resistance (Fernández and Zúñiga, 2006). However, nucleic and protein synthesis decreased in the TO *L. pentosus* AP2-16 by means of genes coding for 30S and 50S ribosomal proteins, suggesting that their abundance was affected by olive-oil adaptation controlling primarily at the level of translation, and rRNA transcription as the rate-limiting step in ribosome biosynthesis. This fact is dependent on the levels of ATP available for consumption since ATP promotes the initiation of ribosomal RNA (rRNA) transcription and is consumed by translating ribosomes (Schneider et al., 2002). This change in transcription after adaptation seems to be involved in energy saving.

Regarding ABC transporters and PTS proteins, both pathways (important for the influx of essential nutrients and efflux of toxic molecules, and carbohydrate uptake, respectively) were up-regulated and down-regulated after olive oil adaptation. Thus, to maintain cell growth, metabolism regulation was achieved by upregulation and downregulation of several genes involved in transport, uptake of nutrients, and regulatory systems (two-component system).

CONCLUSION

Probiotic lactobacilli retain a broad arsenal of molecular mechanisms to combat the frequent harsh environmental stresses encountered during processing and ingestion, especially *L. pentosus* due to its genetic heterogeneity and plasticity. Thus, understanding the molecular mechanisms involved in the adaptation of potential probiotic lactobacilli is crucial for its use as probiotics improving their viability during technological stresses, storage, and digestion and also their functionality. In the present study, transcriptional changes were reported in the potential probiotic TO *L. pentosus* AP2-16 which exhibited improved functionality, rerouting its metabolic pathways highly connected and linked to energy balance control (energy production and energy storage), cell growth and survivability, interaction with host (glycoconjugates), and other physiological features. Pre-adaptation of some lactobacilli with olive oil may represent a novel approach for manufacturing probiotic products with improved stability and functionality.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/**Supplementary Material**.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

HA: supervision, project administration, conceptualization, methodology, writing – original draft, and writing – review and editing. EAG: conceptualization, methodology, and writing. JFO: conceptualization and methodology. LLL, ME-M, and SC-G: methodology, writing – review and editing. NB: supervision, conceptualization, methodology, writing – original draft, and writing – review and editing. CK: conceptualization, writing – original draft, and writing – review and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the Research Team (University of Jaen, EI_BIO1_2019). Technical and human support provided by CICT of Universidad de Jaén (UJA, MINECO, Junta de Andalucía, FEDER) is gratefully acknowledged.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.747043/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Abriouel, H., Benomar, N., Cobo, A., Caballero, N., Fernández Fuentes, M. Á., Pérez-Pulido, R., et al. (2012). Characterization of lactic acid bacteria from naturally-fermented Manzanilla Aloreña green table olives. *Food Microbiol.* 32, 308–316. doi: 10.1016/j.fm.2012.07.006
- Abriouel, H., Pérez Montoro, B., Casimiro-Soriguer, C. S., Pérez Pulido, A. J., Knapp, C. W., Caballero Gómez, N., et al. (2017). Insight into potential probiotic markers predicted in *Lactobacillus pentosus* MP-10 genome sequence. *Front. Microbiol.* 8:891. doi: 10.3389/fmicb.2017.00891
- Alonso García, E., Pérez Montoro, B., Benomar, N., Castillo-Gutiérrez, S., Estudillo-Martínez, M. D., Knapp, C. W., et al. (2019). New insights into the molecular effects and probiotic properties of *Lactobacillus pentosus* pre-adapted to edible oils. *LWT Food Sci. Technol.* 109, 153–162. doi: 10.1016/j.lwt.2019.04.028
- Angelin, J., and Kavitha, M. (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *Int. J. Biol. Macromol.* 162, 853–865. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190
- Bernardeau, M., Guguen, M., and Vernoux, J. P. (2006). Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 487–513. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00020.x
- Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S., and Gueguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 278–285. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.015
- Bienenstock, J., Gibson, G., Klaenhammer, T. R., Walker, W. A., and Neish, A. S. (2013). New insights into probiotic mechanisms: a harvest from functional and metagenomic studies. *Gut Microbes* 4, 94–100. doi: 10.4161/gmic.23283
- Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: an update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiol.* 4, 665–684. doi: 10.3934/microbiol.2018.4.665
- Blighe, K., Rana, S., and Lewis, M. (2020). *Enhanced Volcano: Publication-Ready Volcano Plots with Enhanced Colouring and Labeling. R package version 1.6.0.*
- Boels, I. C., Van Kranenburg, R., Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., and de Vos, W. M. (2001). Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 11, 723–732. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00116-9
- Casado Muñoz, M. C., Benomar, N., Ennahar, S., Horvatovich, P., Lavilla Lerma, L., Knapp, C. W., et al. (2016). Comparative proteomic analysis of a potentially probiotic *Lactobacillus pentosus* MP-10 for the identification of key proteins involved in antibiotic resistance and biocide tolerance. *Int. J. Food Microbiol.* 222, 8–15. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.012
- Corcoran, B. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Dockery, P., and Stanton, C. (2006). Enhanced survival of GroESL-overproducing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 under stressful conditions induced by drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5104–5107. doi: 10.1128/AEM.02626-05
- Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., and Ross, R. P. (2005). Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3060–3067. doi: 10.1128/AEM.71.6.3060-3067.2005
- Corthésy, B., Gaskins, H. R., and Mercenier, A. (2007). Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J. Nutr.* 137 (Suppl. 2), 781S–790S. doi: 10.1093/jn/137.3.781S
- De Angelis, M., and Gobetti, M. (2011). “Stress responses of lactobacilli” in *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*, eds E. Tsakalidou and K. Papadimitriou (New York, NY: Springer), 219–249. doi: 10.1007/978-0-387-92771-8_11
- Desmond, C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Collins, K., and Ross, R. P. (2001). Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *Int. Dairy J.* 11, 801–808. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00121-2
- Duar, R. M., Lin, X. B., Zheng, J. Z., Martino, M. E., Grenier, T., Pérez-Muñoz, M. E., et al. (2017). Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, S27–S48. doi: 10.1093/femsr/fux030
- Escobar-Ramírez, M. C., Jaimez-Ordaz, J., Escorzar-Iglesias, V. A., Rodríguez-Serrano, G. M., Contreras-López, E., Ramírez-Godínez, J., et al. (2020). *Lactobacillus pentosus* ABHEAU-05: An in vitro digestion resistant lactic acid bacterium isolated from a traditional fermented Mexican beverage. *Rev. Argent. Microbiol.* 52, 305–314. doi: 10.1016/j.ram.2019.10.005
- Fernández, M., and Zúñiga, M. (2006). Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 32, 155–183. doi: 10.1080/10408410600880643
- Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization (2002). *Report of a Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. Rome: FAO.
- Gaucher, F., Bonnassie, S., Rabah, H., Marchand, P., Blanc, P., Jeantet, R., et al. (2019). Review: adaptation of beneficial propionibacteria, lactobacilli, and bifidobacteria improves tolerance toward technological and digestive stresses. *Front. Microbiol.* 10:841. doi: 10.3389/fmicb.2019.00841
- Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G., and Faria, J. A. F. (2010). Functional foods and non dairy probiotic food development: trends, concepts, and products. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9, 292–302. doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00110.x
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., et al. (2014). 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.* 11, 506–514. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66
- Joint WHO/FAO/UNU (2007). *Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition*. Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation, WHO Technical Report Series no. 935. Geneva: WHO.
- Kay, E., Lesk, V. I., Tamaddoni-Nezhad, A., Hitchen, P. G., Dell, A., Sternberg, M. J., et al. (2010). Systems analysis of bacterial glycomes. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 1290–1293. doi: 10.1042/BST0381290
- Kemgang, T. S., Kapila, S., Shanmugam, V. P., and Kapila, R. (2014). Cross-talk between probiotic lactobacilli and host immune system. *J. Appl. Microbiol.* 117, 303–319. doi: 10.1111/jam.12521
- Kim, J. F., Jeong, H., Yu, D. S., Choi, S. H., Hur, C. G., Park, M. S., et al. (2009). Genome sequence of the probiotic bacterium *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis AD011. *J. Bacteriol.* 191, 678–679. doi: 10.1128/JB.01515-08
- Kopylova, E., Noé, L., and Touzet, H. (2012). SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* 28, 3211–3217. doi: 10.1093/bioinformatics/bts611
- Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J., and Withers, S. G. (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 521–555. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322
- Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
- Luo, W., and Brouwer, C. (2013). Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics* 29, 1830–1831. doi: 10.1093/bioinformatics/btt285
- Marchix, J., Goddard, G., and Helmuth, M. A. (2018). Host-gut microbiota crosstalk in intestinal adaptation. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 6, 149–162. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.01.024
- Markowiak, P., and Śliżewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients* 9:1021. doi: 10.3390/nu9091021
- Mills, S., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., and Ross, R. P. (2011). Enhancing the stress responses of probiotics for a lifestyle from gut to product and back again. *Microb. Cell Fact.* 10 (Suppl. 1), S19. doi: 10.1186/1475-2859-10-S1-S19
- Naser, S. M., Thompson, F. L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M., et al. (2005). Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on rpoA and pheS genes. *Microbiology* 151(Pt 7), 2141–2150. doi: 10.1099/mic.0.27840-0
- Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., and Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat. Methods* 14, 417–419. doi: 10.1038/nmeth.4197
- Pérez Montoro, B., Benomar, N., Caballero Gómez, N., Ennahar, S., Horvatovich, P., Knapp, C. W., et al. (2018). Proteomic analysis of *Lactobacillus pentosus* for the identification of potential markers involved in acid resistance and their influence on other probiotic features. *Food Microbiol.* 72, 31–38. doi: 10.1016/j.fm.2017.11.006
- Pérez Montoro, B., Benomar, N., Lavilla Lerma, L., Castillo Gutiérrez, S., Gálvez, A., and Abriouel, H. (2016). Fermented Aloreña table olives as a source of potential probiotic *Lactobacillus pentosus* strains. *Front. Microbiol.* 7:1583. doi: 10.3389/fmicb.2016.01583

- Piekarska-Radzik, L., and Klewicka, E. (2021). Mutual influence of polyphenols and *Lactobacillus* spp. bacteria in food: a review. *Eur. Food Res. Technol.* 247, 9–24. doi: 10.1007/s00217-020-03603-y
- Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., and Adams, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res. Int.* 43, 1–7. doi: 10.1016/j.foodres.2009.09.009
- Sanchez, B., Champomier-Verges, M. C., Anglade, P., Baraige, F., de Los Reyes-Gavilan, C. G., Margolles, A., et al. (2005). Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809. *J. Bacteriol.* 187, 5799–5808. doi: 10.1128/JB.187.16.5799-5808.2005
- Schneider, D. A., Gaal, T., and Gourse, R. L. (2002). NTP-sensing by rRNA promoters in *Escherichia coli* is direct. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 8602–8607. doi: 10.1073/pnas.132285199
- Soneson, C., Love, M. I., and Robinson, M. D. (2015). Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Res.* 4:1521. doi: 10.12688/f1000research.7563.1
- Vizoso Pinto, M. G., Schuster, T., Briviba, K., Watzl, B., Holzapfel, W. H., and Franz, C. M. (2007). Adhesive and chemokine stimulatory properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *J. Food Protect.* 70, 125–134. doi: 10.4315/0362-028X-70.1.125
- Vlková, E., Rada, V., Šmehilová, M., and Killer, J. (2008). Auto-aggregation and co-aggregation ability in bifidobacteria and clostridia. *Folia Microbiol.* 53, 263–269. doi: 10.1007/s12223-008-0040-z
- Vogel-Scheel, J., Alpert, C., Engst, W., Loh, G., and Blaut, M. (2010). Requirement of purine and pyrimidine synthesis for colonization of the mouse intestine by *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5181–5187. doi: 10.1128/AEM.00242-10
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., et al. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 2782–2858. doi: 10.1099/ijsem.0.004107

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Alonso García, de la Fuente Ordoñez, Lavilla Lerma, Estudillo-Martínez, Castillo-Gutiérrez, Benomar, Knapp and Abriouel. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ARTÍCULO III

CHANGES IN RESISTOME PROFILE OF
POTENTIAL PROBIOTIC
LACTIPLANTIBACILLUS PENTOSUS IN
RESPONSE TO EDIBLE OIL ADAPTATION

1
2 **Changes in resistome profile of potential probiotic *Lactiplantibacillus pentosus* in**
3 **response to edible oil adaptation**

4 Esther Alonso García¹, Nabil Benomar¹, Leyre Lavilla Lerma¹, Juan José de la Fuente
5 Ordoñez¹, Charles W. Knapp², Hikmate Abriouel^{1*}
6
7

8
9 ¹Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias
10 Experimentales, Universidad de Jaén, 23071-Jaén, Spain.
11

12 ²Centre for Water, Environment, Sustainability & Public Health; Department of Civil and
13 Environmental Engineering; University of Strathclyde, Glasgow, Scotland, United
14 Kingdom.
15
16

17
18
19
20 ***Correspondence:** Dr. Hikmate Abriouel, Área de Microbiología. Departamento de
21 Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Experimentales. Edif. B3. Universidad de
22 Jaén. Campus Las Lagunillas s/n. 23071-Jaén, Spain. Tel.: 34-953-212003; fax: 34-953-
23 212943.
24
25

26
27 hikmate@ujaen.es
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Abstract

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Despite increasing interest to investigate horizontal gene transfer as a leading cause of antibiotic resistance spread, the resistome is not only influenced by the influx and efflux of genes in different environments. Rather, the expression of existing genes under different stress conditions requires special attention. This study determined whether pre-adapting *Lactiplantibacillus pentosus* strains, isolated from Aloreña green table olives, to vegetable-based edible oils influence their phenotypic and genotypic responses to antibiotics. This has significant diet, food matrix, gut health, and food safety concerns. Pre-adapting *L. pentosus* strains to oils significantly changed their susceptibility profile to antibiotics. However, results generally differed among the three strains; although changes in the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of antibiotics occurred, it depended on the *L. pentosus* strain and the oil used for adaptation. The pre-adaptation of *L. pentosus* strains with olive, sunflower, argan and linseed oils induced gene expressions (e.g., *rpsL*, *recA* and *uvrB*) in several stress responses. Thus, to analyze this fact in-depth, transcriptional changes were reported in the selected potential probiotic *L. pentosus* CF2-10 adapted with olive or sunflower, rerouting its metabolic pathways to export toxic molecules through efflux pumps and ABC transporters. Pre-adaptation of some lactobacilli with olive or sunflower oils may represent a novel approach for manufacturing probiotic products with improved stability, functionality and robustness. On the other hand, this finding must be considered in the control of resistance boosting related to horizontal gene transfer and the stress-induced expression of genes involved in the antimicrobial resistance of pathogenic bacteria.

Keywords: *Lactiplantibacillus pentosus*, probiotics, vegetable edible oils, transcriptomics, antibiotic resistance

1. Introduction

1
2 Probiotic safety has become a significant criterion and an emerging concern (Toomey
3 et al., 2009). Probiotics are defined as "live microorganisms that, when administered in
4 adequate amounts, confer a health benefit on the host" (Food and Agricultural
5 Organization of the United Nations and World Health Organization, 2002; Hill et al.,
6 2014). However, concerning safety criteria, probiotics may have antibiotic resistance, an
7 emerging issue of great responsibility, especially the acquired resistance elements that
8 transfer horizontally into the human and animal microbiomes (Laxminarayan, 2014).
9 They have severe impacts and increased adverse effects on public health and the
10 environment due to the potential spread and the accumulation of antibiotic-resistant
11 bacteria (ABRs) and antibiotic resistance genes (ARGs) in different ecosystems as
12 contaminants (Kraemer et al., 2019; Martínez, 2008; Van Bruggen et al., 2019). The use,
13 abuse and misuse of antibiotics in different sectors (veterinary, agriculture and clinical
14 therapy) generated this issue, thus allowing the continuous cycling of ABRs and ARGs
15 between animals/humans and their environments (Lushniak, 2014; Michael et al., 2014),
16 but this is not the sole mechanism. Biocides, as antiseptics or disinfectants in industrial
17 and sanitary areas, also promote significant challenges to the industry, veterinary and
18 medical settings through their cross-resistance to antibiotics (Braoudaki and Hilton, 2004;
19 Piovesan Pereira et al., 2021; Wand et al., 2017).

20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35 The increased emergence of antibiotic resistance (ABRs and ARGs) is not only due to
36 antimicrobial selective pressure exerted by antibiotics and biocides, which have been
37 primarily documented as the leading causes of antibiotic resistance occurrence, spread
38 and persistence (Oz et al., 2014). Instead, other factors can contribute to this issue, such
39 as environmental stresses (e.g., extreme temperature or pH, chemicals, and osmotic
40 stress) (Maltas et al., 2020) frequently encountered in clinical, natural environments and
41 food production. Thus, the horizontal gene transfer of multidrug resistance to the
42 pathogens and commensal gut microbiota is a potential threat to public health (Courvalin,
43 2006); however, antibiotic resistance, either intrinsic or resultant of mutation, does not
44 manifest a safety concern in itself. Furthermore, intrinsic resistant probiotics are helpful
45 during the co-administration of probiotics with antibiotics during antibiotic treatment,
46 allowing gut-microbiota restoration (Gueimonde et al., 2013; Yao et al., 2021).

47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57 The fermentation process of table olives is recognized as a stressful environment due
58 to its physicochemical conditions such as high salt concentration, low pH, polyphenols,
59
60
61
62
63
64
65

1 and some condiments with antimicrobial activity (Borges et al., 2013; Thielmann et al.,
2 2017). In this sense, lactic acid bacteria (LAB), isolated during the natural fermentation
3 process of Aloreña table olives (Abriouel et al., 2012; Casado Muñoz et al., 2014), were
4 resistant to physicochemical conditions and at least three antibiotics. However, these
5 resistances relied on intrinsic mechanisms that were non-transferable or non-acquired
6 determinants; these included chromosomally encoded efflux pumps (NorA, MepA and
7 MdeA). Therefore, according to Qualified Presumption of Safety criteria, they were
8 considered safe for future applications as starter cultures or as probiotics.

9
10 Among these LAB, some *Lactiplantibacillus pentosus* strains exhibited probiotic
11 potential (Abriouel et al., 2012; Pérez Montoro et al., 2016) and their robustness and
12 functionality were improved after several stresses such as antimicrobials, chemicals and
13 UV light, showing changes in susceptibility patterns to antibiotics and the associated
14 expressed genes (Casado Muñoz et al., 2016a and b). Similarly, the adaptation of *L.*
15 *pentosus*, isolated from Aloreña table olives, with vegetable-based edible oils showed
16 increased survivability, stress resistance (acid and bile) and functionality through
17 transcriptional network switch to regulate robustness, stability and functionality (Alonso
18 García et al., 2019, 2021). However, no data are available about the changes induced by
19 vegetable-based edible oils on the antibiotic-resistance profile of these bacteria. Taking
20 into consideration the safety of potential probiotic *L. pentosus* under different conditions
21 in the food matrix, in the gut and the presence of different diet components, the present
22 study focused on the molecular mechanisms underlying oil effects on *L. pentosus*
23 antibiotic resistance at a transcriptomic level and identify the bacterial mechanisms
24 involved. It is noteworthy to highlight that this is the first study dealing with the
25 determination of resistance change of potential probiotic bacteria as a response to
26 vegetable edible-oils present in the diet, probiotic formulation or dietary supplements.

27
28 On the other hand, this study will shed light on the potential of other bacteria
29 possessing transferable resistance genes. Exposure to this stress significantly contributes
30 to the spread of antibiotic resistance genes in natural environments, mainly to pathogens.
31 Nevertheless, further studies are required.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

Three strains (CF1-6, CF2-10 and MP-10) of *Lactiplantibacillus pentosus* (previously *Lactobacillus pentosus*) isolated by Abriouel et al. (2012) from naturally-fermented Aloreña green table olives by four small-medium enterprises (SMEs) from Malaga (Spain) were selected among the best strains with the probiotic potential to be used in this study. Strains adapted to different oils: almonds, argan, corn, linseed, olive, soy and sunflower according to Alonso García et al. (2019), were routinely cultured at 30°C in the Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Fluka, Madrid, Spain) for 24 hours, and kept in 20% glycerol at -80°C for long term storage.

2.2. Antibiotic susceptibility of oil-adapted *L. pentosus* strains

The antibiotic MICs in oil-adapted and non-adapted *L. pentosus* strains were determined as reported by Casado Muñoz et al. (2014) in LSM broth [90% of IST broth (Oxoid, Madrid, Spain) and 10% MRS broth (Fluka, Madrid, Spain)] (Klare et al., 2005) according to the ISO 10932/IDF 233 standard (ISO, 2010). After incubation, the MIC was read, representing the lowest concentration of each antimicrobial agent that inhibited the growth of the strain. All MIC determinations of each antimicrobial against each strain were carried out in triplicate, and reliable results were taken if at least two of the three replicates were in agreement. All antibiotics were purchased from Sigma Aldrich (Madrid, Spain).

2.3. Molecular response of oil-adapted *L. pentosus*

2.3.1. RNA extraction

RNA extractions were done from the non-adapted and oil-adapted *L. pentosus* CF1-6, CF2-10 and MP-10 (sunflower, olive, linseed and argan) using Direct-zol™ RNA Miniprep (Zymo Research, California, USA) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was isolated from three biological repeats. DNase digestion was performed according to the manufacturer's instructions (Zymo Research, California, USA). RNA quantification and quality assessment were performed using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific) and TapeStation. RNAs were adjusted to a

1 500 ng/ml concentration and frozen at -80°C until required. RNAs were adjusted to a 2
2 µg/ml concentration per sample for sequencing and transcriptomic analyses.
3
4

5 2.3.2. *Quantitative real-time PCR of stress/resistance genes after adaptation with edible* 6 *oils* 7

8 The expressions of stress-resistance genes (*rpsL*, *recA*, *srtA* and *uvrB*) were done as
9 reported by Casado Muñoz et al. (2016a). For quantitative real-time PCR (qRT-PCR),
10 mRNAs were subjected to reverse transcription into cDNA and subsequent real-time PCR
11 in a single reaction using the SensiFast SYBR & Fluorescein One-Step kit (Bioline,
12 Barcelona, Spain). The 16S-rRNA gene was used as a housekeeping gene, and a no
13 template control (NTC) was used as the negative control. Primers for the 16S rRNA
14 housekeeping gene and resistance genes were reported by Casado Muñoz et al. (2016a).
15 Quantitative PCRs (qPCRs) were performed in triplicate on an iCycler iQTM Real-Time
16 PCR Detection System (BioRad, Herts, United Kingdom). PCR-grade water served as a
17 negative control.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

28 2.3.3. *Transcriptomic analysis of oil-adapted L. pentosus CF2-10 versus non-adapted* 29 *strains* 30 31

32 *RNA extraction, library preparation and RNA sequencing* 33

34 Based on the results obtained in the previous section (2.3.2.), we selected *L. pentosus*
35 CF2-10 adapted with sunflower or olive oils to deepen its molecular response regarding
36 resistance. RNA extraction was done as described above in section 2.3.1. According to
37 the manufacturer's instructions, the Truseq Stranded Total RNA Kit (Illumina, Inc., San
38 Diego, CA, United States) was used to remove ribosomal RNA for library preparation.
39 Sequencing was done on an Illumina Novaseq platform (2 × 150 bp read lengths) at
40 Lifesequencing S.L. (Valencia, Spain). First, raw sequencing reads were processed with
41 the *reformat.sh* script from the *BBTools* suite (Bushnell–
42 sourceforge.net/projects/bbmap/) to remove low-quality bases (Q20) from both ends and
43 short sequences (50 nucleotides). Filtered reads were then scanned for traces of ribosomal
44 RNA with *SortMeRNA* v2.1 (Kopylova, 2012), parameters and databases by default.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55

56 *Bioinformatic analysis* 57

58 The resulting reads were aligned to the protein-coding transcriptome of *Lactobacillus*
59 *pentosus* BGM48 (GCA_002850015.1) using Salmon v1.1 (Patro, 2017), parameters by
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

default. Counts were collapsed with *tximport* v1.12.3 (Soneson, 2015) and analyzed with *DESeq2* v1.24.0 (Love, 2014) packages on R v3.6. Only genes with ten or more counts across all samples were kept for further comparisons. $P_{adj} < 0.05$ and $|\log_2 FC| > 1.5$ were the criteria for considering a gene as differentially expressed between the studied groups. Gene ontology (GO) terms were obtained from the *Lactobacillus pentosus* BGM48 page of Uniprot. Only terms with two or more counts across differentially expressed genes (DEG) of at least one comparison were used to generate the figures.

Validation of differentially expressed genes by qRT-PCR

Five genes were selected for RT-PCR experiments to verify transcriptomic results (Table 1). Total RNA was extracted from *L. pentosus* CF2-10 strains pre-adapted with either sunflower or olive oil and non-adapted strain (control) as described above. RNAs were adjusted to a 500 ng/ml concentration and frozen at -80°C until required for analysis.

The expression of selected genes (Table 1) was analyzed by quantitative, real-time PCR (qRT-PCR) using SensiFAST™ SYBR & Fluorescein One-Step Kit (BIOLINE). Phenylalanyl-tRNA synthase alpha-subunit (*pheS*) gene was used as a housekeeping gene (Naser et al., 2005), and no-template control (NTC) was used as a negative control. Quantitative PCRs (qPCRs) were performed in triplicate, 20- μl reactions on a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System from BioRad. The qPCR conditions were as follows: pre-denaturation at 95°C for 2 min, denaturation at 95°C for 30 s, and annealing at 59°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s; fluorescence signals were collected during annealing and extension, and the whole process was repeated for 40 cycles; final extension for 2 min. Melting-curve analysis included 95°C for 10 s, 65°C for 5 s, and 95°C for 50 s.

2.4. Statistical Analysis

Statistical analyses were conducted using Excel 2016 software (Microsoft Corporation, Redmond, WA, United States) to determine averages and standard deviations. All analyses were performed in triplicate. Statistics included the Analysis of Variances (ANOVA) by XLStat software (Addinsoft 2020.2.2; New York, United States), Shapiro–Wilk test and Levene test to check data normality, and Tukey HSD test, where

$p < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analysis for transcriptome analysis was previously described in Section 2.3.3 "Bioinformatic Analysis".

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

3. Results

3.1. Phenotypic response of *L. pentosus* strains to oil adaptation

Phenotypic response to oil adaptation with different edible oils (almonds, argan, corn, linseed, olive, soy and sunflower) was generally different in the three *L. pentosus* strains analyzed (Table 2). An increase, decrease, or no change in the MIC of antibiotics was observed, but it was highly dependent on the *L. pentosus* strain and the oil used for adaptation. Generally, the MICs of ciprofloxacin, erythromycin, clindamycin, streptomycin and tetracycline increased by 2-8 fold, followed by sulfamethoxazole/trimethoprim, gentamycin, amoxicillin and ampicillin (Table 2). However, the MICs of chloramphenicol and kanamycin exhibited no changes regardless of the strain and oil adaptation (Table 2). On the other hand, we observed a decrease in MICs in a few cases for ciprofloxacin and tetracycline after adapting *L. pentosus* CF1-6 with oil (Table 2).

Concerning oils, linseed, olive, sunflower, and soy were the oils which induced the most changes in antibiotic MICs. In contrast, erythromycin, ciprofloxacin and tetracycline were the antimicrobials that exhibited MIC changes after oil adaptation (Table 1). Regarding *L. pentosus* strains, linseed and argan induced more changes in antibiotic MIC in *L. pentosus* CF1-6; however, olive, linseed and sunflower impacted *L. pentosus* CF2-10; finally, linseed and soy induced changes in antibiotic susceptibility of *L. pentosus* MP-10.

3.2. Genotypic response of stress/resistance genes in oil-adapted *L. pentosus*

Based on the phenotypic response of *L. pentosus* strains to oil adaptation, linseed, sunflower, olive and argan were selected to test the effect of oil adaptation on the expression of genes involved in tolerance/resistance of three potential probiotic *L. pentosus* (CF1-6, CF2-10 and MP-10) strains. For this, we analyzed the following genes: *rpsL*, *recA*, *uvrB* and *srtA*. The results obtained showed that responses differed depending on *L. pentosus* strain, the oil used for adaptation and the gene analyzed (Fig. 1).

Concerning the *rpsL* gene, up-regulation was observed in *L. pentosus* CF2-10 adapted with olive (9.10 fold), argan (4.75 fold), sunflower (4.23 fold) and linseed (1.68 fold) oils; and in *L. pentosus* MP-10 adapted with argan oil (2.27 fold) (Fig. 1). Similarly, up-regulation of the *uvrB* gene was observed after adaptation of *L. pentosus* CF2-10 with

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

sunflower (6.38 fold) and linseed (1.77 fold) oils; also in *L. pentosus* MP-10 with argan (2.75 fold) and sunflower (1.79 fold) oils (Fig. 1).

Concerning the *recA* gene, the adaptation with sunflower oil produced an up-regulation in *L. pentosus* CF2-10 and MP-10 strains. However, this up-regulation was also shown in argan-adapted *L. pentosus* MP-10 and olive-adapted *L. pentosus* CF1-6 (Fig. 1).

Analysis of *srtA* gene expression revealed only up-regulation in sunflower-adapted *L. pentosus* MP-10. In the rest of the cases, we observed no significant changes or down-regulation occurred, especially in *srtA* gene expression of the following cases: olive-adapted *L. pentosus* CF2-10 and MP-10, argan-adapted *L. pentosus* CF1-6, CF2-10 and MP-10, linseed-adapted *L. pentosus* CF1-6 and MP-10, and sunflower-adapted *L. pentosus* CF1-6 (Fig. 1).

