



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Revalorización de las lías del cava como prebiótico y para mejorar la seguridad de derivados cárnicos fermentados

Salvador Hernández Macías



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

REVALORIZACIÓN DE LAS LÍAS DEL CAVA COMO PREBIÓTICO Y PARA MEJORAR LA SEGURIDAD DE DERIVADOS CÁRNICOS FERMENTADOS

Tesis Doctoral | Salvador Hernández Macías | 2021



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Universitat de Barcelona
Campus de la Alimentación de Torribera
Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación
Departamento de Nutrición, Ciencias de la Alimentación y Gastronomía

REVALORIZACIÓN DE LAS LÍAS DEL CAVA
COMO PREBIÓTICO Y PARA MEJORAR LA SEGURIDAD
DE DERIVADOS CÁRNICOS FERMENTADOS

Directoras:

Dra. M. Carmen Vidal Carou
Catedrática de Nutrición y Bromatología

Dra. M. Luz Latorre Moratalla
Profesora lectora de Nutrición y Bromatología

Salvador Hernández Macias
2021



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Universitat de Barcelona
Campus de la Alimentación de Torribera
Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación
Departamento de Nutrición, Ciencias de la Alimentación y Gastronomía

Programa de Doctorado
Alimentación y Nutrición

REVALORIZACIÓN DE LAS LÍAS DEL CAVA
COMO PREBIÓTICO Y PARA MEJORAR LA SEGURIDAD
DE DERIVADOS CÁRNICOS FERMENTADOS

Memoria presentada por Salvador Hernández Macias
para optar al título de doctor por la Universidad de Barcelona

Dra. M. Carmen Vidal Carou
Directora y Tutora

Dra. M. Luz Latorre Moratalla
Directora

Salvador Hernández Macias
Doctorando

2021

FINANCIAMIENTO Y SOPORTE INSTITUCIONAL



Universidad de Guadalajara
Beca-Crédito Completa



Proyecto AGL 2016-78324-R financiado por
MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER "Una manera de hacer Europa"



Direcció General de Recerca, Generalitat de Catalunya
SGR-2017-1476



Instituto de Investigación en Nutrición y Seguridad Alimentaria (INSA·UB)



Xarxa d'Innovació Alimentària (XIA)



Campus de la Alimentación de Torribera de la Universidad de Barcelona

Referencia bibliográfica sugerida:

Hernández-Macias, S. (2020). Revalorización de las lías del cava como prebiótico y para mejorar la seguridad de derivados cárnicos fermentados. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona (UB), Barcelona.

Créditos:

Maquetación: Salvador Hernández Macias

Diseño gráfico e ilustraciones: Aída Morales Michel

[@aidamoralesdiseno](https://www.instagram.com/aidamoralesdiseno)

En un contexto de economía circular, esta tesis doctoral ha sido impresa en papel reciclado.

Dedicada a los mejores profesores de mi vida Sara, Gloria y Vicente; y
para los mejores compañeros de curso Zaira, Miriam e Isaac.

AGRADECIMIENTOS

La construcción de una tesis doctoral requiere de la intervención de diferentes voluntades, la mayoría de ellas humanas y otras más institucionales. Es por ello que, quiero agradecer a las personas e instituciones que participaron directa o indirectamente en la realización de esta tesis.

Lo primero de todo, me gustaría agradecer a la Universidad de Guadalajara por concederme la beca para realizar estudios doctorales, sin la cual, la realización de esta tesis no hubiera sido posible.

Estoy especialmente agradecido con mi grupo de investigación aminas y poliaminas bioactivas de los alimentos, particularmente con mis directoras de tesis, Carmen Vidal y Mariluz Latorre. Carmen, te agradezco por poner a mi disposición tu experiencia, tu valioso apoyo y tu aprecio, siempre encontré una puerta abierta ante mis dudas, en tus consejos. Gracias por estar al tanto no solo del desarrollo de esta tesis, sino también de nuestro desarrollo personal, esta es una valiosa característica de nuestro grupo. Mariluz, gracias por resolver mis dudas con la mejor disposición y la mayor de las paciencias. Te agradezco por las recomendaciones culinarias y por las explicaciones culturales convertidas en grandes monólogos, pero sobretodo por permitirme conocer, en el terreno de lo personal, tu enorme calidad humana. Carmen, Mariluz, les agradezco las incontables horas que pasamos revisando textos y realizando correcciones, incluso durante fines de semana y vacaciones. Esta tesis ha visto finalmente la luz gracias a su compromiso como directoras. Teresa, gracias por tu acompañamiento durante toda esta etapa, te agradezco por el cariño y por la empatía cultural con la que siempre te dirigiste. Abel Mariné, te agradezco por las charlas en donde siempre me explicaste y reconociste los puntos de coincidencia entre Cataluña y México. Joan Bosch, gracias por que, a tu manera, estuviste presente en toda esta etapa, tus opiniones y consejos fueron muy precisos y prudentes cuando se requerían.

A mis compañeros de laboratorio Oriol, Sonia, Judit y Nelly. Oriol, amigo, gracias por las tantas horas de revisiones que pasamos juntos y mostrarte siempre disponible ante mis dudas. Gracias por compartir conmigo tu buen gusto en el diseño de póster y presentaciones, por tus correcciones de inglés y sobre todo por tu valioso acompañamiento y tus palabras de aliento en los momentos complicados. Sonia, amiga, gracias por que desde mi llegada a Barcelona has sido una parte importante de esta bonita etapa, basta con decir que a ti te debo la invitación a este grupo de investigación. Gracias por hacerme de traductora Mexicano-Catalán, por darle el último vistazo a este documento, por tu cariño y por escucharme en los momentos divertidos y también en los complicados. Judit,

gracias por tu disposición y compañerismo en estos últimos meses, tus magdalenas fueron una gran forma de endulzarlos. Nelly, gracias por ayudarme con las extracciones de aminos y por no quejarte, ni del toper, ni del café.

Gracias a Sara Bover, a Anna Jofré y a Nuria Ferrer investigadoras del programa de funcionalidad y seguridad alimentarias del IRTA, por aceptarme para realizar la estancia de investigación que realicé en su equipo, por compartir su experiencia profesional y sus conocimientos, y por las revisiones *fast track* de los últimos meses.

A los Torriberos, muchas gracias por estos 5 grandes años que compartimos juntos. Gracias por la inmersión cultural, por las casas rurales y por compartir cada día la hora de la comida, incluso a veces, el toper. Beatriz Quintanilla, gracias por tu amistad desde mis primeros días en Torribera, por tu cariño y por hacernos parte de tu familia cuando estábamos lejos de la nuestra. Héctor Sanz, gracias por todas las clases de historia catalana, fundamentos de la música y gastronomía; pero sobre todo gracias por el cariño y la atención que siempre nos demostraste. Julián Lozano, gracias por los buenos momentos dentro y fuera de Torribera, por ser el anfitrión de tantas y tantas cenas, y por hacernos parte de tu familia. Elisa Varona, gracias por tu acompañamiento durante estos últimos meses, por las tantas risas, por los entrenos de la Barceloneta y las relajantes caminatas del *Par Güell*, pero, sobre todo, por compartir con nosotros tu gran corazón.

A mi familia adoptiva de Barcelona, Fernanda Ramírez, Ángel Ayala, Martín Mora y Alan Alvarado, por las copiosas comidas nostálgicas, por su cariño y por su acompañamiento. Solo los que vivimos este proceso podemos entendernos.

Me gustaría expresar mi gratitud a mi equipo de la Universidad de Guadalajara. Alfredo Peña y Marco Núñez, les agradezco por haber puesto a mi disposición su confianza y los recursos necesarios para mi desarrollo académico, que hoy se ven reflejados con la finalización de esta tesis.

A Vicente y a Gloria por su apoyo incondicional en todo momento durante toda mi vida, este y todos mis logros siempre serán de ustedes.

Finalmente, quiero agradecer a Nelly por su valentía de aceptar juntos este reto, por el apoyo mutuo e incondicional en los buenos momentos, y en los no tan buenos. Por la prudencia al diferenciar los espacios que compartíamos juntos y sobre todo, por esta *“Vuelta por el universo”* (†Gustavo Cerati).

ÍNDICE

Resumen Abstract	1
1. Introducción y Antecedentes	7
1.1. Lías del cava	9
1.1.1. <i>Un subproducto de la elaboración del cava</i>	9
1.1.2. <i>Caracterización y composición</i>	11
1.2. Reutilización y revalorización de subproductos de la industria de transformación de vegetales	17
1.2.1. <i>Estrategias de revalorización de subproductos para la mejora de la seguridad alimentaria de productos fermentados</i>	20
1.2.2. <i>Estrategias de revalorización de subproductos por su potencial efecto prebiótico</i>	24
2. Interés y Objetivos	29
3. Resultados y Discusión	35
3.1. Evaluación del efecto promotor de las lías del cava en el crecimiento de diferentes especies de BAL comúnmente utilizadas como cultivos iniciadores, tanto en modelos <i>in vitro</i> como en derivados cárnicos fermentados	38
3.2. Estudio del efecto antimicrobiano de las lías del cava y de su extracto fenólico frente a bacterias patógenas de origen alimentario en derivados cárnicos fermentados	53
3.3. Efecto de la adición de lías del cava o de su extracto fenólico en la reducción de la formación de aminos biógenos en derivados cárnicos fermentados	65
3.4. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto prebiótico de las lías del cava en el crecimiento de bacterias probióticas	75
4. Conclusiones	81
5. Bibliografía	85
6. Anexos	103

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema del proceso de elaboración del cava por el método tradicional o *Champenoise* desde el vino base hasta su embotellado.
Página 10
- Figura 2. Organización de la pared celular de *S. cerevisiae*.
Página 13
- Figura 3. Número de publicaciones científicas sobre revalorización de subproductos alimentarios en el periodo de 1990-2020. Datos obtenidos del portal *Web of Science* con el término de búsqueda: *food by-products valorization*.
Página 18
- Figura 4. Procedimiento experimental para la evaluación *in vitro* del efecto de las lías del cava en el crecimiento de diferentes cepas de BAL.
Página 41
- Figura 5. Concentración microbiana de 6 cepas de BAL en medio de crecimiento sin (control) y con diferentes cantidades de lías del cava después de 6 h, 24 h y 48 h de incubación.
Página 45
- Figura 6. Cinética de crecimiento y evolución en los valores de pH de las cepas de BAL utilizadas como cultivos iniciadores cultivadas sin (control) y con 5% de lías del cava.
Página 47
- Figura 7. Crecimiento de BAL en derivados cárnicos crudos-curados fermentados espontáneamente sin (C1) o con (L1) la adición de 5% de lías del cava o fermentados con el cultivo iniciador *L. sakei* CTC494 sin (C1+CTC494) o con (L1+CTC494) 5% de lías.
Página 50
- Figura 8. Recuentos de cepas de *Salmonella* (A) y *L. monocytogenes* (B) en derivados cárnicos crudos-curados fermentados espontáneamente sin (C1) o con (L1) la adición del 5% de lías del cava o fermentados con el cultivo iniciador *L. sakei* CTC494 sin (C1+CTC494) o con (L1+CTC494) lías.
Página 57
- Figura 9. Recuentos de cepas de *Salmonella* (A) y *L. monocytogenes* (B) en derivados cárnicos crudos-curados fermentados espontáneamente sin (C2) o con (E2) la adición de 0,3% de LPE o fermentados con el cultivo iniciador *L. sakei* CTC494 o *L. sakei* BAP110 sin (C2+CTC494 o C2+BAP110) o con (E2+CTC494 o E2+BAP110) el LPE.
Página 61

Figura 10. Contenidos de cadaverina, putrescina y tiramina en derivados cárnicos fermentados crudos-curados.

Página 71

Figura 11. Cinética de crecimiento y evolución en los valores de pH de las cepas probióticas cultivadas sin (control) y con un 5% (p/v) de lías del cava.

Página 78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variedades de uvas permitidas para la producción del vino base, y parámetros de calidad del cava una vez terminada la segunda fermentación.

Página 9

Tabla 2. Componentes de la pared celular de *S. cerevisiae*.

Página 13

Tabla 3. Estudios sobre la revalorización de subproductos vegetales para la mejora de la seguridad alimentaria de productos fermentados.

Página 23

Tabla 4. Resumen de los artículos científicos que evalúan el efecto prebiótico de los subproductos alimentarios.

Página 27

Tabla 5. Cepas de cultivos iniciadores empleadas para evaluar el efecto promotor del crecimiento de las lías del cava.

Página 42

Tabla 6. Lotes de derivados cárnicos fermentados crudos-curados elaborados para la evaluación del efecto promotor de las lías del cava en el crecimiento de BAL.

Página 43

Tabla 7. Valores de pH y a_w durante la fermentación y curado de los derivados cárnicos fermentados crudos-curados elaborados para la evaluación del efecto promotor de las lías del cava en el crecimiento de BAL.

Página 49

Tabla 8. Lotes de derivados cárnicos fermentados crudos-curados elaborados para el estudio del efecto antimicrobiano de las lías del cava y de su extracto fenólico frente a bacterias patógenas de origen alimentario.

Página 54

Tabla 9. Lotes de derivados cárnicos fermentados crudos-curados elaborados para el estudio de la influencia de la adición de lías del cava y de su extracto fenólico en la formación de aminas biógenas.

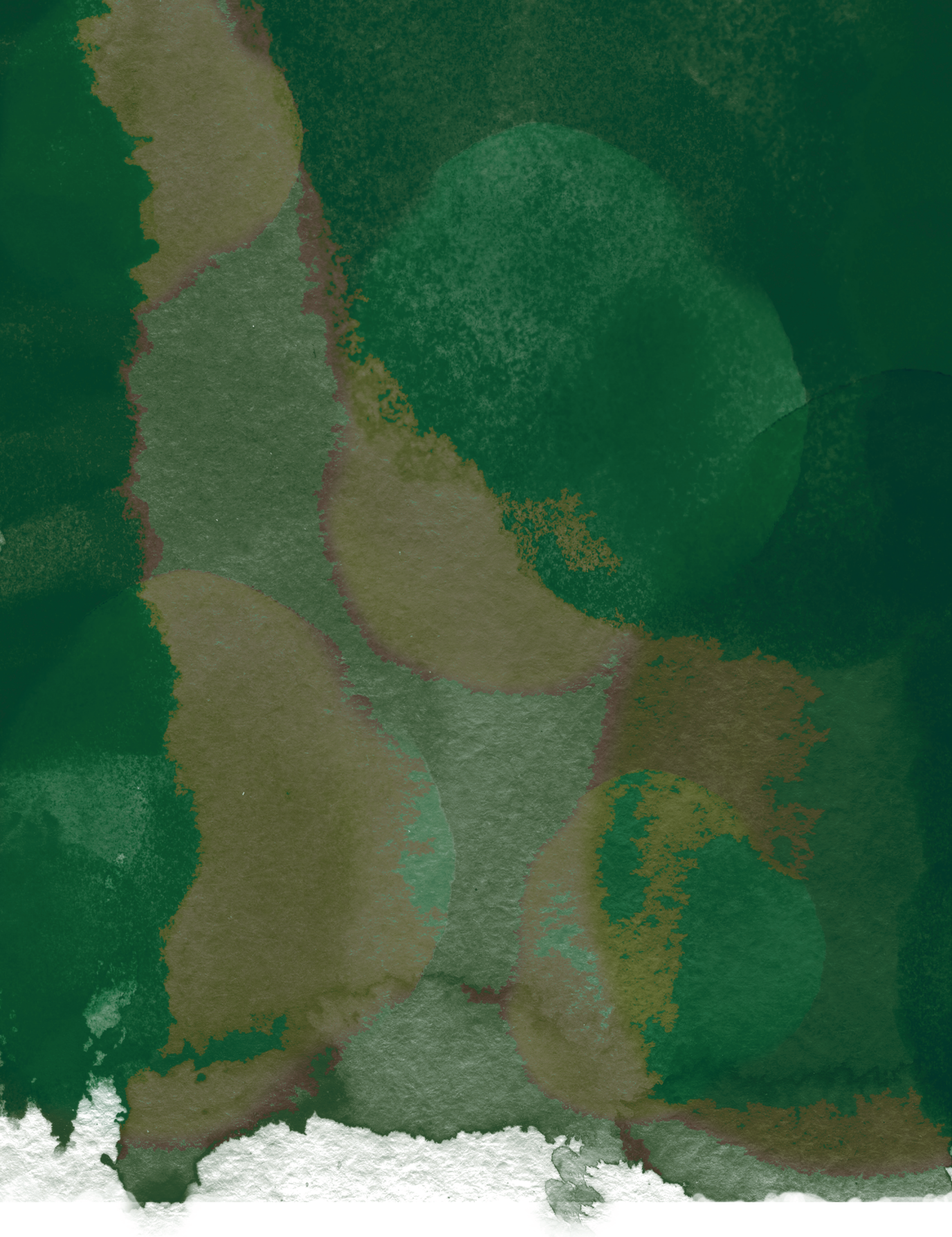
Página 67

Tabla 10. Cepas probióticas seleccionadas para el estudio del efecto prebiótico de las lías del cava.