3.3. Insights into the molecular response of *L. pentosus* CF2-10 to oil adaptation

3.3.1. Illumina NovaSeq mRNA sequencing and global transcriptomic analysis of the oil-adapted *Lactiplantibacillus pentosus* CF2-10

Compared to untreated control, *L. pentosus* CF2-10 adapted with sunflower or olive oils was subjected to transcriptomic analysis. Raw data for this study have been deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) at EMBL-EBI under accession number PRJEB51051 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB51051>), and the Pearson correlation coefficient showed a correlation of gene expression patterns among three independent biological replicates. Clean reads of the three libraries were mapped to the *L. pentosus* BGM48 reference genome. About 2735 genes from 3197 (85.55%) were successfully mapped (Tables S1, S2 and S3). Degrees of similarity were evaluated between the different samples using a PCA plot (Principal Component Analysis) (Figure S1-A) and a heat map (Fig. S1-B); both treatment conditions showed great differences with the "control" condition (Fig. S1). Comparative analysis showed 91 (50 up-regulated and 41 down-regulated) and 78 (49 up-regulated and 29 down-regulated) differentially expressed genes (DEGs) (\log_2 "fold change" > 1.5 at statistically significance level $P < 0.05$) in olive-adapted (O) and sunflower-adapted (G) *L. pentosus* CF2-10 versus control (C), respectively (Tables S1 and S2). Furthermore, 49 DEGs (19 up-regulated and 30 down-regulated genes) were detected in sunflower-adapted (G) versus olive-adapted *L. pentosus* CF2-10 (Table S3).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

GO terms analysis highlighted the adaptation to each oil-induced change in gene expression to decipher the biological processes, cellular components, and molecular functions of oil-adapted *L. pentosus* CF2-10 (Fig. 2), i.e., those different from non-adapted controls. Comparative transcriptomics of oil-adapted *L. pentosus* CF2-10 versus non-adapted control indicated that some metabolic pathways were up-regulated in both sunflower and olive-adapted strain versus non-adapted control (Fig. 2). However, others were only up-regulated in one of the oil-adapted strains and thus are exclusively enhanced in sunflower or olive-adapted *L. pentosus* CF2-10 versus control involving the differential expression of different genes. In this sense, GO-terms analysis revealed similar up-regulated metabolic pathways in both sunflower and olive-adapted *L. pentosus* CF2-10 versus control; different DEG levels included: bacterial secretion system; RNA polymerase; glyoxylate and decarboxylase metabolism; valine, leucine and isoleucine degradation; quorum sensing; fatty acid metabolism; aminoacyl t-RNA degradation; biotin metabolism and fatty acid biosynthesis (Fig. 2). Furthermore, up- and down-regulation of the same metabolic pathways were shown for olive and sunflower-adapted *L. pentosus* CF2-10 versus control. These include: protein export; pantothenate and COA biosynthesis; DNA replication; phosphotransferase system (PTS); two-component system, biosynthesis of amino acids; carbon metabolism; microbial metabolism in diverse environments; biosynthesis of secondary metabolites; metabolic pathways; propanoate metabolism; pyruvate metabolism; starch and sucrose metabolism; purine metabolism; oxidative phosphorylation; fructose and mannose metabolism; pentose phosphate pathway; citrate cycle and glycolysis/gluconeogenesis (Fig. 2). On the other hand, in the case of sunflower-adapted *L. pentosus* CF2-10, exclusive up-regulation of nitrogen metabolism, arginine metabolism and glycerophospholipid metabolism was detected (Fig. 2). However, olive-adapted *L. pentosus* CF2-10 exclusively showed other arsenals of up-regulated metabolic pathways such as cationic antimicrobial peptide (CAMP) resistance, sulfur relay system and terpenoid backbone biosynthesis (Fig. 2).

3.3.2. Identification of DEGs involved in resistance after oil adaptation of *L. pentosus* CF2-10

Figure 3 clearly shows the up-regulation of DEGs involved in defense and antimicrobial resistance of *L. pentosus* CF2-10 after oil adaptation (sunflower or olive). In this sense, MFS (major facilitator superfamily) transporter gene was over-expressed in

1 olive-adapted and sunflower adapted *L. pentosus* CF2-10 by 5.21 (BB562_15125) and
2 4.17/1.90 (BB562_09955 and BB562_15125, two gene locus) log₂FC, respectively
3 (Tables S1 and S2). Furthermore, anthranilate phosphoribosyltransferase coding gene
4 (BB562_09180) was over-expressed in olive-adapted *L. pentosus* CF2-10 by 4.11 log₂FC
5 (Table S1), while in sunflower-adapted *L. pentosus* CF2-10 it was of 4.47 log₂FC (Table
6 S2). Also, BB562_09180 gene coding for peptide ABC transporter substrate-binding was
7 up-regulated in olive-adapted and sunflower adapted *L. pentosus* CF2-10 by 1.77 and 1.52
8 log₂FC, respectively (Tables S1 and S2). On the other hand, CRISPR-associated
9 endonuclease Cas2 (BB562_00540, 2.54 log₂FC); hypothetical proteins [(BB562_00880,
10 1.67 log₂FC, ATP binding [GO:0005524], ATPase activity [GO:0016887]);
11 (BB562_01605, 1.54 log₂FC, integral component of membrane [GO:0016021]);
12 transcriptional repressor (BB562_12770, 1.69 log₂FC); diguanylate cyclase
13 (BB562_13230, 1.61 log₂FC); cellulose synthase (BB562_13235, 1.51 log₂FC);
14 glycosyl transferase family 2 (BB562_13240, 1.67 log₂FC); phosphate ABC transporter
15 substrate-binding protein (BB562_13420, 1.95 log₂FC); phosphonoacetaldehyde
16 hydrolase (BB562_13500, 1.97 log₂FC); 2-aminoethylphosphonate-pyruvate
17 transaminase (BB562_13505, 1.88 log₂FC); metal ABC transporter substrate-binding
18 protein (BB562_15075, 2.49 log₂FC); transcriptional regulator Spx (BB562_15285, 1.63
19 log₂FC) were only up-regulated in olive-adapted *L. pentosus* CF2-10 (Table S1).
20 However, in sunflower-adapted *L. pentosus* CF2-10 (Table S2), the following genes
21 coding for hypothetical proteins [(BB562_01300, 2.42 log₂FC); (BB562_07910, 1.59
22 log₂FC); (BB562_07915, hydrolase activity [GO:0016787], 1.70 log₂FC);
23 (BB562_13245, 1.61 log₂FC, integral component of membrane [GO:0016021]), 6-
24 phospho-beta-glucosidase (BB562_01895, 2.13 log₂FC), and short-chain dehydrogenase
25 (BB562_07735, 2.10 log₂FC) were over-expressed.

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

On the other hand, Circos plots (Fig. 4) displaying percentages of the differentially expressed ARG carrying *L. pentosus* CF2-10 showed that multidrug ABC transporter, response to antibiotics and multidrug resistance were the most prevalent resistance mechanisms under different conditions (control and oil-adapted cells) to others. In this sense, both multidrug ABC transporter and multidrug resistance were highly expressed in control (40 and 17.2%, respectively) compared with sunflower- (37 and 12.8%, respectively) and olive- (34 and 15.56%, respectively) adapted *L. pentosus* CF2-10 (Fig. 4). However, genes in response to antibiotics were over-expressed in oil-adapted *L. pentosus* CF2-10 versus control (33.4 and 32% in sunflower and olive-adapted strain

1 versus 29.7% in control). In addition, daunorubicin was over-expressed in sunflower and
2 olive-adapted *L. pentosus* CF2-10 (6.8% and 12.14%, respectively) compared with
3 control (5.7%). In comparison, aminoglycoside and multidrug MFS ARG were over-
4 expressed in sunflower-adapted *L. pentosus* CF2-10 (4.15 and 3.26%, respectively)
5 versus control (2.8 and 2.9%, respectively) (Fig. 4). Regarding other ARGs such as
6 multidrug DMT transporter and EmrB/QacA family drug, over-expression was detected
7 in oil-adapted *L. pentosus* CF2-10 (0.6-0.8%) versus control (0.4-0.6%).
8 Chloramphenicol, bleomycin and azaleucine resistance genes showed slight differences
9 between conditions (Fig. 4).
10
11
12
13
14
15
16
17

18 3.3.3. Quantitative Real-Time PCR Validation of Differential Expression

19
20 qRT-PCR was used to compare the expression activity of non-adapted cells (control)
21 and in olive/sunflower-adapted *L. pentosus* CF2-10 and verify the RNA-seq results. In
22 general, gene expressions in the olive and sunflower-adapted bacteria were higher for the
23 following genes: *mfs* (*BB562_15125* gene coding for MFS transporter), *ath*
24 (*BB562_09180* gene coding for anthranilate phosphoribosyltransferase) and *ABCtr*
25 (*BB562_00860* gene coding for peptide ABC transporter substrate-binding). As
26 determined by qPCR and RNA-seq (Fig. 5), respectively, *mfs* gene was up-expressed in
27 sunflower (5 and 4.17- fold) and olive-adapted *L. pentosus* CF2-10 (5.75 and 5.21- fold),
28 while *ath* gene was over-expressed in sunflower (4.8 and 4.47- fold) and olive-adapted *L.*
29 *pentosus* CF2-10 (4.5 and 4.11- fold). Furthermore, *ABCtr* gene was over-expressed in
30 sunflower (1.8 and 1.5- fold) and in olive-adapted *L. pentosus* CF2-10 (2 and 1.77- fold)
31 (Fig. 5). However, *cas2* (*BB562_00540* gene coding for CRISPR-associated
32 endonuclease Cas2, 2.8 and 2.54- fold) and *bglA* (*BB562_01895* gene coding for 6-
33 phospho-beta-glucosidase, 2 and 2.13- fold) genes were up-expressed in olive and
34 sunflower-adapted *L. pentosus* CF2-10, respectively. The qRT-PCR validates the
35 differential expression, and it was consistent with the RNA-Seq (Figure 5); thus, the
36 transcriptomics results were considered representative.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

4. Discussion

Vegetable edible oil direct consumption and their use as adjuncts in functional food/dietary supplement formulation have drawn attention from earlier; however, the impact of these oils on probiotic activities and their effect on defence mechanisms were poorly addressed. Recently, Alonso García et al. (2019, 2021) determined whether pre-adapting *Lactiplantibacillus pentosus* strains, isolated from Aloreña green table olives to vegetable-based edible oils improved their robustness and functionality (e.g., auto-aggregation, co-aggregation with pathogens, and mucin adhesion). However, results depended on the strain and the oil used for pre-adaptation. Improved functionality was due to *L. pentosus* strain rerouting its metabolic pathways to balance energy production and storage, cell growth and survivability, host interactions (glycoconjugates) and other physiological features. In this study, we analyzed the effect of edible oils on the defence mechanisms of *L. pentosus* isolated from Aloreña table olives, especially in terms of antibiotic resistance, which is of great relevance not only in probiotic strains but also in other bacteria of health interest such as pathogens. In this way, the transcriptomic analysis may shed light on molecular aspects involved in this adaptation correlated with the increase in resistance.

It was primarily reported that essential oils were used as alternative antimicrobials due to their ability to decrease or inhibit pathogen growth and biofilm formation (El-Tarabily et al., 2021; Millezi et al., 2016, Reda et al., 2020). However, some oils (e.g., manuka, marjoram and oregano) at sub-inhibitory concentration induced antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* (Turchi et al., 2019). In this study, we first analyzed the effect of the adaptation to different vegetable edible oils on the phenotypic and genotypic responses of three potential probiotic *L. pentosus* strains (CF1-6, CF2-10 and MP-10) to antibiotics, thus providing new insights on how they become resistant in different environments (e.g., in a food matrix, gut or other condition involving edible oils). In this sense, previous studies demonstrated that physicochemical stresses, including antimicrobials, chemicals and UV light, changed the susceptibility patterns to antibiotics by increasing MICs for ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, teicoplanin and tetracycline, and decreasing the MICs for clindamycin, erythromycin, streptomycin and trimethoprim in most *L. pentosus* strains isolated from Aloreña table olives (Casado Muñoz et al., 2016a). The results obtained in the current study indicated that oil adaptation induced the increase of antibiotic MICs in a similar way as for physicochemical stresses

1 (e.g., antimicrobials, chemicals and UV light) as reported by Casado Muñoz et al. (2016a)
2 for ciprofloxacin and tetracycline. However, the MIC of other antibiotics (e.g.,
3 erythromycin, clindamycin, streptomycin, trimethoprim, and ampicillin) was increased
4 after oil adaptation, most of which was decreased after physicochemical stress exposure
5 (Casado Muñoz et al., 2016a). This finding indicates that the susceptibility pattern of
6 antibiotics may rely mainly on the stress applied and the strains tested. We observed that
7 linseed, olive, sunflower and soy were the main oils that induced more antibiotic MICs.
8 Expression profiles of selected genes involved in stress/resistance response (*rpsL*, *recA*,
9 *uvrB* and *srtA*) differed depending on the oil used (linseed, sunflower, olive and argan)
10 for adaptation, *L. pentosus* strain (CF1-6, CF2-10 and MP-10), and the target gene. We
11 conclude that, despite the uniform phenotypic antibiotic susceptibility response to oil
12 adaptation observed in most cases, the repertoire of induced and repressed genes differs.
13 In this sense, *rpsL* gene, which encodes the 30S ribosomal protein S12, was over-
14 expressed after induction with all oils (olive, argan, sunflower and linseed) used for
15 adaptation of *L. pentosus* CF2-10; however, this gene was only over-expressed in argan
16 adapted *L. pentosus* MP-10. The over-expression of *rpsL* gene was maybe responsible for
17 the observed increased MIC of tetracycline and streptomycin in *L. pentosus* CF2-10, as a
18 30S-ribosomal protein S12 with polyspecific effects may act as an RNA chaperone
19 (Coetzee et al., 1994), to protect the ribosome structure and function under stress.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 On the other hand, the *uvrB* gene was up-regulated in *L. pentosus* CF2-10 adapted to
35 sunflower and linseed and in *L. pentosus* MP-10 adapted to argan and sunflower; this
36 gene is related to nucleotide excision repair (NER) system (*uvrA*, *uvrB*, *uvrC* and *uvrD*
37 genes). Notably, the *uvrB* and *recA* genes had paired expression patterns involved in the
38 same repair mechanism, which were activated in some cases of strain adaptation with
39 some oils, similarly as occurred with *L. pentosus* strains exposed to antibiotics (Casado
40 Muñoz et al., 2016a). In this sense, the SOS response as an inducible pathway (Van der
41 Veen and Abee, 2011) may partly be responsible for some antibiotics' increased MICs
42 after oil adaptation. Regarding the *srtA* gene, which encodes an enzyme that anchors
43 surface proteins to the cell wall (Mazmanian et al., 1999), up-regulation was only detected
44 in sunflower-adapted *L. pentosus* MP-10. No significant changes or down-regulation
45 occurred in the other cases, suggesting that the *srtA* gene was not involved in the increased
46 antibiotic MIC after oil adaptation.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

58 In general, oil adaptation as a stress condition may induce changes in the phenotypic
59 and genotypic response of potential probiotic *L. pentosus* strains highlighted by their
60
61
62
63
64
65

1 increased robustness and functionality and their resistance to antimicrobials involving a
2 repertoire of genes. However, to ensure survival and improve stress tolerance of these
3 bacteria as necessary as starter/protective cultures or probiotics, this will rely on the
4 individual screening of each strain under each stress condition. For this, we selected a
5 potential probiotic *L. pentosus* CF2-10, which exhibited more changes at phenotypic and
6 genotypic levels after oil adaptation. In this sense, *L. pentosus* CF2-10 was phenotypically
7 susceptible to tetracycline (Casado Muñoz et al., 2014). However, it was shown to be
8 resistant to this antibiotic after oil adaptation, while in the other cases, increased antibiotic
9 MIC was observed, thus increasing their resistance. To investigate the molecular
10 mechanisms behind the increased antibiotic resistance, comparative transcriptomic
11 analysis under stressing (oil adaptation) and non-stressing conditions (control) revealed
12 that olive or sunflower oils had an impact on *L. pentosus* CF2-10, showing significant
13 differences [91 and 78 DEGs in olive-adapted (O) and sunflower-adapted (G) *L. pentosus*
14 CF2-10 versus control (C), respectively], and also between stress conditions [49 DEGs in
15 sunflower-adapted (G) versus olive-adapted *L. pentosus* CF2-10]. Overall, *L. pentosus*
16 CF2-10 switched the expression of several genes involved in different metabolic
17 pathways to survive oil adaptation being; some mechanisms shared by both oils used in
18 adaptation (sunflower and olive) include bacterial secretion system, nucleotide
19 metabolism, fatty acid metabolism, amino acid metabolism, quorum sensing and stress
20 response. Some of these mechanisms are involved in growth and survival, and also in
21 probiotic activity, as reported by Alonso García et al. (2021) for olive-adapted *L. pentosus*
22 AP2-16, which responded by rerouting its metabolic pathways to balance energy
23 production and storage, cell growth and survivability, host interactions (glycoconjugates),
24 and other physiological features involved in robustness and functionality. In the current
25 study, the pre-adaptation with olive or sunflower oils switches the transcriptional network
26 of *L. pentosus* CF2-10 to regulate its functionality and robustness; antibiotic resistance is
27 one of the affected features. In this sense, over-expression of the MFS transporter gene
28 (4-5 log₂FC) involved in antibacterial drug resistance (Andersen et al., 2015; Ranaweera
29 et al., 2015) was observed in both olive and sunflower-adapted *L. pentosus* CF2-10.
30 Besides antimicrobials, MFS efflux pumps play an essential role in the extrusion of toxic
31 metabolites, Krebs cycle intermediates, quorum sensing signals and other unknown
32 molecules, being quorum sensing molecules involved in the expression of the efflux gene
33 (Evans et al., 1998; Martinez et al., 2009). According to phenotypic susceptibility tests,
34 olive and sunflower-adapted *L. pentosus* CF2-10 showed increased MICs for
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 ciprofloxacin, clindamycin, streptomycin and tetracycline, thus over-expressed MFS
2 gene may be involved in the resistance to these antibiotics. Independent of the horizontal
3 gene transfer of ARGs, MFS efflux pumps non-horizontally transferred in different
4 bacteria such as probiotics or pathogens could be induced under some stress conditions
5 (environment, diet, and digestive conditions), leading to different effects. Vegetable
6 edible oils are widely consumed as a component of the diet. Some oils that are extensively
7 used in the Mediterranean diet, such as olive oil, could represent a promising approach
8 toward the design and manufacture of probiotic products with improved stability,
9 functionality and robustness and also, in some cases, to inhibit pathogens (Dang Xuan et
10 al., 2018; Tabassum et al., 2014). However, this fact may represent a great challenge for
11 other pathogens with clinical importance since oils may induce increased resistance to
12 antibiotics used in therapy depending on the strain and the oil used.

21 On the other hand, the anthranilate-phosphoribosyltransferase gene involved in the
22 aromatic amino acid biosynthesis pathway, specifically the tryptophan synthesis, was
23 over-expressed (4-4.5 log₂FC) in olive and sunflower-adapted *L. pentosus* CF2-10. This
24 fact may enhance the growth and resistance of *L. pentosus* CF2-10 since the tryptophan
25 pathway is essential for bacterial growth. The pre-adaptation of probiotics with oils
26 represents a new approach to increase tryptophan biosynthesis in food and the gut.
27 Tryptophan has a vital role in host-microbiota cross-talk underlying regulation of gut
28 functions in health conditions and during disease states such as irritable bowel syndrome
29 (IBS) and inflammatory bowel disease (IBD) (Bosi et al., 2020).

38 Additionally, the gene coding for peptide ABC transporter substrate-binding was over-
39 expressed in olive and sunflower-adapted *L. pentosus* CF2-10 being involved in self
40 immunity and substrate export, conferring resistance against different antimicrobials,
41 including antibiotics (Smits et al., 2020). In this sense, other transporters such as
42 phosphate ABC transporter substrate-binding protein and metal ABC transporter
43 substrate-binding protein or other proteins (transcriptional regulator Spx and hypothetical
44 protein with ATPase activity) were only up-regulated in olive-adapted *L. pentosus* CF2-
45 10 being involved in the influx of essential nutrients and efflux of toxic molecules such
46 as antibiotics (Jousselin et al., 2013; Murina et al., 2019).

54 Finally, the overall analysis of DEGs abundance in sunflower or olive-adapted *L.*
55 *pentosus* MP-10 confirmed the effect of oil adaptation on the increased response to
56 antibiotics by increasing resistance against some antibiotics utilizing multidrug
57 transporters. Furthermore, it's noteworthy to highlight the increased resistance to
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

chemotherapeutic agent daunorubicin. Oil-adapted probiotics with high daunorubicin-resistance is a good strategy to administer to a patient exposed to this compound, since it inhibits commensal anaerobes such as *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Clostridium* among others (van Vliet et al., 2009).

5. Conclusions

Vegetable oils are primarily consumed and used as adjuncts in functional food/dietary supplement formulation. Thus, understanding the molecular mechanisms behind the impact of oil adaptation on potential probiotic lactobacilli is crucial to design oil adaptation as a strategy to increase their robustness and functionality under several stresses. However, the safety aspects must be analyzed to resist changes after oil adaptation to avoid resistant bacteria. In the present study, pre-adaptation of probiotic *L. pentosus* strains with oils induced changes in their phenotypic and genotypic profile related to antibiotic susceptibility and defence mechanisms. Thus, transcriptional changes were reported in the potential probiotic *L. pentosus* CF2-10 adapted with olive or sunflower, which exhibited increased antibiotic MIC and over-expression of stress genes (*rpsL*, *recA* and *uvrB*), rerouting its metabolic pathways to the export of toxic molecules such as efflux pumps and ABC transporters. Pre-adaptation of some lactobacilli with olive or sunflower oils may represent a novel approach for manufacturing probiotic products with improved stability, functionality and robustness. The control of resistance spread must include horizontal gene transfer and expression of genes induced by stress and are involved in antimicrobial resistance.

Acknowledgments

We acknowledge the Research Team (University of Jaen, EI_BIO1_2021).

Appendix A. Supplementary data

The following is the Supplementary data to this article: Figure S1, Table S1, Table S2 and Table S3.

Table S1. Genes differentially expressed in olive-adapted *L. pentosus* CF2-10 versus control.

Table S2. Genes differentially expressed in sunflower-adapted *L. pentosus* CF2-10 versus control.

Table S3. Genes differentially expressed in sunflower versus olive adapted *L. pentosus* CF2-10.

References

- 1
2 Abriouel, H., Benomar, N., Cobo, A., Caballero, N., Fernández Fuentes, M. Á, Pérez-
3 Pulido, R., Gálvez, A., 2012. Characterization of lactic acid bacteria from naturally-
4 fermented Manzanilla Aloreña green table olives. *Food Microbiol.* 32, 308–316.
5
6 Alonso García, E., Pérez Montoro, B., Benomar, N., Castillo-Gutiérrez, S., Estudillo-
7 Martínez, M. D., Knapp, C. W., Abriouel, H., 2019. New insights into the molecular
8 effects and probiotic properties of *Lactobacillus pentosus* pre-adapted to edible oils.
9 *LWT Food Sci. Technol.* 109, 153–162.
10
11 Alonso García, E., de la Fuente Ordoñez, J.J., Lavilla Lerma, L., Estudillo-Martínez,
12 M.D., Castillo-Gutiérrez, S., Benomar, N., Knapp, C.W., Abriouel, H., 2021.
13 Transcriptomic profile and probiotic properties of *Lactiplantibacillus pentosus* pre-
14 adapted to edible oils. *Front. Microbiol.* 12, 747043.
15
16 Andersen, J.L., He, G.X., Kakarla, P., Ranjana, K.C., Kumar, S., Singh Lakra, W.,
17 Mukherjee, M.M., Ranaweera, I., Shrestha, U., Tran, T., Varela, M.F., 2015.
18 Multidrug efflux pumps from *Enterobacteriaceae*, *Vibrio cholerae* and
19 *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. *Int. J. Env. Res. Pub. He.* 12,
20 1487–1547.
21
22 Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., Simoes, M., 2013. Antibacterial activity and
23 mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microb. Drug*
24 *Resist.* 19, 256–265.
25
26 Bosi, A., Banfi, D., Bistoletti, M., Giaroni, C., Baj, A., 2020. Tryptophan Metabolites
27 Along the Microbiota-Gut-Brain Axis: An interkingdom communication system
28 influencing the gut in health and disease. *Int. J. Tryptophan Res.* 13, 1–25.
29
30 Braoudaki, M., Hilton, A., 2004. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica*
31 and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *J. Clin.*
32 *Microbiol.* 42, 73–78.
33
34 Casado Muñoz, M.C., Benomar, N., Lavilla Lerma, L., Galvez, A., Abriouel, H., 2014.
35 Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudome-*
36 *senteroides* isolated from naturally-fermented Aloreña table olives throughout
37 fermentation process. *Int. J. Food Microbiol.* 172, 110-118.
38
39 Casado Muñoz, M.C., Benomar, N., Lavilla Lerma, L., Knapp, C.W., Gálvez, A.,
40 Abriouel, H., 2016a. Biocide tolerance, phenotypic and molecular response of lactic
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 acid bacteria isolated from naturally-fermented Aloreña table to different physico-
2 chemical stresses. Food Microbiol. 60, 1-12.

3 Casado Muñoz, M.C., Benomar, N., Ennahar, S., Horvatovich, P., Lavilla Lerma, L.,
4 Knapp, C.W., Gálvez, A., Abriouel, H., 2016. Comparative proteomic analysis of
5 a potentially probiotic *Lactobacillus pentosus* MP-10 for the identification of key
6 proteins involved in antibiotic resistance and biocide tolerance. Int. J. Food
7 Microbiol. 222, 8-15.

8 Coetzee, T., Herschlag, D., Belfort, M., 1994. Escherichia coli proteins, including
9 ribosomal protein S12, facilitate *in vitro* splicing of phage T4 introns by acting as
10 RNA chaperones. Genes Dev. 8, 1575-1588.

11 Courvalin, P., 2006. Antibiotic resistance: the pros and cons of probiotics. Dig. Liver Dis.
12 38, S261–5.

13 Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J., Poole, K., 1998. Influence
14 of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas*
15 *aeruginosa*. J. Bacteriol. 180, 5443–5447.

16 El-Tarabily, K.A., El-Saadony, M.T., Alagawany, M., Arif, M., Batiha, G.E., Khafaga,
17 A.F., Elwan, H.A., Elnesr, S.S., Abd El-Hack, M.E., 2021. Using essential oils to
18 overcome bacterial biofilm formation and their antimicrobial resistance. Saudi J.
19 Biol. Sci. 28, 5145–5156.

20 Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health
21 Organization, 2002. Report of a Joint FAO/WHO Working Group Report on
22 Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Rome: FAO.

23 Gueimonde, M., Sánchez, B., de los Reyes-Gavilán, C.G., Margolles, A., 2013. Antibiotic
24 resistance in probiotic bacteria. Front. Microbiol. 4, 202.

25 Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Berni
26 Canani, R., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E., 2014. Expert
27 consensus document: the international scientific association for probiotics and
28 prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term
29 probiotic. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 11, 506–514.

30 Jouselin, A., Kelley, W.L., Barras, C., Lew, D.P., Renzoni, A., 2013. The
31 *Staphylococcus aureus* Thiol/oxidative stress global regulator Spx controls *trfA*, a
32 gene Implicated in cell wall antibiotic resistance. Antimicrob. Agents Chemother.
33 57(7), 3283–3292.

- 1 Klare, I., Konstabel, C., Müller-Bertling, S., Reissbrodt, R., Huys, G., Vancanneyt, M.,
2 Swings, J., Goossens, H., Witte, W., 2005. Evaluation of new broth media for
3 microdilution antibiotic susceptibility testing of lactobacilli, pediococci, lactococci,
4 and bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8982-8986.
5
6
7 Kopylova, E., Noé, L., Touzet, H., 2012. SortMeRNA: fast and accurate filtering of
8 ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* 28, 3211–3217.
9
10
11 Kraemer, S.A., Ramachandran, A., Perron, G.G., 2019. Antibiotic Pollution in the
12 Environment: From Microbial Ecology to Public Policy. *Microorganisms* 7,180.
13
14 Laxminarayan, R., 2014. Antibiotic effectiveness: balancing conservation against
15 innovation. *Science* 345, 1299–1301.
16
17
18 Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and
19 dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550.
20
21
22 Lushniak, B.D., 2014. Antibiotic resistance: a public health crisis. *Public Health Rep.*
23 129(4), 314-6.
24
25
26 Maltas, J., Krasnick, B., Wood, K.B., 2020. Using selection by nonantibiotic stressors to
27 sensitize bacteria to antibiotics. *Mol. Biol. Evol.* 37(5), 1394–1406.
28
29
30 Martínez, J.L., 2008. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments.
31 *Science* 321, 365–367.
32
33
34 Martínez, J.L., Sanchez, M.B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L.,
35 Fajardo, A., Alvarez-Ortega, C., 2009. Functional role of bacterial multidrug efflux
36 pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 430–449.
37
38
39 Mazmanian, S.K., Liu, G., Ton-That, H., Schneewind, O., 1999. *Staphylococcus aureus*
40 sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* 285, 760-
41 763.
42
43
44 Merchel Piovesan Pereira, B., Wang, X., Tagkopoulos, I., 2021. Biocide-Induced
45 Emergence of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 12,
46 640923.
47
48
49 Michael, C.A., Dominey-Howes, D., Labbate, M., 2014. The antibiotic resistance crisis:
50 causes, consequences, and management. *Front. Public Health* 2, 145.
51
52
53 Millezi, A.F., Piccoli, R.H., Oliveira, J.M., Pereira, M.O., 2016. Anti-biofilm and
54 antibacterial effect of essential oils and their major compounds. *J. Essent. Oil Bear*
55 *Plants* 19, 624-631.
56
57
58 Murina, V., Kasari, M., Takada, H., Hinno, M., Saha, C.K., Grimshaw, J.W., Seki, T.,
59 Reith, M., Putrinš, M., Tenson, T., Strahl, H., Hauryliuk, V., Atkinson, G.C., 2019.