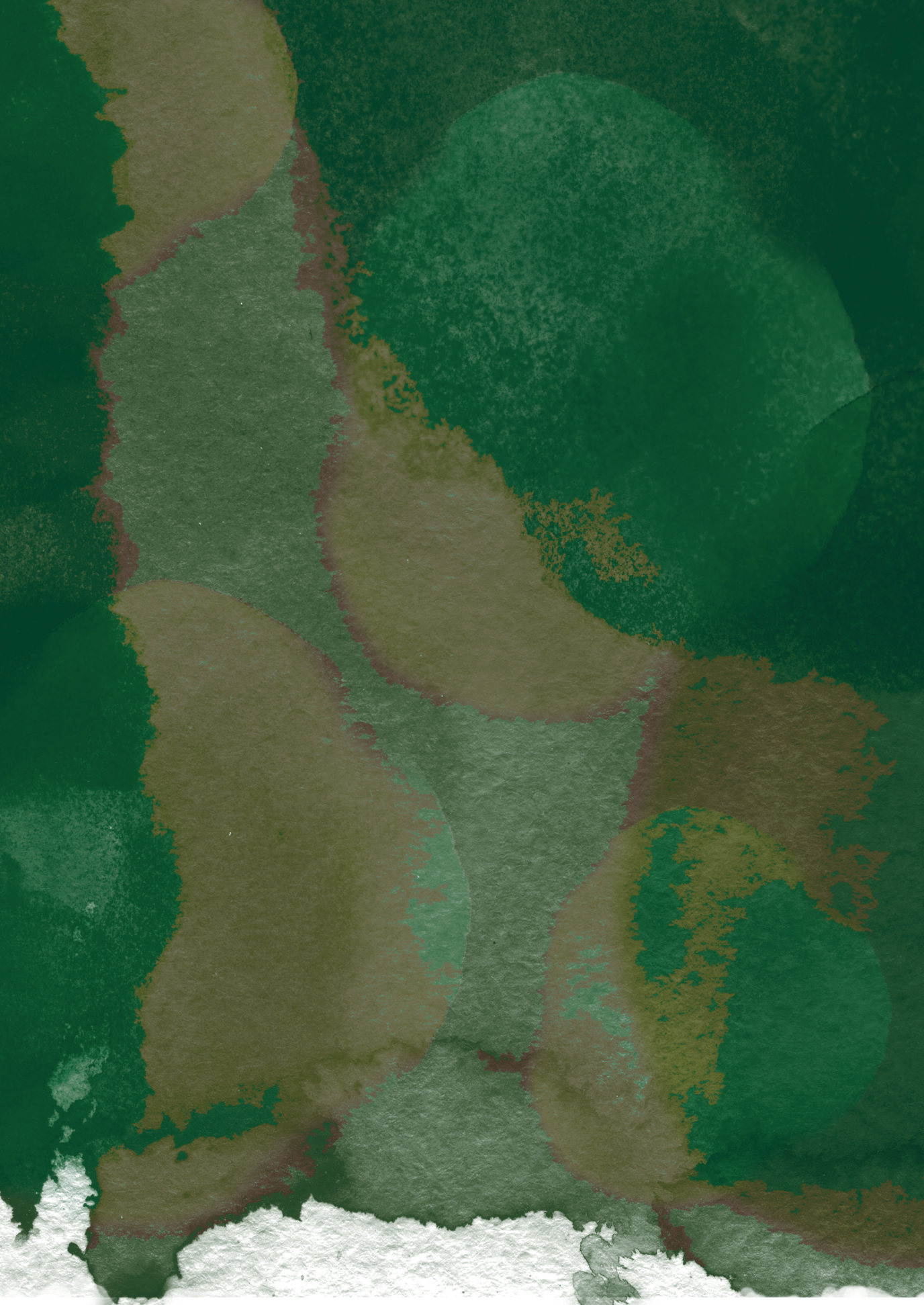
Página 77

ABREVIATURAS

MOS	Manano-oligosacáridos
BAL	Bacterias del Ácido Láctico
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, por sus siglas en inglés
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, por sus siglas en inglés
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
LPE	Extracto Fenólico de las Lías del Cava, por sus siglas en inglés
ONU	Organización de las Naciones Unidas
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
FIAB	Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas
FOS	Fructo-oligosacáridos
AGCC	Ácidos Grasos de Cadena Corta
MRS	<i>Man Rogosa Sharpe</i> (medio de cultivo microbiológico)
KOH	Hidróxido de Potasio
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo, por sus siglas en inglés
CTC	Ciencia y Tecnología de la Carne
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (medio de cultivo microbiológico)
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades, por sus siglas en inglés



RESUMEN | ABSTRACT



RESUMEN

Las lías del cava son un subproducto vitivinícola que consiste en células no viables de *Saccharomyces cerevisiae*. Su composición rica en β -glucanos y manano-oligosacáridos (MOS) podría dar lugar a una mejor implantación de las bacterias responsables de la fermentación y un mayor y más rápido descenso del pH que, en último término, reduciría el riesgo de desarrollo de posibles microorganismos patógenos. Además, las lías contienen sustancias procedentes del cava, como compuestos fenólicos, que podrían también ejercer o potenciar este efecto antimicrobiano. Por otra parte, la fibra de las lías del cava podría favorecer el crecimiento selectivo de bacterias probióticas, promoviendo así una mejora de la microbiota intestinal y, por extensión, de la salud humana.

Actualmente, las lías son el segundo subproducto generado en la producción del cava con una producción estimada de aproximadamente 200 toneladas anuales. A pesar de este gran volumen generado, y de su interesante composición, hasta el momento han recibido poca atención. En este contexto, esta tesis doctoral plantea como objetivo general estudiar una nueva estrategia de revalorización de las lías del cava, tanto como ingrediente con una aplicación en seguridad alimentaria como por su carácter prebiótico.

Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, se evaluó el efecto promotor de lías del cava en el crecimiento de diferentes especies de BAL comúnmente utilizadas como cultivos iniciadores, tanto *in vitro* como en derivados cárnicos fermentados. Los estudios *in vitro* mostraron un efecto promotor del crecimiento de ciertas cepas de *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus curvatus*, siendo este efecto dosis y cepa dependiente. De entre las diferentes proporciones ensayadas, la adición de un 5% de lías produjo los mayores recuentos de BAL. En derivados cárnicos fermentados, la adición de un 5% de lías se tradujo en una mayor acidificación, aunque los recuentos de BAL no se vieron afectados de manera significativa.

También se estudió el efecto antimicrobiano de las lías del cava y de su extracto fenólico frente a bacterias patógenas de origen alimentario en derivados cárnicos

fermentados. Las lías del cava inhibieron de manera significativa el crecimiento de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*, con una efectividad similar a la obtenida cuando se añadió el cultivo iniciador *L. sakei* CTC494. Además, el uso combinado de las lías del cava con el cultivo iniciador tuvo un efecto sinérgico y bactericida contra *Salmonella*. El extracto fenólico de las lías del cava redujo ligeramente los recuentos de *Salmonella* en el producto acabado, pero no tuvo ningún efecto anti-listeria.

Además del efecto antimicrobiano, también se planteó estudiar si la adición de lías del cava o de su extracto fenólico reducían la formación de aminas biógenas en este tipo de productos fermentados. La adición de lías del cava en los derivados cárnicos redujo significativamente los contenidos de cadaverina y putrescina durante todo el proceso de curado, con porcentajes de reducción en el producto acabado por encima del 60%. El extracto fenólico de las lías del cava también fue capaz de reducir de manera significativa los niveles de estas diaminas, aunque en porcentajes más moderados.

Finalmente, en el marco de esta tesis doctoral también se evaluó *in vitro* el efecto prebiótico de las lías del cava en el crecimiento de bacterias probióticas. La suplementación con un 5% de lías potenció el crecimiento y/o la supervivencia de algunas cepas probióticas de *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum* y *Lacticaseibacillus casei*.

ABSTRACT

Cava lees are a winery by-product consisting of non-viable cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Their richness in β -glucans and mannan-oligosaccharides (MOS) could lead to a better implantation of bacteria responsible for fermentation and a higher and faster reduction in pH, which would ultimately reduce the risk of foodborne pathogens in products such as dry-fermented sausages. In addition, the lees contain bioactive substances present in cava, such as phenolic compounds, which could also exert or enhance this antimicrobial effect. On the other hand, the fibre in cava lees could favour the selective growth of probiotic bacteria, thus benefitting intestinal microbiota and human health.

Lees are currently the second most important by-product generated by the cava industry, with an estimated production of approximately 200 tons per year. Yet despite this large volume, and their interesting composition, cava lees have so far attracted little attention. In this context, the general objective of this doctoral thesis was to study a new strategy for the revaluation of cava lees, both as an ingredient with application in food safety and as a prebiotic.

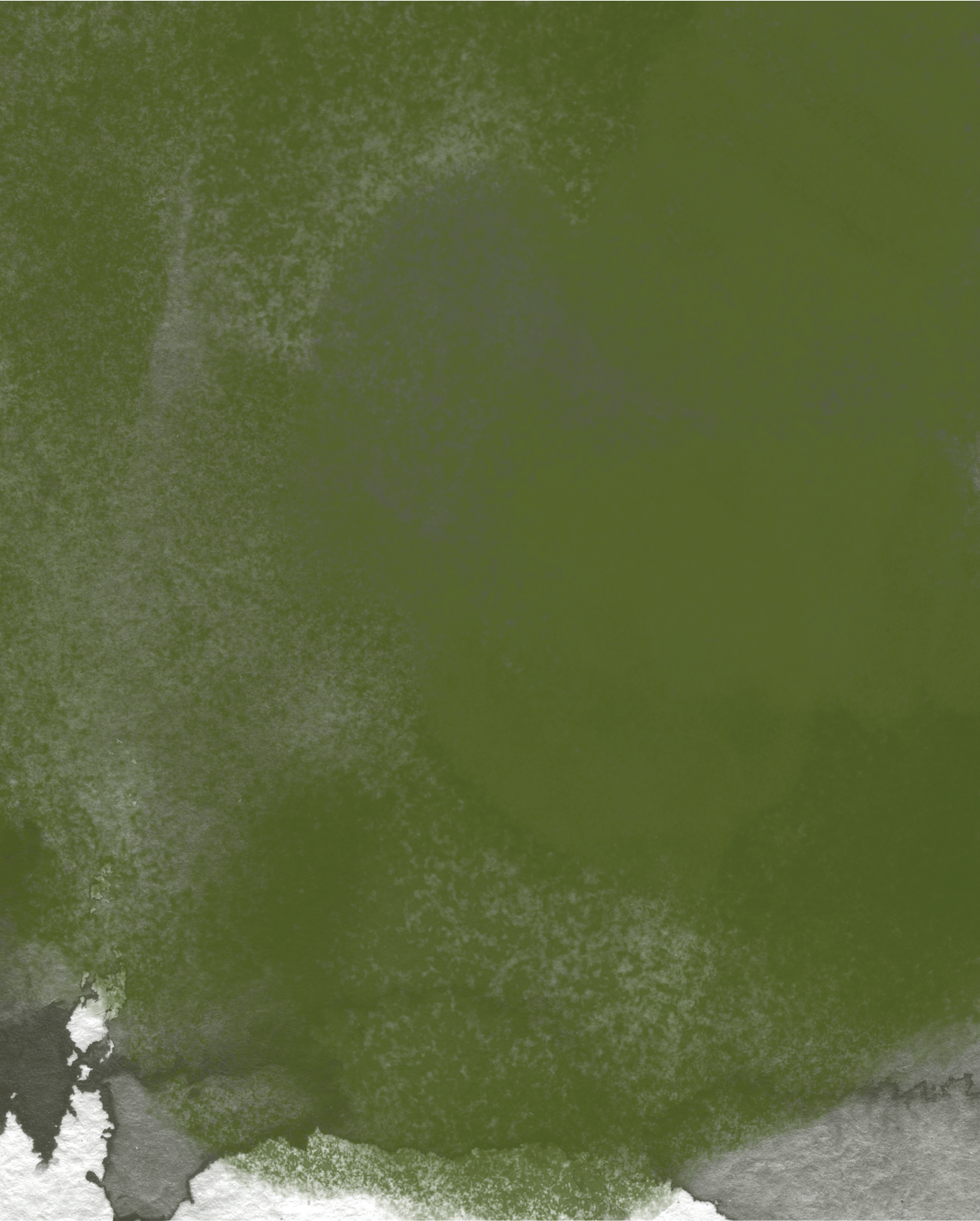
From a food safety point of view, the growth-promoting effect of cava lees on different LAB species commonly used as starter cultures was evaluated, both *in vitro* and in dry-fermented sausages. *In vitro* studies showed a growth-promoting effect on certain strains of *Latilactobacillus sakei* and *Latilactobacillus curvatus*, in a dose- and strain-dependent manner. Among the different proportions tested, the addition of 5% lees produced the highest LAB counts. In dry-fermented sausages, the addition of 5% lees resulted in greater acidification, although LAB counts were not significantly affected.

The antimicrobial effect of cava lees and a derived phenolic extract against foodborne pathogenic bacteria in dry-fermented sausages was also studied. Cava lees significantly inhibited the growth of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*, with an effectiveness similar to that obtained when the starter culture *L. sakei* CTC494 was added. In addition, the combination of cava lees and the starter culture had a synergistic and bactericidal effect against *Salmonella*. The

phenolic extract from the cava lees slightly reduced *Salmonella* counts in the finished product but had no anti-*Listeria* effect.

Besides the antimicrobial effect, it was also proposed to study whether the addition of cava lees or a derived phenolic extract reduces the formation of biogenic amines in this type of fermented products. The addition of cava lees to dry-fermented sausages significantly reduced the contents of cadaverine and putrescine throughout the ripening process, with reduction percentages in the finished product of over 60%. The phenolic extract of the cava lees was also capable of significantly reducing the levels of these diamines, although in more moderate percentages.

Finally, within the framework of this doctoral thesis, the prebiotic effect of cava lees on the growth of probiotic bacteria was also evaluated *in vitro*. Supplementation with 5% cava lees enhanced the growth and/or survival of some probiotic strains of *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum* and *Lacticaseibacillus casei*.



1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 LÍAS DEL CAVA

1.1.1 Un subproducto de la elaboración del cava

El cava es un vino espumoso de calidad producido en una región determinada, principalmente en la comarca catalana del Penedés (Consejo de la Unión Europea, 2008). Su elaboración está legalmente protegida por el reglamento de la denominación D.O. Cava y por su consejo regulador (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 1991). Esta legislación establece las zonas de producción específicas y las variedades de uva permitidas para la producción del vino base, así como los parámetros de calidad del cava (Tabla 1) (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 1991).

Tabla 1. Variedades de uvas permitidas para la producción del vino base, y parámetros de calidad del cava una vez terminada la segunda fermentación (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 1991).

Variedad de uva	Parámetros de calidad	
Uva Blanca: Macabeo (Viura) Xarel.lo Parellada Malvasía (Subirat Parent) Chardonnay	Graduación alcohólica adquirida	
	<i>mínima</i>	10,8 % vol.
	<i>máxima</i>	12,8 % vol.
	Acidez total mínima (en ácido tartárico)	5,5 g/L
	Extracto seco no reductor	
	<i>mínimo</i>	13 g/L
	<i>máximo</i>	22g/L
	Acidez volátil real (en ácido acético) inferior a	0,65g/L
	Anhídrido sulfuroso total inferior a	160 mg/L
	Cenizas	
Uva Tinta: Garnacha tinta Monastrell Pinot Noir Trepát	<i>mínimo</i>	0,70 g/L
	<i>máximo</i>	2 g/L
	pH	
	<i>mínimo</i>	2,8
	<i>máximo</i>	3,3
	Sobrepresión mínima	3.5 bar a 20 °C

Los vinos espumosos naturales elaborados por el método tradicional o *Champenoise* se caracterizan por una segunda fermentación de un vino base, al que se le adicionan azúcares y levaduras, con un posterior proceso de envejecimiento o crianza en contacto con sus mismas levaduras (*sur lie*) (Fornairon-Bonnefond et al., 2002; Alexandre and Guilloux-Benatier, 2006a). La Figura 1 muestra las diferentes etapas del proceso de elaboración del cava. El reglamento

del cava exige que tanto la segunda fermentación, como su crianza *sur lie*, se realicen íntegramente en botella y durante un periodo mínimo de 9 meses. A lo largo de la fermentación, que oscila entre 1–3 meses, los azúcares son bio-transformados en etanol y CO₂ por acción de las levaduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*. Posteriormente, durante la crianza *sur lie*, el vino madura y desarrolla los aromas característicos de este producto. El proceso de crianza puede extenderse desde como mínimo 9 meses hasta 3 años y se realiza manteniendo las botellas en posición horizontal (en rima). En esta fase, también tiene lugar la autólisis de las levaduras, proceso en el cual su pared celular se degrada por acción de las propias enzimas endógenas, provocando la liberación de varios compuestos intracelulares, como aminoácidos, péptidos, proteínas, polisacáridos, derivados de ácidos nucleicos y ácidos grasos, que tienen un efecto positivo en la calidad organoléptica del cava (Torresi et al., 2011). Consecuentemente, las células de *S. cerevisiae* dejan de ser viables, pasando a ser consideradas lías del cava.

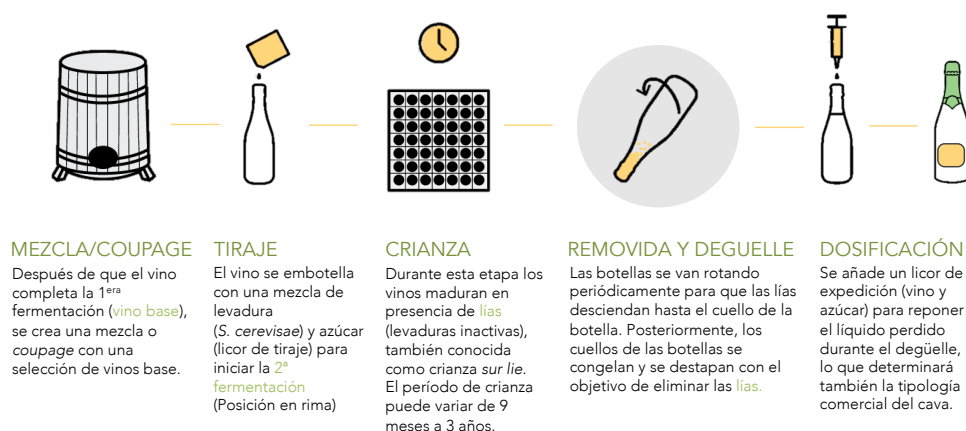


Figura 1. Esquema del proceso de elaboración del cava por el método tradicional o *Champenoise* desde el vino base hasta su embotellado (Consejo Regulador de la denominación Cava, 2021).