1 ABCF ATPases Involved in Protein Synthesis, Ribosome Assembly and Antibiotic
2 Resistance: Structural and Functional Diversification across the Tree of Life. J.
3 Mol. Biol. 431(18), 3568-3590.
4

5 Naser, S.M., Thompson, F.L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M.,
6 Swings, J., 2005. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid
7 identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. Microbiology
8 151(Pt 7), 2141–2150.
9

10 Oz, T., Guvenek, A., Yildiz, S., Karaboga, E., Tamer, Y. T., Mumcuyan, N., Burak Ozan,
11 V., Hazal Senturk, G., Cokol, M., Yeh, P., Toprak, E., 2014. Strength of selection
12 pressure is an important parameter contributing to the complexity of antibiotic
13 resistance evolution. Mol. Biol. Evol. 31, 2387–2401.
14

15 Patro, R., Duggal, G., Love, M.I., Irizarry, R.A., Kingsford, C., 2017. Salmon provides
16 fast and bias-aware quantification of transcript expression. Nat. Methods 14, 417–
17 419.
18

19 Pérez Montoro, B., Benomar, N., Lavilla Lerma, L., Castillo Gutiérrez, S., Gálvez, A.,
20 Abriouel, H., 2016. Fermented Aloreña table olives as a source of potential
21 probiotic *Lactobacillus pentosus* strains. Front. Microbiol. 7, 1583.
22

23 Ranaweera, I., Shrestha, U., Ranjana, K.C., Kakarla, P., Willmon, T.M., Hernandez, A.J.,
24 Mukherjee, M.M., Barr, S.R., Varela, M.F., 2015. Structural comparison of
25 bacterial multidrug efflux pumps of the major facilitator superfamily. Trends Cell.
26 Mol. Biol. 10, 131–140.
27

28 Reda, F.M., Alagawany, M., Mahmoud, H.K., Mahgoub, S.A., Elnesr, S.S., 2020. Use of
29 red pepper oil in quail diets and its effect on performance, carcass measurements,
30 intestinal microbiota, antioxidant indices, immunity and blood constituents.
31 Animals 14, 1025-1033.
32

33 Smits, S.H.J., Schmitt, L., Beis, K., 2020. Self-immunity to antibacterial peptides by ABC
34 transporters. FEBS Lett. 594, 3920–3942.
35

36 Sonesson, C., Love, M.I., Robinson, M.D., 2015. Differential analyses for RNA-seq:
37 transcript-level estimates improve gene-level inferences. F1000Res. 4, 1521.
38

39 Tabassum, N., Vidyasagar, G.M., 2014. *In-vitro* antimicrobial activity of edible oils
40 against human pathogens causing skin infections. Int. J. Pharm. Sci. Res. 5(10),
41 4493-98.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 Thielmann, J., Kohnen, S., Hauser, C., 2017. Antimicrobial activity of *Olea europaea*
2 Linne extracts and their applicability as natural food preservative agents. *Int. J.*
3 *Food Microbiol.* 251, 48–66.
4
- 5 Toomey, N., Monaghan, Á., Fanning, S., Bolton, D., 2009. Transfer of antibiotic
6 resistance marker genes between lactic acid bacteria in model rumen and plant
7 environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3146–52.
8
- 9 Turchi, B., Mancini, S., Pistelli, L., Najar, B., Fratini, F., 2019. Sub-inhibitory
10 concentration of essential oils induces antibiotic resistance in *Staphylococcus*
11 *aureus*. *Nat. Prod. Res.* 33(10), 1509-1513.
12
- 13 Van Bruggen, A.H.C., Goss, E.M., Havelaar, A., van Diepeningen, A.D., Finckh, M.R.,
14 Morris, J.G., 2019. One Health—Cycling of diverse microbial communities as a
15 connecting force for soil, plant, animal, human and ecosystem health. *Sci. Total*
16 *Environ.* 664, 927–937.
17
- 18 Van der Veen, S., Abee, T., 2011. Bacterial SOS response: a food safety perspective.
19 *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 136-142.
20
- 21 van Vliet, M.J., Tissing, W.J., Dun, C.A., Meessen, N.E., Kamps, W.A., de Bont, E.S.,
22 Harmsen, H.J., 2009. Chemotherapy treatment in pediatric patients with acute
23 myeloid leukemia receiving antimicrobial prophylaxis leads to a relative increase
24 of colonization with potentially pathogenic bacteria in the gut. *Clin. Infect. Dis.* 49,
25 262-270.
26
- 27 Wand, M.E., Bock, L.J., Bonney, L.C., Sutton, J.M., 2017. Mechanisms of increased
28 resistance to chlorhexidine and cross-resistance to colistin following exposure of
29 *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to chlorhexidine. *Antimicrob. Agents*
30 *Chemother.* 61, e01162–16.
31
- 32 Yao, G., Cao, C., Zhang, M., Kwok, L-Y., Zhang, H., Zhang, W., 2021. *Lactobacillus*
33 *casei* Zhang exerts probiotic effects to antibiotic-treated rats. *Comput. Struct.*
34 *Biotechnol. J.* 19, 5888–5897.
35
- 36 Xuan, T.D., Gangqiang, G., Minh, T.N., Quy, T.N., Khanh, T., 2018. An overview of
37 chemical profiles, antioxidant and antimicrobial activities of commercial vegetable
38 edible oils marketed in Japan. *Foods* 7, 21.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure legend

Figure 1. The effect of oil adaptation on the expression of *rpsL*, *recA*, *uvrB* and *srtA* genes in *L. pentosus* CF2-10 (A), *L. pentosus* MP-10 (B) and *L. pentosus* CF1-6 (C). The relative expression levels were normalized to control values for the three *L. pentosus* strains for x-fold expression analysis. Each bar represents the mean value and the standard deviation as the error bar for three independent experiments. * denotes significant differences between controls and oil-adapted strain ($P < 0.05$).

Figure 2. GO classification of significantly differentially expressed genes (DEGs) in oil-adapted *L. pentosus* CF2-10. Significantly up-regulated (turquoise bars) and down-regulated (brick bars) DEGs (\log_2 FoldChange > 1.5) between sunflower-adapted (G) and olive-adapted (O) (G vs O); between olive-adapted (O) and non-adapted (C) (O vs C); and between sunflower-adapted (G) and non-adapted (C) (G vs C) *L. pentosus* CF2-10 were annotated into GO terms.

Figure 3. Expression of differentially expressed genes in the oil-adapted (G or O) *L. pentosus* CF2-10 vs. control (C). Samples in columns and the encoded genes on rows. Differential expression is indicated with the color key. Samples: O vs C, olive-adapted strain vs. control; G vs C, sunflower-adapted strain vs. control; and G vs O, sunflower-adapted strain vs. olive-adapted strain.

Figure 4. Circos plot illustrating abundance of differentially expressed antibiotic resistance genes (ARGs) in oil-adapted (G or O) *L. pentosus* CF2-10 vs. control (C). The width of each connecting ribbon is directly proportional to the percentage of expressed ARG in each transcriptome sample. A specific ribbon color represented each ARG, and the width of each ribbon demonstrates the abundance of each differentially expressed ARG.

Figure 5. Validation of relative RNA sequence results of five selected genes in the non-adapted cells (control) and sunflower (A) and olive (B) -adapted *L. pentosus* CF2-10, by comparing with qRT-PCR results. All values were normalized to "control" values.

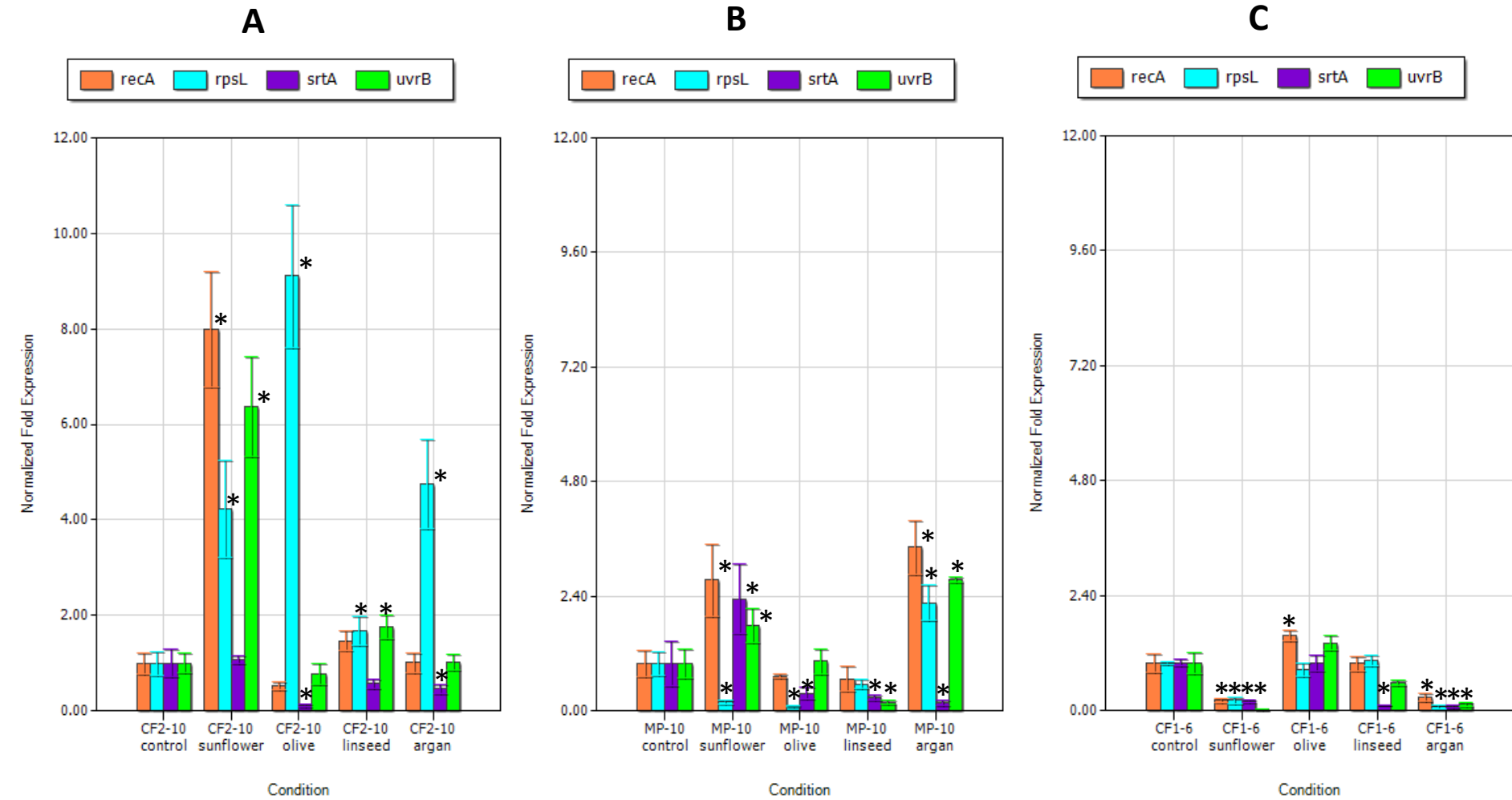


Figure 1

Figure 2

[Click here to access/download;Figure;Figure 2.pptx](#)

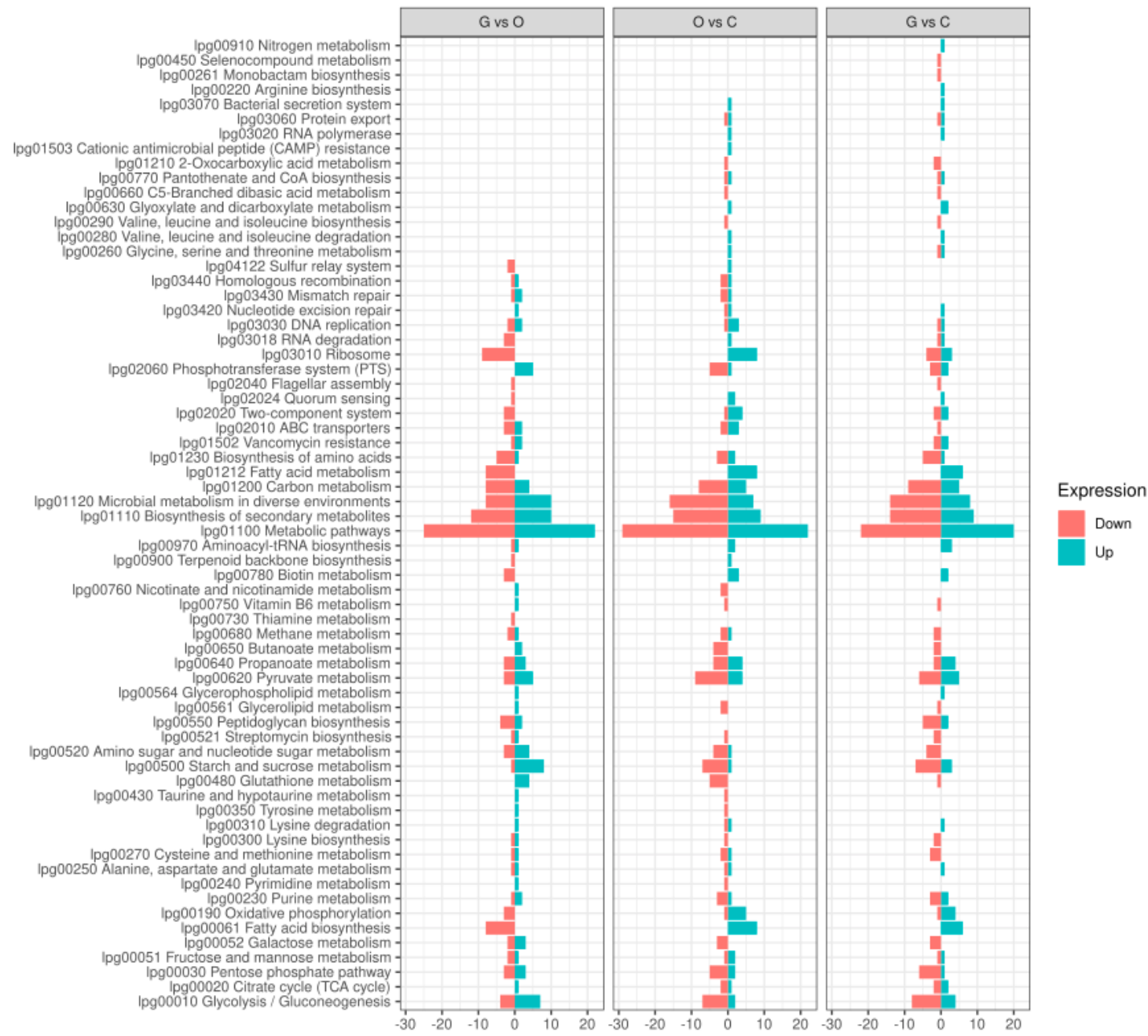


Figure 2

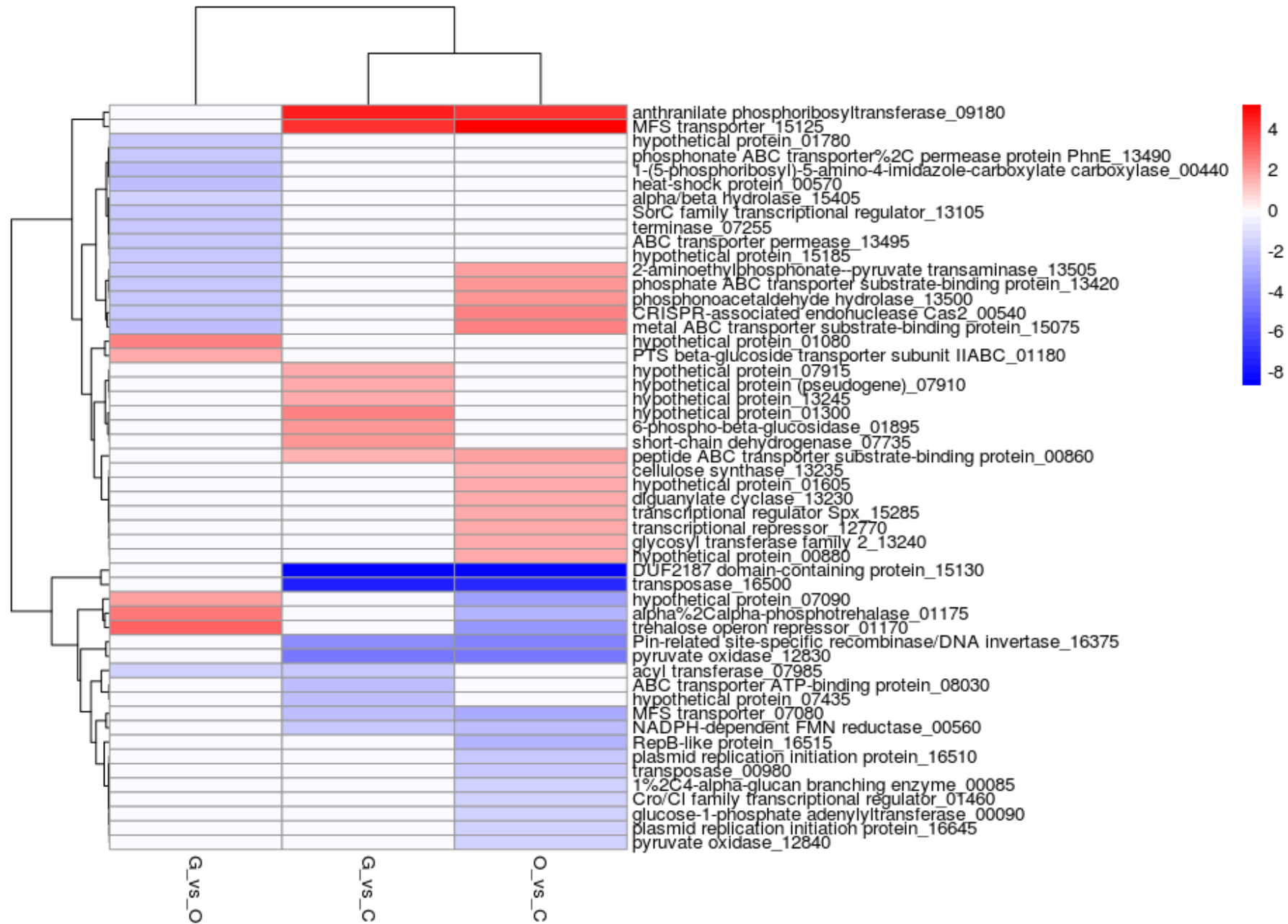


Figure 3

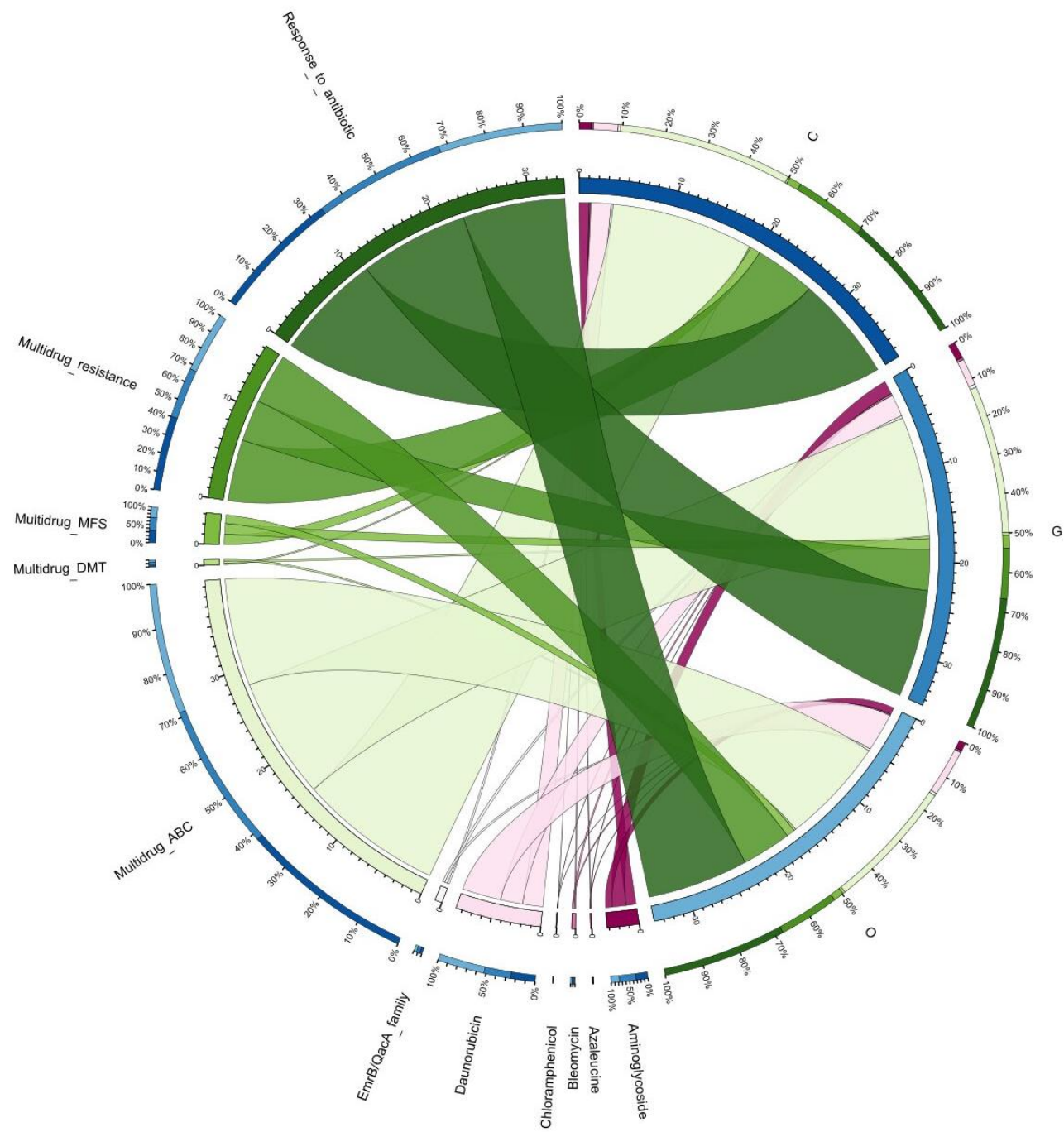


Figure 4

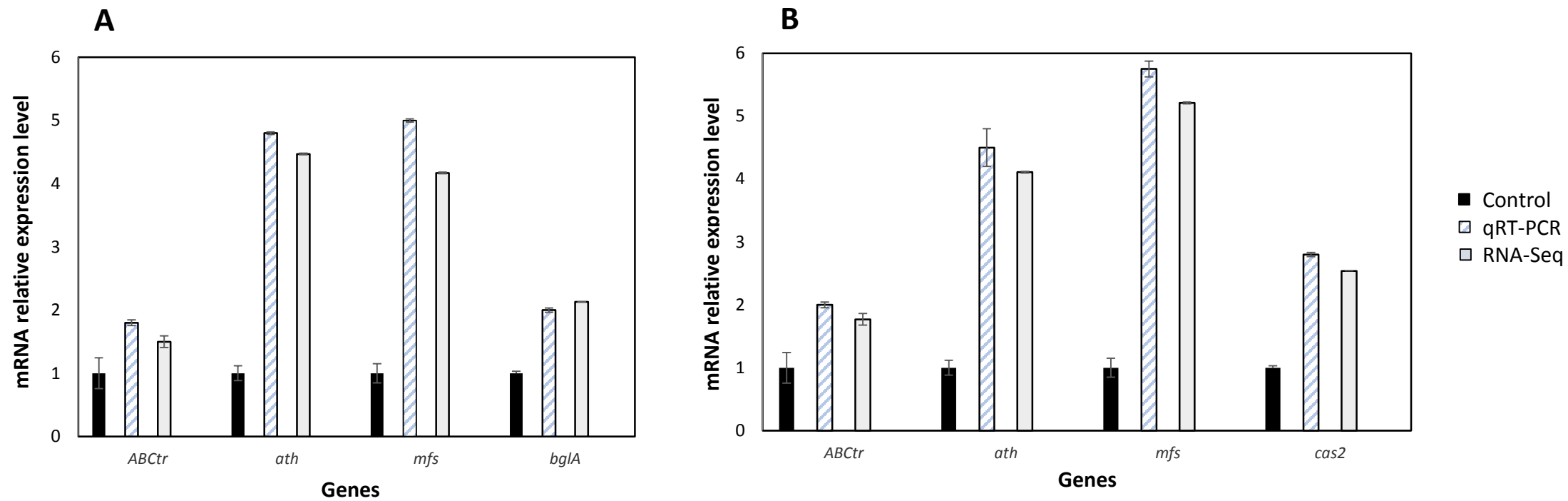


Figure 5

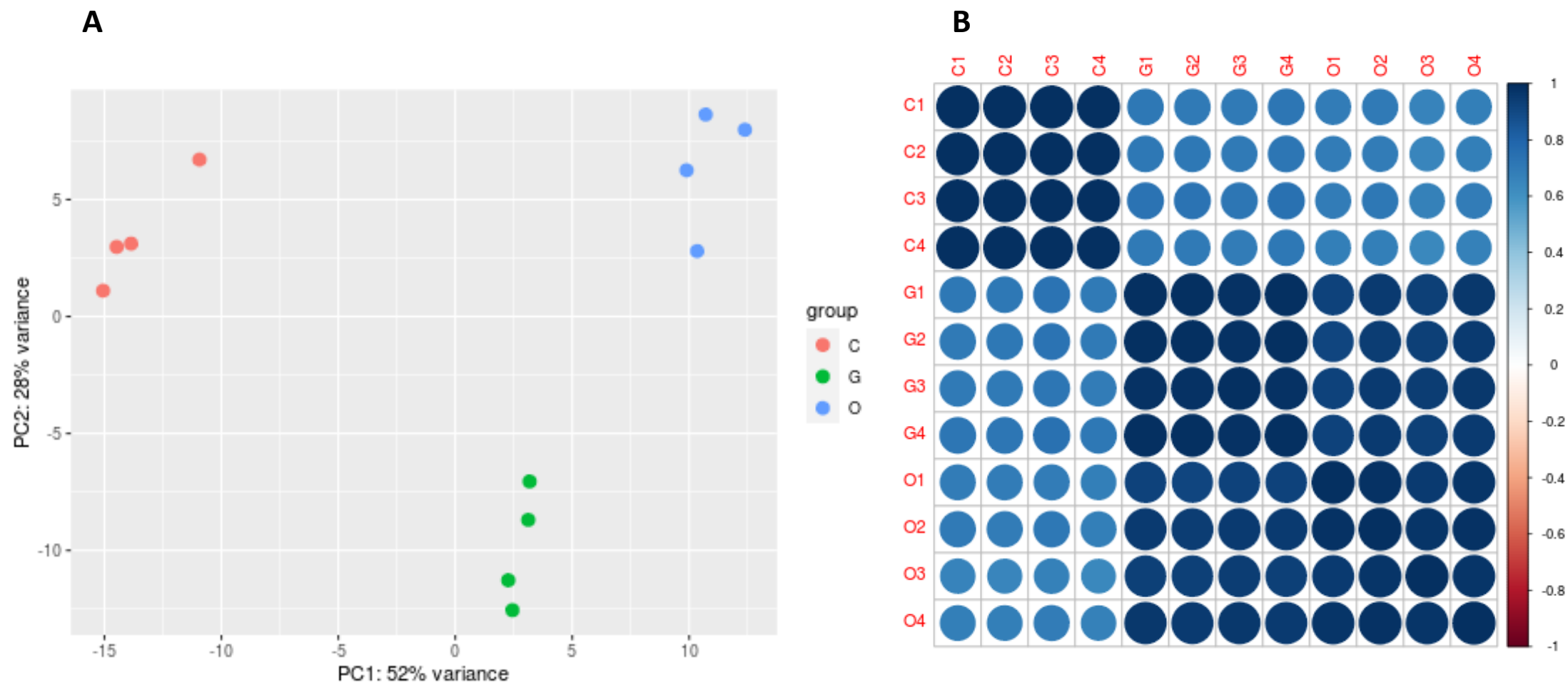


Figure S1

Legend:

Figure S1. Correlation among *Lactiplantibacillus pentosus* CF2-10 RNA-seq samples. (A) Principal component analysis (PCA) of transcript levels of RNA-seq samples. The analysis was performed on R using the expression data of all expressed genes. (B) Heat map of the Pearson correlation of sequenced samples based on gene expression level. Clustering was done according to the expression data of all expressed genes. Samples: C, control; G, sunflower-adapted *L. pentosus* CF2-10; O, olive-adapted *L. pentosus* CF2-10.

Table 1

Primers and PCR conditions used in this study.

Gene (product)	Primer	Sequence (5'-3')	Annealing Temperature (°C)	PCR product size (bp)	Reference
<i>mfs</i> (MFS transporter)	<i>mfs-F</i>	ATGCAGACAACCTGGTCAAAACA	59	200	This study
	<i>mfs-R</i>	ACGACCATCGTCAACATAAAA			
<i>ath</i> (Anthranilate phosphoribosyltransferase)	<i>ath-F</i>	ATGGTTATTGCGGTGGCGA	59	213	This study
	<i>ath-R</i>	ACTAAAGGAAGATTGAGCATC			
<i>ABCtr</i> (Peptide ABC transporter substrate- binding protein)	<i>ABCtr-F</i>	ATGCAATGGAAATTATTTACAAC	59	212	This study
	<i>ABCtr-R</i>	ATCGTGCCACTAACCACGT			
<i>cas2</i> (CRISPR-associated endonuclease Cas2)	<i>cas2-F</i>	ATGAGTATGTTGGTCGTGGT	59	217	This study
	<i>cas2-R</i>	ATGTCTGGAAC TCAAATCCC			
<i>bglA</i> (6-phospho-beta-glucosidase)	<i>bglA-F</i>	ATGATAGTGAAAAA ACTCACCT	59	212	This study
	<i>bglA-R</i>	ACGGCTTCATGGTTTGGATA			
<i>pheS</i> (Phenylalanyl-tRNA synthase alphasubunit)	<i>pheS-21F</i>	CAYCCNGCHCGYGAYATGC	59	411	Naser et al. (2005)
	<i>pheS-23R</i>	GGRTGRACCATVCCNGCHCC			

Antimicrobials are: AMP, ampicillin; AMX, amoxicillin; CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; CLI, Clindamycin; ERY, erythromycin; GEN, gentamycin; KAN, kanamycin; SMZ/TMP, sulfametoxazol/Trimethoprim; STR, streptomycin; TET, tetracycline.

(↗ and ↘): Strains exhibited fold increase or decrease, respectively in the corresponding antibiotic MICs comparing with controls under standard conditions. (-): No change in MIC comparing with non-adapted strain to oil.

DISCUSIÓN

Los aceites vegetales comestibles se han propuesto durante siglos como ingredientes de calidad alimentaria, condimentos, cosméticos y también como agentes terapéuticos debido a sus actividades antimicrobianas y/o antiinflamatorias (Gurib-Fakim, 2006; Reichert, 2002). Además, los aceites vegetales se han utilizado como componentes de emulsiones que transportan microorganismos, genes, proteínas antigénicas y fármacos (Nam *et al.*, 2009). Sin embargo, como componente dietético, queda poca información disponible de sus efectos sobre los probióticos y otras bacterias saludables en los productos alimenticios y el intestino (Shahdadi *et al.*, 2015). Para asegurar la funcionalidad de los probióticos, los microorganismos deben permanecer viables durante toda la vida útil de los productos en los que se incorporan y en el tracto gastrointestinal (Galdeano & Perdigon, 2004). Como tales, los aceites vegetales comestibles añadidos a los alimentos probióticos, o como parte de la dieta, pueden afectar su viabilidad y funcionalidad; constituyen una fuente de potentes agentes naturales biológicamente activos incapaces de discriminar entre bacterias benéficas y patógenas (Nychas *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha visto que los aceites esenciales inhiben los patógenos y algunas bacterias probióticas (Mahmoudi *et al.*, 2014).

En condiciones ambientales, dietéticas y digestivas, las bacterias probióticas encuentran varios factores estresantes que incluyen temperatura, ácido, bilis, componentes dietéticos, estrés oxidativo y osmótico y antimicrobianos, entre otros. Para contrarrestar los efectos perjudiciales de las condiciones hostiles y el estrés, las respuestas de los probióticos resultantes de los mecanismos de adaptación inducen cambios bioquímicos y fisiológicos para asegurar la supervivencia o incluso una actividad probiótica mejorada. En este sentido, varias investigaciones se centraron en la búsqueda de nuevas estrategias para incrementar la robustez de las bacterias benéficas, aprovechando las adaptaciones naturales en condiciones adversas. Los estudios previos realizados por varios autores (Corcoran *et al.*, 2006; Desmond *et al.*, 2002; Gaucher *et al.*, 2019; Mills *et al.*, 2011) mostraron que la adaptación a diferentes estreses (sal, pH bajo, bilis, alta temperatura, etc.) como estrategia para mejorar el desempeño tecnológico de los lactobacilos probióticos (Corcoran *et al.*, 2006;

Desmond *et al.*, 2002; Mills *et al.*, 2011; Pérez Montoro, Benomar, Caballero Gómez, Ennahar, Horvatovich, Knapp, Gálvez, *et al.*, 2018). Además, Casado Muñoz *et al.*, (2016) indicaron que la adaptación a concentraciones subletales de antimicrobianos podría ser una buena manera de lograr la robustez deseable del probiótico *L. pentosus* MP-10 en diversas condiciones ambientales y gastrointestinales (por ejemplo, estrés ácido y biliar) según lo revelado por el análisis proteómico. Asimismo, Pérez Montoro *et al.* (2018) mostraron que las cepas de *L. pentosus* preexpuestas a ácidos mostraban una función probiótica mejorada, como la capacidad de autoagregación a través de proteínas de superficie.

Teniendo en cuenta esta información, el primer estudio tuvo dos objetivos principales: en primer lugar, la evaluación *in vitro* de cómo los aceites dietéticos afectaban el crecimiento de bacterias probióticas y, en segundo lugar, cómo la preadaptación con aceites comestibles vegetales aumentaba la robustez de las bacterias probióticas y mejoraba las características probióticas y qué mecanismos moleculares estaban involucrados.

En este estudio se examinó *in vitro* el efecto de los aceites comestibles sobre el crecimiento de cepas probióticas de *L. pentosus* aisladas de aceitunas verdes de mesa Aloreña, ya que existe un gran interés en desarrollar alimentos probióticos que contengan aceites. Como tal, la viabilidad (es decir, la supervivencia y el crecimiento óptimo) de las bacterias probióticas debe garantizarse durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos, así como en el tracto gastrointestinal donde promueven beneficios para la salud (Ranadheera *et al.*, 2010). Este estudio indica que los aceites vegetales probados (al 2% como concentración adecuada para ensayar todos los aceites) promovieron niveles variables de inhibición del crecimiento de las cepas de *L. pentosus* con potencial probiótico, y cada cepa de *L. pentosus* respondió de manera diferente, aunque los recuentos de células fueron a menudo mayores que el requisito mínimo de 10^8 UFC/ml para que un producto se considere probiótico. Además, el aceite esencial de menta mostró el mayor efecto inhibitorio en comparación con los otros aceites (es decir, girasol, oliva, lino, soja, maíz, almendra y argán), disminuyendo

la viabilidad bacteriana hasta $1.2 \log_{10}$ tras una incubación de 24 horas, con recuentos celulares manteniéndose, en la mayoría de los casos, por encima de 10^8 CFU/ml. De manera similar, Moritz, Rall, Saeki, & Júnior (2012) demostraron que el aceite esencial de menta solo causaba estrés subletal a un probiótico *L. rhamnosus* en la leche fermentada durante su período de vida útil; sin embargo, Shahdadi *et al.* (2015) mostraron que el aceite esencial de menta disminuyó la viabilidad del probiótico *L. acidophilus* e inhibió la reducción del pH durante el almacenamiento de yogur líquido para beber. Los ácidos grasos, presentes como triglicéridos en estos aceites, y los polifenoles, inhiben directamente la viabilidad de las bacterias probióticas según el tipo de aceite y las reacciones de la cepa expuesta. Aquí, tanto el crecimiento como la capacidad de acidificar se vieron relativamente afectados por los tratamientos con aceites, especialmente por el aceite esencial de menta, aunque a menudo no disminuyeron la viabilidad celular por debajo del recuento mínimo requerido para ser considerado un probiótico. A la luz de estos hallazgos, la ingestión de algunos aceites puede afectar la viabilidad de algunas bacterias beneficiosas, pero podría ayudar a reducir los patógenos tanto en los productos alimenticios como en el intestino.

Teniendo en cuenta que la viabilidad de las bacterias probióticas y su funcionalidad depende de la cepa y del aceite utilizado, los probióticos de segunda generación se obtuvieron mediante la preadaptación de cepas de probióticas de *L. pentosus* con los diferentes aceites. El uso de probióticos de segunda generación puede tener efectos positivos adicionales, incluidas actividades probióticas mejoradas en comparación con las cepas parentales de *L. pentosus*. Los resultados mostraron una tasa de crecimiento mejorada de bacterias adaptadas (frente a bacterias no adaptadas) una vez expuestas a los aceites, alcanzando recuentos viables similares o mayores (hasta 9 unidades logarítmicas) que los controles cultivados en ausencia de aceites. En este sentido, las bacterias probióticas responden al estrés produciendo sustancias específicas, como exopolisacáridos y proteínas, que pueden proteger a las células de otros factores estresantes (Nguyen *et al.*, 2016). Además, esta adaptación tuvo un gran impacto en sus características probióticas detectadas *in vitro*, como la tolerancia al pH bajo y las

sales biliares. Por otro lado, se ha demostrado ampliamente que las características probióticas están muy relacionadas con la cepa y sus sustancias producidas; sin embargo, las condiciones de exposición de la cepa probiótica son cruciales para determinar su funcionalidad, como las respuestas a diferentes tensiones ambientales (incluidas las gastrointestinales) o tecnológicas. La preexposición de bacterias probióticas al estrés puede afectar su robustez, como estudiaron previamente Casado Muñoz *et al.* (2016), que mostraron que la preexposición de *L. pentosus* -con potencial probiótico- a ácidos mejora sus funciones probióticas como la autoagregación a través de proteínas de superficie. Otros estudios revelaron que los probióticos preadaptados a múltiples factores de estrés como los ácidos, la bilis o la temperatura son más robustos a las condiciones gastrointestinales simuladas que sus contrapartes parentales y exhiben acciones antagónicas mejoradas contra los patógenos (Mathipa & Thantsha, 2015). Siguiendo estos estudios, se comparó la capacidad de supervivencia de cepas de *L. pentosus* adaptadas al aceite a un pH bajo y una concentración alta de bilis; los resultados demostraron que la preadaptación de los probióticos con algunos aceites mejoró su tolerancia a los ácidos y la bilis. La tolerancia al ácido de las cepas de *L. pentosus* no adaptadas y adaptadas fue similar a pH 2.0, sin embargo se detectaron diferencias evidentes a pH 1.5, dependiendo del aceite usado y la cepa ensayada. En general, los aceites del maíz, el argán, el girasol y la soja indujeron de manera más efectiva la tolerancia al ácido en casi todas las cepas de *L. pentosus*, seguidas de los aceites de oliva, almendra y lino. Sin embargo, los aceites de oliva, lino y argán aumentaron la tolerancia a la bilis en la mayoría de las cepas de *L. pentosus*. Estos resultados sugieren que se utilizaron diferentes mecanismos para resistir ambas tensiones aplicadas en este estudio.

Para obtener una mayor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la tolerancia a ácido/bilis después de la adaptación al aceite, se realizó un estudio comparativo de la expresión de genes involucrados en la respuesta al estrés/tolerancia. Estudios previos (p. ej., Montoro *et al.*, 2016), utilizando análisis proteómico comparativo, determinaron que los marcadores proteicos implicados en la resistencia a

los ácidos en *L. pentosus* eran fosfoglicerato mutasa 2 dependiente de 2,3-bisfosfoglicerato (PGAM-d) y el factor de elongación G, que se produjeron en exceso en condiciones estándar y de acidez. Como tal, el análisis del gen *pgm*, que codifica la fosfoglicerato mutasa; el gen *fus*, que codifica el factor de elongación G; y otros genes tales como *gapd*, que codifica gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa; el gen *tuf*, que codifica el factor de elongación Tu; el gen *prep*, que codifica la prepilina; el gen *groEL*, que codifica la proteína de choque térmico GroEL; el gen *enol*, que codifica enolasa; el gen *adhes*, que codifica adhesina; y el gen *rpsL*, que codifica la proteína S12 de la subunidad ribosómica 30S, reveló que las cepas de *L. pentosus* adaptadas al aceite exhibían un repertorio diferente de sobreexpresión génica, según la cepa y el aceite utilizado para la adaptación. En comparación con las cepas parentales, las respuestas adaptativas de cada cepa de *L. pentosus* se relacionaron con diferentes conjuntos de genes (es decir, *groEL*, *pgm*, *rpsL*, *fus*, *gapd*, *tuf*, *prep* y *enol*) sobreexpresados para mantener la homeostasis del pH intracelular, la producción de energía, el metabolismo de proteínas y carbohidratos y la secreción. En cada cepa adaptada de *L. pentosus*, dependiendo del aceite utilizado, se involucró un equilibrio de diferentes respuestas en la tolerancia/resistencia, que es una característica estable e irreversible. Con respecto a la tolerancia a la bilis, se sobreexpresaron diferentes conjuntos de genes (*fus*, *pgm*, *gapd*, *prep*, *groEL*, *enol* y *rpsL*). En general, independientemente de la cepa y el tratamiento con aceite, los genes *fus*, *rpsL*, *pgm*, *groEL*, *enol* y *prep* fueron sobreinducidos en cepas de *L. pentosus* adaptadas al aceite y que han sido involucradas en la tolerancia a ácido/bilis. La respuesta a los aceites, especialmente los de oliva, argán, girasol y lino, desencadenó la inducción de genes implicados en el metabolismo para asegurar la supervivencia bajo estrés por el aceite y, en consecuencia, también estuvieron implicados en la tolerancia a ácido y/o bilis. Pérez Montoro *et al.* (2016) demostraron que las cepas de *L. pentosus* preexpuestas a ácidos mostraron una mejor función probiótica, incluida una mayor capacidad de autoagregación, por medio de proteínas multifuncionales como el factor de elongación G (codificado por el gen *fus*) y el fosfoglicerato mutasa 2 dependiente de 2,3-bisfosfoglicerato (codificada por el gen

pgm). Como tal, ambos genes que codifican proteínas multifuncionales y están involucrados en la tolerancia a los ácidos, también fueron inducidos por los aceites. Además, Pérez Montoro *et al.* (2018) encontraron que los genes que codifican algunas de las proteínas biomarcadores involucradas en la adhesión de mucina de *L. pentosus* también fueron inducidos por aceites; por lo tanto, podemos sugerir que esta preadaptación también puede estar involucrada en la mejora de la capacidad de adhesión de *L. pentosus* –con potencial probiótico– en el intestino, además de su tolerancia a los ácidos.

Los resultados obtenidos también mostraron que el crecimiento en presencia de algunos aceites comestibles puede disminuir las propiedades probióticas en varios casos dependiendo de la cepa y también del aceite utilizado. Sin embargo, también se observó un aumento en la capacidad de autoagregación y adhesión de mucina de las bacterias probióticas, dependiendo también de la cepa ensayada y del aceite utilizado. Por otro lado, la adaptación previa de cepas de *L. pentosus* con aceites mejoró su respuesta y, por lo tanto, las actividades probióticas se incrementaron en algunos casos dependiendo de la cepa y el aceite utilizado para la adaptación.

Este estudio confirmó que la pre-adaptación de cepas probióticas de *L. pentosus* con aceites constituirá una nueva estrategia para incrementar su robustez y funcionalidad. El análisis multivariado de las propiedades probióticas en ambos casos (aceites en medio de crecimiento o después de la adaptación previa de cepas con aceites) para todas las cepas de *L. pentosus* mostró que la disimilitud observada de las cepas probióticas fue independientemente del aceite utilizado en el medio de cultivo o en el proceso de adaptación, estando la adhesión a mucina y la autoagregación altamente correlacionadas, lo que sugiere mecanismos moleculares comunes involucrados en tales actividades.

Sobre la base de este análisis, la cepa *L. pentosus* AP2-16 seleccionada con el mejor perfil probiótico se sometió a agrupamiento jerárquico de PCA con el objetivo de determinar la disimilitud entre los aceites entre la misma cepa y así determinar la respuesta molecular detrás de las propiedades probióticas en cada condición,

determinando la mejor estrategia para dicha cepa. En este sentido, teniendo en cuenta que la respuesta adaptativa depende de la cepa y la condición, se seleccionó y se analizó *L. pentosus* AP2-16 adaptada a aceites de oliva y almendras a nivel transcriptómico comparándolo con el control (sin adaptación al aceite) para explorar los mecanismos subyacentes mediados por bacterias y responsables de la mejora de las propiedades probióticas en condiciones de adaptación al aceite.

Este es el primer estudio centrado en el análisis transcriptómico del impacto de los aceites comestibles en los probióticos para aportar nuevos conocimientos sobre la respuesta de una posible bacteria probiótica de origen vegetal a la adaptación al aceite. Los resultados obtenidos mostraron que no se presentaron cambios entre el control y *L. pentosus* AP2-16 adaptada al aceite de almendra, sin embargo, la cepa adaptada al aceite de oliva mostró diferencias significativas frente al control (125 genes expresados diferencialmente de forma significativa) y también frente a la cepa adaptada al aceite de almendra (108 genes expresados diferencialmente de forma significativa). Entre los 125 genes expresados diferencialmente en *L. pentosus* AP2-16 adaptada al aceite de oliva, 60 genes fueron regulados positivamente por estar involucrados en el proceso de biosíntesis de glucógeno, metabolismo de carbohidratos, biosíntesis de aminoácidos, componentes de membrana y citoplasma y varias actividades metabólicas. Sin embargo, los genes implicados en la traducción, el proceso catabólico del fosfonato orgánico, el ribosoma (subunidades pequeña y grande), la unión del ARNr, la unión del ARNt y la unión del ion magnesio estaban regulados negativamente.

Con respecto al metabolismo de los carbohidratos, se detectó una regulación positiva de genes que codifican proteínas que participan en la glucólisis/gluconeogénesis, el metabolismo de la galactosa, la vía de las pentosas fosfato (PPP), el almidón y el metabolismo de la sacarosa. *Lactiplantibacillus pentosus* empleó estos cambios metabólicos en los carbohidratos para mejorar la producción de energía para resistir la adaptación al aceite. En este sentido, las enzimas glucósido hidrolasa representadas por 6-fosfo- β -glucosidasa y beta-galactosidasa (Familia 1), alfa, alfa-fosfotrehalasa (Familia 13) y sacarosa-6-fosfato hidrolasa (Familia 32) fueron

sobreproducidas catalizando la hidrólisis del enlace glicosídico entre dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato y un resto no glucídico de β -glucósidos para producir monosacáridos. Además, la sobreexpresión de genes que codifican glicosiltransferasas como glucosa-1-fosfato adeniltransferasa y enzima ramificadora 1,4-alfa-glucano que potencian la biosíntesis de glicoconjugados mediante la transferencia de restos de azúcar de un donante activado a un sustrato específico (Lairson *et al.*, 2008), contribuyen a la biosíntesis de disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos como el glucógeno (función de almacenamiento).

Por otro lado, el transporte se incrementó por medio de la sobreproducción de la subunidad transportadora de PTS-beta-glucósido (sistema fosfotransferasa-beta-glucósido) EIIBCA que está involucrada en la captación de carbohidratos necesarios para el crecimiento. En general, las proteínas sobreproducidas que participan en el metabolismo y el transporte de carbohidratos pueden jugar un papel clave en la adaptación de *L. pentosus* AP2-16 al aceite de oliva, pero también tienen una ventaja en su adaptación a la fermentación de alimentos de origen vegetal y también ambientes del tracto gastrointestinal (GIT) (Corcoran *et al.*, 2005). En la fermentación de alimentos, el aumento del metabolismo de los carbohidratos es un rasgo deseable y la regulación al alza del gen que codifica la transcetolasa (enzima de la PPP) puede dar a la cepa adaptada al aceite de oliva una ventaja competitiva en alimentos de origen vegetal y también en GIT, ya que la ribosa es abundante en material vegetal y también en la dieta. Además, como probiótico, los glicoconjugados pueden facilitar y mejorar la interacción específica con el huésped (Kay *et al.*, 2010). Este hecho se demostró previamente en la cepa *L. pentosus* MP-10 aislada de aceitunas de mesa Aloreña (Abriouel *et al.*, 2017) y también en otros probióticos (Kim *et al.*, 2009). Por otro lado, los transcriptomas de *L. pentosus* AP2-16 adaptada al aceite de oliva mostraron diferencias adicionales en comparación con la cepa adaptada al aceite de almendra, ya que otros genes también estaban regulados positivamente y estaban involucrados en el metabolismo de la galactosa, el ciclo del citrato y el metabolismo del piruvato. Todos los mecanismos de adaptación desencadenados por *L. pentosus* AP2-16 adaptada al

aceite de oliva con respecto al metabolismo de los carbohidratos, muestran una imagen coherente de los cambios en la expresión génica que se espera que resulten en la producción de energía, el almacenamiento de energía y otros procesos biológicos para ayudar a las bacterias a adaptarse a los nuevos ambientes mejorando su capacidad para autoagregarse, coagregarse con bacterias patógenas y también para adherirse a la mucina.

El perfil transcriptómico proporcionó evidencia de que *L. pentosus* AP2-16 también respondió a la adaptación al aceite de oliva mediante la regulación del metabolismo de nucleótidos y aminoácidos. La regulación a la alta y a la baja de los genes involucrados en el metabolismo de nucleótidos mostró que la adaptación al aceite de oliva de *L. pentosus* AP2-16 indujo la regulación a la baja de la adenilato quinasa involucrada en la síntesis de adenina y la conversión de AMP en ADP (Sánchez *et al.*, 2005) catalizando la interconversión reversible de ATP y AMP en dos moléculas de ADP, y 3',5'-nucleótido cíclico fosfodiesterasa implicada en la degradación del enlace fosfodiéster en las moléculas del segundo mensajero AMPc y GMPc. Por tanto, ambas enzimas relacionadas con la síntesis de ATP fueron reguladas para controlar el balance energético en la cepa adaptada. Sin embargo, se indujeron enzimas involucradas en la biosíntesis de pirimidina *de novo*, como la aspartato carbamoiltransferasa y la dihidroorotasa, lo que sugiere que la adaptación al aceite de oliva puede ser ventajosa para los lactobacilos probióticos en términos de adhesión al hospedador, ya que Vogel-Scheel, Alpert, Engst, Loh, & Blaut (2010) demostraron que la síntesis de purinas y pirimidinas es necesaria para una colonización exitosa del intestino del ratón por *Escherichia coli*.

Por otro lado, la adaptación previa de *L. pentosus* AP2-16 con aceite de oliva indujo una respuesta transcripcional inversa de genes involucrados en el metabolismo de purinas y pirimidinas desde que Piekarska-Radzik & Klewicka (2021) descubrieron que la exposición de *Lactobacillus* a polifenoles (presente en aceite de oliva) puede provocar un aumento de la expresión de los genes responsables de la biosíntesis de purinas y contribuir a la reducción del transporte de pirimidinas. Por lo tanto, la

respuesta adaptativa puede depender en gran medida de la cepa y el polifenol utilizado, que a su vez depende de la composición del aceite, lo que sugiere que la estrategia de adaptación utilizada para optimizar la funcionalidad de los probióticos debe investigarse caso por caso.

Los genes que codifican los nucleótidos de azúcar y los aminoazúcares fueron regulados positivamente, siendo estas proteínas precursoras de la biosíntesis de exopolisacáridos extracelulares (EPS) (Boels *et al.*, 2001). Este flujo de carbono hacia la producción de polímeros a partir de glucosa está respaldado por el hecho de que las glicosiltransferasas (glucosa-1-fosfato adeniltransferasa y enzima ramificadora 1,4-alfa-glucano) estaban reguladas al alza. El papel de los EPS en los lactobacilos probióticos se ha estudiado en gran medida debido a sus beneficios y potencial para la salud (Angelin & Kavitha, 2020).

Con respecto a la biosíntesis de aminoácidos, la sobreproducción de algunas enzimas clave (proteínas involucradas en la biosíntesis de cisteína, metionina, fenilalanina, tirosina, triptófano e histidina) por *L. pentosus* AP2-16 adaptada al aceite de oliva es una vía interesante en bacterias probióticas, ya que la fenilalanina, la metionina y el triptófano se encuentran entre los aminoácidos esenciales para los seres humanos. Además, también aumentaron la histidina, la cisteína y la tirosina que son necesarias en los niños (Joint WHO/FAO/UNU, 2007). Estos datos sugieren que la adaptación de la cepa de lactobacilos con aceite de oliva es de gran importancia biotecnológica aumentando su uso como cultivos iniciadores y también como probióticos que aportan, tanto a adultos como a niños, valiosos aminoácidos.

El papel de estos aminoácidos en la adaptación de *L. pentosus* AP2-16 al aceite de oliva parece estar relacionado con el crecimiento y la supervivencia celular, jugando un papel clave en la fisiología de las bacterias como el control del pH intracelular, la generación de energía metabólica o el potencial redox, y resistencia al estrés (Fernández & Zúñiga, 2008). Sin embargo, la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas disminuyó en *L. pentosus* AP2-16 adaptado al aceite de oliva por medio de genes que codifican proteínas ribosomales 30S y 50S, lo que sugiere que su abundancia se vio

afectada por la adaptación al aceite de oliva siendo controlada principalmente a nivel de traducción, y la transcripción de ARNr como el paso limitante de la velocidad en la biosíntesis de ribosomas. Este hecho depende de los niveles de ATP disponibles para el consumo, ya que el ATP promueve el inicio de la transcripción del ARN ribosómico (ARNr) y es consumido por la traducción de los ribosomas (Schneider, Gaal, & Gourse, 2002). Este cambio en la transcripción después de la adaptación parece estar implicado en el ahorro de energía.

Con respecto a los transportadores ABC y las proteínas PTS, ambas vías son importantes para la importación de nutrientes esenciales y la exportación de moléculas tóxicas en bacterias, y la absorción de carbohidratos, respectivamente, se regularon al alza y a la baja después de la adaptación al aceite de oliva. Por lo tanto, para mantener el crecimiento celular, la regulación del metabolismo se logró mediante la regulación hacia arriba y hacia abajo de varios genes involucrados en el transporte, la absorción de nutrientes y el sistema regulador (sistema de dos componentes).

En esta tesis, también hemos analizado el efecto de aceites comestibles en los mecanismos de defensa de *L. pentosus* aislada de aceitunas de mesa Aloreña, especialmente en términos de resistencia a antibióticos, lo cual es de gran relevancia no sólo en cepas probióticas sino también en otras bacterias de interés para la salud como los patógenos. En este sentido, el análisis transcriptómico puede arrojar luz sobre los aspectos moleculares involucrados en esta adaptación correlacionados con el aumento de la resistencia (Alonso-García *et al.*, 2022).

En primer lugar, cabe destacar que los aceites esenciales se han utilizado como antimicrobianos alternativos debido a su capacidad para disminuir o inhibir el crecimiento patógeno y la formación de biofilm (El-Tarabily *et al.*, 2021; Millezi *et al.*, 2016; Reda *et al.*, 2020) Sin embargo, algunos aceites (por ejemplo, manuka, mejorana y orégano) a concentraciones sub-inhedoras indujeron resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus* (Turchi *et al.*, 2019). En este estudio, hemos analizado en primer lugar el efecto de la adaptación a diferentes aceites comestibles vegetales en las respuestas fenotípicas y genotípicas a antibióticos de tres cepas con potencial

probiótico de *L. pentosus* (CF1-6, CF2-10 y MP-10), proporcionando así nuevos conocimientos sobre cómo se vuelven resistentes en diferentes entornos (por ejemplo, en una matriz alimentaria, en el intestino u otra condición involucrando aceites comestibles).

Estudios previos demostraron que los estreses fisicoquímicos, incluyendo antimicrobianos, químicos y luz UV, cambiaron los patrones de susceptibilidad a antibióticos incrementando la Concentración Mínimas Inhibitoria (MIC) para ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina y trimetoprima en la mayoría de cepas *L. pentosus* aisladas de aceitunas de mesa Aloreña (Casado Muñoz *et al.*, 2016b). Los resultados obtenidos en el actual estudio indicaron que la adaptación al aceite inducía un incremento de la MIC de antibióticos en una manera similar a los estreses fisicoquímicos (por ejemplo, antimicrobianos, químicos y luz UV) como demostraron Casado Muñoz *et al.* (2016b) para ciprofloxacino y tetraciclinas. Sin embargo, la MIC de otros antibióticos (por ejemplo, eritromicina, clindamicina, estreptomicina, trimetoprima y ampicilina) aumentó después de la adaptación al aceite, y la mayoría disminuyó tras la exposición al estrés (Casado Muñoz *et al.*, 2016b). Este hallazgo indica que el patrón de susceptibilidad de los antibióticos puede depender principalmente del estrés aplicado y las cepas ensayadas.

Se observó que los aceites de lino, oliva, girasol y soja fueron los principales que indujeron mayor MIC de antibiótico. Los perfiles de expresión de genes seleccionados implicados en la respuesta al estrés/resistencia (*rpsL*, *recA*, *uvrB* y *srtA*) diferían según el aceite utilizado para la adaptación (lino, girasol, oliva y argán) de la cepa de *L. pentosus* (CF1-6, CF2-10 y MP-10) y del gen diana. Concluimos que, a pesar de la respuesta uniforme de susceptibilidad antibiótica fenotípica a la adaptación al aceite observada en la mayoría de los casos, el repertorio de genes inducidos y reprimidos difiere.

En este sentido, el gen *rpsL*, que codifica la proteína S12 de la subunidad ribosomal 30S, se sobreexpresó tras la inducción con todos los aceites (oliva, argán, girasol y lino) utilizados para la adaptación de *L. pentosus* CF2-10; sin embargo, este gen solo se

sobreexpresó en *L. pentosus* MP-10 adaptada al aceite de argán. La sobreexpresión del gen *rpsL* fue quizás la responsable del aumento observado en la MIC de tetraciclina y estreptomicina en *L. pentosus* CF2-10, ya que la proteína S12 de la subunidad ribosomal 30S con efectos poliespecíficos puede actuar como una chaperona de ARN (Coetzee *et al.*, 1994), para proteger la estructura y función de los ribosomas bajo estrés.

Por otro lado, el gen *uvrB* estaba sobreexpresado en *L. pentosus* CF2-10 adaptada a los aceites de girasol y lino y en *L. pentosus* MP-10 adaptada a los aceites de argán y girasol; este gen está relacionado con el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER) (genes *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* y *uvrD*). Cabe destacar que los genes *uvrB* y *recA* tenían patrones de expresión apareados implicados en el mismo mecanismo de reparación, que se activaron en algunos casos de adaptación de cepas con algunos aceites, de forma similar a lo que ocurrió con cepas de *L. pentosus* expuestas a antibióticos (Casado *et al.*, 2016b). En este sentido, la respuesta SOS como vía inducible (van der Veen & Abee, 2011) puede ser en parte responsable del aumento de la MIC de algunos antibióticos después de la adaptación al aceite.

Con respecto al gen *srtA*, que codifica una enzima que ancla proteínas de superficie a la pared celular (Mazmanian *et al.*, 1999), la sobreexpresión solo se detectó en *L. pentosus* MP-10 adaptada al aceite de girasol. No se produjeron cambios significativos o regulación negativa en los otros casos, lo que sugiere que el gen *srtA* no estuvo involucrado en el aumento de la MIC de antibiótico después de la adaptación al aceite.

En general, la adaptación al aceite como condición de estrés puede inducir cambios en la respuesta fenotípica y genotípica de las cepas de *L. pentosus* con potencial probiótico destacadas por su mayor robustez y funcionalidad y su resistencia a los antimicrobianos que involucran un repertorio de genes. Sin embargo, para garantizar la supervivencia y mejorar la tolerancia al estrés de estas bacterias necesarias como cultivos iniciadores/protectores o probióticos, esto se basará en la detección individual de cada cepa en cada condición de estrés. Para esto, seleccionamos la cepa *L. pentosus* CF2-10 con potencial probiótico, que exhibió más cambios a nivel fenotípico y

genotípico después de la adaptación a los aceites en comparación con las demás cepas ensayadas. En este sentido, *L. pentosus* CF2-10 fue fenotípicamente susceptible a la tetraciclina (Casado Muñoz *et al.*, 2014). Sin embargo, se mostró resistente a este antibiótico tras la adaptación al aceite, mientras que en los demás casos se observó un aumento de la MIC de antibióticos, aumentando así su resistencia.

Para investigar los mecanismos moleculares detrás del aumento de la resistencia a los antibióticos, el análisis transcriptómico comparativo bajo condiciones de estrés (adaptación al aceite) y sin estrés (control) reveló que los aceites de oliva o de girasol tuvieron un impacto en *L. pentosus* CF2-10, mostrando diferencias significativas [91 y 78 genes diferencialmente expresados (DEGs) en *L. pentosus* CF2-10 adaptada al aceite de oliva (O) y al aceite de girasol (G) versus control (C), respectivamente], y también entre condiciones de estrés [49 DEG en *L. pentosus* CF2-10 adaptada al aceite de girasol (G) versus al aceite de oliva (O)].

En general, *L. pentosus* CF2-10 cambió la expresión de varios genes involucrados en diferentes vías metabólicas para sobrevivir a la adaptación al aceite; algunos mecanismos compartidos por ambos aceites utilizados en la adaptación (girasol y oliva) incluyen el sistema de secreción bacteriana, el metabolismo de nucleótidos, el metabolismo de ácidos grasos, el metabolismo de aminoácidos, el quórum sensing y la respuesta al estrés. Algunos de estos mecanismos están implicados en el crecimiento y la supervivencia, así como en la actividad probiótica, tal y como demostraron Alonso-García *et al.* (2021) para *L. pentosus* AP2-16 adaptada al aceite de oliva, que respondió desviando sus vías metabólicas para equilibrar la producción y el almacenamiento de energía, el crecimiento y la supervivencia celular, las interacciones con el huésped (glucoconjugados) y otras características fisiológicas involucradas en la robustez y funcionalidad.

En el estudio actual, la pre-adaptación con aceites de oliva o de girasol cambió la red transcripcional de *L. pentosus* CF2-10 para regular su funcionalidad y robustez; la resistencia a los antibióticos es una de las características afectadas. En este sentido, se observó una sobreexpresión del gen transportador MFS (4-5 log₂FC) implicado en la

resistencia a fármacos antibacterianos (Andersen *et al.*, 2015; Ranaweera *et al.*, 2015) tanto en *L. pentosus* adaptada al aceite de oliva como al aceite de girasol. Además de los antimicrobianos, las bombas de eflujo MFS juegan un papel esencial en la extrusión de metabolitos tóxicos, intermediarios del ciclo de Krebs, señales de quorum sensing y otras moléculas desconocidas, siendo las moléculas de quorum sensing involucradas en la expresión de los genes de eflujo (Evans *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 2009). De acuerdo con las pruebas de susceptibilidad fenotípica, *L. pentosus* CF2-10 adaptada al aceite de oliva y al aceite de girasol mostró una MIC aumentada para ciprofloxacina, clindamicina, estreptomicina y tetraciclina, por lo que el gen MFS sobre-expresado puede estar involucrado en la resistencia a estos antibióticos. Independientemente de la transferencia génica horizontal de genes de resistencia a antibióticos (ARGs), las bombas de eflujo MFS transferidas no horizontalmente en diferentes bacterias, como probióticos o patógenos, podrían inducirse bajo algunas condiciones de estrés (ambiente, dieta y condiciones digestivas), lo que lleva a diferentes efectos.