Una vez finalizada la crianza, las botellas se someten a una etapa de aclarado o removida con el objetivo de desplazar las lías al cuello de la botella y facilitar su posterior eliminación en la fase de degüelle. Con este fin, las botellas emplazadas en pupitres o palés giratorios van rotando periódicamente de forma manual o automática hasta alcanzar una posición vertical invertida denominada “de punta”.

El proceso de degüelle consiste en destapar la botella con el objetivo de eliminar las lías depositadas en el cuello de la botella. Habitualmente, se efectúa la congelación ($-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 minutos) del cuello de la botella mediante inmersión en una solución de etilenglicol al 45%. Ya en posición vertical, se retira el tapón corona, provocando que la presión interna del cava expulse las lías junto con una pequeña parte de la bebida espumosa. A continuación, se repone el volumen de líquido perdido mediante la incorporación del denominado licor de expedición, una mezcla consistente en vino y azúcares. La cantidad de azúcar adicionada determinará la tipología comercial del cava obtenido de acuerdo con la legislación vigente, que puede oscilar entre brut nature ($<3\text{g/L}$) y dulce ($>50\text{g/L}$). Finalmente, se tapa la botella con un corcho que se rodea de un alambre para evitar su expulsión a causa de la presión interior del producto.

En términos económicos y productivos, la industria del cava en Cataluña cuenta actualmente con más de 6.000 explotaciones vitivinícolas que disponen de una superficie cultivable de prácticamente 40.000 hectáreas (Consejo Regulador de la Denominación de Origen Protegida Cava, 2020). En el año 2020, la producción de botellas de cava ascendió a más de 215 millones. Se calcula que cada botella de cava contiene alrededor de un gramo de lías, el cual contiene 10^8 células de *S. cerevisiae* (Gallardo-Chacón et al., 2010). En base a estos datos, se puede estimar que en el año 2020 se produjeron aproximadamente 200 toneladas de lías (Consejo Regulador de la Denominación de Origen Protegida Cava, 2020). Actualmente las lías del cava son consideradas un subproducto sin valor añadido que requieren, además, de estrategias de gestión para su almacenamiento y disposición. No obstante, se ha sugerido su posible reaprovechamiento para la elaboración de compost o para alimentación animal tras un proceso de desalcoholización. Sin embargo, el alto contenido de polifenoles asociados con las proteínas hace que gran parte de esta fracción no sea asimilable nutricionalmente (Devesa-Rey et al., 2011).

1.1.2 Caracterización y composición de las lías del cava

El proceso de fermentación no fue completamente elucidado hasta el año 1863, cuando el investigador francés Louis Pasteur describió que este proceso

metabólico era desarrollado por microorganismos vivos, concretamente levaduras (Torresi et al., 2011). En la actualidad, se han descrito alrededor de 60 géneros y más de 500 especies de levaduras. Entre las levaduras responsables de la fermentación alcohólica, *S. cerevisiae* es la más comúnmente utilizada, por lo que también es conocida como la levadura del vino (Torresi et al., 2011).

La composición de *S. cerevisiae* cambia durante la crianza de los vinos espumosos, etapa en la que tiene lugar el proceso de autólisis. Como se expuso en el apartado anterior, durante esta etapa tiene lugar la lisis de los componentes celulares por acción de las propias enzimas de la levadura y esto conlleva la pérdida de viabilidad de las células (Babayan et al., 1981). A pesar de ser un proceso de degradación enzimática, la pared celular de las levaduras permanece estructuralmente intacta o sólo parcialmente degradada (Alexandre and Guilloux-Benatier, 2006b). Así, las lías del cava pueden definirse como células no viables de *S. cerevisiae* que están naturalmente plasmolizadas debido al proceso de crianza. Visualmente, las lías del cava son un material arcilloso formado por una fracción líquida correspondiente al cava residual y una fracción sólida, principalmente integrada por las paredes celulares de la levadura junto con otros compuestos procedentes del vino.

La pared celular de *S. cerevisiae* es una estructura rígida que envuelve a la célula y que representa aproximadamente el 30% de su peso seco (de Iseppi et al., 2020). Entre sus funciones principales está el mantenimiento de la forma celular, la protección frente al estrés físico, la estabilización de las condiciones osmóticas, así como el desarrollo de interacciones de tipo molecular, tales como la unión sexual y la floculación (Klis et al., 2006). Además, tiene la capacidad de modificar su estructura y composición ante necesidades específicas de la célula y factores de tipo ambiental (Klis et al., 2002).

En cuanto a su composición, la pared celular de las levaduras posee diferentes capas interconectadas de polisacáridos (85%) y proteínas (15%), tal como se puede apreciar en la Figura 2 (de Iseppi et al., 2020). La capa externa está formada por manoproteínas, integradas por manano-oligosacáridos (MOS) unidos a proteínas, y conectadas entre sí por una matriz de β -1,3 glucanos amorfos. La capa interna está formada por β -1,3 glucanos sobre una pequeña cantidad de quitina (Klis, 1994;

Lipke and Ovalle, 1998; Alcázar et al., 2016). Ambas capas se encuentran unidas por moléculas de β -1,6 glucanos.

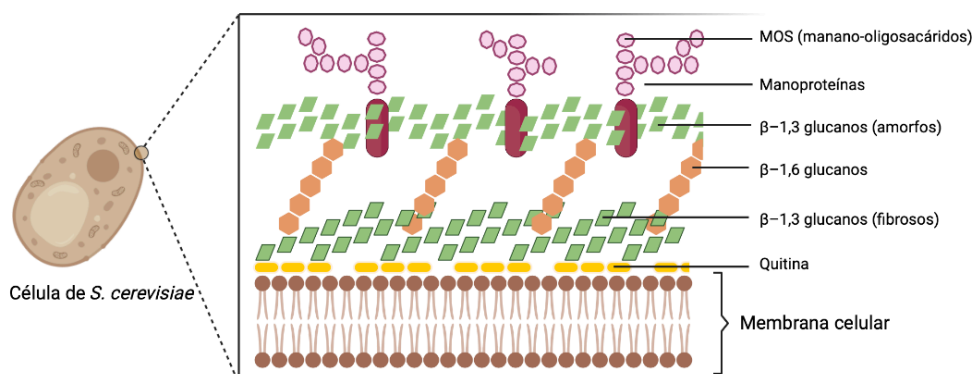


Figura 2. Organización de la pared celular de *S. cerevisiae* adaptada de (de Iseppi et al., 2020).

Los β -glucanos son polímeros de glucosa unidos por enlaces β -glicosídicos y representan el principal constituyente de la pared celular de la levadura (35-55%) (Tabla 2) (Nerantzis and Taritidis, 2006). En la pared celular se encuentran dos tipos de β -glucanos, los formados por cadenas largas de unas 1.500 unidades de glucosa unidas con enlaces β -1,3 y otros más cortos de unas 150 unidades unidas por enlaces β -1,6 (Liu et al., 2008). Las diferentes cadenas de β -glucanos interactúan entre sí a través de enlaces de hidrógeno, formando una red continua y tridimensional. La elasticidad de esta red permite a las células de levadura soportar el estrés osmótico.

Tabla 2. Componentes de la pared celular de *S. cerevisiae*. Las diferentes moléculas se presentan en función de su localización en la pared celular, desde el exterior al interior (de Iseppi et al., 2020).

Macromolécula	Porcentaje que representa de la pared celular	Peso molecular (kDa)	Grado de polimerización
Manoproteínas	30–50	Altamente variable	Altamente variable
β -1,6 glucanos	5–10	24	150
β -1,3 glucanos	30–45	240	1500
Quitina	1.5–6	25	120

kDa: Kilodalton

En los últimos años ha crecido el interés por el uso de glucanos como ingredientes en la formulación de alimentos. En el año 2011, la Comisión Europea autorizó el uso de β -glucanos de levaduras como nuevos ingredientes alimentarios (Comisión Europea, 2011). Además, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA por su siglas en inglés) ha validado declaraciones de salud derivadas de los efectos saludables producidos por la ingesta de glucanos. Concretamente, para los β -glucanos de la avena y la cebada se aprobó una declaración referente al normal mantenimiento de los niveles de colesterol en sangre y otra referente a la reducción de la respuesta glucémica postprandial (Comisión Europea, 2012). Por otro lado, varios estudios han demostrado la habilidad de los β -glucanos para promover el crecimiento y supervivencia de ciertas especies de bacterias del ácido láctico (BAL) (Guergoletto et al., 2010; Russo et al., 2012; Shi et al., 2018; Liu et al., 2021).

Otro de los componentes mayoritarios de la pared celular de la levadura son las manoproteínas, que constituyen entre el 30-50% del peso de la pared celular (Tabla 2) (Klis, 1994; Alcázar et al., 2016). Gracias a su estructura anfifílica, las manoproteínas han sido evaluadas como posibles emulsionantes en varias aplicaciones alimentarias, así como compuestos estabilizantes y potenciadores de la espumabilidad y palatabilidad en enología (de Iseppi et al., 2020). Los MOS que integran estas manoproteínas son polímeros compuestos exclusivamente de unidades de manosa, para los que se ha reconocido desde hace muchos años una importante capacidad prebiótica (Cameron et al., 1988; Kath and Kulicke, 1999). Según diferentes estudios, los MOS son capaces de modular la microbiota intestinal, promover el crecimiento de cepas probióticas, especialmente del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y retardar el crecimiento de microorganismos patógenos, como *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* (Asano et al., 2001; Chauhan et al., 2014; Chen et al., 2014; Pongsapipatana et al., 2016; Cao et al., 2019; Julendra et al., 2019). Además, los MOS también han sido propuestos como una alternativa natural al uso de antibióticos en la producción animal, ya que impiden la adhesión de patógenos bacterianos al bloquear la adherencia de las proteínas microbianas a la superficie del epitelio intestinal (Kogan and Kocher, 2007; Gainza and Romero, 2017).

La quitina representa aproximadamente del 1.5 al 6% de la pared celular y consiste en polímeros lineales de N-acetilglucosamina unidos por enlaces de tipo β -1,4 (Tabla 1). Prácticamente la mitad de las cadenas de quitina están conectadas con β -1,3 glucanos mediante enlaces glucosídicos (Kollár et al., 1995). Esta estructura de la quitina confiere resistencia a la pared celular (Lesage and Bussey, 2006).

Además de los componentes intrínsecos de *S. cerevisiae*, las lías también contienen sustancias procedentes del cava, tales como ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y compuestos volátiles (Gallardo-Chacón et al., 2010). De hecho, se ha descrito la capacidad de las levaduras de adsorber en su pared celular este tipo de compuestos (Jara-Palacios, 2019a). Según Aguilera (2016), casi una quinta parte de las lías del cava en peso seco corresponde a ácido tartárico. Este es el ácido predominante en las uvas y los vinos y el responsable, en gran medida, de la acidez de las lías del cava ($\text{pH} = 3.2$). Las lías del cava también contienen una alta cantidad de compuestos fenólicos, con un contenido total de 34,4 mg EAG/L según la caracterización realizada por (Aguilera, 2016). Este trabajo describe el perfil fenólico de las lías del cava, que se caracteriza por la presencia de ácido caftárico (350 $\mu\text{g/g}$ de peso seco), epicatequina (73 $\mu\text{g/g}$ de peso seco), ácido cumárico (10 $\mu\text{g/g}$ de peso seco), ácido cafeico (9 $\mu\text{g/g}$ de peso seco) y ácido ferúlico (4 $\mu\text{g/g}$ de peso seco) (Aguilera, 2016). Las lías del cava también contienen compuestos volátiles que son adsorbidos en la superficie la pared celular. Gallardo-Chacón et al. (2009), reportaron la afinidad de las lías del cava hacia varios compuestos volátiles relacionados con el aroma del vino. Concretamente, los compuestos mayoritarios detectados en las lías fueron ésteres, aldehídos, norisoprenoides y terpenos, mientras que los compuestos minoritarios fueron cetonas alifáticas, sesquiterpenos y trimetil tetrahidronaftalenos. Finalmente, las lías del cava también contienen restos de algún coadyuvante tecnológico como la bentonita, que se añade al cava para favorecer la floculación y la recuperación de las lías al final de la crianza (Alexandre and Guilloux-Benatier, 2006a).

A pesar de que la composición de las lías del cava ha sido escasamente estudiada hasta el momento, sí que existen algunos trabajos acerca de las lías procedentes de vinos. Según estos trabajos, la composición de las lías puede depender de

numerosos factores principalmente relacionados con el tipo de uva y el método de vinificación utilizado (Jara-Palacios, 2019b; de Iseppi et al., 2020). Por lo tanto, se puede extrapolar que, en la medida que estos factores varíen en la elaboración del cava, también influirán en la composición final de sus lías.

1.2 REUTILIZACIÓN Y REVALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA DE TRANSFORMACIÓN DE VEGETALES

Hoy en día, en un contexto de emergencia climática, uno de los principales retos a nivel mundial es la búsqueda de sistemas alimentarios ambientalmente sostenibles. Actualmente, la gran mayoría de países y organismos internacionales incluyen en sus políticas alimentarias el concepto de la economía circular y la sostenibilidad. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés), la economía circular es un concepto económico, que se interrelaciona con la sostenibilidad, y cuyo objetivo es la producción de bienes y servicios reduciendo el consumo y el desperdicio de materias primas, agua y fuentes de energía (FAO, 2015). Es decir, que el valor de los productos y los recursos se mantenga en la economía durante el mayor tiempo posible, y que se reduzca al mínimo la generación de residuos. En este contexto, los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de las Naciones Unidas incentivan el desarrollo de estrategias encaminadas a un procesamiento eficiente de los alimentos, proponiendo una reutilización integral de los subproductos alimentarios (ONU, 2015). A nivel europeo, el Pacto Verde Europeo (*European Green Deal*) es el plan de acción de la Comisión Europea para garantizar la aplicación de los ODS. En el sector agroalimentario, este plan de acción propone iniciativas que promuevan la transición hacia modelos de producción más sostenibles, con menor impacto ambiental y más eficientes en el aprovechamiento de los recursos, por ejemplo, generando nuevas estrategias de valorización asociadas a los subproductos de la industria alimentaria (FIAB, 2021).

La industria alimentaria genera grandes cantidades de subproductos, lo que supone un importante impacto medioambiental y económico derivado de su manipulación, tratamiento y/o eliminación. Durante las últimas décadas, el procesamiento industrial de alimentos de origen vegetal ha aumentado considerablemente con el objetivo de satisfacer la creciente demanda de este tipo de productos por parte de los consumidores (Sagar et al., 2018). Esta industria genera una gran cantidad de subproductos vegetales (*i.e.*, bagazo, cáscaras, semillas y hojas) que pueden llegar a alcanzar hasta un 60% de la materia prima

procesada y que, en gran medida, suelen desecharse (Amaya-Cruz et al., 2015). Desde el punto de vista de la economía circular, muchos de estos subproductos que en la actualidad carecen de valor añadido, podrían reutilizarse en nuevas aplicaciones en el ámbito de la alimentación. De hecho, en los últimos años, el uso y revalorización de subproductos ricos, por ejemplo, en proteínas, fibras, lípidos o polifenoles, ha devenido un tema de creciente interés para la industria alimentaria. En la Figura 3 se muestra el número de publicaciones científicas acerca de la revalorización de subproductos alimentarios publicadas desde 1990, observando cómo el 95% de estas han aparecido en los últimos 10 años, y el 80% en los últimos 5 años.

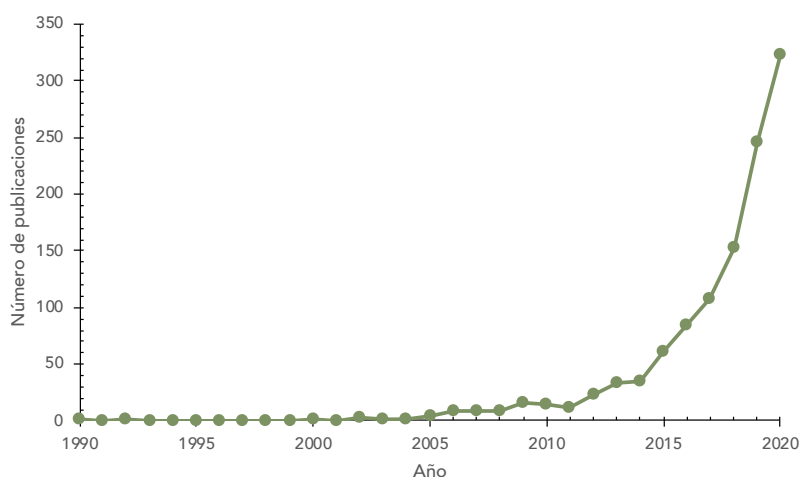


Figura 3. Número de publicaciones científicas sobre revalorización de subproductos alimentarios en el periodo de 1990-2020. Datos obtenidos del portal *Web of Science* con el término de búsqueda: *food by-products valorization* a fecha de 1º de noviembre del 2021. Número total de artículos: 1150.

Una de las estrategias de reutilización de subproductos más utilizada hasta el momento es su uso como ingredientes de origen natural en la reformulación de alimentos, aprovechando sus potenciales efectos antioxidantes, texturizantes, prebióticos y/o antimicrobianos. La mayoría de las investigaciones están enfocadas a la mejora del perfil nutricional de ciertos alimentos, muchos de ellos productos fermentados, mediante la adición de subproductos de origen vegetal ricos en fibra dietética (García et al., 2002; Fernández-Ginés et al., 2004; Fernández-López et al.,

2008; Sendra et al., 2008a; Sayas-Barberá et al., 2012; Yalinkiliç et al., 2012a; Sánchez-Zapata et al., 2013; Mendes et al., 2014; Mikami et al., 2020). En este campo, se han obtenido derivados cárnicos más saludables tras la adición de subproductos ricos en fibra. Por ejemplo, Fernández-Ginés et al. (2004), añadieron albedo de limón (*i.e.*, la parte blanquecina de los cítricos que se encuentra bajo la piel, muy rica en fibra y compuestos bioactivos) en la elaboración de salchichas cocidas de Boloña, obteniendo una mejora significativa tanto desde el punto de vista nutricional (aumento del porcentaje de fibra) como tecnológico (reducción del nivel de nitritos residuales). Sánchez-Zapata et al. (2013), elaboraron chorizos con un alto contenido de fibra añadiendo a su formulación un subproducto resultante de la elaboración de horchata (restos de chufa ricos en fibra) sin comprometer el proceso de curado ni las propiedades físico-químicas. En ambos estudios, la reformulación de los derivados cárnicos con los subproductos no implicó cambios significativos en las propiedades sensoriales, siendo muy similares a los convencionales.

Otra estrategia de revalorización es el uso de subproductos ricos en fibra en la sustitución de la fracción grasa de los alimentos. En este sentido, un estudio publicado en el año 2020 evaluó el uso de restos de limón procedentes de la elaboración de *Limoncello* en la formulación de derivados cárnicos fermentados crudos-curados (*Salamis*) bajos en grasa (Tremonte et al., 2020). Así, la adición de un 4% de este subproducto, junto con la acción de un cultivo iniciador específicamente seleccionado, permitió la obtención de derivados cárnicos fermentados nutricionalmente mejorados, con un 14% menos de grasa y presencia de fibra, y con características de textura y color similares al producto tradicional (Tremonte et al., 2020). En otro estudio similar también se demostró cómo la adición de un 1,5% de fibras procedentes de diferentes frutas y cereales en derivados cárnicos fermentados bajos en grasa (un 15% menos), tuvo un efecto positivo, no sólo en las características nutricionales (35% menos del valor energético) si no también en las organolépticas, que fueron muy similares a las de los productos altos en grasa. De todos los subproductos considerados, la fibra de naranja fue la que mostró los mejores resultados (García et al., 2002).

Además de estas estrategias encaminadas a la mejora nutricional y sensorial de ciertos alimentos, también se ha planteado la reutilización de subproductos de la industria alimentaria desde la perspectiva de la seguridad alimentaria y de la salud por su papel como prebióticos. A continuación, se tratarán con más detalle estos dos enfoques de revalorización de subproductos aplicados a alimentos fermentados, ya que son en los que se basan los objetivos de esta tesis.

1.2.1. Estrategias de revalorización de subproductos para la mejora de la seguridad alimentaria de productos fermentados

Además de las conocidas implicaciones nutricionales de la adición de fibra dietética a los alimentos, cada vez más se está investigando su efecto desde el punto de vista tecnológico y de seguridad alimentaria, especialmente en productos fermentados.

El proceso de fermentación comporta una serie de modificaciones físico-químicas y bioquímicas que confieren al producto final las características organolépticas propias, además de aumentar su estabilidad. Concretamente, la fermentación láctica, que tiene lugar en la obtención de productos como los derivados cárnicos fermentados o los quesos, conlleva una acidificación ($\text{pH} < 5,2$) del producto que favorece la selección de la propia microbiota fermentativa, es decir las BAL, inhibiendo a su vez el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos. En el ámbito de la elaboración industrial de este tipo de productos es habitual el uso de cultivos iniciadores o *starters*, que proporcionan una elevada carga inicial de BAL, que fácilmente dominará sobre la endógena, reduciendo la posibilidad de que se produzcan deficiencias de tipo microbiano y permitiendo estandarizar la calidad del proceso (Cocconcelli and Fontana, 2010).

En este contexto, la reutilización de subproductos vegetales ricos en fibra como ingredientes en la formulación de productos fermentados podría estimular el crecimiento de BAL y/o ayudar a lograr una mayor disminución del pH. Ambos efectos son deseables en términos de seguridad alimentaria. Hasta el momento, pocos trabajos han considerado el impacto de la adición de subproductos de

origen vegetal en alimentos fermentados en términos de seguridad alimentaria (Tabla 3).

El trabajo de Sayas-Barberá et al. (2012), evaluó el efecto de la adición de un 1% de fibra de naranja, obtenida como residuo de la producción de zumos, en la seguridad y calidad de un derivado cárnico (*Longaniza de Pascua*) fermentado con la cepa probiótica *Lactocaseibacillus casei* CECT475 (anteriormente llamado *Lactobacillus casei*). El uso combinado del subproducto a base de fibra de naranja y del cultivo iniciador tuvo un efecto promotor en el crecimiento y la supervivencia de bacterias fermentativas (i.e., *Lactobacilos* y *Micrococos*), y consecuentemente, una mayor y más rápida acidificación del producto en comparación con el control (sin la adición de fibra). Resultados muy similares se han obtenido también en el trabajo publicado recientemente por Mikami et al. (2020). En este estudio se evaluó el efecto en la seguridad microbiológica y la calidad sensorial de la suplementación con lías de sake (10%) en un derivado cárnico fermentado. Estas lías son un subproducto procedente de la elaboración de sake (i.e., bebida alcohólica japonesa obtenida a partir de la fermentación de arroz) compuesto, en gran parte, por *S. cerevisiae* (Kawamoto et al., 2011). La suplementación con este subproducto provocó un aumento tanto en los recuentos de BAL como de *Staphylococcus* respecto a los derivados cárnicos fermentados control. Asimismo, los valores de pH de los derivados cárnicos adicionados con lías de sake fueron significativamente más bajos que los del control, al igual que los nitritos residuales.

Sin embargo, dos estudios que reformularon derivados cárnicos fermentados crudos-curados con la adición de un subproducto de la elaboración de zumo de naranja, únicamente vieron un efecto sobre la acidificación, con valores de pH más bajos en comparación con los derivados cárnicos control sin fibra (Fernández-López et al., 2008; Yalinkiliç et al., 2012a). De hecho, en el estudio de Yalinkiliç et al. (2012), el incremento observado en los recuentos medios de BAL debido a la presencia de fibra de naranja no puede considerarse microbiológicamente relevante. Otro trabajo más reciente también observó el mismo comportamiento para los valores de pH y los recuentos de BAL en un *salami* elaborado con un 4%

de albedo de limón, un subproducto de la elaboración de *limoncello* (Tremonte et al., 2020).

Finalmente, Sánchez-Zapata et al. (2013), no observaron un efecto desde el punto de vista de la seguridad microbiológica tras la adición de un subproducto rico en fibra obtenido tras el procesado de la chufa, ya que no se vieron afectados ni los recuentos de las BAL, responsables de la fermentación, ni los valores de pH (Sánchez-Zapata et al., 2013).

Además del potencial efecto promotor de la fermentación, otra estrategia de revalorización de subproductos desde el punto de vista de la seguridad alimentaria sería su impacto en el crecimiento de ciertas especies patógenas comúnmente transmitidas por los alimentos (*i.e.*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*). Algunos estudios han demostrado el efecto protector de extractos fenólicos obtenidos de diferentes subproductos alimentarios frente a patógenos alimentarios (*i.e.*, semillas, hollejos y tallos de uva; orujo de aceituna; pulpa de manzana y tallos de *shitake*) (van Ba et al., 2016, 2017; Vázquez-Armenta et al., 2017; Vazquez-Armenta et al., 2018; Menchetti et al., 2020; Zokaityte et al., 2020). Sin embargo, la gran mayoría de trabajos que han demostrado el efecto antimicrobiano de los extractos fenólicos procedentes de subproductos se basan en ensayos *in vitro* (Taguri et al., 2004; Serra et al., 2008; Tsukada et al., 2016; Sanz-Puig et al., 2017; Gouvinhas et al., 2018; Silva et al., 2018; Ricci et al., 2019). En este caso, es importante destacar que la concentración mínima inhibitoria contra un patógeno específico varía dependiendo del tipo de polifenol o incluso de la cepa bacteriana (Taguri et al., 2004).

Tabla 3. Estudios sobre la revalorización de subproductos vegetales para la mejora de la seguridad alimentaria de productos fermentados.

Subproducto (% adicionado)	Alimento reformulado	Efecto obtenido por la adición del subproducto	Referencia
Fibra de naranja obtenida de la producción industrial de zumo (1% y 2%)	Derivado cárnico fermentado crudo-curado (<i>Salchichón</i>)	• Sin efecto sobre BAL, pero sí en el crecimiento de <i>Micrococcus</i> • Mayor acidificación (2%) • Menor a_w (2%) • Disminución del nivel de nitrito residual	(Fernández-López et al., 2008)
Fibra de naranja obtenida de la producción industrial de zumo (1%)	Derivado cárnico fermentado crudo-curado (<i>Longaniza de Pascua</i>)	• Mayor crecimiento de BAL y <i>Micrococcus</i> • Menor crecimiento de enterobacterias • Mayor acidificación • Disminución del nivel de nitrito residual	(Sayas-Barberá et al., 2012)
Fibra de naranja obtenida de la producción industrial de zumo (2% y 4%)	Derivado cárnico fermentado crudo-curado (<i>Sucuk</i>)	• Mayores recuentos de BAL (4%) • Menor crecimiento de <i>Micrococcus/Staphylococcus</i> • Mayor acidificación • Disminución del nivel de nitrito residual	(Yalinkiliç et al., 2012b)
Fibra de chufa (<i>Cyperus esculentus</i>) obtenida de la elaboración de horchata (5% y 7%)	Derivado cárnico fermentado crudo-curado (<i>Chorizo</i>)	• Sin efecto sobre BAL • Sin efecto sobre el pH • Mayor a_w (2%)	(Sánchez-Zapata et al., 2013)
Fibra del albedo de limón obtenido de la producción de <i>Limoncello</i> (4%)	Derivado cárnico fermentado crudo-curado (<i>Salami</i>)	• Sin efecto sobre BAL • Mayor acidificación • Mayor a_w	(Tremonte et al., 2020)
Pulpa de manzana obtenida de la elaboración de zumo (8%)	Bebida láctica fermentada	• Efecto antimicrobiano sobre 13 cepas de bacterias alterantes y/o patógenos	(Zokaityte et al., 2020)
Lías obtenidas de la elaboración de Sake (bebida alcohólica fermentada de arroz japonés) (10%)	Derivado cárnico fermentado crudo-curado	• Mayores recuentos de BAL y <i>Staphylococcus</i> • Mayor acidificación • Disminución del nivel de nitrito residual	(Mikami et al., 2020)

1.2.2 Estrategias de revalorización de subproductos por su potencial efecto prebiótico

Los subproductos de origen vegetal, fundamentalmente ricos en fibra alimentaria, parecen ejercer efectos moduladores positivos sobre la microbiota intestinal, lo que sugiere un efecto prebiótico (Borrelli et al., 2004; Piekarska-Radzik and Klewicka, 2021). De hecho, los prebióticos están formados por fibra soluble alimentaria, no digerible por las enzimas digestivas, pero susceptible de ser fermentada por la microbiota intestinal del individuo, estimulando el crecimiento o la actividad de determinadas especies beneficiosas, principalmente bifidobacterias y lactobacilos (Gibson et al., 2017; Mudgil et al., 2018). El aumento de este tipo de población colónica representa un beneficio para la salud humana, interviniendo en procesos antiinflamatorios e inmunológicos, en la producción de compuestos que inhiben a potenciales patógenos, y en el aporte de vitaminas y enzimas activas que ayudan al aprovechamiento de nutrientes. Numerosos estudios demuestran que la ingesta de prebióticos puede reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades, como el síndrome de colon irritable, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, entre otras (Slavin, 2013; Corzo et al., 2015; Carlson et al., 2018)

Recientemente, se han publicado diferentes estudios que tenían como objetivo la revalorización de subproductos vegetales por su potencial papel prebiótico. Estos trabajos se han realizado mediante ensayos *in vitro* con cepas probióticas o con bacterias aisladas de la microbiota intestinal. En general, todos los estudios disponibles ofrecen resultados prometedores al demostrar un mayor crecimiento de las cepas bacterianas ensayadas *in vitro*, principalmente sobre *Lactobacillus*, en presencia de diferentes subproductos ricos en fibra, como la piel de limón, el bagazo de remolacha, manzana o jabuticaba, las semillas de castaña o la harina de frutas y verduras (Sendra et al., 2008a; Jiménez-Zamora et al., 2015a; Albuquerque et al., 2017; Gómez et al., 2019a; Przyborska et al., 2019a; Lacerda Massa et al., 2020a; Mateos-Aparicio et al., 2020; Silva de Andrade et al., 2020). La Tabla 4 resume los diferentes estudios que evalúan el potencial efecto prebiótico de algunos subproductos alimentarios de origen vegetal. Por ejemplo, el trabajo publicado por Silva de Andrade et al. (2020), demostró la viabilidad de utilizar harina hecha a base de subproductos de frutas y verduras obtenidas de la

producción de bebidas isotónicas, como posible fuente prebiótica sostenible. En un primer ensayo *in vitro* con varias cepas probióticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se observó un aumento en el crecimiento bacteriano en presencia del subproducto vegetal, en comparación con un control no suplementado. Posteriormente, cuando este subproducto de frutas y verduras se ensayó sobre la microbiota fecal obtenida de cinco donantes, los autores reportaron un efecto prebiótico sobre *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* igual o superior al que ejercieron los fructo-oligosacáridos (FOS), un compuesto comúnmente reconocido por su efecto prebiótico (Silva de Andrade et al., 2020).

La Jabuticaba es una fruta altamente perecedera que se consume habitualmente en Brasil, cuya mayor parte se destina a la transformación industrial, lo que genera un subproducto formado por piel y la semillas. Recientemente, Lacerda Massa et al. (2020), evaluaron el efecto prebiótico de este subproducto, en comparación con FOS, en cepas probióticas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Los recuentos celulares de las cepas probióticas fueron similares tanto en medio con Jabuticaba o FOS. Además, la presencia de Jabuticaba en el medio de cultivo de los probióticos dio lugar a una disminución del pH, un aumento de la producción de ácido láctico y de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Lacerda Massa et al., 2020b).

Además de los estudios que han evaluado el efecto prebiótico *in vitro* de ciertos subproductos, algunos autores han estudiado este mismo efecto en modelos de productos fermentados. En este sentido, el trabajo de Sendra et al. (2008), evaluó el efecto prebiótico de una fibra de cítricos obtenida como subproducto de la elaboración de zumo en el crecimiento de bacterias probióticas en leche fermentada. Este subproducto fue capaz de potenciar el crecimiento y supervivencia de las cepas probióticas añadidas (*Lactobacillus acidophilus* CECT903 y *Lactobacillus casei* CECT 475), mostrando a la vez una buena aceptación sensorial del producto (Sendra et al., 2008a). Otro estudio realizado por Albuquerque et al. (2017), evaluó el efecto prebiótico en el crecimiento de bacterias probióticas de un subproducto de la fruta de la pasión en una bebida de soja fermentada. La adición de este subproducto derivó en recuentos más altos de

las cepas probióticas del género *Lactobacillus* y en una mayor acidificación del producto. Sin embargo, no se vio ningún efecto prebiótico sobre las cepas de *Streptococcus* (Albuquerque et al., 2017).

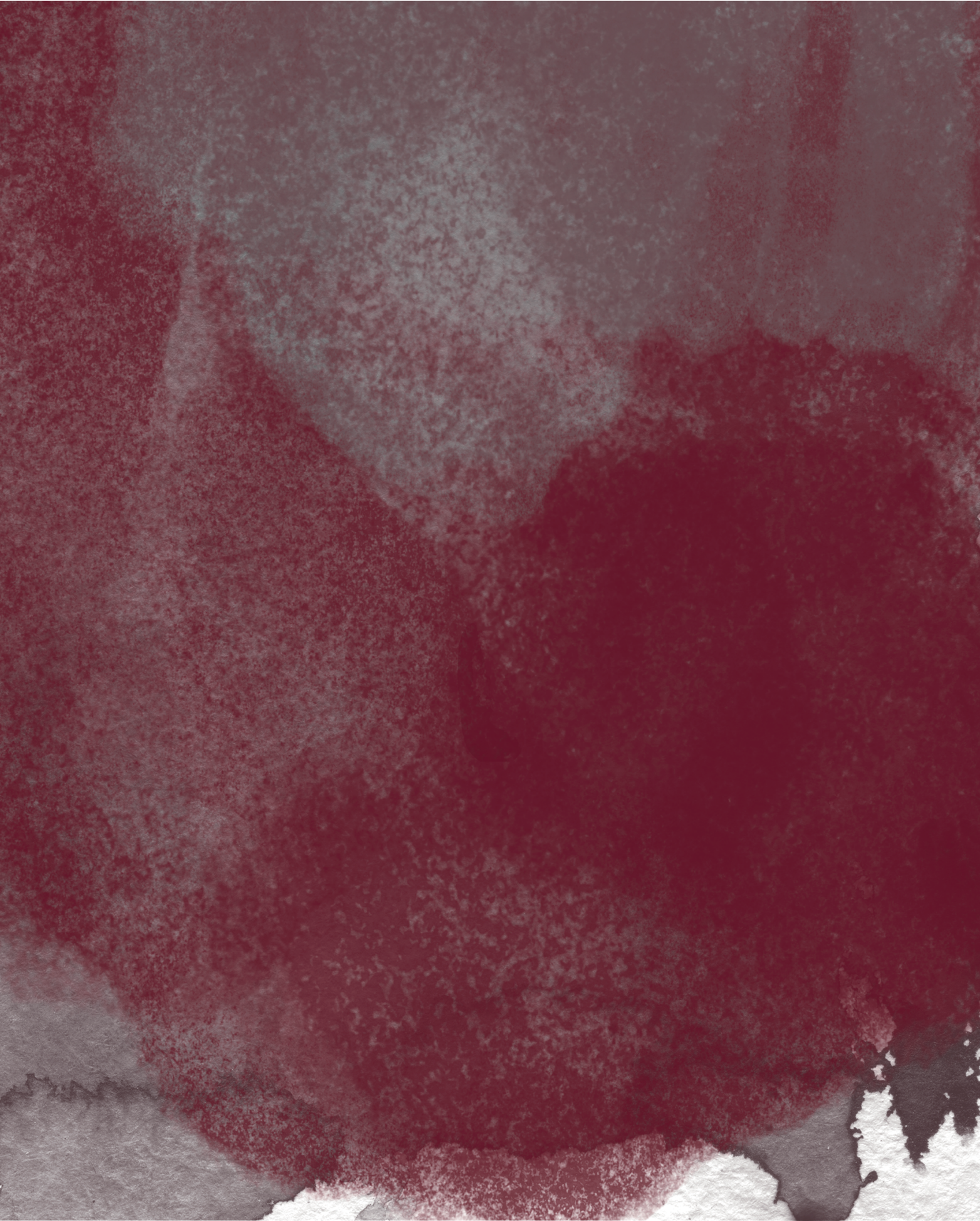
Tabla 4. Resumen de los artículos científicos que evalúan el efecto prebiótico de los subproductos alimentarios.