Los aceites comestibles vegetales se consumen ampliamente como componente de la dieta. Algunos aceites que se utilizan extensamente en la dieta mediterránea, como el aceite de oliva, podrían representar un enfoque prometedor hacia el diseño y la fabricación de productos probióticos con estabilidad, funcionalidad y robustez mejoradas y también, en algunos casos, para inhibir patógenos (Dang Xuan *et al.*, 2018; Tabassum *et al.*, 2014). Sin embargo, este hecho puede representar un gran desafío para otros patógenos con importancia clínica, ya que los aceites pueden inducir una mayor resistencia a los antibióticos utilizados en terapia dependiendo de la cepa y el aceite utilizado.

Por otra parte, el gen de la antranilato-fosforribosiltransferasa implicado en la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos, concretamente en la síntesis de triptófano, se sobre-expresó (4-4,5 log₂FC) en *L. pentosus* CF2-10 adaptada al aceite de oliva y al aceite de girasol. Este hecho puede potenciar el crecimiento y la resistencia de *L. pentosus* CF2-10 ya que la vía del triptófano es esencial para el crecimiento bacteriano. La pre-adaptación de probióticos con aceites representa un nuevo enfoque

para aumentar la biosíntesis de triptófano en los alimentos y el intestino. El triptófano tiene un papel vital en la regulación subyacente de la comunicación entre el huésped y la microbiota de las funciones intestinales en condiciones de salud y durante estados patológicos como el síndrome del intestino irritable (SII) y la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Bosi *et al.*, 2020).

Además, el gen que codifica para la unión al sustrato del transportador ABC de péptidos se sobre-expresó en *L. pentosus* CF2-10 adaptada al aceite de oliva y al aceite de girasol, y estuvo involucrado en la autoinmunidad y la exportación de sustrato, confiriendo resistencia contra diferentes antimicrobianos, incluidos los antibióticos (Smits *et al.*, 2020). En este sentido, otros transportadores, como la proteína de unión al sustrato del transportador ABC de fosfato y la proteína de unión al sustrato del transportador ABC metálico u otras proteínas (regulador transcripcional Spx y proteína hipotética con actividad ATPasa) solo estaban reguladas al alza en *L. pentosus* CF2-10 adaptada al aceite de oliva participando en la entrada de nutrientes esenciales y la salida de moléculas tóxicas como los antibióticos (Jousselin *et al.*, 2013; Murina *et al.*, 2019).

Finalmente, el análisis general de la abundancia de DEGs en *L. pentosus* MP-10 adaptada al aceite de girasol o al aceite de oliva confirmó el efecto de la adaptación del aceite en el aumento de la respuesta a los antibióticos al aumentar la resistencia contra algunos antibióticos que utilizan transportadores de múltiples fármacos. Además, cabe destacar el aumento de la resistencia al agente quimioterapéutico daunorrubicina. Los probióticos adaptados al aceite con alta resistencia a la daunorrubicina son una buena estrategia para administrar a un paciente expuesto a este compuesto, ya que inhibe los anaerobios comensales como *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Clostridium* entre otros (Van Vliet *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES

1. La supervivencia y el crecimiento de 7 cepas de *L. pentosus* con potencial probiótico, aisladas de la fermentación natural de la aceituna Aloreña, han sido afectados en presencia de aceites vegetales comestibles especialmente el aceite de menta. Dicha bajada dependía de la cepa ensayada y del aceite usado en la adaptación.

2. La pre-adaptación de 7 cepas de *L. pentosus* con potencial probiótico, aisladas de la fermentación natural de la aceituna Aloreña, a diferentes aceites vegetales comestibles constituye una posible nueva estrategia para mejorar su robustez. Esta pre-adaptación ha incrementado la viabilidad y crecimiento de las bacterias, su capacidad para resistir diversos estreses como ácidos o bilis, aunque esto dependía en gran medida de la cepa ensayada y del aceite usado en la adaptación.

3. La pre-adaptación con el aceite de oliva, argán, girasol y lino indujo la expresión de genes (*fus*, *rpsL*, *pgm*, *groEL*, *enol* y *prep*) que codifican para las proteínas multifuncionales que participan en varias respuestas al estrés y otras funciones. Además, la pre-adaptación con aceites puede representar un nuevo enfoque para la fabricación de productos probióticos, mejorando así la estabilidad de las bacterias durante el procesamiento industrial que a menudo corren el riesgo de comprometer la viabilidad y funcionalidad de las cepas.

4. La pre-adaptación de 7 cepas de *L. pentosus* con potencial probiótico, aisladas de la fermentación natural de la aceituna Aloreña, a diferentes aceites vegetales comestibles ha incrementado significativamente su funcionalidad probiótica mediante el incremento de la capacidad de autoagregación, coagregación con patógenos y adhesión a mucina, aunque esto dependía de la cepa ensayada y del aceite usado en la pre-adaptación.

5. El análisis transcriptómico comparativo de la cepa *L. pentosus* AP2-16 adaptada al aceite de oliva, que exhibió una funcionalidad mejorada, y el control sin adaptar reveló mecanismos moleculares responsables de dicha mejora mediante la redirección de sus vías metabólicas altamente conectadas y vinculadas al control del balance energético (producción de energía y almacenamiento de energía), crecimiento celular

y capacidad de supervivencia, interacción con el huésped (glicoconjugados) y otras características fisiológicas.

6. La pre-adaptación de los lactobacilos con aceite de oliva puede representar un enfoque novedoso para la fabricación de productos probióticos con una estabilidad y funcionalidad mejoradas.

7. La pre-adaptación previa de cepas probióticas de *L. pentosus* con aceites indujo cambios en su perfil fenotípico y genotípico relacionados con la susceptibilidad a los antibióticos y los mecanismos de defensa.

8. Se produjeron cambios transcripcionales en *L. pentosus* CF2-10, con potencial probiótico, adaptada con aceite de oliva o girasol, que exhibió un aumento de la MIC de antibióticos y una sobreexpresión de genes de estrés (*rpsL*, *recA* y *uvrB*), desviando sus rutas metabólicas hacia la exportación de moléculas tóxicas via bombas de eflujo y transportadores ABC.

9. La pre-adaptación de algunos lactobacilos con aceites de oliva o de girasol puede representar un enfoque novedoso para la fabricación de productos probióticos con estabilidad, funcionalidad y robustez mejoradas.

10. El control de la propagación de la resistencia debe incluir la transferencia horizontal de genes y la expresión de genes inducidos por el estrés y que están involucrados en la resistencia a los antimicrobianos.

CONCLUSIONS

1. The survival and growth of 7 strains of *L. pentosus* with probiotic potential, isolated from the natural fermentation of Aloreña olives, have been affected in the presence of edible vegetable oils, especially mint oil. The observed decrease depended on the tested strain and the oil used in the adaptation.

2. The pre-adaptation of 7 strains of *L. pentosus* with probiotic potential, isolated from the natural fermentation of Aloreña olives, to different edible vegetable oils constitutes a possible new strategy to improve their robustness. This pre-adaptation has increased the viability and growth of the bacteria, their ability to resist various stresses such as acids or bile, although this largely depended on the strain tested and the oil used in the adaptation.

3. Pre-adaptation with olive, argan, sunflower, and linseed oils induced the expression of genes (*fus*, *rpsL*, *pgm*, *groEL*, *enol*, and *prep*) that code for moonlighting proteins involved in various stress responses and other functions. In addition, pre-adaptation with oils may represent a new approach for the manufacture of probiotic products, thus improving the stability of bacteria during industrial processing that often runs the risk of compromising the viability and functionality of the strains.

4. The pre-adaptation of 7 strains of *L. pentosus* with probiotic potential, isolated from the natural fermentation of the Aloreña olive, to different edible vegetable oils has significantly increased their probiotic functionality by increasing the capacity for auto-aggregation, co-aggregation with pathogens and adhesion to mucin, although this depended on the strain tested and the oil used for pre-adaptation.

5. Comparative transcriptomic analysis of the olive oil-adapted *L. pentosus* AP2-16 strain, which exhibited enhanced functionality, with the non-adapted control revealed molecular mechanisms responsible for such enhancement by redirecting their highly connected and linked metabolic pathways to the control of energy balance (energy production and energy storage), cell growth and survival capacity, interaction with the host (glycoconjugates) and other physiological characteristics.

6. Pre-adaptation of *lactobacilli* with olive oil may represent a novel approach for manufacturing probiotic products with improved stability and functionality.

7. Pre-adaptation of probiotic *L. pentosus* strains with oils induced changes in their phenotypic and genotypic profile related to antibiotic susceptibility and defence mechanisms.

8. Transcriptional changes were reported in the potential probiotic *L. pentosus* CF2-10 adapted with olive or sunflower oils, which exhibited increased antibiotic MIC and over-expression of stress genes (*rpsL*, *recA* and *uvrB*), rerouting its metabolic pathways to the export of toxic molecules via efflux pumps and ABC transporters.

9. Pre-adaptation of some lactobacilli with olive or sunflower oils may represent a novel approach for manufacturing probiotic products with improved stability, functionality and robustness.

10. The control of resistance spread must include horizontal gene transfer and expression of genes induced by stress and are involved in antimicrobial resistance.

REFERENCIAS

- Aarnikunnas, J., von Weymarn, N., Rönholm, K., Leisola, M., & Palva, A. (2003). Metabolic engineering of *Lactobacillus fermentum* for production of mannitol and pure L-lactic acid or pyruvate. *Biotechnology and Bioengineering*, *82*(6), 653–663. <https://doi.org/10.1002/bit.10615>
- Abrams, S. A., Griffin, I. J., Hawthorne, K. M., Liang, L., Gunn, S. K., Darlington, G., & Ellis, K. J. (2005). A combination of prebiotic short-and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents 1-4. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *82*(2), 471–476. <https://academic.oup.com/ajcn/article-abstract/82/2/471/4863010>
- Abriouel, H., Benomar, N., Cobo, A., Caballero, N., Fernández Fuentes, M. Á., Pérez-Pulido, R., & Gálvez, A. (2012). Characterization of lactic acid bacteria from naturally-fermented Manzanilla Aloreña green table olives. *Food Microbiology*, *32*(2), 308–316. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.07.006>
- Abriouel, H., Benomar, N., Lucas, R., & Gálvez, A. (2011). Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally-fermented Aloreña green table olives. *International Journal of Food Microbiology*, *144*(3), 487–496. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.006>
- Abriouel, H., Benomar, N., Pulido, R. P., Cañamero, M. M., & Gálvez, A. (2011). Annotated genome sequence of *Lactobacillus pentosus* MP-10, which has probiotic potential, from naturally fermented Aloreña green table olives. *Journal of Bacteriology*, *193*(17), 4559–4560. <https://doi.org/10.1128/JB.05171-11>
- Abriouel, H., Casado Muñoz, M. del C., Lavilla Lerma, L., Pérez Montoro, B., Bockelmann, W., Pichner, R., Kabisch, J., Cho, G.-S., Franz, C. M. A. P., Gálvez, A., & Benomar, N. (2015). New insights in antibiotic resistance of *Lactobacillus* species from fermented foods. *Food Research International*, *78*, 465–481. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.09.016>
- Abriouel, H., Pérez Montoro, B., Casimiro-Soriguer, C. S., Pérez Pulido, A. J., Knapp, C. W., Caballero Gómez, N., Castillo-Gutiérrez, S., Estudillo-Martínez, M. D., Gálvez, A., & Benomar, N. (2017). Insight into potential probiotic markers predicted in *Lactobacillus pentosus* MP-10 genome sequence. *Frontiers in Microbiology*, *8*(MAY), 891. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00891/BIBTEX>
- Aguiar-Pulido, V., Huang, W., Suarez-Ulloa, V., Cickovski, T., Mathee, K., & Narasimhan, G. (2016). Metagenomics, metatranscriptomics, and metabolomics approaches for microbiome analysis. In *Evolutionary Bioinformatics* (Vol. 12, Issue Suppl 1, pp. 5–16). Libertas Academica Ltd. <https://doi.org/10.4137/EBO.S36436>

- Aiba, Y. (1998). Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *The American Journal of Gastroenterology*, *93*(11), 2097–2101. [https://doi.org/10.1016/s0002-9270\(98\)00481-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9270(98)00481-x)
- Aires, J., & Butel, M. J. (2011). Proteomics, human gut microbiota and probiotics. In *Expert Review of Proteomics* (Vol. 8, Issue 2, pp. 279–288). Expert Rev Proteomics. <https://doi.org/10.1586/epr.11.5>
- Al-Nabulsi, A. A., Osaili, T. M., Elabedeen, N. A. Z., Jaradat, Z. W., Shaker, R. R., Kheirallah, K. A., Tarazi, Y. H., & Holley, R. A. (2011). Impact of environmental stress desiccation, acidity, alkalinity, heat or cold on antibiotic susceptibility of *Cronobacter sakazakii*. *International Journal of Food Microbiology*, *146*(2), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.013>
- Alakomi, H. L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(5), 2001–2005. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000>
- Ali, A. A., & Mustafa, M. M. (2009). Use of Starter Cultures of Lactic Acid Bacteria and Yeasts in the Preparation of Kisra, a Sudanese Fermented Food. *Pakistan Journal of Nutrition*, *8*(9), 1349–1353.
- Allen, S. J., Martinez, E. G., Gregorio, G. V., & Dans, L. F. (2010). Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Vol. 2010, Issue 11). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003048.pub3>
- Allen, S. J., Okoko, B., Martinez, E. G., Gregorio, G. V., & Dans, L. F. (2004). Probiotics for treating infectious diarrhoea. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Issue 4). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd003048.pub2>
- Alonso-García, E., Benomar, N., Lavilla-Lerma, L., de la Fuente-Ordóñez, J. J., Knapp, C. W., & Abriouel, H. (2022). Changes in resistome profile of potential probiotic *Lactiplantibacillus pentosus* in response to edible oil adaptation. *Food Microbiology*.
- Alonso-García, E., de la Fuente Ordoñez, J. J., Lavilla Lerma, L., Estudillo-Martínez, M. D., Castillo-Gutiérrez, S., Benomar, N., Knapp, C. W., & Abriouel, H. (2021). Transcriptomic Profile and Probiotic Properties of *Lactiplantibacillus pentosus* Pre-adapted to Edible Oils. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.747043/FULL>

- Ammor, M. S., Belén Flórez, A., & Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. In *Food Microbiology* (Vol. 24, Issue 6, pp. 559–570). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.11.001>
- Ammor, M. S., Flórez, A. B., van Hoek, A. H. A. M., de los Reyes-Gavilán, C. G., Aarts, H. J. M., Margolles, A., & Mayo, B. (2008). Molecular Characterization of Intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 14(1–3), 6–15. <https://doi.org/10.1159/000106077>
- Andersen, J. L., He, G. X., Kakarla, P., Ranjana, K. C., Kumar, S., Lakra, W. S., Mukherjee, M. M., Ranaweera, I., Shrestha, U., Tran, T., & Varela, M. F. (2015). Multidrug Efflux Pumps from Enterobacteriaceae, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* Bacterial Food Pathogens. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2015, Vol. 12, Pages 1487–1547, 12(2), 1487–1547. <https://doi.org/10.3390/IJERPH120201487>
- Andlauer, W., & Fürst, P. (2002). Nutraceuticals: A piece of history, present status and outlook. *Food Research International*, 35(2–3), 171–176. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00179-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00179-X)
- Andrews, J. M., & Tan, M. (2012). Probiotics in luminal gastroenterology: the current state of play. *Internal Medicine Journal*, 42(12), 1287–1291. <https://doi.org/10.1111/imj.12015>
- Angelin, J., & Kavitha, M. (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 853–865. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.06.190>
- Ann Patterson, L., Josling Professor, T. E., & Fellow, S. (2005). *Mediterranean Agriculture in the Global Marketplace: A Project Comparing Policy Approaches in California and the Southern EU States Report on Stage 1*.
- Anukam, K. C., & Olise, N. A. (2012). Development of a novel probiotic yogurt “PENTOYO” with a fully sequenced lactobacillus pentosus KCA1 and its survival during storage at 4°C. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(6), 977–981. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v11i6.15>
- Arihara, K., Nakashima, Y., Ishikawa, S., & Itoh, M. (2004). Antihypertensive activities generated from porcine skeletal muscle proteins by lactic acid bacteria. In *Abstracts of 50th International Congress of Meat Science and Technology* (Elsevier Ltd, pp. 236–236).
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., Van Der Veeken, J., Deroos, P., Liu, H., Cross, J. R., Pfeiffer, K., Coffey, P. J., & Rudensky, A. Y. (2013). Metabolites

- produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, *504*(7480), 451–455. <https://doi.org/10.1038/nature12726>
- Arthur, J. C., Gharaibeh, R. Z., Uronis, J. M., Perez-Chanona, E., Sha, W., Tomkovich, S., Mühlbauer, M., Fodor, A. A., & Jobin, C. (2013). VSL#3 probiotic modifies mucosal microbial composition but does not reduce colitis-associated colorectal cancer. *Scientific Reports*, *3*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep02868>
- Atrih, A., Rekhif, N., Milliere, J. B., & Lefebvre, G. (1993). Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *Canadian Journal of Microbiology*, *39*(12), 1173–1179. <https://doi.org/10.1139/m93-178>
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Gou, Y. K., Nagy, A., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(44), 15718–15723. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>
- Barberán, A., Fernández-Guerra, A., Bohannan, B. J. M., & Casamayor, E. O. (2012). Exploration of community traits as ecological markers in microbial metagenomes. *Molecular Ecology*, *21*(8), 1909–1917. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05383.x>
- Barbosa, T. M., & Levy, S. B. (2000). The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Updates*, *3*(5), 303–311. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0167>
- Barrett, E., Ross, R. P., O'Toole, P. W., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2012). γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *Journal of Applied Microbiology*, *113*(2), 411–417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05344.x>
- Baumgart, M., Dogan, B., Rishniw, M., Weitzman, G., Bosworth, B., Yantiss, R., Orsi, R. H., Wiedmann, M., McDonough, P., Kim, S. G., Berg, D., Schukken, Y., Scherl, E., & Simpson, K. W. (2007). Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME Journal*, *1*(5), 403–418. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.52>
- Belletti, N., Gatti, M., Bottari, B., Neviani, E., Tabanelli, G., & Gardini, F. (2009). Antibiotic resistance of lactobacilli isolated from two Italian hard cheeses. *Journal of Food Protection*, *72*(10), 2162–2169. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.10.2162>

- Ben Omar, N., Abriouel, H., Keleke, S., Sánchez Valenzuela, A., Martínez-Cañamero, M., Lucas López, R., Ortega, E., & Gálvez, A. (2008). Bacteriocin-producing *Lactobacillus* strains isolated from poto poto, a Congolese fermented maize product, and genetic fingerprinting of their plantaricin operons. *International Journal of Food Microbiology*, *127*(1–2), 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.037>
- Bergonzelli, G. E., Granato, D., Pridmore, R. D., Marvin-Guy, L. F., Donnicola, D., & Corthésy-Theulaz, I. E. (2006). GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: Potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*, *74*(1), 425–434. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.425-434.2006>
- Bevilacqua, A., Altieri, C., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Ouoba, L. I. I. (2010). Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Italian Bella di Cerignola Table Olives: Selection of Potential Multifunctional Starter Cultures. *Journal of Food Science*, *75*(8), M536–M544. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01793.x>
- Bevins, C. L., & Salzman, N. H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 9, Issue 5, pp. 356–368). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2546>
- Birol, I., Jackman, S. D., Nielsen, C. B., Qian, J. Q., Varhol, R., Stazyk, G., Morin, R. D., Zhao, Y., Hirst, M., Schein, J. E., Horsman, D. E., Connors, J. M., Gascoyne, R. D., Marra, M. A., & Jones, S. J. M. (2009). De novo transcriptome assembly with ABySS. *Bioinformatics*, *25*(21), 2872–2877. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp367>
- Blana, V. A., Grounta, A., Tassou, C. C., Nychas, G. J. E., & Panagou, E. Z. (2014). Inoculated fermentation of green olives with potential probiotic *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures isolated from industrially fermented olives. *Food Microbiology*, *38*, 208–218. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.007>
- Boels, I. C., Kranenburg, R. van, Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., & De Vos, W. M. (2001). Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, *11*(9), 723–732. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00116-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00116-9)
- Booijink, C. C. G. M., Zoetendal, E. G., Kleerebezem, M., & de Vos, W. M. (2007). Microbial communities in the human small intestine: Coupling diversity to metagenomics. In *Future Microbiology* (Vol. 2, Issue 3, pp. 285–295). Future Medicine Ltd London, UK. <https://doi.org/10.2217/17460913.2.3.285>

- Borchers, A. T., Selmi, C., Meyers, F. J., Keen, C. L., & Gershwin, M. E. (2009). Probiotics and immunity. *Journal of Gastroenterology*, *44*(1), 26–46. <https://doi.org/10.1007/s00535-008-2296-0>
- Borody, T. J., & Khoruts, A. (2012). Fecal microbiota transplantation and emerging applications. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 9, Issue 2, pp. 88–96). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.244>
- Bosi, A., Banfi, D., Bistoletti, M., Giaroni, C., & Baj, A. (2020). Tryptophan Metabolites Along the Microbiota-Gut-Brain Axis: An Interkingdom Communication System Influencing the Gut in Health and Disease: <https://doi.org/10.1177/1178646920928984>, *13*. <https://doi.org/10.1177/1178646920928984>
- Both, E., Gyenge, L., Bodor, Z., György, É., Lányi, S., & Ábrahám, B. (2012). Intensification of probiotic microorganisms viability by microencapsulation using ultrasonic atomizer. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, *74*(1).
- Bouskra, D., Brézillon, C., Bérard, M., Werts, C., Varona, R., Boneca, I. G., & Eberl, G. (2008). Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature*, *456*(7221), 507–510. <https://doi.org/10.1038/nature07450>
- Braat, H., Rottiers, P., Hommes, D. W., Huyghebaert, N., Remaut, E., Remon, J. P., van Deventer, S. J. H., Neiryneck, S., Peppelenbosch, M. P., & Steidler, L. (2006). A Phase I Trial With Transgenic Bacteria Expressing Interleukin-10 in Crohn's Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, *4*(6), 754–759. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2006.03.028>
- Brito, D., Serrano, C., Pereira, A., Fernandes, S., Delgado, A., Oleastro, M., & Peres, C. (2007). Evaluation of the inhibitory activity of *Lactobacillus* sp. from table-olives against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, *12*, 438.
- Broadbent, J. R. (2008). *Proteolysis in lactobacilli: Applications in food and health*.
- Buck, B. L., Altermann, E., Svingerud, T., & Klaenhammer, T. R. (2005). Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(12), 8344–8351. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8344-8351.2005>
- C. Senok, A. (2009). Probiotics in the Arabian Gulf Region. *Food & Nutrition Research*, *53*(1), 1842. <https://doi.org/10.3402/fnr.v53i0.1842>

- Cadena, M., Villarraga, E., Luján, D., & Salcedo, J. (2006). Evaluación de la agroindustria del almidón agrio de yuca (*Manihot esculenta*, Crantz) en Córdoba y Sucre. *Temas Agrarios*, *11*(1), 43–53. <https://doi.org/10.21897/rta.v11i1.639>
- Canani, R. B., Sangwan, N., Stefka, A. T., Nocerino, R., Paparo, L., Aitoro, R., Calignano, A., Khan, A. A., Gilbert, J. A., & Nagler, C. R. (2016). *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *ISME Journal*, *10*(3), 742–750. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.151>
- Cani, P., & Delzenne, N. (2009). The Role of the Gut Microbiota in Energy Metabolism and Metabolic Disease. *Current Pharmaceutical Design*, *15*(13), 1546–1558. <https://doi.org/10.2174/138161209788168164>
- Cao, H. X., Schmutzer, T., Scholz, U., Pecinka, A., Schubert, I., & Vu, G. T. (2015). Metatranscriptome analysis reveals host-microbiome interactions in traps of carnivorous *Genlisea* species. *Frontiers in Microbiology*, *6*(MAY), 526. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00526>
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gabaldón, T. (2009). trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, *25*(15), 1972–1973. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTP348>
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Pa, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. In *Nature Methods* (Vol. 7, Issue 5, pp. 335–336). Nat Methods. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Carvalhais, L. C., Dennis, P. G., Tyson, G. W., & Schenk, P. M. (2012). Application of metatranscriptomics to soil environments. In *Journal of Microbiological Methods* (Vol. 91, Issue 2, pp. 246–251). J Microbiol Methods. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.08.011>
- Casado Muñoz, M. del C., Benomar, N., Ennahar, S., Horvatovich, P., Lavilla Lerma, L., Knapp, C. W., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2016a). Comparative proteomic analysis of a potentially probiotic *Lactobacillus pentosus* MP-10 for the identification of key proteins involved in antibiotic resistance and biocide tolerance. *International Journal of Food Microbiology*, *222*, 8–15. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2016.01.012>
- Casado Muñoz, M. del C., Benomar, N., Lavilla Lerma, L., Knapp, C. W., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2016b). Biocide tolerance, phenotypic and molecular response of

- lactic acid bacteria isolated from naturally-fermented Aloreña table to different physico-chemical stresses. *Food Microbiology*, *60*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2016.06.013>
- Casado Muñoz, M. del C., Benomar, N., Lerma, L. L., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2014). Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from naturally-fermented Aloreña table olives throughout fermentation process. *International Journal of Food Microbiology*, *172*, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.025>
- Cashman, K. D. (2003). Prebiotics and calcium bioavailability. *Current Issues Molecular Biology*, *4*(1), 21–32.
- Castaldo, C., Vastano, V., Siciliano, R. A., Candela, M., Vici, M., Muscariello, L., Marasco, R., & Sacco, M. (2009). Surface displaced alfa-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein. *Microbial Cell Factories*, *8*(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-14>
- Celaj, A., Markle, J., Danska, J., & Parkinson, J. (2014). Comparison of assembly algorithms for improving rate of metatranscriptomic functional annotation. *Microbiome*, *2*(1), 39. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-39>
- Cencic, A., & Chingwaru, W. (2010). The Role of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements in Intestinal Health. *Nutrients*, *2*(6), 611–625. <https://doi.org/10.3390/nu2060611>
- Çetin, B. (2011). Production of probiotic mixed pickles (Tursu) and microbiological properties | African Journal of Biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, *10*, 14926–14931. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/97233>
- Chagnot, C., Zorgani, M. A., Astruc, T., & Desvaux, M. (2013). Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Frontiers in Microbiology*, *4*, 303. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00303>
- Chapman, C. M. C., Gibson, G. R., & Rowland, I. (2011). Health benefits of probiotics: Are mixtures more effective than single strains? In *European Journal of Nutrition* (Vol. 50, Issue 1, pp. 1–17). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00394-010-0166-z>
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 84).
- Chiu, H.-H., Tsai, C.-C., Hsieh, H.-Y., & Tsen, H.-Y. (2007). Screening from pickled vegetables the potential probiotic strains of lactic acid bacteria able to inhibit the

- Salmonella invasion in mice. *Journal of Applied Microbiology*, 0(0), 071010063119012-??? <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03573.x>
- Choi, K. R., Jang, W. D., Yang, D., Cho, J. S., Park, D., & Lee, S. Y. (2019). Systems Metabolic Engineering Strategies: Integrating Systems and Synthetic Biology with Metabolic Engineering. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 37, Issue 8, pp. 817–837). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.01.003>
- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., Costa, M. S. da, Rooney, A. P., Yi, H., Xu, X.-W., Meyer, S. De, & Trujillo, M. E. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 461–466. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.002516>
- Clarke, G., Cryan, J. F., Dinan, T. G., & Quigley, E. M. (2012). Review article: probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome - focus on lactic acid bacteria. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 35(4), 403–413. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04965.x>
- Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R. D., Shanahan, F., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2013). The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Molecular Psychiatry*, 18(6), 666–673. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.77>
- Clarke, G., Stilling, R. M., Kennedy, P. J., Stanton, C., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2014). Minireview: Gut Microbiota: The Neglected Endocrine Organ. *Molecular Endocrinology*, 28(8), 1221–1238. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1108>
- Coast, J., & Smith, R. D. (2003). Antimicrobial resistance: Cost and Containment. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Vol. 1, Issue 2, pp. 241–251). Future Drugs Ltd. <https://doi.org/10.1586/14787210.1.2.241>
- Coetzee, T., Herschlag, D., & Belfort, M. (1994). Escherichia coli proteins, including ribosomal protein S12, facilitate in vitro splicing of phage T4 introns by acting as RNA chaperones. *Genes & Development*, 8(13), 1575–1588. <https://doi.org/10.1101/GAD.8.13.1575>
- Collins, S. M., Surette, M., & Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 10, Issue 11, pp. 735–742). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2876>
- Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., & Sorrentino, E. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Le Lait*, 85(3), 193–204. <https://doi.org/10.1051/lait:2005007>

- Corcoran, B. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Dockery, P., & Stanton, C. (2006). Enhanced survival of GroESL-overproducing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 under stressful conditions induced by drying. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(7), 5104–5107. <https://doi.org/10.1128/AEM.02626-05/ASSET/510F9298-D576-471E-95A2-551AEB168B19/ASSETS/GRAPHIC/ZAM0070669320003.JPEG>
- Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2005). Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(6), 3060–3067. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3060-3067.2005/ASSET/AB066113-EA2A-46BA-BACE-A82C8A7A3F73/ASSETS/GRAPHIC/ZAM0060554440004.JPEG>
- Corr, S. C., Li, Y., Riedel, C. U., O'Toole, P. W., Hill, C., & Gahan, C. G. M. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(18), 7617–7621. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700440104>
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J., & Damiani, P. (1998). Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: Identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *50*(2), 253–256. <https://doi.org/10.1007/s002530051285>
- Cross, M. L. (2002). Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *34*(4), 245–253. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2002.tb00632.x>
- Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 13, Issue 10, pp. 701–712). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn3346>
- Da Silva, W. M., Oliveira, L. C., Soares, S. C., Sousa, C. S., Tavares, G. C., Resende, C. P., Pereira, F. L., Ghosh, P., Figueiredo, H., & Azevedo, V. (2019). Quantitative proteomic analysis of the response of probiotic putative *Lactococcus lactis* NCDO 2118 strain to different oxygen availability under temperature variation. *Frontiers in Microbiology*, *10*(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00759>
- Dale, C., & Moran, N. A. (2006). Molecular Interactions between Bacterial Symbionts and Their Hosts. In *Cell* (Vol. 126, Issue 3, pp. 453–465). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.014>

- Danielsen, M., & Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, *82*(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00254-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00254-4)
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, *505*(7484), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- Day, R. L., Harper, A. J., Woods, R. M., Davies, O. G., & Heaney, L. M. (2019). Probiotics: current landscape and future horizons. *Future Science OA*, *5*(4), FSO391. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2019-0004>
- De Bona, F., Ossowski, S., Schneeberger, K., & Räsch, G. (2008). Optimal spliced alignments of short sequence reads. *Bioinformatics*, *24*(16). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn300>
- De Boo, H. A., & Harding, J. E. (2006). The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. In *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* (Vol. 46, Issue 1, pp. 4–14). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1479-828X.2006.00506.x>
- de Jong, A., van Hijum, S. A. F. T., Bijlsma, J. J. E., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2006). BAGEL: A web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acids Research*, *34*(WEB. SERV. ISS.), W273–W279. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl237>
- De Vrese, M., & Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, prebiotics, and synbiotics. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Vol. 111, pp. 1–66). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2008_097
- de Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., & Schrezenmeir, J. (2001). Probiotics—compensation for lactase insufficiency. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *73*(2), 421s–429s. <https://academic.oup.com/ajcn/article-abstract/73/2/421s/4737573>
- de Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M., & de Vos, W. M. (2006). *Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. In *International Dairy Journal* (Vol. 16, Issue 9, pp. 1018–1028). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.003>
- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, P. (2005). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. In *International Dairy Journal* (Vol. 16, Issue 9, pp. 1058–1071). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.026>
- Delcenserie, V., Martel, D., Lamoureux, M., Amiot, J., Boutin, Y., & Roy, D. (2008).