Subproducto (% adicionado)	Diseño del estudio para evaluar el efecto prebiótico	Efecto obtenido por la adición del subproducto	Referencia
Fibra de limón y naranja obtenida de la producción de zumo (1%)	Ensayo <i>in vitro</i> y en leche fermentada en el crecimiento de las cepas probióticas <i>B. bifidum</i> CECT 870, <i>L. casei</i> CECT 475 y <i>L. acidophilus</i> CECT 903	• En el ensayo <i>in vitro</i>, mayor supervivencia de todas las cepas probióticas, especialmente en el caso de la fibra de naranja • En la leche fermentada, mayor crecimiento y supervivencia de todas las cepas probióticas • Mayor acidificación de la leche fermentada	(Sendra et al., 2008b)
Cascarilla (endocarpio) del grano de café obtenida después del tueste y, granos de café molidos obtenidos después de su infusión (1%)	Ensayo <i>in vitro</i> en el crecimiento de la microbiota intestinal de 3 pacientes sanos	• Capacidad de crecimiento de los géneros <i>Lactobacillus</i> spp. y <i>Bifidobacterium</i> de la microbiota al añadir el subproducto como única fuente de carbono	(Jiménez-Zamora et al., 2015b)
Subproducto obtenido del procesamiento de fruta de la pasión (1%)	Ensayo en bebida fermentada de soja en el crecimiento de las cepas probióticas <i>Streptococcus thermophilus</i> TH-4, <i>L. acidophilus</i> LA-5, <i>L. rhamnosus</i> LGG, <i>L. fermentum</i> PCC, <i>L. reuteri</i> RC-14	• Mayor crecimiento únicamente de las cepas probióticas de <i>Lactobacillus</i> • Mayor acidificación de la bebida de soja fermentada con cepas probióticas de <i>Lactobacillus</i>	(Albuquerque et al., 2017)
Semilla del castaño de indias obtenido de la fabricación de complementos alimenticios (1%)	Ensayo <i>in vitro</i> en el crecimiento de las cepas probióticas <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469, <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356, <i>L. casei</i> ATCC 393, <i>Latilactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC801, <i>Limosilactobacillus fermentum</i> ATCC9338, <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC15698, <i>Bifidobacterium angulatum</i> DSM20098, <i>Bifidobacterium infantis</i> DSM20088 y <i>Bifidobacterium longum</i> DSM20219	• Capacidad de crecimiento de los probióticos en presencia del subproducto como única fuente de carbono • Capacidad de producir ácido láctico y ácido acético	(Przyborska et al., 2019b)
Continúa			

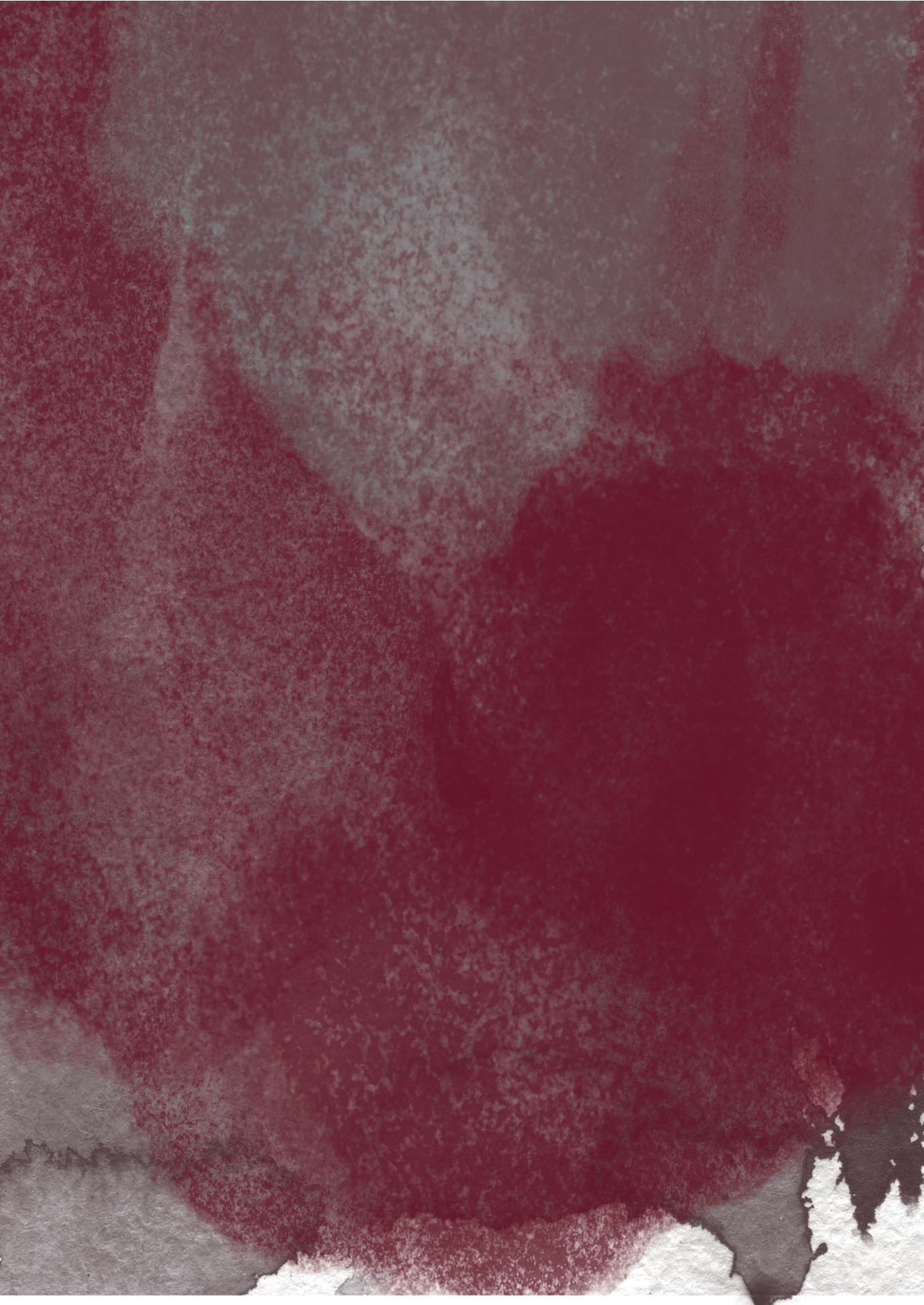
Introducción

Subproducto (% adicionado)	Diseño del estudio para evaluar el efecto prebiótico	Efecto obtenido por la adición del subproducto	Referencia
Oligosacáridos obtenidos de la remolacha procedente de la producción de azúcar y, oligosacáridos obtenidos de piel de limón procedente de la producción de zumo (1%)	Ensayo <i>in vitro</i> en el crecimiento de las cepas probióticas <i>L. plantarum</i> IFPL935, <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. casei</i> IFPL710, <i>Limosilactobacillus reuteri</i> DSM17938, <i>Levilactobacillus brevis</i> IFPL737, <i>B. lactis</i> BB12, <i>B. breve</i> 26M2	• Capacidad de crecimiento de todos los probióticos en presencia del subproducto de la remolacha como única fuente de carbono. • Capacidad de crecimiento limitada o nula de algunos probióticos (<i>L. reuteri</i> DSM17938, <i>L. rhamnosus</i> GG) en presencia del subproducto del limón como única fuente de carbono.	(Gómez et al., 2019b)
Bagazo de manzana (piel, pulpa, semillas, tallos) obtenido de la producción de zumo, sidra y vinagre (5%)	Ensayo <i>in vitro</i> sobre el metabolismo (producción de AGCC) de <i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM20239	• Mayor producción AGCC por parte de la cepa probiótica	(Mateos-Aparicio et al., 2020)
Bagazo (pieles y semillas) de <i>Jabuticaba</i> (fruta brasileña) (2%)	Ensayo <i>in vitro</i> en el crecimiento de las cepas probióticas <i>L. acidophilus</i> LA-5, <i>L. casei</i> LAFTI y <i>B. animalis</i> spp. <i>lactis</i> BB12	• Capacidad de crecimiento de los probióticos en presencia del subproducto como única fuente de carbono • Capacidad de producir AGCC por parte de los probióticos	(Lacerda Massa et al., 2020b)
Harina de frutas y verduras obtenidas de la producción de bebidas isotónicas (2% y 3%)	Ensayo <i>in vitro</i> en el crecimiento de las cepas probióticas <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> R11, <i>Lactocaseibacillus casei</i> 01, <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5, <i>Bifidobacterium animalis</i> spp. <i>lactis</i> BB12 y sobre la microbiota intestinal de 5 donantes sanos	• Mayor crecimiento de las 4 cepas probióticas en presencia de 3% de subproducto • Mayor acidificación producida por las cepas del género <i>Lactobacillus</i> • Mayor crecimiento de los géneros <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> de la microbiota intestinal con un 2% de subproducto • Mayor producción de AGCC por parte de la microbiota intestinal con un 2% de subproducto	(Silva de Andrade et al., 2020)

AGCC: Ácidos grasos de cadena corta



2. INTERÉS Y OBJETIVOS



2. INTERÉS Y OBJETIVOS

En la industria vitivinícola se genera una enorme cantidad de subproductos que pueden llegar a representar hasta un 20% del total de vino o cava producido. De estos, el bagazo u orujo (constituido por el hollejo o piel de la uva, las semillas y los tallos de los racimos) es el principal residuo (aproximadamente un 60%), seguido de las lías, que representan un 14% del total del residuo enológico generado (Giacobbo et al., 2019), aunque se ha estimado que la cantidad de lías producidas puede llegar a suponer hasta un 25% (Lavelli et al., 2016). Desde el enfoque de la economía circular, estos subproductos de la industria vitivinícola podrían ser reciclados, reutilizados o recuperados, mejorando así la sostenibilidad económica y medioambiental de las actividades enológicas. Sin embargo, a pesar del gran volumen de lías generadas, y de que contienen una amplia variedad de compuestos con interés desde el punto de vista de la industria alimentaria (*i.e.*, fibra soluble, polifenoles, ácidos orgánicos), hasta el momento han recibido poca atención y son muy escasas las estrategias para su revalorización, especialmente para las lías procedentes de la elaboración de cava.

En la actualidad, las lías se utilizan principalmente para la obtención de etanol y ácido tartárico, o bien como compost o para suplementar el pienso animal. Sin embargo, estas aplicaciones son más una manera de reducir costos de eliminación que una verdadera estrategia de revalorización. El Reglamento (CE) n° 479/2008, por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola, contempla la obtención de etanol a partir de la destilación de las lías del vino, rico en compuestos aromáticos y utilizado normalmente en la producción de bebidas espirituosas (Bustos et al., 2004b). Una vez las lías han sido destiladas, se pueden utilizar para la obtención de ácido tartárico, el ácido más abundante en las uvas y en el vino. El ácido tartárico es un acidificante utilizado para diferentes aplicaciones, no sólo en la producción de alimentos y bebidas, sino también en la industria farmacéutica, cosmética y química (Quitmann et al., 2014). Además, tanto la destilación como la obtención de ácido tartárico permiten reducir la cantidad de materia orgánica del residuo sólido y, por lo tanto, la demanda de oxígeno de este

subproducto, mejorando así el impacto ambiental ligado a su gestión y eliminación (de Iseppi et al., 2020).

Otra estrategia que se ha planteado es el uso de las lías del vino como ingrediente para la producción de medios de cultivo microbiano, aunque todavía se encuentra en un estado de investigación preliminar. Los estudios desarrollados hasta el momento han demostrado que la adición de lías a un medio de cultivo proporciona un rendimiento similar al obtenido por otros medios de cultivo tradicionales, como el *Man Rogosa Sharpe* (MRS), siendo a la vez una alternativa económicamente más rentable (Bustos et al., 2004c, 2004a; Salgado et al., 2009). Finalmente, también existen algunos estudios que proponen la posibilidad de obtener compuestos fenólicos a partir de las lías para su futura reutilización como ingredientes biofuncionales (Jara-Palacios, 2019a).

En el contexto actual en el que las lías del cava son un subproducto de la industria vitivinícola con poco valor añadido y generado en gran volumen, alrededor de 200 toneladas en el último año, esta tesis doctoral plantea como objetivo general **estudiar una nueva estrategia de revalorización de las lías del cava, tanto como ingrediente con una aplicación en seguridad alimentaria como por su carácter prebiótico.**

La adición de lías del cava en la formulación de ciertos alimentos fermentados podría tener un impacto positivo desde el punto de vista de la seguridad alimentaria. Su composición rica en β -glucanos y MOS podría dar lugar a una mejor implantación de las bacterias responsables de la fermentación y un mayor y más rápido descenso del pH que, en último término, reduciría el riesgo de desarrollo de posibles microorganismos patógenos. Asimismo, otros compuestos presentes en las lías podrían también ejercer un efecto antimicrobiano. El uso de este subproducto podría suponer, además, una reducción en la formación de metabolitos microbianos indeseables, como ciertas aminas biógenas.

Por otra parte, la fibra soluble de la pared celular de las lías del cava podría favorecer el crecimiento selectivo de bacterias probióticas, promoviendo así una mejora de la microbiota intestinal y, por extensión, de la salud humana. El potencial

rol prebiótico de las lías del cava permitiría dar una nueva salida a este subproducto en el ámbito de los complementos alimentarios.

De acuerdo con nuestros conocimientos, es la primera vez que se plantea el estudio de las lías del cava desde estas perspectivas de revalorización.

Para alcanzar el objetivo general de esta tesis, se plantean los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1. Evaluar el efecto promotor de las lías del cava en el crecimiento de diferentes especies de BAL comúnmente utilizadas como cultivos iniciadores, tanto *in vitro* como en derivados cárnicos fermentados (Publicaciones 1 y 2).

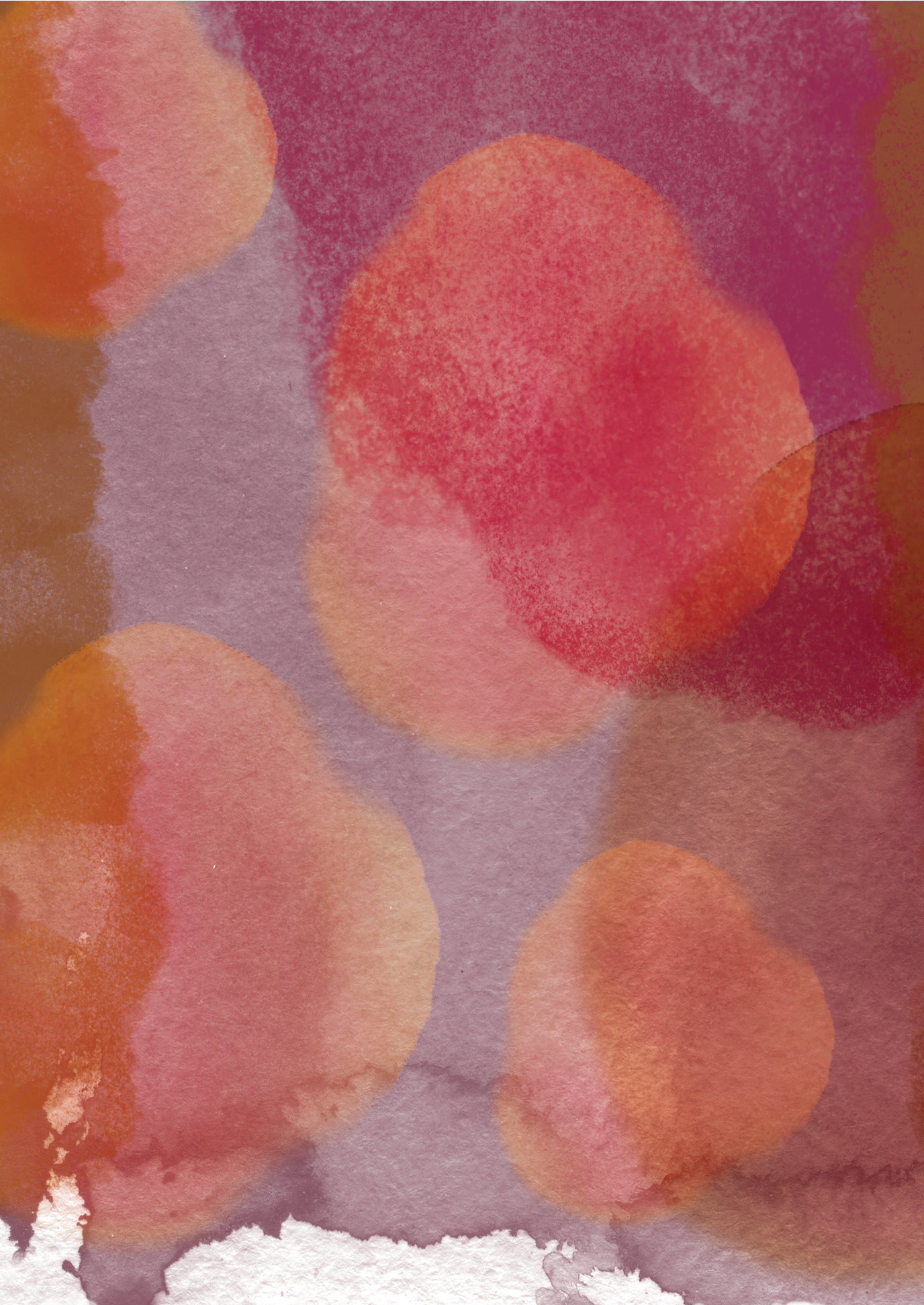
Objetivo 2. Estudiar y comparar el efecto antimicrobiano de las lías del cava y de su extracto fenólico frente a bacterias patógenas de origen alimentario en derivados cárnicos fermentados (Publicación 2).