- Immunomodulatory Effects of Probiotics in the Intestinal Tract. *Current Issues in Molecular Biology*, 10, 37–54. <http://www.cimb.org>
- Delgado, A., Brito, D., Peres, C., Noé-Arroyo, F., & Garrido-Fernández, A. (2005). Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiology*, 22(6), 521–528. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.11.015>
- Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Bienenstock, J., & Dinan, T. G. (2008). The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *Journal of Psychiatric Research*, 43(2), 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2008.03.009>
- Desmond, C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Collins, K., & Paul Ross, R. (2002). Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal*, 12(2–3), 183–190. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00040-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00040-7)
- Dethlefsen, L., & Relman, D. A. (2011). Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4554–4561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000087107>
- Devirgiliis, C., Coppola, D., Barile, S., Colonna, B., & Perozzi, G. (2009). Characterization of the Tn916 conjugative transposon in a food-borne strain of *Lactobacillus paracasei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), 3866–3871. <https://doi.org/10.1128/AEM.00589-09>
- Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2013). Melancholic microbes: a link between gut microbiota and depression? *Neurogastroenterology & Motility*, 25(9), 713–719. <https://doi.org/10.1111/nmo.12198>
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), 11971–11975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
- Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 14(1), 20–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>
- Dumont, M. G., Pommerenke, B., & Casper, P. (2013). Using stable isotope probing to obtain a targeted metatranscriptome of aerobic methanotrophs in lake sediment. *Environmental Microbiology Reports*, 5(5), 757–764. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12078>

- Duran-Pinedo, A. E., Chen, T., Teles, R., Starr, J. R., Wang, X., Krishnan, K., & Frias-Lopez, J. (2014). Community-wide transcriptome of the oral microbiome in subjects with and without periodontitis. *ISME Journal*, *8*(8), 1659–1672. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.23>
- EFSA. (2008). Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA Journal*, *7*(2), 1–15.
- EFSA. (2012). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed. *EFSA Journal*, *10*:3020(13), 4138.
- EFSA. (2015). Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. 2: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2015. EFSA panel on biological hazards (BIOHAZ). *EFSA Journal*.
- Egervärn, M., Roos, S., & Lindmark, H. (2009). Identification and characterization of antibiotic resistance genes in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, *107*(5), 1658–1668. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04352.x>
- El-Tarabily, K. A., El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Arif, M., Batiha, G. E., Khafaga, A. F., Elwan, H. A. M., Elnesr, S. S., & E. Abd El-Hack, M. (2021). Using essential oils to overcome bacterial biofilm formation and their antimicrobial resistance. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*(9), 5145–5156. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2021.05.033>
- Erejuwa, O., Sulaiman, S., & Wahab, M. (2014). Modulation of Gut Microbiota in the Management of Metabolic Disorders: The Prospects and Challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(3), 4158–4188. <https://doi.org/10.3390/ijms15034158>
- Evans, J. M., Morris, L. S., & Marchesi, J. R. (2013). The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *Journal of Endocrinology*, *218*, 37–47. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0131>
- Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J., & Poole, K. (1998). Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *180*(20), 5443–5447. <https://doi.org/10.1128/JB.180.20.5443-5447.1998/ASSET/35A89EE0-5D03-4AEB-B752-508A08F181FF/ASSETS/GRAPHIC/JB2080749003.JPEG>
- FAO/WHO. (2002). *Report of a Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food* (F. and A. O. of the U. Nations & W. H. Organization (eds.)).

- Faten, K., Hamida, K., Soumya, E. A., Saad, I. S. K., Hasna, M., Hassan, L., & Moktar, H. (2016). Lactobacillus plantarum: Effect of a protective biofilm on the surface of olives during storage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.028>
- Feld, L., Bielak, E., Hammer, K., & Wilcks, A. (2009). Characterization of a small erythromycin resistance plasmid pLFE1 from the food-isolate Lactobacillus plantarum M345. *Plasmid*, 61(3), 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2009.01.002>
- Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., & Rodríguez, J. M. (2013). The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. In *Pharmacological Research* (Vol. 69, Issue 1, pp. 1–10). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.09.001>
- Fernández, M., & Zúñiga, M. (2008). Amino Acid Catabolic Pathways of Lactic Acid Bacteria. <Http://Dx.Doi.Org/10.1080/10408410600880643>, 32(3), 155–183. <https://doi.org/10.1080/10408410600880643>
- Ferrario, C., Taverniti, V., Milani, C., Fiore, W., Laureati, M., De Noni, I., Stuknyte, M., Chouaia, B., Riso, P., & Guglielmetti, S. (2014). Modulation of Fecal Clostridiales Bacteria and Butyrate by Probiotic Intervention with Lactobacillus paracasei DG Varies among Healthy Adults. *The Journal of Nutrition*, 144(11), 1787–1796. <https://doi.org/10.3945/jn.114.197723>
- Fleming, H., & McFeeters, R. (1981). Use of microbial cultures: vegetable products. *Food Technology*, 35, 84–88.
- Forsythe, P., Sudo, N., Dinan, T., Taylor, V. H., & Bienenstock, J. (2010). Mood and gut feelings. In *Brain, Behavior, and Immunity* (Vol. 24, Issue 1, pp. 9–16). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.05.058>
- Fotiadis, C. I., Stoidis, C. N., Spyropoulos, B. G., & Zografos, E. D. (2008). Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 14, Issue 42, pp. 6453–6457). Baishideng Publishing Group Inc. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.6453>
- Franzosa, E. A., Morgan, X. C., Segata, N., Waldron, L., Reyes, J., Earl, A. M., Giannoukos, G., Boylan, M. R., Ciulla, D., Gevers, D., IZard, J., Garrett, W. S., Chan, A. T., & Huttenhower, C. (2014). Relating the metatranscriptome and metagenome of the human gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22), E2329–E2338. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319284111>
- Freestone, P. P. E., Sandrini, S. M., Haigh, R. D., & Lyte, M. (2008). Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection. In *Trends in*

- Microbiology* (Vol. 16, Issue 2, pp. 55–64). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.11.005>
- Freestone, P. P., Williams, P. H., Haigh, R. D., Maggs, A. F., Neal, C. P., & Lyte, M. (2002). Growth stimulation of intestinal commensal *Escherichia coli* by catecholamines: A possible contributory factor in trauma-induced sepsis. *Shock*, *18*(5), 465–470. <https://doi.org/10.1097/00024382-200211000-00014>
- Freitas, M., Tavan, E., Cayuela, C., Diop, L., Catherine, S., & Trugnan, G. (2003). Host-pathogens cross-talk. Indigenous bacteria and probiotics also play the game. *Biology of the Cell*, *95*(8), 503–506. <https://doi.org/10.1016/j.biolcel.2003.08.004>
- Freitas, M., Tavan, E., Thoreux, K., Cayuela, C., Sapin, C., & Trugnan, G. (2003). *Lactobacillus casei* DN-114 001 and *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 inhibit Rotavirus infection by modulating apical glycosylation pattern of cultured human intestinal HT29-MTX cells. *Annals of Nutrition and Metabolism*. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00416331>
- Frias-Lopez, J., Shi, Y., Tyson, G. W., Coleman, M. L., Schuster, S. C., Chisholm, S. W., & DeLong, E. F. (2008). Microbial community gene expression in ocean surface waters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(10), 3805–3810. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708897105>
- Galdeano, C. M., & Perdigon, 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), 673–681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02353.x>
- Gallopoulos, E., Houstis, E., & Rice, J. R. (1994). Computer as Thinker/Doer: Problem-Solving Environments for Computational Science. *IEEE Computational Science and Engineering*, *1*(2), 11–23. <https://doi.org/10.1109/99.326669>
- Ganjan, H., Nikokar, I., Tieshayar, A., Mostafaei, A., Amirmozafari, N., & Kiani, S. (2012). Effects of Salt Stress on the Antimicrobial Drug Resistance and Protein Profile of *Staphylococcus aureus*. *Jundishapur J Microbiol*, *5*(1), 328–359. <https://doi.org/10.5812/kowsar.20083645.2375>
- Garcovich, M., Zocco, M. A., Roccarina, D., Ponziani, F. R., & Gasbarrini, A. (2012). Prevention and treatment of hepatic encephalopathy: Focusing on gut microbiota. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 18, Issue 46, pp. 6693–6700). Baishideng Publishing Group Inc. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i46.6693>
- Garrigues, C., Johansen, E., & Crittenden, R. (2013). Pangenomics - an avenue to improved industrial starter cultures and probiotics. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 24, Issue 2, pp. 187–191). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.009>

- Gaucher, F., Bonnassie, S., Rabah, H., Marchand, P., Blanc, P., Jeantet, R., & Jan, G. (2019). Review: Adaptation of beneficial propionibacteria, lactobacilli, and bifidobacteria improves tolerance toward technological and digestive stresses. *Frontiers in Microbiology*, *10*(APR), 841. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00841/BIBTEX>
- Ge, B., Jiang, P., Han, F., Saleh, N. K., Dhiman, N., Fedorko, D. P., Nelson, N. A., & Meng, J. (2007). Identification and antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria from retail fermented foods. *Journal of Food Protection*, *70*(11), 2606–2612. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.11.2606>
- Genome Taxonomy Database*. (n.d.). Retrieved October 5, 2021, from <https://gtdb.ecogenomic.org/>
- Gilbert, J. A., Field, D., Huang, Y., Edwards, R., Li, W., Gilna, P., & Joint, I. (2008). Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities. *PLoS ONE*, *3*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003042>
- Giraffa, G., Chanishvili, N., & Widyastuti, Y. (2010). Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, *161*(6), 480–487. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2010.03.001>
- Gophna, U., Sommerfeld, K., Gophna, S., Doolittle, W. F., & Veldhuyzen Van Zanten, S. J. O. (2006). Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(11), 4136–4141. <https://doi.org/10.1128/JCM.01004-06>
- Gordon, S. (2008). Elie Metchnikoff: Father of natural immunity. *European Journal of Immunology*, *38*(12), 3257–3264. <https://doi.org/10.1002/eji.200838855>
- Gosalbes, M. J., Durbán, A., Pignatelli, M., Abellan, J. J., Jiménez-Hernández, N., Pérez-Cobas, A. E., Latorre, A., & Moya, A. (2011). Metatranscriptomic Approach to Analyze the Functional Human Gut Microbiota. *PLoS ONE*, *6*(3), e17447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017447>
- Gotteland, M., Brunser, O., & Cruchet, S. (2006). Systematic review: Are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? In *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 23, Issue 8, pp. 1077–1086). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.02868.x>
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., Di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., ... Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, *29*(7), 644–

652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Granato, D., Bergonzelli, G. E., Pridmore, R. D., Marvin, L., Rouvet, M., & Corthésy-Theulaz, I. E. (2004). Cell Surface-Associated Elongation Factor Tu Mediates the Attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to Human Intestinal Cells and Mucins. *Infection and Immunity*, *72*(4), 2160–2169. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2160-2169.2004>
- Granato, D., Branco, G. F., Cruz, A. G., Faria, J. de A. F., & Shah, N. P. (2010). Probiotic Dairy Products as Functional Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*(5), 455–470. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00120.x>
- Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G., & Faria, J. A. F. (2010). Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*(3), 292–302. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00110.x>
- Grattepanche, F., Miescher-Schwenninger, S., Meile, L., & Lacroix, C. (2008). Recent developments in cheese cultures with protective and probiotic functionalities. *Dairy Science and Technology*, *88*(4–5), 421–444. <https://doi.org/10.1051/dst:2008013>
- Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2011). Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Frontiers in Physiology*, *2* DEC, 94. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00094>
- Gries, D. M., Pultz, N. J., & Donskey, C. J. (2005). Growth in Cecal Mucus Facilitates Colonization of the Mouse Intestinal Tract by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Infectious Diseases*, *192*(9), 1621–1627. <https://doi.org/10.1086/491737>
- Grounta, A., Doulgeraki, A. I., Nychas, G. J. E., & Panagou, E. Z. (2016). Biofilm formation on *Conservolea* natural black olives during single and combined inoculation with a functional *Lactobacillus pentosus* starter culture. *Food Microbiology*, *56*, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.12.002>
- Grzymiski, J. J., Murray, A. E., Campbell, B. J., Kaplarevic, M., Gao, G. R., Lee, C., Daniel, R., Ghadiri, A., Feldman, R. A., & Cary, S. C. (2008). Metagenome analysis of an extreme microbial symbiosis reveals eurythermal adaptation and metabolic flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(45), 17516–17521. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802782105>
- Gu, S., Chen, D., Zhang, J.-N., Lv, X., & Wang, K. (2013). Bacterial Community Mapping of the Mouse Gastrointestinal Tract. *PLoS ONE*, *8*(10), 74957.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074957>

- Guarner, F., Khan, A. G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., Krabshuis, J., Lemair, T., Kaufmann, P., de Paula, J. A., Fedorak, R., Shanahan, F., Sanders, M. E., Szajewska, H., Ramakrishna, B. S., Karakan, T., & Kim, N. (2012). World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *46*(6), 468–481. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3182549092>
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, *27*(1), 1–93. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2005.07.008>
- Guttman, M., Garber, M., Levin, J. Z., Donaghey, J., Robinson, J., Adiconis, X., Fan, L., Koziol, M. J., Gnirke, A., Nusbaum, C., Rinn, J. L., Lander, E. S., & Regev, A. (2010). Ab initio reconstruction of cell type-specific transcriptomes in mouse reveals the conserved multi-exonic structure of lincRNAs. *Nature Biotechnology*, *28*(5), 503–510. <https://doi.org/10.1038/nbt.1633>
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., Macmanes, M. D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C. N., ... Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, *8*(8), 1494–1512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
- Haller, D., Colbus, H., Gänzle, M. G., Scherenbacher, P., Bode, C., & Hammes, W. P. (2001). Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastrointestinal ecosystem: A comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Systematic and Applied Microbiology*, *24*(2), 218–226. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00023>
- Hamad, E. M., Sato, M., Uzu, K., Yoshida, T., Higashi, S., Kawakami, H., Kadooka, Y., Matsuyama, H., El-Gawad, I. A. A., & Imaizumi, K. (2009). Milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 influences adipocyte size via inhibition of dietary fat absorption in Zucker rats. *British Journal of Nutrition*, *101*(5), 716–724. <https://doi.org/10.1017/S0007114508043808>
- Hammami, R., Zouhir, A., Ben Hamida, J., & Fliss, I. (2007). BACTIBASE: A new web-accessible database for bacteriocin characterization. *BMC Microbiology*, *7*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-89>
- Hammes, W. P., & Tichaczek, P. S. (1994). The potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food. In *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* (Vol. 198, Issue 3, pp. 193–201). Springer-Verlag.

<https://doi.org/10.1007/BF01192595>

- Hammes, W. P., & Vogel, R. F. (1995). The genus *Lactobacillus*. In *The Genera of Lactic Acid Bacteria* (pp. 19–54). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0_3
- Hamon, E., Horvatovich, P., Izquierdo, E., Bringel, F., Marchioni, E., Aoudé-Werner, D., & Ennahar, S. (2011). Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-63>
- Hanson, N. B., & Lanning, D. K. (2008). Microbial induction of B and T cell areas in rabbit appendix. *Developmental and Comparative Immunology*, *32*(8), 980–991. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.01.013>
- Harris, L. J., Fleming, H. P., & Klaenhammer, T. R. (1992). Characterization of two nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from a commercial sauerkraut fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(5).
- Hasler, C. M., & Brown, A. C. (2009). Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. *Journal of the American Dietetic Association*, *109*(4), 735–746. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2009.02.023>
- Hayes, M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2007). Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part I: Overview. *Biotechnology Journal*, *2*(4), 426–434. <https://doi.org/10.1002/biot.200600246>
- Hekmat, S., & McMahon, D. J. (1992). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in Ice Cream for Use as a Probiotic Food. *Journal of Dairy Science*, *75*(6), 1415–1422. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77895-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77895-3)
- Helanto, M., Kiviharju, K., Leisola, M., & Nyssölä, A. (2007). Metabolic engineering of *Lactobacillus plantarum* for production of L-ribulose. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(21), 7083–7091. <https://doi.org/10.1128/AEM.01180-07>
- Henaoui-Mejia, J., Elinav, E., Jin, C., Hao, L., Mehal, W. Z., Strowig, T., Thaiss, C. A., Kau, A. L., Eisenbarth, S. C., Jurczak, M. J., Camporez, J. P., Shulman, G. I., Gordon, J. I., Hoffman, H. M., & Flavell, R. A. (2012). Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*, *482*(7384), 179–185. <https://doi.org/10.1038/nature10809>
- Higashikawa, F., Noda, M., Awaya, T., Nomura, K., Oku, H., & Sugiyama, M. (2010). Improvement of constipation and liver function by plant-derived lactic acid

- bacteria: A double-blind, randomized trial. *Nutrition*, 26(4), 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.05.008>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). 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 and Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Holzapfel, W. H. (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 75(3), 197–212. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00707-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00707-3)
- Homan, M., & Orel, R. (2015). Are probiotics useful in *Helicobacter pylori* eradication? In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 21, Issue 37, pp. 10644–10653). WJG Press. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i37.10644>
- Homayouni, A., Payahoo, L., & Azizi, A. (2012). Effects of probiotics on lipid profile: A review. *American Journal of Food Technology*, 7(5), 251–265. <https://doi.org/10.3923/ajft.2012.251.265>
- Hong, C., Manimaran, S., Shen, Y., Perez-Rogers, J. F., Byrd, A. L., Castro-Nallar, E., Crandall, K. A., & Johnson, W. E. (2014). PathoScope 2.0: A complete computational framework for strain identification in environmental or clinical sequencing samples. *Microbiome*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-33>
- Hong, Y.-S., Hong, K. S., Park, M.-H., Ahn, Y.-T., Lee, J.-H., Huh, C.-S., Lee, J., Kim, I.-K., Hwang, G.-S., & Kim, J. S. (2011). Metabonomic Understanding of Probiotic Effects in Humans With Irritable Bowel Syndrome. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 45(5), 415–425. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e318207f76c>
- Hsu, C., Liao, J., Chung, Y., Hsieh, C., & Chan, Y. (2004). Xylooligosaccharides and fructooligosaccharides affect the intestinal microbiota and precancerous colonic lesion development in rats. *The Journal of Nutrition*, 134(6), 1523–1528.
- Hughenoltz, J., Sybesma, W., Groot, M. N., Wisselink, W., Ladero, V., Burgess, K., van Sinderen, D., Piard, J.-C., Eggink, G., Smid, E. J., Savoy, G., Sesma, F., Jansen, T., Hols, P., & Kleerebezem, M. (2002). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* (pp. 217–235). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2029-8_13
- Hughenoltz, P. (1998). The genera of lactic acid bacteria. In *Blackie Academic & Professional*.

- Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapfel, W. H., & Franz, C. M. A. P. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(3), 730–739. <https://doi.org/10.1128/AEM.02105-06>
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., & Rozès, N. (2010). Evaluation of a single and combined inoculation of a *Lactobacillus pentosus* starter for processing cv. Arbequina natural green olives. *Food Microbiology*, *27*(6), 731–740. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.006>
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., Creasy, H. H., Earl, A. M., Fitzgerald, M. G., Fulton, R. S., Giglio, M. G., Hallsworth-Pepin, K., Lobos, E. A., Madupu, R., Magrini, V., Martin, J. C., Mitreva, M., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., ... White, O. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, *486*(7402), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- Imperlini, E., Santorelli, L., Orrù, S., Scolamiero, E., Ruoppolo, M., & Caterino, M. (2016). Mass spectrometry-based metabolomic and proteomic strategies in organic acidemias. In *BioMed Research International* (Vol. 2016). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2016/9210408>
- Ivec, M., Botić, T., Koren, S., Jakobsen, M., Weingartl, H., & Cencič, A. (2007). Interactions of macrophages with probiotic bacteria lead to increased antiviral response against vesicular stomatitis virus. *Antiviral Research*, *75*(3), 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.03.013>
- Izumo, T., Izumi, F., Nakagawa, I., Kitagawa, Y., Shibata, H., & Kiso, Y. (2011). Influence of *Lactobacillus pentosus* S-PT84 Ingestion on the Mucosal Immunity of Healthy and *Salmonella* Typhimurium-Infected Mice. *Bioscience and Microflora*, *30*(2), 27–35. <https://doi.org/10.12938/bifidus.30.27>
- Jewett, M. C., Hofmann, G., & Nielsen, J. (2006). Fungal metabolite analysis in genomics and phenomics. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 17, Issue 2, pp. 191–197). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.02.001>
- Jiménez, E., Ladero, V., Chico, I., Maldonado-Barragán, A., López, M., Martín, V., Fernández, L., Fernández, M., Álvarez, M. A., Torres, C., & Rodríguez, J. M. (2013). Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human milk. *BMC Microbiology*, *13*(1), 288. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-288>
- Johansson, M. E. V., Holmén Larsson, J. M., & Hansson, G. C. (2011). The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a

- legislator of host-microbial interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4659–4665. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006451107>
- Johnson, C. L., & Versalovic, J. (2012). The human microbiome and its potential importance to pediatrics. In *Pediatrics* (Vol. 129, Issue 5, pp. 950–960). American Academy of Pediatrics. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-2736>
- Joint WHO/FAO/UNU. (2007). Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. Report of a Joint WHO/ FAO/UNU Expert Consultation. *WHO Technical Report Series No. 935*. Geneva: WHO.
- Jorth, P., Turner, K. H., Gumus, P., Nizam, N., Buduneli, N., & Whiteley, M. (2014). Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. *MBio*, 5(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.01012-14>
- Jousselin, A., Kelley, W. L., Barras, C., Lew, D. P., & Renzoni, A. (2013). The *Staphylococcus aureus* Thiol/Oxidative stress global regulator Spx controls trfA, a gene implicated in cell wall antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3283–3292. https://doi.org/10.1128/AAC.00220-13/SUPPL_FILE/ZAC999101956SO1.PDF
- Kadooka, Y., Ogawa, A., Ikuyama, K., & Sato, M. (2011). The probiotic *Lactobacillus gasseri* SBT2055 inhibits enlargement of visceral adipocytes and upregulation of serum soluble adhesion molecule (sICAM-1) in rats. *International Dairy Journal*, 21(9), 623–627. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.02.001>
- Kamada, N., Seo, S. U., Chen, G. Y., & Núñez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 13, Issue 5, pp. 321–335). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3430>
- Kamble, R. D., & Pathade, G. R. (2010). Studies on potential application of representative promising isolates of *Lactobacillus* for preparation of soft drink-like lassie. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 1, 5–10.
- Kambouris, M. E., Pavlidis, C., Skoufas, E., Arabatzis, M., Kantzanou, M., Velegraki, A., & Patrinos, G. P. (2018). Culturomics: A new kid on the block of OMICS to enable personalized medicine. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 22(2), 108–118. <https://doi.org/10.1089/omi.2017.0017>
- Kandler, O., & Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus* Beijerinck. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Williams a, pp. 1209–1234).
- Karahan, A. G., Çakmakçı, M. L., Cicio• lu-Arido• an, B., & Kart-Gündo• du, A. (2005). Nitric Oxide (NO) and lactic acid bacteria-contributions to health, food quality,

- and safety. *Food Reviews International*, 21(3), 313–329. <https://doi.org/10.1080/FRI-200061620>
- Karasu, N., Şimşek, Ö., & Çon, A. H. (2010). Technological and probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditionally produced fermented vegetables. *Annals of Microbiology*, 60(2), 227–234. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0031-6>
- Kastner, S., Perreten, V., Bleuler, H., Hugenschmidt, G., Lacroix, C., & Meile, L. (2006). Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(2), 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.07.009>
- Katla, A. K., Kruse, H., Johnsen, G., & Herikstad, H. (2001). Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 67(1–2), 147–152. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00522-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00522-5)
- Kaur, N., & Gupta, A. K. (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. In *Journal of Biosciences* (Vol. 27, Issue 7, pp. 703–714). Indian Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1007/BF02708379>
- Kay, E., Lesk, V. I., Tamaddoni-Nezhad, A., Hitchen, P. G., Dell, A., Sternberg, M. J., Muggleton, S., & Wren, B. W. (2010). Systems analysis of bacterial glycomes. *Biochemical Society Transactions*, 38(5), 1290–1293. <https://doi.org/10.1042/BST0381290>
- Kelly, C. P. (2013). Fecal microbiota transplantation - An old therapy comes of age. In *New England Journal of Medicine* (Vol. 368, Issue 5, pp. 474–475). Massachusetts Medical Society. <https://doi.org/10.1056/NEJMe1214816>
- Keoghane, J., Ryan, K., & Shanahan, F. (2009). *Lactobacillus* in the gastrointestinal tract. In *Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics* (Caister Ac, pp. 169–181).
- Khangwal, I., & Shukla, P. (2019). Combinatory biotechnological intervention for gut microbiota. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 103, Issue 9). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09727-w>
- Kim, J. F., Jeong, H., Yu, D. S., Choi, S. H., Hur, C. G., Park, M. S., Yoon, S. H., Kim, D. W., Ji, G. E., Park, H. S., & Oh, T. K. (2009). Genome Sequence of the Probiotic Bacterium *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* AD011. *Journal of Bacteriology*, 191(2), 678–679. <https://doi.org/10.1128/JB.01515-08>
- Kim, M., Lee, K.-H., Yoon, S.-W., Kim, B.-S., Chun, J., & Yi, H. (2013). Analytical Tools and Databases for Metagenomics in the Next-Generation Sequencing Era.

- Genomics & Informatics*, 11(3), 102. <https://doi.org/10.5808/gi.2013.11.3.102>
- Kinoshita, H., Uchida, H., Kawai, Y., Kawasaki, T., Wakahara, N., Matsuo, H., Watanabe, M., Kitazawa, H., Ohnuma, S., Miura, K., Horii, A., & Saito, T. (2008). Cell surface *Lactobacillus plantarum* LA 318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6), 1667–1674. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03679.x>
- Klaenhammer, T. R., & De Vos, W. M. (2011). An incredible scientific journey. The evolutionary tale of the lactic acid bacteria. *The 10th LAB Symposium. Thirty Years of Research on Lactic Acid Bacteria*, 24, 1–11.
- Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Müller-Bertling, S., Witte, W., & Goossens, H. (2007). Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(5), 900–912. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm035>
- Klein, G. (2011). Antibiotic Resistance and Molecular Characterization of Probiotic and Clinical *Lactobacillus* Strains in Relation to Safety Aspects of Probiotics. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(2), 267–281. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0672>
- Klemm, P., & Schembri, M. A. (2000). Bacterial adhesins: Function and structure. *International Journal of Medical Microbiology*, 290(1), 27–35. [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80102-2](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80102-2)
- Kline, K. A., Fälker, S., Dahlberg, S., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2009). Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. In *Cell Host and Microbe* (Vol. 5, Issue 6, pp. 580–592). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.011>
- Knief, C., Delmotte, N., Chaffron, S., Stark, M., Innerebner, G., Wassmann, R., Von Mering, C., & Vorholt, J. A. (2012). Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *ISME Journal*, 6(7), 1378–1390. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.192>
- Knorr, D. (1998). Technology aspects related to microorganisms in functional foods. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 9, Issues 8–9, pp. 295–306). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00051-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00051-X)
- Koletzko, B., Aggett, P. J., Bindels, J. G., Bung, P., Ferré, P., Gil, A., Lentze, M. J., Roberfroid, M., & Strobel, S. (1998). Growth, development and differentiation: a functional food science approach. *British Journal of Nutrition*, 80(S1), S5–S45. <https://doi.org/10.1079/bjn19980104>

- Kolmeder, C. A., & de Vos, W. M. (2014). Metaproteomics of our microbiome - Developing insight in function and activity in man and model systems. In *Journal of Proteomics* (Vol. 97, pp. 3–16). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.018>
- Kotani, Y., Shinkai, S., Okamoto, H., Toba, M., Ogawa, K., Yoshida, H., Fukaya, T., Fujiwara, Y., Chaves, P. H. M., Kakumoto, K., & Kohda, N. (2010). Oral intake of *Lactobacillus pentosus* strain b240 accelerates salivary immunoglobulin A secretion in the elderly: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Immunity and Ageing*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-7-11>
- Kristensen, N. B., Bryrup, T., Allin, K. H., Nielsen, T., Hansen, T. H., & Pedersen, O. (2016). Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: A systematic review of randomized controlled trials. *Genome Medicine*, 8(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0300-5>
- Kubinak, J. L., Petersen, C., Stephens, W. Z., Soto, R., Bake, E., O'Connell, R. M., & Round, J. L. (2015). MyD88 signaling in T cells directs IgA-mediated control of the microbiota to promote health. *Cell Host and Microbe*, 17(2), 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.12.009>
- Kumar, A., Mosa, K. A., Ji, L., Kage, U., Dhokane, D., Karre, S., Madalageri, D., & Pathania, N. (2018). Metabolomics-assisted biotechnological interventions for developing plant-based functional foods and nutraceuticals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(11), 1791–1807. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1285752>
- Kuo, S.-M. (2013). The Interplay Between Fiber and the Intestinal Microbiome in the Inflammatory Response. *Advances in Nutrition*, 4(1), 16–28. <https://doi.org/10.3945/an.112.003046>
- Kyla-Nikkila, K., Hujanen, M., Leisola, M., & Palva, A. (2000). Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L-(+)-lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3835–3841. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.3835-3841.2000>
- Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J., & Withers, S. G. (2008). Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. <https://doi.org/10.1146/Annurev.Biochem.76.061005.092322>, 77, 521–555. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.76.061005.092322>
- Laitila, A., Alakomi, H. L., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., & Haikara, A. (2002). Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds in vitro and in malting of barley. *Journal of Applied Microbiology*, 93(4), 566–576. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01731.x>

- Lavermicocca, P., Valerio, F., Lonigro, S. L., Di Leo, A., & Visconti, A. (2008). Antagonistic activity of potential probiotic lactobacilli against the ureolytic pathogen *Yersinia enterocolitica*. *Current Microbiology*, *56*(2), 175–181. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9069-5>
- Leatherhead Food International, I. (2006). The international market for functional foods. In *Functional Food Market Report* (Leatherhea).
- Lee, J. H., Nam, S. H., Seo, W. T., Yun, H. D., Hong, S. Y., Kim, M. K., & Cho, K. M. (2012). The production of surfactin during the fermentation of cheonggukjang by potential probiotic *Bacillus subtilis* CSY191 and the resultant growth suppression of MCF-7 human breast cancer cells. *Food Chemistry*, *131*(4), 1347–1354. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.133>
- Lee, K. B., Lee, H. G., & Choi, Y. J. (2008). Proteomic analysis of the effect of bile salts on the intestinal and probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Biotechnology*, *137*(1–4), 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.07.1788>
- Lee, S. M., Donaldson, G. P., Mikulski, Z., Boyajian, S., Ley, K., & Mazmanian, S. K. (2013). Bacterial colonization factors control specificity and stability of the gut microbiota. *Nature*, *501*(7467), 426–429. <https://doi.org/10.1038/nature12447>
- Leimena, M. M., Ramiro-Garcia, J., Davids, M., van den Bogert, B., Smidt, H., Smid, E. J., Boekhorst, J., Zoetendal, E. G., Schaap, P. J., & Kleerebezem, M. (2013). A comprehensive metatranscriptome analysis pipeline and its validation using human small intestine microbiota datasets. *BMC Genomics*, *14*(1), 530. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-530>
- Leitich, H., & Kiss, H. (2007). Asymptomatic bacterial vaginosis and intermediate flora as risk factors for adverse pregnancy outcome. In *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* (Vol. 21, Issue 3, pp. 375–390). Baillière Tindall. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2006.12.005>
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, *15*(2), 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
- Lesbros-Pantoflickova, D., Corthésy-Theulaz, I., & Blum, A. L. (2007). *Helicobacter pylori* and Probiotics. *The Journal of Nutrition Effects of Probiotics and Prebiotics*, *137*(3), 812S–818S. <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/137/3/812S/4664764>
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, *444*(7122), 1022–1023. <https://doi.org/10.1038/4441022a>

- Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, *12*, 323. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
- Li, R., Zhu, H., Ruan, J., Qian, W., Fang, X., Shi, Z., Li, Y., Li, S., Shan, G., Kristiansen, K., Li, S., Yang, H., Wang, J., & Wang, J. (2010). De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. *Genome Research*, *20*(2), 265–272. <https://doi.org/10.1101/gr.097261.109>
- Liou, A. P., Paziuk, M., Luevano, J. M., Machineni, S., Turnbaugh, P. J., & Kaplan, L. M. (2013). Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. *Science Translational Medicine*, *5*(178), 178ra41-178ra41. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005687>
- Liu, C., Zhang, Z. Y., Dong, K., Yuan, J. P., & Guo, X. K. (2009). Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Biomedical and Environmental Sciences*, *22*(5), 401–412. [https://doi.org/10.1016/S0895-3988\(10\)60018-9](https://doi.org/10.1016/S0895-3988(10)60018-9)
- Lorrot, M., & Vasseur, M. (2007). Physiopathologie de la diarrhée à rotavirus. *Archives de Pédiatrie*, *14*(SUPPL. 3), S145–S151. [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(07\)80018-2](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(07)80018-2)
- Louis, P., Hold, G. L., & Flint, H. J. (2014). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 12, Issue 10, pp. 661–672). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3344>
- Lourens-Hattingh, A., & Viljoen, B. C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. In *International Dairy Journal* (Vol. 11, Issues 1–2, pp. 1–17). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00036-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00036-X)
- Luh, K. T., Hsueh, P. R., Teng, L. J., Pan, H. J., Chen, Y. C., Lu, J. J., Wu, J. J., & Ho, S. W. (2000). Quinupristin-dalfopristin resistance among gram-positive bacteria in Taiwan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *44*(12), 3374–3380. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.12.3374-3380.2000>
- Lyte, M. (2004). Microbial endocrinology and infectious disease in the 21st century. *Trends in Microbiology*, *12*(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.11.004>
- Lyte, M. (2010). The microbial organ in the gut as a driver of homeostasis and disease. *Medical Hypotheses*, *74*(4), 634–638. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.10.025>
- Lyte, M. (2011). Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *BioEssays*, *33*(8), 574–581. <https://doi.org/10.1002/bies.201100024>

- Lyte, M. (2013). Microbial Endocrinology in the Microbiome-Gut-Brain Axis: How Bacterial Production and Utilization of Neurochemicals Influence Behavior. *PLoS Pathogens*, *9*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003726>
- Lyte, M., & Ernst, S. (1992). Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life Sciences*, *50*(3), 203–212. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(92\)90273-R](https://doi.org/10.1016/0024-3205(92)90273-R)
- Mack, D. R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., & Hollingsworth, M. A. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *276*(4), 39–4). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.4.g941>
- Madsen, K. (2011). Using Metabolomics to Decipher Probiotic Effects in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *45*(5), 389–390. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31821377cf>
- Mahmoudi, R., Zare, P., Hassanzadeh, P., & Nosratpour, S. (2014). Effect of *Teucrium polium* Essential Oil on the Physicochemical and Sensory Properties of Probiotic Yoghurt. *Journal of Food Processing and Preservation*, *38*(3), 880–888. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12042>
- Maldonado-Barragán, A., Caballero-Guerrero, B., Lucena-Adrós, H., & Ruiz-Barba, J. L. (2011). Genome sequence of *Lactobacillus pentosus* IG1, a strain isolated from Spanish-style green olive fermentations. In *Journal of Bacteriology* (Vol. 193, Issue 19, p. 5605). American Society for Microbiology Journals. <https://doi.org/10.1128/JB.05736-11>
- Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., Roca, J., & Dore, J. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, *55*(2), 205–211. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.073817>
- Manzoni, P. (2007). Use of *Lactobacillus casei* Subspecies *Rhamnosus* GG and Gastrointestinal Colonization by *Candida* Species in Preterm Neonates. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *45*(Suppl 3), S190–S194. <https://doi.org/10.1097/01.mpg.0000302971.06115.15>
- Mapelli, V., Olsson, L., & Nielsen, J. (2008). Metabolic footprinting in microbiology: methods and applications in functional genomics and biotechnology. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 26, Issue 9, pp. 490–497). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.05.008>

- Marshall, B. M., Ochieng, D. J., & Levy, S. B. (2009). Commensals: Underappreciated reservoir of antibiotic resistance. *Microbe*, 4(5), 231–238. <https://doi.org/10.1128/microbe.4.231.1>
- Marteau, P., Sokol, H., Dray, X., & Seksik, P. (2009). Bacteriotherapy for inflammatory bowel disease: therapeutic tool and/or pharmacological vectors? In *Gastroentérologie clinique et biologique: Vol. 33 Suppl 3* (pp. S228–S234). Elsevier Masson. [https://doi.org/10.1016/s0399-8320\(09\)73158-6](https://doi.org/10.1016/s0399-8320(09)73158-6)
- Martin, F. J., Wang, Y., Sprenger, N., Yap, I. K. S., Lundstedt, T., Lek, P., Rezzi, S., Ramadan, Z., van Bladeren, P., Fay, L. B., Kochhar, S., Lindon, J. C., Holmes, E., & Nicholson, J. K. (2008). Probiotic modulation of symbiotic gut microbial–host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. *Molecular Systems Biology*, 4(1), 157. <https://doi.org/10.1038/msb4100190>
- Martin, F. P. J., Sprenger, N., Montoliu, I., Rezzi, S., Kochhar, S., & Nicholson, J. K. (2010). Dietary modulation of gut functional ecology studied by fecal metabonomics. *Journal of Proteome Research*, 9(10), 5284–5295. <https://doi.org/10.1021/pr100554m>
- Martin, F. P. J., Wang, Y., Sprenger, N., Holmes, E., Lindon, J. C., Kochhar, S., & Nicholson, J. K. (2007). Effects of probiotic *Lactobacillus Paracasei* treatment on the host gut tissue metabolic profiles probed via magic-angle-spinning NMR spectroscopy. *Journal of Proteome Research*, 6(4), 1471–1481. <https://doi.org/10.1021/pr060596a>
- Martín, R., Jiménez, E., Olivares, M., Marín, M. L., Fernández, L., Xaus, J., & Rodríguez, J. M. (2006). *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother–child pair. *International Journal of Food Microbiology*, 112(1), 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.011>
- Martinez, J. L., Sánchez, M. B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., & Alvarez-Ortega, C. (2009). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(2), 430–449. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2008.00157.X>
- Martins, E. M. F., Ramos, A. M., Vanzela, E. S. L., Stringheta, P. C., de Oliveira Pinto, C. L., & Martins, J. M. (2013). Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. In *Food Research International* (Vol. 51, Issue 2, pp. 764–770). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.047>
- Masuda, T., Kimura, M., Okada, S., & Yasui, H. (2010). *Pediococcus pentosaceus* Sn26 Inhibits IgE Production and the Occurrence of Ovalbumin-Induced Allergic Diarrhea in Mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(2), 329–335.

- <https://doi.org/10.1271/bbb.90656>
- Mathias, A., & Corthésy, B. (2011). N-Glycans on secretory component. *Gut Microbes*, 2(5), 287–293. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.5.18269>
- Mathipa, M., & Thantsha, M. (2015). Cocktails of probiotics pre-adapted to multiple stress factors are more robust under simulated gastrointestinal conditions than their parental counterparts and exhibit enhanced antagonistic capabilities against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Gut Pathogens*, 7(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13099-015-0053-5>
- Matsumoto, M., Kibe, R., Ooga, T., Aiba, Y., Kurihara, S., Sawaki, E., Koga, Y., & Benno, Y. (2012). Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. *Scientific Reports*, 2(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep00233>
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future Probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12(2–3), 173–182. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00099-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00099-1)
- Mawe, G. M., & Hoffman, J. M. (2013). Serotonin signalling in the gut-functions, dysfunctions and therapeutic targets. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 10, Issue 8, pp. 473–486). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.105>
- Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D., & Weaver, C. T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. In *Nature* (Vol. 489, Issue 7415, pp. 231–241). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature11551>
- Mazmanian, S. K., Liu, G., Ton-That, H., & Schneewind, O. (1999). *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science*, 285(5428), 760–763. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.285.5428.760/SUPPL_FILE/1041555S2_THUMB.GIF
- McMahon, M. A. S., McDowell, D. A., & Blair, I. S. (2007). The pattern of pleiomorphism in stressed *Salmonella* Virchow populations is nutrient and growth phase dependent. *Letters in Applied Microbiology*, 45(3), 276–281. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02187.x>
- McNulty, N. P., Yatsunenko, T., Hsiao, A., Faith, J. J., Muegge, B. D., Goodman, A. L., Henrissat, B., Oozeer, R., Cools-Portier, S., Gobert, G., Chervaux, C., Knights, D., Lozupone, C. A., Knight, R., Duncan, A. E., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Newgard, C. B., Heath, A. C., & Gordon, J. I. (2011). The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and

- monozygotic twins. *Science Translational Medicine*, 3(106), 106ra106-106ra106. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002701>
- Michail, S., & Abernathy, F. (2002). Lactobacillus plantarum Reduces the In Vitro Secretory Response of Intestinal Epithelial Cells to Enteropathogenic Escherichia coli Infection. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 35(3), 350–355. https://journals.lww.com/jpgn/Fulltext/2002/09000/Lactobacillus_plantarum_Reduces_the_In_Vitro.21.aspx
- Millette, M., Luquet, F.-M., Ruiz, M. T., & Lacroix, M. (2008). Characterization of probiotic properties of *Lactobacillus* strains. *Dairy Science and Technology*, 88(6), 695–705. <https://doi.org/10.1051/dst:2008018>
- Millezi, A. F., Piccoli, R. H., Oliveira, J. M., & Pereira, M. O. (2016). Anti-biofilm and Antibacterial Effect of Essential Oils and Their Major Compounds. *Http://Dx.Doi.Org/10.1080/0972060X.2014.960262*, 19(3), 624–631. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.960262>
- Mills, K., Mills, P., Jackson, M., Worthington, V., Beesley, C., Mann, A., Clayton, P., Grunewald, S., Keir, G., Young, L., Langridge, J., Mian, N., & Winchester, B. (2006). Diagnosis of congenital disorders of glycosylation type-I using protein chip technology. *Proteomics*, 6(7), 2295–2304. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500682>
- Mills, S., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2011). Enhancing the stress responses of probiotics for a lifestyle from gut to product and back again. *Microbial Cell Factories*, 10(SUPPL. 1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S19/FIGURES/3>
- Mitsuoka, T. (1992). The Human Gastrointestinal Tract. In *The Lactic Acid Bacteria Volume 1* (pp. 69–114). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3522-5_4
- Miyoshi, Y., Okada, S., Uchimura, T., & Satoh, E. (2006). A Mucus Adhesion Promoting Protein, MapA, Mediates the Adhesion of Lactobacillus reuteri to Caco-2 Human Intestinal Epithelial Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(7), 1622–1628. <https://doi.org/10.1271/bbb.50688>
- Moayyedi, P., Ford, A. C., Talley, N. J., Cremonini, F., Foxx-Orenstein, A. E., Brandt, L. J., & Quigley, E. M. M. (2010). The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: A systematic review. In *Gut* (Vol. 59, Issue 3, pp. 325–332). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.167270>
- Mokhbi, A., Kaid-Harche, M., Lamri, K., Rezki, M., & Kacem, M. (2009). Selección de cepas de Lactobacillus plantarum para su uso como cultivos iniciadores en la

- fermentación de aceitunas de Argelia. *Grasas y Aceites*, 60(1), 82–88. <https://doi.org/10.3989/gya.064408>
- Montoro, B. P., Benomar, N., Lavilla Lerma, L., Castillo Gutiérrez, S., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2016). Fermented Aloreña Table Olives as a Source of Potential Probiotic *Lactobacillus pentosus* Strains. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1583. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01583>
- Moran, M. (2009). Metatranscriptomics: eavesdropping on complex microbial communities. *Microbe Magazine*, 4, 329–335.
- Morita, H., Yoshikawa, H., Sakata, R., Nagata, Y., & Tanaka, H. (1997). Synthesis of nitric oxide from the two equivalent guanidino nitrogens of L-arginine by *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Bacteriology*, 179(24), 7812–7815. <https://doi.org/10.1128/jb.179.24.7812-7815.1997>
- Moritz, C. M. F., Rall, V. L. M., Saeki, M. J., & Júnior, A. F. (2012). Inhibitory effect of essential oils against *Lactobacillus rhamnosus* and starter culture in fermented milk during its shelf-life period. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 43(3), 1147–1156. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220120003000042>
- Morotomi, M., Watanabe, T., Suegara, N., Kawai, Y., & Mutai, M. (1975). Distribution of indigenous bacteria in the digestive tract of conventional and gnotobiotic rats. *Infection and Immunity*, 11(5), 962–968. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/804450>
- Mourad, K., & Nour-Eddine, K. (2006). In vitro preselection criteria for probiotic *Lactobacillus plantarum* strains of fermented olives origin. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 1, 27–32. www.newcenturyhealthpublishers.com
- Mouricout, M. (1997). *Interactions between the Enteric Pathogen and the Host* (pp. 109–123). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1828-4_19
- Mozzi, F., Ortiz, M. E., Bleckwedel, J., De Vuyst, L., & Pescuma, M. (2013). Metabolomics as a tool for the comprehensive understanding of fermented and functional foods with lactic acid bacteria. *Food Research International*, 54(1), 1152–1161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.010>
- Murina, V., Kasari, M., Takada, H., Hinnu, M., Saha, C. K., Grimshaw, J. W., Seki, T., Reith, M., Putrinš, M., Tenson, T., Strahl, H., Hauryliuk, V., & Atkinson, G. C. (2019). ABCF ATPases Involved in Protein Synthesis, Ribosome Assembly and Antibiotic Resistance: Structural and Functional Diversification across the Tree of Life. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3568–3590. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2018.12.013>

- Nakjang, S., Ndeh, D. A., Wipat, A., Bolam, D. N., & Hirt, R. P. (2012). A novel extracellular metallopeptidase domain shared by animal Host-Associated mutualistic and pathogenic microbes. *PLoS ONE*, *7*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030287>
- Nam, H. Y., Park, J. H., Kim, K., Kwon, I. C., & Jeong, S. Y. (2009). Lipid-based emulsion system as non-viral gene carriers. *Archives of Pharmacal Research*, *32*(5), 639–646. <https://doi.org/10.1007/s12272-009-1500-y>
- Namiki, T., Hachiya, T., Tanaka, H., & Sakakibara, Y. (2012). MetaVelvet: An extension of Velvet assembler to de novo metagenome assembly from short sequence reads. *Nucleic Acids Research*, *40*(20), e155. <https://doi.org/10.1093/nar/gks678>
- Neeser, J.-R., Granato, D., Rouvet, M., Servin, A., Teneberg, S., & Karlsson, K.-A. (2000). Lactobacillus johnsonii La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiology*, *10*(11), 1193–1199. <https://doi.org/10.1093/glycob/10.11.1193>
- Neish, A. S. (2014). Mucosal immunity and the microbiome. *Annals of the American Thoracic Society*, *11*(SUPPL. 1), S28–S32. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201306-161MG>
- Nes, I. F., Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V., & Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. In *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* (Vol. 70, Issues 2–4, pp. 113–128). Springer. <https://doi.org/10.1007/BF00395929>
- Nguyen, H.-T., Truong, D.-H., Kouhouné, S., Ly, S., Razafindralambo, H., Delvigne, F., Nguyen, H.-T., Truong, D.-H., Kouhouné, S., Ly, S., Razafindralambo, H., & Delvigne, F. (2016). Biochemical Engineering Approaches for Increasing Viability and Functionality of Probiotic Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(6), 867. <https://doi.org/10.3390/ijms17060867>
- Nicholson, J. K., Lindon, J. C., & Holmes, E. (1999). “Metabonomics”: Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. In *Xenobiotica* (Vol. 29, Issue 11, pp. 1181–1189). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/004982599238047>
- Niku-Paavola, M. L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T., & Haikara, A. (1999). New types of antimicrobial compounds produced by Lactobacillus plantarum. *Journal of Applied Microbiology*, *86*(1), 29–35. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00632.x>

- Nisiotou, A. A., Chorianopoulos, N., Nychas, G.-J. E., & Panagou, E. Z. (2010). Yeast heterogeneity during spontaneous fermentation of black Conservolea olives in different brine solutions. *Journal of Applied Microbiology*, *108*(2), 396–405. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04424.x>
- Niwa, T. (1986). Metabolic profiling with gas chromatography—mass spectrometry and its application to clinical medicine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, *379*(C), 313–345. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)80688-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)80688-X)
- Nychas, G.-J. E., Skandamis, P. N., & Tassou, C. C. (2003). Antimicrobials from herbs and spices. *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*, 176–200. <https://doi.org/10.1533/9781855737037.176>
- O'Brien, T. F. (2002). Emergence, Spread, and Environmental Effect of Antimicrobial Resistance: How Use of an Antimicrobial Anywhere Can Increase Resistance to Any Antimicrobial Anywhere Else. *Clinical Infectious Diseases*, *34*(s3), S78–S84. <https://doi.org/10.1086/340244>
- O'May, G. A., & Macfarlane, G. T. (2005). Health claims associated with probiotics. In *Probiotic Dairy Products* (pp. 138–166). Blackwell Publishing Ltd.
- O'Sullivan, D. J. (2001). Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(4), 1751–1760. <https://doi.org/10.1021/jf0012244>
- Oberreuther-Moschner, D. L., Jahreis, G., Rechkemmer, G., & Pool-Zobel, B. L. (2004). Dietary intervention with the probiotics *Lactobacillus acidophilus* 145 and *Bifidobacterium longum* 913 modulates the potential of human faecal water to induce damage in HT29clone19A cells. *British Journal of Nutrition*, *91*(6), 925–932. <https://doi.org/10.1079/bjn20041108>
- Ohtake, T., Pontrelli, S., Laviña, W. A., Liao, J. C., Putri, S. P., & Fukusaki, E. (2017). Metabolomics-driven approach to solving a CoA imbalance for improved 1-butanol production in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, *41*, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.04.003>
- Okkers, D. J., Dicks, L. M. T., Silvester, M., Joubert, J. J., & Odendaal, H. J. (1999). Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *Journal of Applied Microbiology*, *87*(5), 726–734. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00918.x>
- Omar, N. Ben, Abriouel, H., Lucas, R., Martínez-Cañamero, M., Guyot, J. P., & Gálvez, A. (2006). Isolation of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains from ben saalga, a traditional fermented gruel from Burkina Faso. *International*

- Journal of Food Microbiology*, 112(1), 44–50.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.014>
- Otero, M. C., & Nader-Macías, M. E. (2006). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Animal Reproduction Science*, 96(1–2), 35–46.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.11.004>
- Ott, S. J., Musfeldt, M., Wenderoth, D. F., Hampe, J., Brant, O., Fölsch, U. R., Timmis, K. N., & Schreiber, S. (2004). Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*, 53(5), 685–693. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.025403>
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* (pp. 279–289). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2029-8_18
- Panda, A. K., Rao, S. V. R., Raju, M. V. L. N., & Sharma, S. R. (2006). Dietary Supplementation of *Lactobacillus Sporogenes* on Performance and Serum Biochemico-Lipid Profile of Broiler Chickens. *The Journal of Poultry Science*, 43(3), 235–240. <https://doi.org/10.2141/jpsa.43.235>
- Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics—a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577–7587. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1>
- Papagianni, M., & Anastasiadou, S. (2009). Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 8, Issue 1, p. 3). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-3>
- Parashar, U. D., Gibson, C. J., Bresee, J. S., & Glass, R. I. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), 304–306. <https://doi.org/10.3201/eid1202.050006>
- Parente, E., Cogan, T. M., & Powell, I. B. (2017). Starter Cultures: General Aspects. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition* (Vol. 1, pp. 201–226). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00008-9>
- Park, A. J., Collins, J., Blennerhassett, P. A., Ghia, J. E., Verdu, E. F., Bercik, P., & Collins, S. M. (2013). Altered colonic function and microbiota profile in a mouse model of chronic depression. *Neurogastroenterology & Motility*, 25(9), 733–e575. <https://doi.org/10.1111/nmo.12153>
- Parnell, J. A., & Reimer, R. A. (2010). Effect of prebiotic fibre supplementation on hepatic gene expression and serum lipids: A dose-response study in JCR:LA-cp

- rats. *British Journal of Nutrition*, *103*(11), 1577–1584. <https://doi.org/10.1017/S0007114509993539>
- Patel, A. R., Shah, N., & Prajapati, J. B. (2012). Antibiotic Resistance Profile of Lactic Acid Bacteria and Their Implications in Food Chain. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, *7*, 202–211. <https://doi.org/10.5829/idosi.wjdfs.2012.7.2.1113>
- Patel, R., & DuPont, H. L. (2015). New Approaches for Bacteriotherapy: Prebiotics, New-Generation Probiotics, and Synbiotics. *Clinical Infectious Diseases*, *60*(suppl_2), S108–S121. <https://doi.org/10.1093/cid/civ177>
- Pathak, Y. V. (2011). Handbook of nutraceuticals: ingredients, formulations, and applications (Vol. 1). In *Handbook of Nutraceuticals Volume I*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420082227>
- Peano, C., Pietrelli, A., Consolandi, C., Rossi, E., Petiti, L., Tagliabue, L., De Bellis, G., & Landini, P. (2013). An efficient rRNA removal method for RNA sequencing in GC-rich bacteria. *Microbial Informatics and Experimentation*, *3*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/2042-5783-3-1>
- Pelaseyed, T., Bergström, J. H., Gustafsson, J. K., Ermund, A., Birchenough, G. M. H., Schütte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Nyström, E. E. L., Wising, C., Johansson, M. E. V., & Hansson, G. C. (2014). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological Reviews*, *260*(1), 8–20. <https://doi.org/10.1111/imr.12182>
- Peña, A. S. (2007). Intestinal flora, probiotics, prebiotics, synbiotics and novel foods. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, *99*(11), 653.
- Pereira, A. P., Pereira, J. A., Bento, A., & Estevinho, M. L. (2008). Microbiological characterization of table olives commercialized in Portugal in respect to safety aspects. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(8), 2895–2902. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.05.033>
- 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. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 26, Issue 1, pp. 31–42). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.01.006>
- Pérez-Losada, M., Castro-Nallar, E., Bendall, M. L., Freishtat, R. J., & Crandall, K. A. (2015). Dual Transcriptomic Profiling of Host and Microbiota during Health and Disease in Pediatric Asthma. *PLOS ONE*, *10*(6), e0131819. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131819>

- Pérez Montoro, B., Benomar, N., Caballero Gómez, N., Ennahar, S., Horvatovich, P., Knapp, C. W., Alonso, E., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2018). Proteomic analysis of *Lactobacillus pentosus* for the identification of potential markers of adhesion and other probiotic features. *Food Research International*, *111*, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.072>
- Pérez Montoro, B., Benomar, N., Caballero Gómez, N., Ennahar, S., Horvatovich, P., Knapp, C. W., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2018). Proteomic analysis of *Lactobacillus pentosus* for the identification of potential markers involved in acid resistance and their influence on other probiotic features. *Food Microbiology*, *72*, 31–38. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2017.11.006>
- Perricone, M., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2010). Use of *Lactobacillus plantarum* and Glucose to Control the Fermentation of “Bella di Cerignola” Table Olives, a Traditional Variety of Apulian Region (Southern Italy). *Journal of Food Science*, *75*(7), M430–M436. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01742.x>
- Pestka, J. J., Ha, C. L., Warner, R. W., Lee, J. H., & Ustunol, Z. (2001). Effects of ingestion of yogurts containing *Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus* on spleen and Peyer’s patch lymphocyte populations in the mouse. *Journal of Food Protection*, *64*(3), 392–395. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.3.392>
- Petersen, C., & Round, J. L. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular Microbiology*, *16*(7), 1024–1033. <https://doi.org/10.1111/cmi.12308>
- Petriz, B. A., & Franco, O. L. (2017). Metaproteomics as a Complementary Approach to Gut Microbiota in Health and Disease. *Frontiers in Chemistry*, *5*(JAN), 4. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00004>
- Piekarska-Radzik, L., & Klewicka, E. (2021). Mutual influence of polyphenols and *Lactobacillus* spp. bacteria in food: a review. *European Food Research and Technology*, *247*(1), 9–24. <https://doi.org/10.1007/S00217-020-03603-Y/TABLES/1>
- Plaza-Díaz, J., Fernández-Caballero, J., Chueca, N., García, F., Gómez-Llorente, C., Sáez-Lara, M., Fontana, L., & Gil, Á. (2015). Pyrosequencing Analysis Reveals Changes in Intestinal Microbiota of Healthy Adults Who Received a Daily Dose of Immunomodulatory Probiotic Strains. *Nutrients*, *7*(6), 3999–4015. <https://doi.org/10.3390/nu7063999>
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. In *Genes and Nutrition* (Vol. 6, Issue 3, pp. 285–306). BioMed Central. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>

- Ponnusamy, K., Choi, J. N., Kim, J., Lee, S. Y., & Lee, C. H. (2011). Microbial community and metabolomic comparison of irritable bowel syndrome faeces. *Journal of Medical Microbiology*, *60*(6), 817–827. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.028126-0>
- Poole, K. (2014). Efflux-mediated antimicrobial resistance. In *Antibiotic Discovery and Development* (pp. 349–395). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1400-1_10
- Pridmore, R. D., Pittet, A.-C., Praplan, F., & Cavadini, C. (2008). Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-Salmonella activity. *FEMS Microbiology Letters*, *283*(2), 210–215. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01176.x>
- Quévrain, E., Maubert, M. A., Michon, C., Chain, F., Marquant, R., Tailhades, J., Miquel, S., Carlier, L., Bermúdez-Humarán, L. G., Pigneur, B., Lequin, O., Kharrat, P., Thomas, G., Rainteau, D., Aubry, C., Breyner, N., Afonso, C., Lavielle, S., Grill, J. P., ... Seksik, P. (2016). Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut*, *65*(3), 415–425. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307649>
- Quigley, E. M. M. (2012). Prebiotics and Probiotics: their Role in the Management of Gastrointestinal Disorders in Adults. *Nutrition in Clinical Practice*, *27*(2), 195–200. <https://doi.org/10.1177/0884533611423926>
- Raboni, S., Bettati, S., & Mozzarelli, A. (2009). Tryptophan synthase: A mine for enzymologists. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 66, Issue 14, pp. 2391–2403). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0028-0>
- Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., & Adams, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. In *Food Research International* (Vol. 43, Issue 1, pp. 1–7). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.009>
- Ranaweera, I., Shrestha, U., Ranjana, K. C., Kakarla, P., Willmon, T. M., Hernandez, A. J., Mukherjee, M. M., Barr, S. R., & Varela, M. F. (2015). Structural comparison of bacterial multidrug efflux pumps of the major facilitator superfamily. *Trends in Cell & Molecular Biology*, *10*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2015.05.001>
- Randazzo, C. L., Restuccia, C., Romano, A. D., & Caggia, C. (2004). *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *International Journal of Food Microbiology*, *90*(1), 9–14. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00159-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00159-4)