Objetivo 3. Estudiar si la adición de lías del cava o de su extracto fenólico puede reducir la formación de aminos biógenos en derivados cárnicos fermentados (Publicación 3).

Objetivo 4. Evaluar *in vitro* el efecto prebiótico de las lías del cava en el crecimiento de bacterias probióticas (publicación 1).



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta sección se organiza en función de los diferentes objetivos específicos planteados, presentando los principales resultados obtenidos y su discusión de manera conjunta. Cada apartado incluye también un breve planteamiento del estudio, así como un resumen del diseño experimental utilizado. Los resultados de la tesis doctoral se encuentran recogidos en tres artículos científicos.

3.1 Evaluación del efecto promotor de las lías del cava en el crecimiento de diferentes especies de BAL comúnmente utilizadas como cultivos iniciadores, tanto en modelos *in vitro* como en derivados cárnicos fermentados.

PUBLICACIÓN 1

Growth-Promoting Effect of Cava Lees on Lactic Acid Bacteria Strains: A Potential Revalorization Strategy of a Winery By-Product

Salvador Hernández-Macias, Oriol Comas-Basté, Anna Jofré, Sara Bover-Cid, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Carmen Vidal-Carou
Foods, 2021, 10(7), 1636.

Índice de impacto (SJR 2020): 0,774

Posición en el área de conocimiento "Food Science": Q1 (73/332)

PUBLICACIÓN 2

Revalorization of Cava Lees to Improve the Safety of Fermented Sausages.

Salvador Hernández-Macias, Nuria Ferrer-Bustins, Oriol Comas-Basté, Anna Jofré, M. Luz Latorre-Moratalla, Sara Bover-Cid, M. Carmen Vidal-Carou
Foods, 2021, 10(8), 1916.

Índice de impacto (SJR 2020): 0,774

Posición en el área de conocimiento "Food Science": Q1 (73/332)

COMUNICACIÓN ESCRITA

Salvador Hernández-Macias, S., M. Luz Latorre-Moratalla, Oriol Comas-Basté, Montserrat Riu-Aumatell, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou.
¿Pueden las lías del cava mejorar la seguridad de los alimentos fermentados?
Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad Alimentaria, 2018, Salamanca.

COMUNICACIÓN ESCRITA

Salvador Hernández-Macias, Gemma Rius-Olivella, Oriol Comas-Basté, Sonia Sánchez-Pérez, Nelly Muñoz-Esparza, M. Teresa Veciana-Nogués, Sara Bover-Cid., M. Luz Latorre-Moratalla, M. Carmen Vidal-Carou. **Estudio del efecto promotor de las lías del cava en el crecimiento de bacterias lácticas.** V Congreso Internacional de Calidad y Seguridad Alimentaria Asociación de Consultores y Formadores de España en Calidad y Seguridad Alimentaria (ACOFESAL), 2019, Barcelona.

COMUNICACIÓN ORAL | Premio al mejor póster

Salvador Hernández-Macias, Sergio González-Pastor, Oriol Comas-Basté, Sonia Sánchez-Pérez, Nelly Muñoz-Esparza, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Carmen Vidal-Carou. **Histaminase activity of *Lactobacillus sakei* and the promoting effect of cava lees on its growth.** V Workshop del Instituto de Investigación en Nutrición y Seguridad Alimentaria (INSA·UB), 2019, Santa Coloma de Gramenet.

COMUNICACIÓN ORAL

Salvador Hernández-Macias, M. Luz Latorre-Moratalla, Oriol Comas-Basté, Nelly Muñoz-Esparza, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. **Efecto promotor de las lías del cava en el crecimiento de cepas de *Lactobacillus sakei*: una estrategia de seguridad y sostenibilidad.** Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad Alimentaria, 2020, En línea.

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Los derivados cárnicos fermentados crudos-curados son productos elaborados con una mezcla de carne y grasa picadas (generalmente de cerdo), sal, agentes de curado (nitrato y nitrito), azúcares, especias y aditivos alimentarios que, debidamente embutidos en tripas naturales o artificiales, se someten a un proceso de fermentación/curado y, eventualmente, ahumado (Ordoñez and de la Hoz, 2001). En estas etapas del proceso se establecen las modificaciones fisicoquímicas y bioquímicas que conferirán al producto las características organolépticas propias, además de aumentar su estabilidad.

La microbiota típica de los derivados cárnicos fermentados está constituida mayoritariamente por BAL, con recuentos finales de $10^7 - 10^9$ UFC/g (Erkkilä et al., 2001; Benito et al., 2007). Las especies mayoritarias aisladas en derivados cárnicos fermentados son *Latilactobacillus sakei* (anteriormente llamado *Lactobacillus sakei*), *Latilactobacillus curvatus* (anteriormente llamado *Lactobacillus curvatus*) y *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* (anteriormente llamado *Lactobacillus plantarum*) (Hammes et al., 1990; Hugas et al., 1993), siendo *L. sakei* la especie predominante (Aymerich et al., 2003). Esta microbiota es, en general, capaz de generar por sí sola una adecuada fermentación, pues la adición de sal (con la consecuente disminución de la a_w) y azúcares (como sustrato energético)

favorecen selectivamente su desarrollo. En el ámbito de la elaboración industrial de los derivados cárnicos fermentados crudos-curados es habitual el uso de cultivos iniciadores compuestos por cepas bacterianas debidamente seleccionadas por sus adecuadas características fermentativas (Ammor et al., 2005). Estos cultivos proporcionan a la masa cárnica inicial una elevada carga microbiana que dominará sobre la microbiota endógena, permitiendo que la fermentación se lleve a cabo de una manera más controlada, estandarizando así la calidad del proceso y reduciendo el peligro de que se produzcan deficiencias por microorganismos alterantes o patógenos (Cocconcelli and Fontana, 2014).

Teniendo en cuenta que las lías del cava son ricas en fibras, principalmente β -glucanos y MOS, éstas podrían tener una aplicación como promotoras del crecimiento de BAL, con un potencial impacto positivo en la seguridad de los derivados cárnicos fermentados. De confirmarse, ésta podría ser una estrategia novedosa para la revalorización de este subproducto enológico en línea con las iniciativas actuales de la economía circular. Hasta la fecha, las lías del cava no se han estudiado desde esta perspectiva. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* y en derivados cárnicos fermentados el efecto promotor de las lías del cava en el crecimiento de diferentes cepas de especies de BAL comúnmente utilizadas como cultivos iniciadores en la elaboración de derivados cárnicos fermentados crudos-curados.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Obtención de las lías del cava

Las lías del cava fueron cedidas por la bodega Freixenet S.A. (Sant Sadurní d'Anoia, España). Para eliminar el cava remanente, las lías húmedas se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Posteriormente, las lías se congelaron (-80 °C), liofilizaron (Cryodos-50, Telstar, Terrassa, España), molieron y conservaron en tubos sellados protegidos de la luz y de la humedad hasta su uso.

Evaluación in vitro del efecto de diferentes cantidades de lías del cava en el crecimiento de cepas de BAL

Con el objetivo de seleccionar la concentración más eficaz de lías del cava, se evaluó el efecto promotor del crecimiento de diferentes proporciones de lías (0,5%, 1%, 2% y 5% (p/v)) en 6 cepas diferentes de BAL: *L. sakei* (CTC494 y BAP111), *L. plantarum* (CECT4180 y CECT220), *L. curvatus* (BAP202) y *L. casei* (BAP341). La Figura 4 esquematiza el procedimiento experimental seguido.

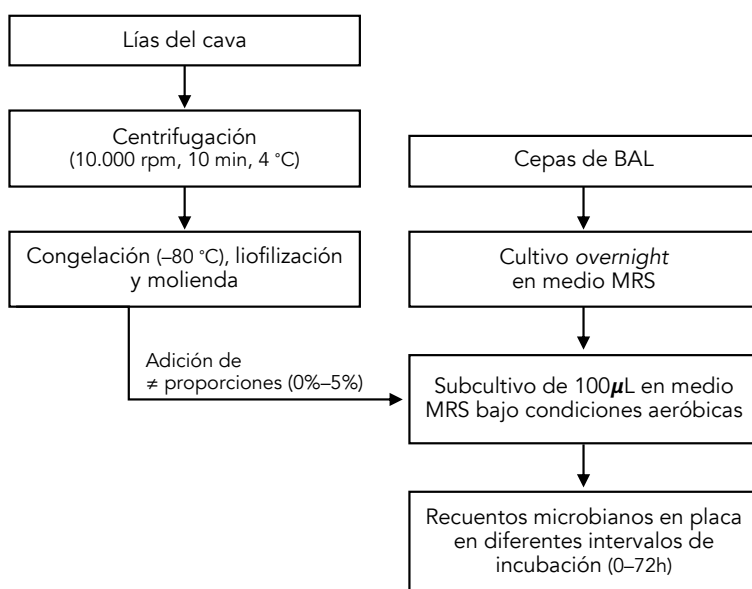


Figura 4. Procedimiento experimental para la evaluación *in vitro* del efecto de las lías del cava en el crecimiento de diferentes cepas de BAL.

Screening del efecto de las lías del cava en el crecimiento de cepas de BAL utilizadas como cultivos iniciadores

Se seleccionaron un total de 10 cepas de BAL por su especial interés tecnológico (cultivos iniciadores), todas ellas incluidas en la lista de microorganismos con estatus de presunción cualificada de seguridad (QPS, por sus siglas en inglés) (Tabla 5). Para cada una de las cepas, se evaluó el efecto de la adición de un 5% de lías (porcentaje previamente seleccionado por mostrar el mayor efecto promotor del crecimiento) tal como se describe en el apartado anterior (Figura 4). Se realizaron tres ensayos independientes para cada cepa bacteriana. La evolución del pH del medio de cultivo se determinó a lo largo del ensayo. Debido a la acidez conferida

por las lías, el valor del pH del medio de cultivo suplementado con las lías se ajustó con KOH (1 M) para equilibrarlo con el de la muestra control.

Tabla 5. Cepas de BAL utilizadas como cultivos iniciadores empleadas para evaluar el efecto promotor del crecimiento de un 5% de lías del cava.

Especie	Cepa	Temperatura óptima de crecimiento	Fuente (Colección)	Crecimiento promovido por las lías del cava
<i>Latilactobacillus sakei</i>	BAP101	30 °C	Grupo de investigación	Sí
	BAP102			Sí
	BAP110			Sí
	BAP111			Sí
	BAP115			Sí
	CTC494		IRTA ¹	Sí
	SM181		CHR Hansen®	No
	FSC111			No
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	BAP201	30 °C	Grupo de investigación	Sí
	BAP202			Sí

¹Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias.

Evaluación del efecto promotor de las lías del cava en el crecimiento de BAL en derivados cárnicos fermentados

A. Elaboración de los derivados cárnicos fermentados

La masa cárnica se preparó a escala piloto mezclando carne magra de cerdo picada y grasa (8:2) molida a través de una placa de 6 mm e inoculándola un cultivo iniciador bioprotector *L. sakei* CTC494, productor de la bacteriocina sakacina K (Garriga et al., 2002) que, previamente, se hizo crecer a 30 °C durante 19 h en medio MRS. Posteriormente, se mezcló la carne molida con (en g/Kg): cloruro de sodio (25), dextrosa (7), pimienta negra (3), ascorbato de sodio (0,5), nitrito de sodio (0,15) y nitrato de potasio (0,15). En los lotes correspondientes también se añadió un 5% (p/p) de lías del cava. La Tabla 6 muestra los diferentes lotes considerados en este estudio. Para cada lote, se introdujeron porciones de 80 g de la masa de carne preparada en bolsas plásticas permeables Tublin10 (Tub-Ex, Tass, Dinamarca) mediante envasado al vacío y se sometieron a un proceso de fermentación (2 días a 23 °C) y curado (19 días a 15 °C).

Tabla 6. Lotes de derivados cárnicos fermentados crudos-curados elaborados para la evaluación del efecto promotor de las lías del cava en el crecimiento de BAL. Los lotes fueron formulados sin o con un 5% (p/p) de lías del cava y *L. sakei* CTC494 como cultivo iniciador.

Lote	Ingrediente	Cepa de cultivo iniciador
C1	-	-
L1	Lías del cava	-
C1+CTC494	-	<i>L. sakei</i> CTC494 ¹
L1+CTC494	Lías del cava	<i>L. sakei</i> CTC494

¹Productor de la bacteriocina sakacina K (Garriga et al., 2002)

B. Análisis microbiológicos y fisicoquímicos

Para los análisis microbiológicos se diluyeron 15 g de cada masa cárnica en solución salina (1/10) (NaCl al 0,85% y Bacto Peptona al 0,1%), se homogeneizaron en una bolsa Blender Smasher® durante 1 min y se volvieron a diluir de manera serial en solución salina. Los recuentos de BAL se realizaron en placas de agar MRS a 30 °C durante 72 h en anaerobiosis. El pH se midió con un electrodo de punción 5232 (Crison Instruments S.A., Alella, España) y un pHmetro portátil PH25 (Crison Instruments S.A., Alella, España) y la a_w con un dispositivo Aqualab 3TE (Decagon Devices, Inc. Pullman, Washington, EE. UU.). Los análisis se realizaron por duplicado a lo largo del proceso de fermentación y maduración (0, 2, 8, 14 y 21 días).

Análisis Estadístico

El efecto promotor del crecimiento de diferentes cantidades de lías se evaluó mediante un ANOVA y pruebas post-hoc de Tukey (IBM SPSS Statistics 23.0). Además, para evaluar el efecto del 5% de lías en el crecimiento de las diferentes cepas ensayadas y sobre el pH del medio se aplicó la prueba t de Student. Las diferencias con $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.

Para determinar las diferencias estadísticas en los recuentos bacterianos, pH y a_w de los derivados cárnicos se realizó un ANOVA de una vía y la prueba post-hoc de Tukey HSD utilizando el "Tiempo" como factor fijo (software JMP).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de diferentes cantidades de lías del cava en el crecimiento de cepas de BAL

La suplementación del medio de cultivo con lías del cava resultó en una mayor concentración de células viables de las diferentes cepas de BAL en comparación con el medio control (sin lías). En general, el efecto de las lías fue diferente en función de la cepa y de la dosis considerada. Tal y como se puede observar en la Figura 5, a partir de las 6 h de cultivo ya se observaron, en algunas cepas, mayores recuentos microbianos debido al efecto de las lías del cava, aunque éstos solo fueron estadísticamente significativos en el caso de las dos cepas de *L. sakei* ($p < 0,05$). A las 24 h, las diferencias observadas por la presencia de lías fueron ya estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en cuatro cepas (*L. sakei* CTC494, *L. sakei* BAP111, *L. curvatus* BAP202, y *L. casei* BAP341) y a todas las cantidades de lías ensayadas. Además, cabe destacar que el efecto de las lías del cava fue diferente en función de la cantidad utilizada, siendo el 2% y el 5% los porcentajes que provocaron un efecto más pronunciado ($p < 0,05$) en el crecimiento bacteriano (24 h) y/o la supervivencia (48 h). Con respecto a las cepas de *L. plantarum*, no se observó ningún efecto hasta las 48 h de incubación ($p < 0,05$). En este punto, los mayores recuentos de *L. plantarum* también se obtuvieron con la adición de un 2% y 5% de lías.

En definitiva, de todas las proporciones de lías del cava evaluadas, la adición de un 5% resultó ser la más efectiva en todas las cepas ensayadas. Esto se tradujo en concentraciones de BAL de entre 0,6 y 1,3 $\log_{10}$ más altas que en los cultivos sin lías, tanto a las 24 h como a las 48 h de incubación. En la literatura científica, otros estudios también han descrito un efecto promotor de diferentes subproductos vegetales en el crecimiento de las BAL, a concentraciones que van desde un 1% hasta un 10% (Sendra et al., 2008a; Matoušková et al., 2016; Gómez et al., 2019a; Lacerda Massa et al., 2020a; Silva de Andrade et al., 2020). Otro estudio ha reportado que incluso cantidades mayores de un subproducto (hasta un 20%), concretamente oligosacáridos purificados de salsa de soja tuvieron un efecto estimulante en el crecimiento *in vitro* de ciertas BAL (Yang et al., 2011).

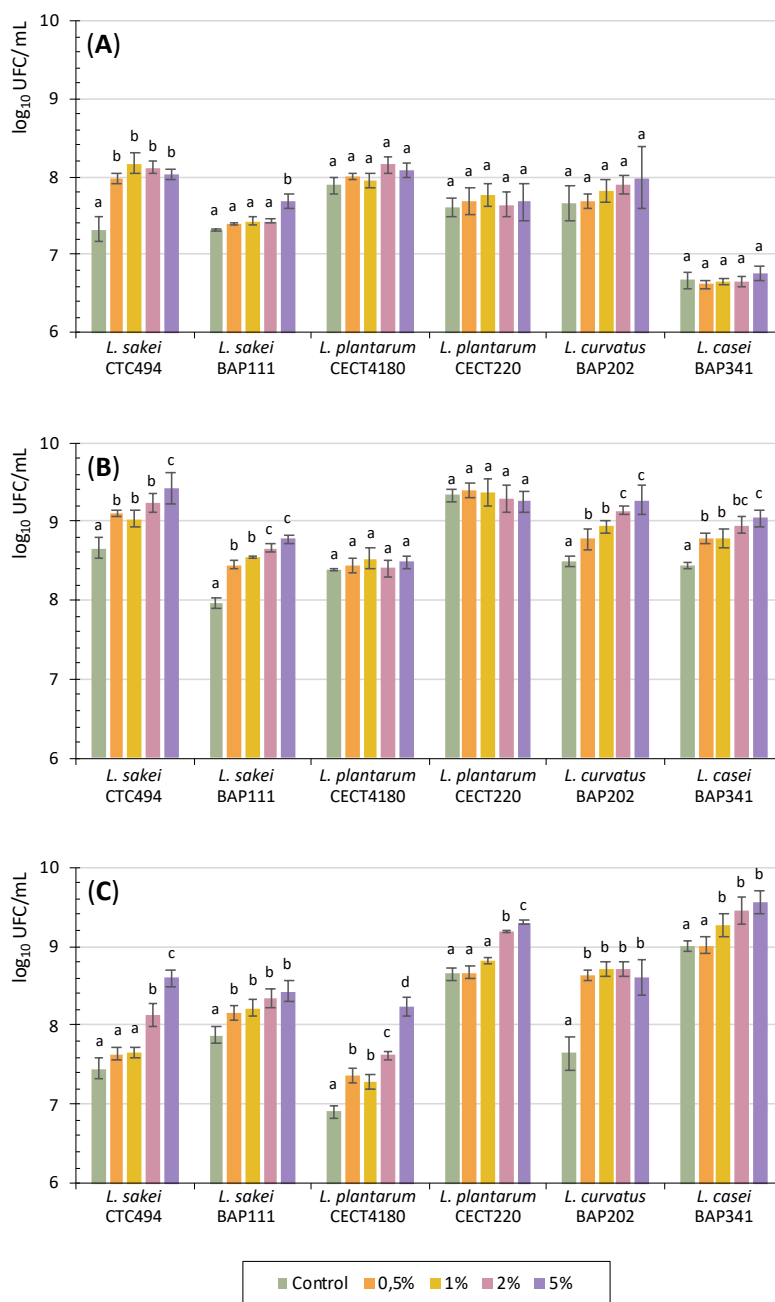


Figura 5. Concentración microbiana de 6 cepas de BAL en medio de cultivo sin (control) y con diferentes cantidades de lías del cava después de 6 h (A), 24 h (B) y 48 h (C) de incubación. Los resultados corresponden al promedio y desviación estándar (barras) de tres experimentos independientes. Las diferentes letras minúsculas denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las cantidades de lías del cava añadidas.

Screening del efecto de las lías del cava en el crecimiento de cepas de BAL utilizadas como cultivos iniciadores

La Tabla 5 indica la respuesta de cada una de las cepas frente a la adición de un 5% (p/v) de lías del cava, en términos de crecimiento. En ocho de las diez cepas ensayadas se observó un recuento microbiano significativamente mayor ($p < 0,05$) debido a la presencia de lías del cava, aunque este efecto varió en función de la cepa considerada (Figura 6). Las únicas cepas que no mostraron este efecto fueron *L. sakei* SM189 y *L. sakei* FSC111.

En cuanto a las seis cepas de *L. sakei* (BAP101, BAP102, BAP110, BAP111, BAP115 y CTC494), la adición de un 5% de lías del cava provocó una mayor tasa de crecimiento en comparación con el control durante la fase de crecimiento exponencial. Así, las diferencias en la densidad de población al final de la fase exponencial fueron de 0,7 a 1,1 $\log_{10}$ con respecto al control ($p < 0,05$). En general, estos recuentos más altos se mantuvieron hasta el final del periodo de incubación (72 horas). Por otro lado, el mayor crecimiento bacteriano de las cepas de *L. sakei* en presencia de lías también dio lugar a una mayor disminución del pH del medio en todas las cepas (Figura 6). El aumento de la acidez del medio de cultivo fue significativamente mayor y más rápido durante las primeras 24 h (valores de pH de entre 4,2 y 4,7, dependiendo de la cepa), coincidiendo con la fase de crecimiento exponencial ($p < 0,05$). El pH del medio sin lías fue superior en todos los casos, con valores de entre 4,7 y 5,3 unidades de pH.

En el caso de las dos cepas *L. curvatus*, se observó un aumento significativo del crecimiento en comparación con el control ($p < 0,05$). *L. curvatus* BAP202, cuya tasa de crecimiento no se vio afectada durante las primeras horas de incubación, alcanzó una mayor densidad de población con respecto al control, con diferencias en la concentración de hasta 1,5 $\log_{10}$ y un pH 0,7 puntos menor. En el caso de *L. curvatus* BAP201, a pesar de que se observó un mayor crecimiento en presencia de lías del cava, el nivel de acidificación del medio fue muy similar con o sin la adición de lías.

Estos resultados se han obtenido tras la adición de un 5% de lías, por lo que proporciones más altas de este subproducto podrían traducirse en un mayor efecto

promotor del crecimiento o, incluso, un efecto en aquellas cepas para las que no se ha observado respuesta en este ensayo.

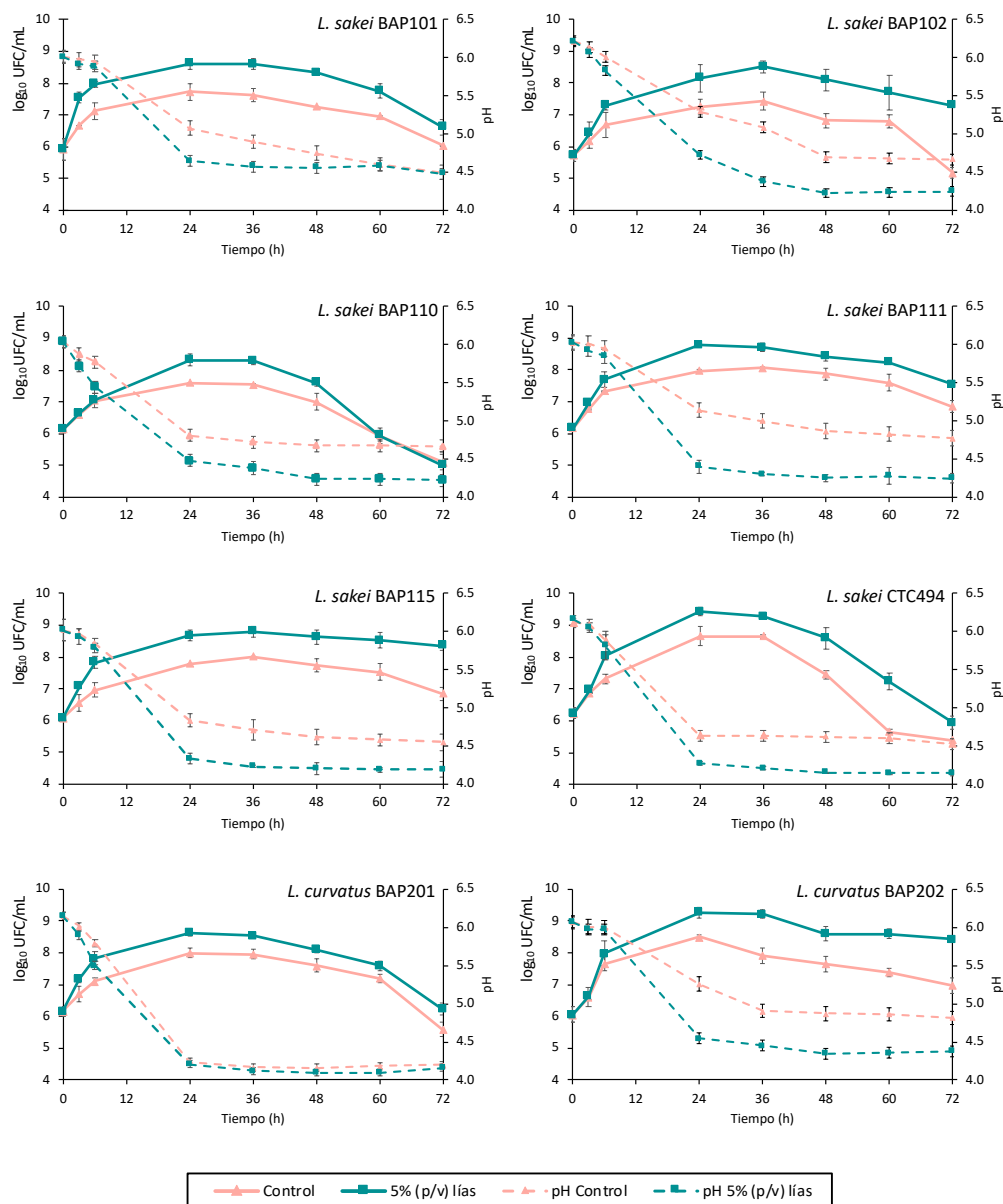


Figura 6. Cinética de crecimiento y evolución del pH de las cepas de BAL utilizadas como cultivos iniciadores cultivadas sin (control) y con 5% de lías del cava. Se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los resultados corresponden al promedio y desviación estándar (barras) de tres experimentos independientes.

Algunos estudios previos han utilizado con éxito varios subproductos vegetales con el objetivo de mejorar las propiedades nutricionales, de textura y sensoriales de productos lácteos y cárnicos fermentados crudos-curados (Fernández-López et al., 2008; Sendra et al., 2008a; Sánchez-Zapata et al., 2013; Mendes et al., 2014). Sin embargo, todavía son pocos los datos disponibles sobre el efecto de la aplicación de subproductos en la seguridad microbiológica de alimentos fermentados, y ninguno *in vitro* (Sayas-Barberá et al., 2012; Mikami et al., 2020). Sayas-Barberá et al. (2012) demostraron un efecto positivo en la seguridad alimentaria de derivados cárnicos fermentados crudos-curados tras la adición de un 1% de un subproducto rico en fibra, obtenido a partir de la producción de zumo de naranja, combinado con la cepa probiótica *L. casei* CTC475. La suplementación con este subproducto cítrico promovió el crecimiento y la supervivencia de las BAL, resultando en una mayor acidificación de los derivados cárnicos sin afectar negativamente sus propiedades sensoriales. Más recientemente, también se evaluó el efecto de las lías del sake (*i.e.*, el subproducto obtenido del proceso de elaboración de la bebida japonesa de arroz fermentado) en derivados fermentados crudos-curados, observando un mayor recuento de BAL y valores de pH más bajos durante el periodo de curado (Mikami et al., 2020).

Evaluación del efecto promotor de las lías del cava en el crecimiento de BAL en derivados cárnicos fermentados

Se estudiaron diferentes lotes de derivados cárnicos fermentados espontáneamente o inoculados con el cultivo iniciador *L. sakei* CTC494 sin y con la adición del 5% de lías del cava.

En primer lugar, se caracterizaron diferentes parámetros fisicoquímicos (pH y a_w) de los diferentes lotes de derivados cárnicos fermentados. Los derivados cárnicos suplementados con un 5% (p/p) de lías presentaron valores iniciales de pH más bajos que los lotes no suplementados, debido a la acidez de este subproducto vitivinícola (pH $3,2 \pm 0,02$) (Tabla 7). Durante la fermentación, el pH de los derivados cárnicos fermentados inoculados con el cultivo iniciador descendió significativamente hasta valores $<5,3$ ($p < 0,05$), mientras que en aquellos productos fermentados espontáneamente tuvo lugar una acidificación más lenta y leve (L1 y

C1) como consecuencia de los bajos niveles iniciales de BAL (Figura 7). Durante el proceso de maduración de todos los lotes, se observó un aumento de los valores de pH que se explica por la formación de compuestos alcalinos durante la proteólisis (Bover-Cid et al., 1999). En todos los casos, la presencia de lías se asoció a valores de pH más bajos. La diferencia de los valores de pH en los derivados cárnicos fermentados espontáneamente con y sin lías (L1 y C1, respectivamente) osciló entre 0,46, en el tiempo cero, y 0,85 al final del curado. Además, también se observó un efecto sinérgico cuando se combinaron lías del cava con *L. sakei* CTC494 (L1+CTC494), lo que dio lugar a un valor final de pH 1,23 unidades inferior al del control (C1, sin lías del cava ni cultivo iniciador). Este efecto de la adición de subproductos vegetales sobre los valores del pH de derivados cárnicos fermentados también ha sido reportado por otros autores, principalmente con subproductos cítricos debido a su acidez intrínseca (Fernández-López et al., 2007; Yalinkiliç et al., 2012a; Tremonte et al., 2020).

Tabla 7. Valores de pH y a_w (media $\pm$ desviación estándar) durante la fermentación y curado de los derivados cárnicos. Los lotes incluían derivados cárnicos crudos-curados fermentados espontáneamente sin (C1) o con (L1) lías del cava, o fermentados con el cultivo iniciador *L. sakei* CTC494 sin (C1+CTC494) y con (L1+CTC494) lías.

	Día	Lote			
		C1	L1	C1+CTC494	L1+CTC494
pH	0	5,67 $\pm$ 0,01 ^a	5,20 $\pm$ 0,14 ^b	5,66 $\pm$ 0,02 ^a	5,22 $\pm$ 0,09 ^b
	2	5,74 $\pm$ 0,01 ^a	5,43 $\pm$ 0,04 ^b	5,07 $\pm$ 0,01 ^c	4,89 $\pm$ 0,01 ^d
	4	5,62 $\pm$ 0,02 ^a	5,39 $\pm$ 0,01 ^b	4,93 $\pm$ 0,01 ^c	4,76 $\pm$ 0,01 ^d
	8	5,44 $\pm$ 0,02 ^a	5,35 $\pm$ 0,01 ^b	5,01 $\pm$ 0,02 ^c	4,80 $\pm$ 0,01 ^d
	14	5,36 $\pm$ 0,05 ^a	5,18 $\pm$ 0,03 ^{ab}	5,40 $\pm$ 0,15 ^a	4,91 $\pm$ 0,00 ^b
	21	6,26 $\pm$ 0,38 ^a	5,41 $\pm$ 0,05 ^b	5,28 $\pm$ 0,05 ^b	5,03 $\pm$ 0,05 ^b
a_w	0	0,973 $\pm$ 0,001 ^a	0,972 $\pm$ 0,000 ^a	0,973 $\pm$ 0,000 ^a	0,972 $\pm$ 0,001 ^a
	2	0,972 $\pm$ 0,000 ^a	0,971 $\pm$ 0,000 ^a	0,972 $\pm$ 0,000 ^a	0,972 $\pm$ 0,000 ^a
	4	0,974 $\pm$ 0,000 ^a	0,972 $\pm$ 0,000 ^a	0,969 $\pm$ 0,000 ^a	0,970 $\pm$ 0,000 ^a
	8	0,969 $\pm$ 0,000 ^a	0,969 $\pm$ 0,000 ^a	0,967 $\pm$ 0,000 ^b	0,964 $\pm$ 0,000 ^c
	14	0,963 $\pm$ 0,000 ^a	0,964 $\pm$ 0,000 ^b	0,965 $\pm$ 0,000 ^{ab}	0,960 $\pm$ 0,000 ^c
	21	0,960 $\pm$ 0,000 ^b	0,966 $\pm$ 0,000 ^a	0,962 $\pm$ 0,000 ^{ab}	0,961 $\pm$ 0,000 ^b

Los valores son la media $\pm$ desviación estándar de los triplicados.

Para cada día de muestreo, las diferencias significativas entre lotes se indican con letras de superíndice diferentes ($p < 0,05$).

Los valores de a_w disminuyeron gradualmente a lo largo de los 21 días de curado debido al proceso de secado que siguen los derivados cárnicos fermentados

(Tabla 7). No se observaron diferencias significativas entre los diferentes lotes, ni por la inoculación del cultivo iniciador ni por la adición de lías del cava ($p > 0,05$).

La Figura 7 muestra el crecimiento de las BAL en los diferentes lotes de derivados cárnicos a lo largo del proceso de fermentación y curado. Los lotes formulados con el cultivo iniciador (C1+CTC494 y L1+CTC494) mostraron los recuentos de BAL más elevados, que fueron de 5,9 $\log_{10}$ UFC/g al inicio y superiores a los 9 $\log_{10}$ UFC/g a partir del día 8 de curado. En el caso de los niveles de BAL en los derivados cárnicos fermentados elaborados sin cultivo iniciador (C1 y L1), estos fueron inicialmente de ca. 1,2 $\log_{10}$ UFC/g y alcanzaron los 8,3 $\log_{10}$ UFC/g al octavo día de elaboración. Durante el proceso de maduración, estos niveles se mantuvieron siempre ligeramente inferiores respecto a los de los derivados cárnicos fermentados elaborados con un cultivo iniciador.

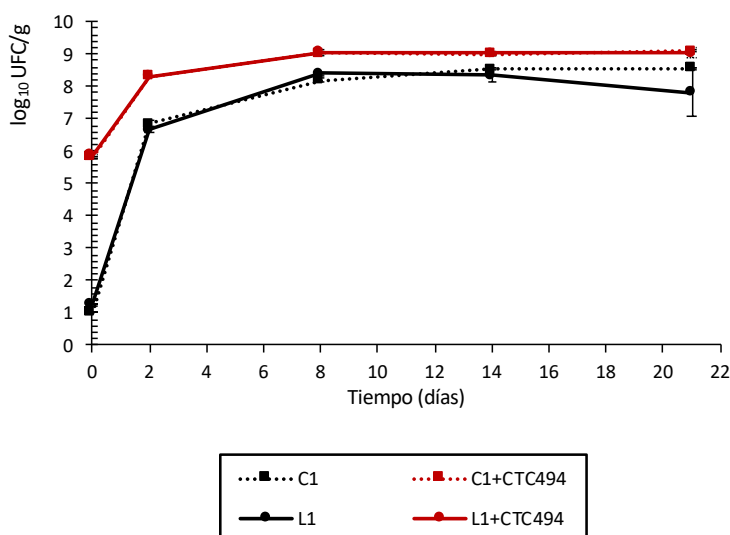


Figura 7. Crecimiento de BAL en derivados cárnicos crudos-curados fermentados espontáneamente sin (C1) o con (L1) la adición de 5% de lías del cava o fermentados con el cultivo iniciador *L. sakei* CTC494 sin (C1+CTC494) o con (L1+CTC494) 5% de lías.