- Rebollar, E. A., Antwis, R. E., Becker, M. H., Belden, L. K., Bletz, M. C., Brucker, R. M., Harrison, X. A., Hughey, M. C., Kueneman, J. G., Loudon, A. H., McKenzie, V., Medina, D., Minbiole, K. P. C., Rollins-Smith, L. A., Walke, J. B., Weiss, S., Woodhams, D. C., & Harris, R. N. (2016). Using “omics” and integrated multi-omics approaches to guide probiotic selection to mitigate chytridiomycosis and other emerging infectious diseases. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue FEB, p. 68). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00068>
- Reda, F. M., Alagawany, M., Mahmoud, H. K., Mahgoub, S. A., & Elnesr, S. S. (2020). Use of red pepper oil in quail diets and its effect on performance, carcass measurements, intestinal microbiota, antioxidant indices, immunity and blood constituents. *Animal*, *14*(5), 1025–1033. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002891>
- Reichert, R. D. (2002). Oilseed medicinals: In natural drugs, dietary supplements and in new functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, *13*(11), 353–360. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00183-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00183-8)
- Reid, G. (2008). Probiotics and prebiotics – Progress and challenges. *International Dairy Journal*, *18*(10–11), 969–975. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2007.11.025>
- Reid, G., & Bruce, A. W. (2006). Probiotics to prevent urinary tract infections: The rationale and evidence. *World Journal of Urology*, *24*(1), 28–32. <https://doi.org/10.1007/s00345-005-0043-1>
- Reid, G., Kim, S. O., & Kähler, G. A. (2006). Selecting, testing and understanding probiotic microorganisms. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *46*(2), 149–157. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2005.00026.x>
- Rijkers, G. T., Bengmark, S., Enck, P., Haller, D., Herz, U., Kalliomaki, M., Kudo, S., Lenoir-Wijnkoop, I., Mercenier, A., Myllyluoma, E., Rabot, S., Rafter, J., Szajewska, H., Watzl, B., Wells, J., Wolvers, D., & Antoine, J.-M. (2010). Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics: Current Status and Recommendations for Future Research. *The Journal of Nutrition*, *140*(3), 671S–676S. <https://doi.org/10.3945/jn.109.113779>
- Rios-Covian, D., Gueimonde, M., Duncan, S. H., Flint, H. J., & de los Reyes-Gavilan, C. G. (2015). Enhanced butyrate formation by cross-feeding between *Faecalibacterium prausnitzii* and *Bifidobacterium adolescentis*. *FEMS Microbiology Letters*, *362*(21). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv176>
- Ritchie, M. L., & Romanuk, T. N. (2012). A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. *PLoS ONE*, *7*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034938>

- Rivera-Espinoza, Y., & Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. In *Food Microbiology* (Vol. 27, Issue 1, pp. 1–11). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.06.008>
- Roberfroid, M. (2002). Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*, *34*(SUPPL. 2), S105–S110. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(02\)80176-1](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(02)80176-1)
- Roberfroid, M. B. (2000). Concepts and strategy of functional food science: The European perspective. *American Journal of Clinical Nutrition*, *71*(6 SUPPL.), 1660S–1664S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.6.1660s>
- Robertson, G., Schein, J., Chiu, R., Corbett, R., Field, M., Jackman, S. D., Mungall, K., Lee, S., Okada, H. M., Qian, J. Q., Griffith, M., Raymond, A., Thiessen, N., Cezard, T., Butterfield, Y. S., Newsome, R., Chan, S. K., She, R., Varhol, R., ... Birol, I. (2010). De novo assembly and analysis of RNA-seq data. *Nature Methods*, *7*(11), 909–912. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1517>
- Rodríguez-Gómez, F., Romero-Gil, V., García-a-García-a, P., Garrido-Fernández, A., & Arroyo-López, F. N. (2014). Fortification of table olive packing with the potential probiotic bacteria *Lactobacillus pentosus* TOMC-LAB2. *Frontiers in Microbiology*, *5*(SEP), 467. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00467>
- Rodríguez-Gómez, F., Romero-Gil, V., García-García-a, P., Garrido-Fernández, A., & Arroyo-López, F. N. (2014). Fortification of table olive packing with the potential probiotic bacteria *Lactobacillus pentosus* TOMC-LAB2. *Frontiers in Microbiology*, *5*(SEP), 467. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00467>
- Rajo-Bezares, B., Sáenz, Y., Navarro, L., Jiménez-Díaz, R., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. (2008). Characterization of a new organization of the plantaricin locus in the inducible bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* J23 of grape must origin. *Archives of Microbiology*, *189*(5), 491–499. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0342-6>
- Romeo, J., Nova, E., Wörnberg, J., Gómez-Martínez, S., Díaz-Ligia, L. E., & Marcos, A. (2010). Immunomodulatory effect of fibres, probiotics and synbiotics in different life-stages. *Nutrición Hospitalaria*, *25*(3), 341–349. <https://doi.org/10.3305/nh.2010.25.3.4517>
- Roselli, M., Finamore, A., Britti, M. S., Konstantinov, S. R., Smidt, H., De Vos, W. M., & Mengheri, E. (2007). The novel porcine *Lactobacillus sobrius* strain protects intestinal cells from enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 infection and prevents membrane barrier damage. *Journal of Nutrition*, *137*(12), 2709–2716. <https://doi.org/10.1093/jn/137.12.2709>

- Rosselló-Móra, R., & Amann, R. (2015). Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Systematic and Applied Microbiology*, *38*(4), 209–216. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2015.02.001>
- Round, J. L., Lee, S. M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T. A., & Mazmanian, S. K. (2011). The toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science*, *332*(6032), 974–977. <https://doi.org/10.1126/science.1206095>
- Round, J. L., & Mazmanian, S. K. (2010). Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(27), 12204–12209. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909122107>
- Roy, K., Meyrand, M., Corthier, G., Monnet, V., & Mistou, M. Y. (2008). Proteomic investigation of the adaptation of *Lactococcus lactis* to the mouse digestive tract. *Proteomics*, *8*(8), 1661–1676. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700698>
- Ruddick, J. P., Evans, A. K., Nutt, D. J., Lightman, S. L., Rook, G. A. W., & Lowry, C. A. (2006). Tryptophan metabolism in the central nervous system: Medical implications. In *Expert Reviews in Molecular Medicine* (Vol. 8, Issue 20, pp. 1–27). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S1462399406000068>
- Ruiz-Barba, J. L., Caballero-Guerrero, B., Maldonado-Barragán, A., & Jiménez-Díaz, R. (2010). Coculture with specific bacteria enhances survival of *Lactobacillus plantarum* NC8, an autoinducer-regulated bacteriocin producer, in olive fermentations. *Food Microbiology*, *27*(3), 413–417. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.10.002>
- Ruiz-Barba, J. L., Cathcart, D. P., Warner, P. J., & Jiménez-Díaz, R. (1994). Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a Bacteriocin Producer, as a Starter Culture in Spanish-Style Green Olive Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(6).
- Ruiz-Barba, J. L., & Jiménez-Díaz, R. (2012). A novel *Lactobacillus pentosus*-paired starter culture for Spanish-style green olivefermentation. *Food Microbiology*, *30*(1), 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.11.004>
- Russell, W. R., Duncan, S. H., & Flint, H. J. (2013). The gut microbial metabolome: Modulation of cancer risk in obese individuals. *Proceedings of the Nutrition Society*, *72*(1), 178–188. <https://doi.org/10.1017/S0029665112002881>
- Ryan, K. A., Jayaraman, T., Daly, P., Canchaya, C., Curran, S., Fang, F., Quigley, E. M., & O'Toole, P. W. (2008). Isolation of lactobacilli with probiotic properties from the human stomach. *Letters in Applied Microbiology*, *47*(4), 269–274. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02416.x>

- Sánchez, B., Champomier-Vergès, M. C., Anglade, P., Baraige, F., De Los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A., & Zagorec, M. (2005). Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809. *Journal of Bacteriology*, *187*(16), 5799–5808. <https://doi.org/10.1128/JB.187.16.5799-5808.2005/ASSET/6E94597C-50C3-4365-B36E-D441AB724EA7/ASSETS/GRAPHIC/ZJB0160549670003.JPEG>
- Sánchez, B., de los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A., & Gueimonde, M. (2009). Probiotic fermented milks: Present and future. *International Journal of Dairy Technology*, *62*(4), 472–483. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00528.x>
- Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., & Margolles, A. (2017). Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, *61*(1), 1600240. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600240>
- Sanchez, B., Noriega, L., Ruas-Madiedo, P., Reyes-Gavilan, C. G., & Margolles, A. (2004). Acquired resistance to bile increases fructose-6-phosphate phosphoketolase activity in *Bifidobacterium*. *FEMS Microbiology Letters*, *235*(1), 35–41. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09564.x>
- Sansonetti, P. J. (2004). War and peace at mucosal surfaces. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 4, Issue 12, pp. 953–964). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri1499>
- Sato, M., Uzu, K., Yoshida, T., Hamad, E. M., Kawakami, H., Matsuyama, H., Abd El-Gawad, I. A., & Imaizumi, K. (2008). Effects of milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on adipocyte size in rats. *British Journal of Nutrition*, *99*(5), 1013–1017. <https://doi.org/10.1017/S0007114507839006>
- Savage, D. C. (1969). Microbial interference between indigenous yeast and lactobacilli in the rodent stomach. *Journal of Bacteriology*, *98*(3), 1278–1283. <https://doi.org/10.1128/jb.98.3.1278-1283.1969>
- Schellekens, H., Finger, B. C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2012). Ghrelin signalling and obesity: At the interface of stress, mood and food reward. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 135, Issue 3, pp. 316–326). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.06.004>
- Schleifer, K. H., & Ludwig, W. (1995). Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. In *The Genera of Lactic Acid Bacteria* (pp. 7–18). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0_2
- Schley, P. D., & Field, C. J. (2002). The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *British Journal of Nutrition*, *87*(S2), S221–S230. <https://doi.org/10.1079/BJN/2002541>

- Schneider, D. A., Gaal, T., & Gourse, R. L. (2002). NTP-sensing by rRNA promoters in *Escherichia coli* is direct. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(13), 8602–8607. <https://doi.org/10.1073/PNAS.132285199>
- Schneider, T., & Riedel, K. (2010). Environmental proteomics: Analysis of structure and function of microbial communities. *PROTEOMICS*, *10*(4), 785–798. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900450>
- Schulz, M. H., Zerbino, D. R., Vingron, M., & Birney, E. (2012). Oases: Robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. *Bioinformatics*, *28*(8), 1086–1092. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts094>
- Schwarcz, R., Bruno, J. P., Muchowski, P. J., & Wu, H. Q. (2012). Kynurenines in the mammalian brain: When physiology meets pathology. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 13, Issue 7, pp. 465–477). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn3257>
- Seegers, J. F. M. L. (2002). Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: Progress and prospects. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 20, Issue 12, pp. 508–515). Elsevier Current Trends. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)02075-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)02075-9)
- Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., & Roy, N. C. (2013). The Role of Cell Surface Architecture of Lactobacilli in Host-Microbe Interactions in the Gastrointestinal Tract. *Mediators of Inflammation*. <https://doi.org/10.1155/2013/237921>
- Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 28, Issue 4, pp. 405–440). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.01.003>
- Seth, A., Yan, F., Polk, D. B., & Rao, R. K. (2008). Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- And MAP kinase-dependent mechanism. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *294*(4), 1060–1069. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00202.2007>
- Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martinez-Gonzalez, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., & Mentis, A. (2004). In Vitro and In Vivo Inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* Strain Shirota. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(1), 518–526. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.518-526.2004>
- Shah, N. P. (2001). Functional foods from probiotics and prebiotics : Functional Foods from Probiotics and Prebiotics. *Food Technology (Chicago)*, *55*(11).
- Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. In *International Dairy Journal* (Vol. 17, Issue 11, pp. 1262–1277). Elsevier.

- <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.014>
- Shahdadi, F., Mirzaie, H., Kashaninejad, M., Khomeiri, M., Ziaifar, A. M., & Akbarian, A. (2015). Effects of various essential oils on chemical and sensory characteristics and activity of probiotic bacteria in drinking yoghurt. *Agricultural Communications*, *3*(1), 16–21.
- Shanahan, F. (2012). A Commentary on the Safety of Probiotics. In *Gastroenterology Clinics of North America* (Vol. 41, Issue 4, pp. 869–876). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2012.08.006>
- Shishov, V. A., Kirovskaya, T. A., Kudrin, V. S., & Oleskin, A. V. (2009). Amine neuromediators, their precursors, and oxidation products in the culture of *Escherichia coli* k-12. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *45*(5), 494–497. <https://doi.org/10.1134/S0003683809050068>
- Silva, T., Reto, M., Sol, M., Peito, A., Peres, C. M., Peres, C., & Malcata, F. X. (2011). Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behavior. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(6), 1349–1354. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.01.029>
- Simpson, P. J., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2005). Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *Journal of Applied Microbiology*, *99*(3), 493–501. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02648.x>
- Smith, D. J., King, W. F., Rivero, J., & Taubman, M. A. (2005). Immunological and protective effects of diepitopic subunit dental caries vaccines. *Infection and Immunity*, *73*(5), 2797–2804. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.5.2797-2804.2005>
- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J. N., & Garrett, W. S. (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic T reg cell homeostasis. *Science*, *341*(6145), 569–573. <https://doi.org/10.1126/science.1241165>
- Smits, L. P., Bouter, K. E. C., De Vos, W. M., Borody, T. J., & Nieuwdorp, M. (2013). Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation. In *Gastroenterology* (Vol. 145, Issue 5, pp. 946–953). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.08.058>
- Smits, S. H. J., Schmitt, L., & Beis, K. (2020). Self-immunity to antibacterial peptides by ABC transporters. *FEBS Letters*, *594*(23), 3920–3942. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13953>
- Socol, C. R., Porto De Souza Vandenberghe, L., Spier, M. R., Bianchi, A., Medeiros, P., Yamaguishi, C. T., De, J., Lindner, D., Pandey, A., & Thomaz-Socol, V.

- (2010). The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 413–434.
- Sonnenburg, J. L., Chen, C. T. L., & Gordon, J. I. (2006). Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host. *PLoS Biology*, 4(12), 2213–2226. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040413>
- Soomro, A. H., & Masud, T. (2012). Probiotic Characteristics of Lactobacillus spp. Isolated from Fermented Milk Product Dahi. *Food Science and Technology Research*, 18(1), 91–98. <https://doi.org/10.3136/fstr.18.91>
- Spiegel, C. A. (1991). Bacterial vaginosis. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 4, Issue 4, pp. 485–502). American Society for Microbiology Journals. <https://doi.org/10.1128/CMR.4.4.485>
- Spiller, R. (2008). Review article: Probiotics and prebiotics in irritable bowel syndrome. In *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 28, Issue 4, pp. 385–396). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2008.03750.x>
- Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 16, Issue 2, pp. 198–203). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.008>
- Stecher, B., Hapfelmeier, S., Müller, C., Kremer, M., Stallmach, T., & Hardt, W. D. (2004). Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of Salmonella enterica serovar typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infection and Immunity*, 72(7), 4138–4150. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.4138-4150.2004>
- Stienstra, R., Tack, C. J., Kanneganti, T. D., Joosten, L. A. B., & Netea, M. G. (2012). The inflammasome puts obesity in the danger zone. In *Cell Metabolism* (Vol. 15, Issue 1, pp. 10–18). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.10.011>
- Stone, T. W., Stoy, N., & Darlington, L. G. (2013). An expanding range of targets for kynurenine metabolites of tryptophan. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 34, Issue 2, pp. 136–143). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.09.006>
- Sudha, M., Chauhan, P., Dixit, K., Babu, S., & Jamil, K. (2009). Probiotics as complementary therapy for hypercholesterolemia. *Biology and Medicine*, 1(4), 1–13. <http://www.biomedonline.com>
- Sugahara, H., Odamaki, T., Fukuda, S., Kato, T., Xiao, J. Z., Abe, F., Kikuchi, J., & Ohno, H. (2015). Probiotic Bifidobacterium longum alters gut luminal

- metabolism through modification of the gut microbial community. *Scientific Reports*, 5(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep13548>
- Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M., & Lochs, H. (2002). Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 122(1), 44–54. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.30294>
- Szajewska, H., Guarino, A., Hojsak, I., Indrio, F., Kolacek, S., Shamir, R., Vandenplas, Y., & Weizman, Z. (2014). Use of Probiotics for Management of Acute Gastroenteritis: A Position Paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 58(4), 531–539. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000320>
- Szajewska, H., & Kołodziej, M. (2015). Systematic review with meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 42(7), 793–801. <https://doi.org/10.1111/apt.13344>
- Tabassum, N., & Vidyasagar, G. M. (2014). In-vitro antimicrobial activity of edible oils against human pathogens causing skin infections. *Int. J. Pharm. Sci. Res*, 5(10), 4493–4498. <https://www.cabdirect.org/globalhealth/abstract/20143369615>
- Takemura, N., Okubo, T., & Sonoyama, K. (2010). *Lactobacillus plantarum* strain No. 14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.), 235(7), 849–856. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.009377>
- Tamime, A., M, S., Korslund Sondergaard, A., Mistry, V., & Shah, N. (2005). Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy product. In *Probiotic Dairy Products* (Blackwell, pp. 39–72).
- Tannock, G. W. (2004). A special fondness for lactobacilli. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 70, Issue 6, pp. 3189–3194). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3189-3194.2004>
- Teitelbaum, J. E., & Walker, W. A. (2002). Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 107–138. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.110901.145412>
- Tejada-Simon, M. V., Lee, J. H., Ustunol, Z., & Pestka, J. J. (1999). Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. *Journal of Dairy Science*, 82(4), 649–660. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75281-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75281-1)

- Teuber, M. (1999). Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *56*(9–10), 755–763. <https://doi.org/10.1007/s000180050022>
- Teuber, M., Meile, L., & Schwarz, F. (1999). Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* (pp. 115–137). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2027-4_5
- Todorov, S. D. (2009). Bacteriocinas de *Lactobacillus plantarum* - production, genetic organization and mode of action. *Brazilian Journal of Microbiology*, *40*(2), 209–221. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000200001>
- Todorov, S. D., Botes, M., Guigas, C., Schillinger, U., Wiid, I., Wachsman, M. B., Holzapfel, W. H., & Dicks, L. M. T. (2008). Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *0*(0), 071008041820005-???. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03558.x>
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2004). Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST151BR, a strain isolated from beer produced by the fermentation of maize, barley and soy flour. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *20*(6), 643–650. <https://doi.org/10.1023/B:WIBI.0000043196.09610.de>
- Tojo, R., Suárez, A., Clemente, M. G., De Los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A., Gueimonde, M., & Ruas-Madiedo, P. (2014). Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 20, Issue 41, pp. 15163–15176). WJG Press. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i41.15163>
- Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Van Baren, M. J., Salzberg, S. L., Wold, B. J., & Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, *28*(5), 511–515. <https://doi.org/10.1038/nbt.1621>
- Tremaroli, V., & Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. In *Nature* (Vol. 489, Issue 7415, pp. 242–249). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature11552>
- Trompette, A., Gollwitzer, E. S., Yadava, K., Sichelstiel, A. K., Sprenger, N., Ngombu, C., Blanchard, C., Junt, T., Nicod, L. P., Harris, N. L., & Marsland, B. J. (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature Medicine*, *20*(2), 159–166. <https://doi.org/10.1038/nm.3444>

- Troost, F. J., Van Baarlen, P., Lindsey, P., Kodde, A., de Vos, W. M., Kleerebezem, M., & Brummer, R. J. M. (2008). Identification of the transcriptional response of human intestinal mucosa to *Lactobacillus plantarum* WCFS1 in vivo. *BMC Genomics*, *9*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-374>
- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E., & Salminen, S. (2001). Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*, *73*(2 SUPPL.), 393s–398s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.393s>
- Turchi, B., Mancini, S., Pistelli, L., Najar, B., & Fratini, F. (2019). Sub-inhibitory concentration of essential oils induces antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1419237>, *33*(10), 1509–1513. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1419237>
- Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L., & Gordon, J. I. (2008). Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host and Microbe*, *3*(4), 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.02.015>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, *444*(7122), 1027–1031. <https://doi.org/10.1038/nature05414>
- Turpin, W., Humblot, C., Thomas, M., & Guyot, J.-P. (2010). Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, *143*(3), 87–102. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.07.032>
- Turroni, F., Milani, C., Duranti, S., Mancabelli, L., Mangifesta, M., Viappiani, A., Lugli, G. A., Ferrario, C., Gioiosa, L., Ferrarini, A., Li, J., Palanza, P., Delledonne, M., Van Sinderen, D., & Ventura, M. (2016). Deciphering bifidobacterial-mediated metabolic interactions and their impact on gut microbiota by a multi-omics approach. *ISME Journal*, *10*(7), 1656–1668. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.236>
- Valeur, N., Engel, P., Carbajal, N., Connolly, E., & Ladefoged, K. (2004). Colonization and Immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the Human Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(2), 1176–1181. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.1176-1181.2004>
- van der Veen, S., & Abee, T. (2011). Bacterial SOS response: a food safety perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, *22*(2), 136–142. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2010.11.012>
- Van Vliet, M. J., Tissing, W. J. E., Dun, C. A. J., Meessen, N. E. L., Kamps, W. A., De

- Bont, E. S. J. M., & Harmsen, H. J. M. (2009). Chemotherapy treatment in pediatric patients with acute myeloid leukemia receiving antimicrobial prophylaxis leads to a relative increase of colonization with potentially pathogenic bacteria in the gut. *Clinical Infectious Diseases*, *49*(2), 262–270. <https://doi.org/10.1086/599346/2/49-2-262-FIG004.GIF>
- van Zanten, G. C., Krych, L., Röytiö, H., Forssten, S., Lahtinen, S. J., Al-Soud, W. A., Sørensen, S., Svensson, B., Jespersen, L., & Jakobsen, M. (2014). Synbiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM and cellobiose does not affect human gut bacterial diversity but increases abundance of lactobacilli, bifidobacteria and branched-chain fatty acids: a randomized, double-blinded cross-over trial. *FEMS Microbiology Ecology*, *90*(1), 225–236. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12397>
- Veiga, P., Pons, N., Agrawal, A., Oozeer, R., Guyonnet, D., Brazeilles, R., Faurie, J. M., Van Hylckama Vlieg, J. E. T., Houghton, L. A., Whorwell, P. J., Ehrlich, S. D., & Kennedy, S. P. (2014). Changes of the human gut microbiome induced by a fermented milk product. *Scientific Reports*, *4*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep06328>
- Verstraelen, H., & Senok, A. C. (2005). Vaginal lactobacilli, probiotics, and IVF. In *Reproductive BioMedicine Online* (Vol. 11, Issue 6, pp. 674–675). Reproductive Healthcare Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61683-5](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61683-5)
- Vinusha, K. S., Deepika, K., Johnson, T. S., Agrawal, G. K., & Rakwal, R. (2018). Proteomic studies on lactic acid bacteria: A review. In *Biochemistry and Biophysics Reports* (Vol. 14, pp. 140–148). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.04.009>
- Vogel-Scheel, J., Alpert, C., Engst, W., Loh, G., & Blaut, M. (2010). Requirement of purine and pyrimidine synthesis for colonization of the mouse intestine by *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(15), 5181–5187. <https://doi.org/10.1128/AEM.00242-10/ASSET/6E00A4F9-DB8A-4368-ABF9-513D0916F296/ASSETS/GRAPHIC/ZAM9991012200011.JPEG>
- Wachsman, M. B., Castilla, V., De Ruiz Holgado, A. P., De Torres, R. A., Sesma, F., & Coto, C. E. (2003). Enterocin CRL35 inhibits late stages of HSV-1 and HSV-2 replication in vitro. *Antiviral Research*, *58*(1), 17–24. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(02\)00099-2](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(02)00099-2)
- Wadolowski, E. A., Laux, D. C., & Cohen, P. S. (1988). Colonization of the streptomycin-treated mouse large intestine by a human fecal *Escherichia coli* strain: role of growth in mucus. *Infection and Immunity*, *56*(5), 1030–1035. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3281898>
- Walker, A. W., Sanderson, J. D., Churcher, C., Parkes, G. C., Hudspith, B. N.,

- Rayment, N., Brostoff, J., Parkhill, J., Dougan, G., & Petrovska, L. (2011). High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiology*, *11*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-7>
- Wang, W. L., Xu, S. Y., Ren, Z. G., Tao, L., Jiang, J. W., & Zheng, S. Sen. (2015). Application of metagenomics in the human gut microbiome. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 21, Issue 3, pp. 803–814). WJG Press. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i3.803>
- Watson, R., & Preedy, V. (2010). *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics* (Academic Press). [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=LjlmUWvQ51sC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Bioactive+foods+in+promoting+health:+probiotics+and+prebiotics.+Academic+Press&ots=SaI_tPKTFv&sig=ZaJzsQnE42zlAAjcN2YDhZMTroo#v=onepage&q=Bioactive foods in promoting health%3A probiotics and prebiotics. Academic Press&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=LjlmUWvQ51sC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Bioactive+foods+in+promoting+health:+probiotics+and+prebiotics.+Academic+Press&ots=SaI_tPKTFv&sig=ZaJzsQnE42zlAAjcN2YDhZMTroo#v=onepage&q=Bioactive+foods+in+promoting+health%3A+probiotics+and+prebiotics.+Academic+Press&f=false)
- Watts, S. W., Morrison, S. F., Davis, R. P., & Barman, S. M. (2012). Serotonin and blood pressure regulation. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 64, Issue 2, pp. 359–388). American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. <https://doi.org/10.1124/pr.111.004697>
- Webb, G. P. (2011). *Dietary Supplements and Functional Foods* (John Wiley and Sons). [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=ip_ZWQo_D1MC&oi=fnd&pg=PT11&dq=Dietary+supplements+and+functional+foods&ots=gRFtX3CD_b&sig=FFSX1iFrayv1z8i4oVfLUHJBoy8#v=onepage&q=Dietary supplements and functional foods&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=ip_ZWQo_D1MC&oi=fnd&pg=PT11&dq=Dietary+supplements+and+functional+foods&ots=gRFtX3CD_b&sig=FFSX1iFrayv1z8i4oVfLUHJBoy8#v=onepage&q=Dietary+supplements+and+functional+foods&f=false)
- Whisner, C. M., Martin, B. R., Schoterman, M. H. C., Nakatsu, C. H., McCabe, L. D., McCabe, G. P., Wastney, M. E., Van Den Heuvel, E. G. H. M., & Weaver, C. M. (2013). Galacto-oligosaccharides increase calcium absorption and gut bifidobacteria in young girls: A double-blind cross-over trial. *British Journal of Nutrition*, *110*(7), 1292–1303. <https://doi.org/10.1017/S000711451300055X>
- Wikoff, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G., Lesley, S. A., Peters, E. C., & Siuzdak, G. (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(10), 3698–3703. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812874106>
- Wishart, D. S. (2008). Metabolomics: applications to food science and nutrition research. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 19, Issue 9, pp. 482–

- 493). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.03.003>
- Woyke, T., Teeling, H., Ivanova, N. N., Huntemann, M., Richter, M., Gloeckner, F. O., Boffelli, D., Anderson, I. J., Barry, K. W., Shapiro, H. J., Szeto, E., Kyrpides, N. C., Musmann, M., Amann, R., Bergin, C., Ruehland, C., Rubin, E. M., & Dubilier, N. (2006). Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. *Nature*, *443*(7114), 950–955. <https://doi.org/10.1038/nature05192>
- Wu, N., Yang, X., Zhang, R., Li, J., Xiao, X., Hu, Y., Chen, Y., Yang, F., Lu, N., Wang, Z., Luan, C., Liu, Y., Wang, B., Xiang, C., Wang, Y., Zhao, F., Gao, G. F., Wang, S., Li, L., ... Zhu, B. (2013). Dysbiosis Signature of Fecal Microbiota in Colorectal Cancer Patients. *Microbial Ecology*, *66*(2), 462–470. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0245-9>
- Wu, R., Wang, W., Yu, D., Zhang, W., Li, Y., Sun, Z., Wu, J., Meng, H., & Zhang, H. (2009). Proteomics analysis of *Lactobacillus casei* Zhang, a new probiotic bacterium isolated from traditional home-made Koumiss in Inner Mongolia of China. *Molecular and Cellular Proteomics*, *8*(10), 2321–2338. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800483-MCP200>
- Xiong, X., Frank, D. N., Robertson, C. E., Hung, S. S., Markle, J., Canty, A. J., McCoy, K. D., Macpherson, A. J., Poussier, P., Danska, J. S., & Parkinson, J. (2012). Generation and analysis of a mouse intestinal metatranscriptome through Illumina based RNA-sequencing. *PLoS ONE*, *7*(4), 36009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036009>
- Xu, J., & Verstraete, W. (2001). Evaluation of nitric oxide production by lactobacilli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *56*(3–4), 504–507. <https://doi.org/10.1007/s002530100616>
- Xu, Z., Hansen, M. A., Hansen, L. H., Jacquiod, S., & Sørensen, S. J. (2014). Bioinformatic Approaches Reveal Metagenomic Characterization of Soil Microbial Community. *PLoS ONE*, *9*(4), e93445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093445>
- Xuan, T. D., Gangqiang, G., Minh, T. N., Quy, T. N., & Khanh, T. D. (2018). An Overview of Chemical Profiles, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Commercial Vegetable Edible Oils Marketed in Japan. *Foods 2018, Vol. 7, Page 21*, *7*(2), 21. <https://doi.org/10.3390/FOODS7020021>
- Yadav, M., & Shukla, P. (2019). Recent systems biology approaches for probiotics use in health aspects: a review. *3 Biotech*, *9*(12), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1980-5>
- Yanofsky, C. (2007). RNA-based regulation of genes of tryptophan synthesis and

- degradation, in bacteria. In *RNA* (Vol. 13, Issue 8, pp. 1141–1154). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1261/rna.620507>
- Yost, S., Duran-Pinedo, A. E., Teles, R., Krishnan, K., & Frias-Lopez, J. (2015). Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis. *Genome Medicine*, *7*(1). <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0153-3>
- Yuan, J., Zhu, L., Liu, X., Li, T., Zhang, Y., Ying, T., Wang, B., Wang, J., Dong, H., Feng, E., Li, Q., Wang, J., Wang, H., Wei, K., Zhang, X., Huang, C., Huang, P., Huang, L., Zeng, M., & Wang, H. (2006). A proteome reference map and proteomic analysis of *Bifidobacterium longum* NCC2705. *Molecular and Cellular Proteomics*, *5*(6), 1105–1118. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500410-MCP200>
- Zhang, M.-M. (2010). Use of pre-, pro- and synbiotics in patients with acute pancreatitis: A meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*, *16*(31), 3970. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i31.3970>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zhou, J. S., Pillidge, C. J., Gopal, P. K., & Gill, H. S. (2005). Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, *98*(2), 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.011>
- Zhu, Q., Gao, R., Wu, W., & Qin, H. (2013). The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. In *Tumor Biology* (Vol. 34, Issue 3, pp. 1285–1300). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-0684-4>
- Zhu, Y., Pei, G., Niu, X., Shi, M., Zhang, M., Chen, L., & Zhang, W. (2015). Metabolomic analysis reveals functional overlapping of three signal transduction proteins in regulating ethanol tolerance in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular BioSystems*, *11*(3), 770–782. <https://doi.org/10.1039/c4mb00651h>
- Zonenschain, D., Rebecchi, A., & Morelli, L. (2009). Erythromycin- and tetracycline-resistant lactobacilli in Italian fermented dry sausages. *Journal of Applied Microbiology*, *107*(5), 1559–1568. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04338.x>