Con el actual diseño de estudio y la composición de la matriz cárnica, la adición de las lías del cava no promovió el crecimiento de BAL en comparación con los lotes control, tanto en el caso de la fermentación espontánea como con *L. sakei* CTC494.

Estos resultados no concuerdan con los obtenidos *in vitro* en el marco de esta tesis doctoral también utilizando el cultivo iniciador *L. sakei* CTC494. Así, en el ensayo *in vitro*, la suplementación del medio de cultivo con la misma cantidad de lías del cava (5%) resultó en recuentos significativamente mayores de BAL en comparación con un medio control (sin lías). Concretamente, en el caso de *L. sakei* CTC494, la densidad poblacional máxima fue de 0,8 unidades logarítmicas mayor con lías que sin lías. La menor cantidad de sustrato fácilmente fermentable en la formulación de los derivados cárnicos fermentados (i.e., 0,7% de dextrosa) en comparación con los medios de cultivo *in vitro* (i.e., caldo MRS con 2% de dextrosa) no favoreció el uso de la fibra de lías del cava por parte de las BAL para promover su crecimiento.

A pesar de que algunos estudios también han demostrado un efecto significativo de subproductos ricos en fibra en la promoción del crecimiento de cepas específicas de BAL mediante estudios *in vitro* (Yang et al., 2011; Gómez et al., 2019a), varios trabajos que evaluaron este mismo efecto en derivados cárnicos fermentados crudos-curados no reportaron ningún efecto positivo sobre las BAL tras la adición de subproductos de limón, naranja, chufa, melocotón o manzana (García et al., 2002; Fernández-López et al., 2008; Sánchez-Zapata et al., 2013; Tremonte et al., 2020). Sin embargo, Yalinkiliç et al. (2012) sí que obtuvieron mayores recuentos de BAL en derivados cárnicos fermentados con un 4% de fibra de naranja en comparación con el control sin fibra añadida, aunque la diferencia en los recuentos medios fue muy baja (0,24 unidades $\log_{10}$).

3.2 Estudio del efecto antimicrobiano de las lías del cava y de su extracto fenólico frente a bacterias patógenas de origen alimentario en derivados cárnicos fermentados.

PUBLICACIÓN 2

Revalorization of Cava Lees to Improve the Safety of Fermented Sausages.

Salvador Hernández-Macias, Nuria Ferrer-Bustins, Oriol Comas-Basté, Anna Jofré, M. Luz Latorre-Moratalla, Sara Bover-Cid, M. Carmen Vidal-Carou
Foods, 2021, 10(8), 1916.

Índice de impacto (SJR 2020): 0,774

Posición en el área de conocimiento "Food Science": Q1 (73/332)

COMUNICACIÓN ORAL

Salvador Hernández-Macias, Nuria Ferrer-Bustins, Oriol Comas-Basté, Anna Jofré, M. Luz Latorre-Moratalla, Sara Bover-Cid, M. Carmen Vidal-Carou. **Revalorización de las lías del cava para mejorar la seguridad de derivados cárnicos fermentados: Una estrategia hacia un futuro más sostenible.** *Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad Alimentaria*, 2021, En línea.

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVO

En los últimos años se ha planteado una estrategia de revalorización consistente en el uso de compuestos fenólicos de subproductos vegetales como antioxidantes naturales o por su efecto antimicrobiano en la formulación de diferentes productos alimenticios (van Ba et al., 2017). De hecho, se ha comprobado que ciertos compuestos fenólicos ayudan a reducir el crecimiento de algunas de las bacterias patógenas más comúnmente transmitidas por los alimentos (*i.e.*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *L. monocytogenes*) (Taguri et al., 2004; Papadopoulou et al., 2005; Cetin-Karaca and Newman, 2015; Mattos et al., 2017).

A lo largo del proceso de elaboración del cava, el contacto sostenido de las lías con el vino durante la crianza *sur lie* las enriquece con importantes cantidades de compuestos fenólicos y ácidos orgánicos. En el marco de la posible revalorización de las lías del cava desde el punto de vista de la seguridad de los derivados cárnicos fermentados, la presencia de este tipo de compuestos en las lías permite plantear también su potencial acción antimicrobiana frente a bacterias patógenas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto inhibitorio de las lías del cava y de su

extracto fenólico (LPE, *lees phenolic extract*) en el crecimiento de bacterias patógenas transmitidas por los alimentos. Para ello se realizó un *challenge test* en derivados cárnicos fermentados crudos-curados inoculados con diferentes cepas de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un *challenge test* utilizando diferentes cepas patógenas de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* en derivados cárnicos crudos-curados, fermentados espontáneamente o con los cultivos iniciadores *L. sakei* CTC494 o *L. sakei* BAP110. Se planteó un primer experimento adicionando a los derivados cárnicos un 5% de lías del cava liofilizadas (experimento 1) y otro con un 0,3% de LPE (experimento 2). Se elaboraron un total de 10 lotes de derivados cárnicos fermentados (Tabla 8).

Tabla 8. Lotes de derivados cárnicos fermentados crudos-curados formulados sin o con un 5% (p/p) de lías del cava o con un 0,3% (p/p) del extracto fenólico de lías (LPE) y/o diferentes cepas de *L. sakei* como cultivo iniciador.

Experimento	Lote	Ingrediente	Cepa de cultivo iniciador
1	C1	-	-
	L1	Lías del cava	-
	C1+CTC494	-	<i>L. sakei</i> CTC494 ¹
	L1+CTC494	Lías del cava	<i>L. sakei</i> CTC494
2	C2	-	-
	E2	LPE	-
	C2+CTC494	-	<i>L. sakei</i> CTC494 ¹
	E2+CTC494	LPE	<i>L. sakei</i> CTC494
	C2+BAP110	-	<i>L. sakei</i> BAP110
	E2+BAP110	LPE	<i>L. sakei</i> BAP110

¹Productor de la bacteriocina sakacina K (Garriga et al., 2002)

Elaboración de los derivados cárnicos fermentados

Para el *challenge test* se utilizaron tres cepas diferentes de *Listeria monocytogenes* (CTC1034-serotipo 4b, 12MOB045LM-genoserotipo II y Scott A-serotipo 4b) y de *Salmonella enterica* (CTC1003-serotipo London, CTC1756-serotipo Derby y CCUG34136-serotipo *Enteritidis*). Estos cultivos se prepararon haciendo crecer cada cepa de forma independiente en medio de cultivo BHI (*Brain Infusion Heart*)

a 37 °C durante 7 h y posteriormente se subcultivaron nuevamente a la misma temperatura durante 18 h hasta alcanzar la fase estacionaria.

Para elaborar los derivados cárnicos, la masa cárnica se preparó a escala piloto bajo medidas de bioseguridad mezclando carne magra de cerdo picada y grasa (8:2) molida a través de una placa de 6 mm e inoculándola con una mezcla de las seis cepas de *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. (la misma cantidad para cada cepa) a un nivel de aproximadamente 6 log₁₀ UFC/g. Posteriormente, se mezcló la carne molida con (en g/Kg): cloruro de sodio (25), dextrosa (7), pimienta negra (3), ascorbato de sodio (0,5), nitrito de sodio (0,15) y nitrato de potasio (0,15). Para cada lote, se introdujeron porciones de 80 g de la masa de carne preparada en bolsas plásticas permeables Tublin10 (Tub-Ex, Tass, Dinamarca) mediante envasado al vacío y se sometieron a un proceso de fermentación (2 días a 23 °C) y curado (19 días a 15 °C). Dependiendo del experimento, se añadió un 5% (p/p) de lías del cava o un 0,3% (p/p) de LPE.

El LPE se obtuvo según el método descrito por Silva et al. (2018) con algunas modificaciones. Tras evaluar diferentes proporciones de solventes de extracción (50/50, 80/20 y 100/0), se seleccionó la mezcla de etanol-agua 80/20 por mostrar un mayor rendimiento de extracción de polifenoles. Brevemente, el extracto se realizó a partir de 1 g de lías liofilizadas con 10 mL del solvente de extracción acidificado con ácido acético. La mezcla se sonicó durante 30 min y se centrifugó (2500 × g durante 10 min a 4 °C) para aislar el sobrenadante. Se realizaron dos extracciones consecutivas y los sobrenadantes recolectados se evaporaron al vacío. El contenido fenólico total del extracto, expresado en mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g, se determinó mediante el método descrito por (Vallverdú-Queralt et al., 2011).

Análisis microbiológicos

Para los análisis microbiológicos se diluyeron 15 g de derivado cárnico en solución salina (1/10) (NaCl al 0,85% y Bacto Peptona al 0,1%), se homogeneizaron en una bolsa Blender Smasher® durante 1 min y se volvieron a diluir de manera serial en solución salina. *L. monocytogenes* se enumeró en agar cromogénico CHROMagar

Listeria después de la incubación a 37 °C durante 48 h. *Salmonella* se enumeró en agar cromogénico CHROMagar Salmonella Plus después de la incubación a 37 °C durante 24 h. Los análisis se realizaron por duplicado a lo largo del proceso de fermentación y maduración a los tiempos 0, 2, 8, 14 y 21 días en el experimento 1 y 0, 2, 9, 14 y 21 días en el experimento 2.

Análisis estadístico

Para determinar las diferencias estadísticas en los recuentos bacterianos entre diferentes lotes de los derivados cárnicos se realizó un ANOVA de una vía y la prueba post-hoc de Tukey HSD utilizando el “Tiempo” como factor fijo (software JMP). Las diferencias con $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de las lías del cava en el crecimiento de bacterias patógenas en derivados cárnicos fermentados (Experimento 1)

La Figura 8 muestra el comportamiento de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* durante la fermentación y maduración de los cuatro lotes de derivados cárnicos fermentados. La presencia de un 5% de lías del cava tuvo un efecto antipatogénico, reduciendo la carga de *Salmonella* y *L. monocytogenes*, tanto en los lotes fermentados espontáneamente como en aquellos inoculados con cultivo iniciador. La cepa *L. sakei* CTC494 se seleccionó como cultivo bioprotector capaz de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* al ser productora de la bacteriocina sakacina K (Garriga et al., 2002). Aunque la sakacina K no tiene un efecto inhibidor específico sobre bacterias Gram-negativas como *Salmonella*, la presencia del cultivo iniciador aceleró la acidificación, potenciando la inactivación de *Salmonella*.

En cuanto al efecto antimicrobiano (inhibición del crecimiento) de *Salmonella*, se obtuvieron recuentos significativamente menores en el lote formulado con lías (L1) en todos los tiempos de muestreo. Estos recuentos llegaron a ser de hasta 2,7 unidades $\log_{10}$ más bajos que en C1 en el día 8 ($p < 0,05$). Es importante destacar que el efecto inhibitorio de las lías del cava sobre los niveles de *Salmonella* fue muy similar al ejercido por el cultivo iniciador. Además, la combinación de las lías con

L. sakei CTC494 (L1+CTC494) potenció el efecto antimicrobiano, dando lugar a recuentos de *Salmonella* significativamente más bajos a lo largo del proceso de fermentación y maduración, observándose tanto un efecto bacteriostático como bactericida. Al final del curado (día 21), los recuentos de *Salmonella* fueron 4,3 unidades $\log_{10}$ más bajos que en el lote control (C1, $p < 0,05$).

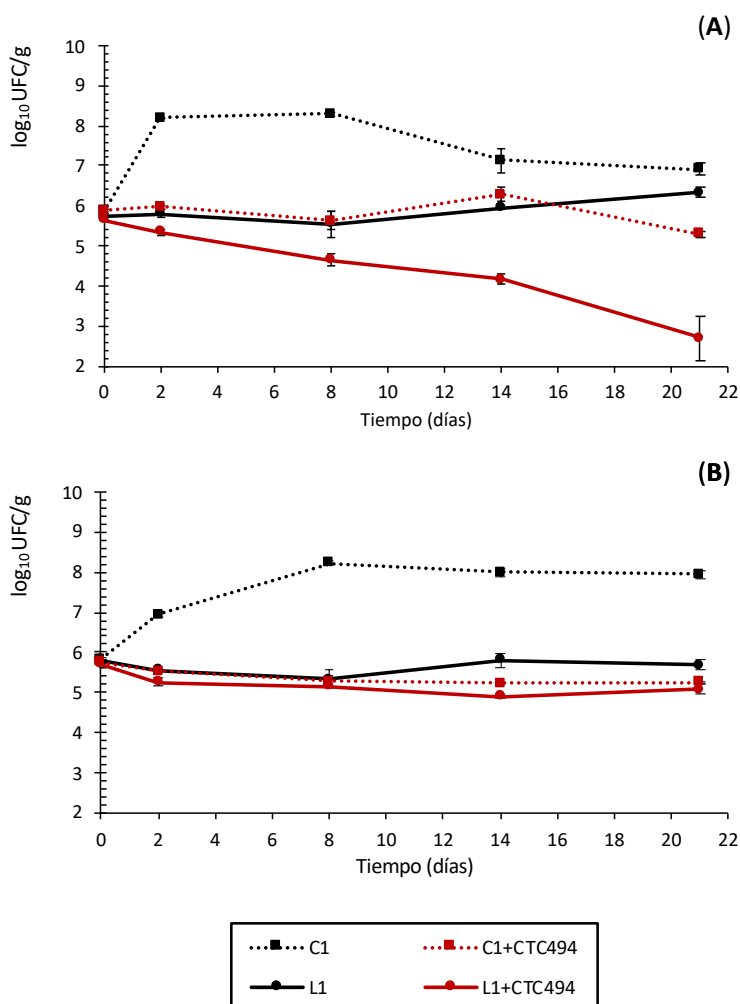


Figura 8. Recuentos de cepas de *Salmonella* (A) y *L. monocytogenes* (B) en derivados cárnicos crudos-curados fermentados espontáneamente sin (C1) o con (L1) la adición del 5% de lías del cava o fermentados con el cultivo iniciador *L. sakei* CTC494 sin (C1+CTC494) o con (L1+CTC494) lías.

En lo que respecta a *L. monocytogenes*, la adición de lías se tradujo en una inhibición de su crecimiento similar a la ejercida por *L. sakei* CTC494, productor de la bacteriocina. En comparación con el control, los recuentos de *L. monocytogenes* fueron 2,3 y 2,9 log₁₀ unidades más bajos en aquellos lotes formulados con lías aplicadas solas o junto con *L. sakei* CTC494, respectivamente ($p < 0,05$).

Hasta la fecha, existen muy pocos estudios que se hayan centrado en la revalorización de subproductos por su efecto antimicrobiano frente a bacterias patógenas transmitidas por los alimentos, especialmente en productos fermentados. Por ejemplo, Zokaityte et al. (2020) han reportado el efecto inhibitor de un subproducto de manzana frente al desarrollo de bacterias patógenas y oportunistas en una bebida de leche fermentada (Zokaityte et al., 2020). Más recientemente, Ramachandraiah and Chin (2021) han demostrado el efecto antimicrobiano de un subproducto de apio en polvo al observar una disminución significativa de los recuentos totales de enterobacterias en salchichas cocidas (Ramachandraiah and Chin, 2021). No obstante, en un estudio realizado en derivados cárnicos fermentados suplementados con un subproducto a base de cáscara de limón se registraron niveles más altos de *Listeria innocua* en comparación con los derivados cárnicos no suplementados (Tremonte et al., 2020).

En nuestro estudio, además del efecto inhibitor del crecimiento del cultivo iniciador *L. sakei* CTC494, los bajos valores de pH alcanzados al inicio de la fermentación en los lotes suplementados con lías del cava (pH cerca de 5,2 en L1 y L1+CTC494) podrían ser otro factor que explicase los menores recuentos de patógenos en estos lotes. De hecho, según la tecnología de obstáculos (*hurdle technology*) para la conservación de alimentos, el pH se considera un factor crucial en el control de las bacterias patógenas en derivados cárnicos fermentados crudos-curados, especialmente en combinación con una baja a_w (Leistner, 2000). En comparación con *Salmonella*, *L. monocytogenes* es más tolerante a los entornos más hostiles que suelen encontrarse en las últimas fases de curado, caracterizados por bajos valores de pH y a_w , lo que podría explicar su menor reducción en los lotes formulados con lías (International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1996; Jofré et al., 2009; Serra-Castelló et al., 2021a). Por último,

además del efecto del pH, ciertos componentes de las lías del cava, como los polifenoles y/o los ácidos orgánicos, también podrían desempeñar un papel en la actividad antimicrobiana de este subproducto. Cabe destacar que los polifenoles suelen ser más activos frente a las bacterias Gram-positivas que frente a las Gram-negativas, lo que puede atribuirse a diferencias en la estructura de la pared celular bacteriana (Taguri et al., 2004; Cetin-Karaca and Newman, 2015; Silva et al., 2018; Menchetti et al., 2020; Piekarska-Radzik and Klewicka, 2021).

Efecto del LPE en el crecimiento de bacterias patógenas en derivados cárnicos fermentados (Experimento 2)

Para conocer si la actividad antimicrobiana de las lías del cava podría atribuirse también a su fracción fenólica, se realizó un segundo *challenge test* en derivados cárnicos fermentados crudos-curados, pero en este caso añadiendo un extracto fenólico en lugar de lías del cava. En este experimento, además del efecto del cultivo iniciador bacteriocinogénico *L. sakei* CTC494, se evaluó también el de un cultivo no bacteriocinogénico (*L. sakei* BAP110).

El contenido de fenoles totales en el LPE fue de $152,2 \pm 3,5$ mg EAG/g. El contenido fenólico de las lías de cava o de vino difiere ampliamente entre estudios, incluso entre aquellos que utilizan la misma metodología de extracción y determinación, con valores medios que oscilan entre los 26 y los 254 mg EAG/g (Aguilera, 2016; Romero-Díez et al., 2018; Jara-Palacios, 2019c). Según (Jara-Palacios, 2019c), el contenido fenólico de las lías del vino depende de la variedad de uva y de otros factores relacionados con el proceso de vinificación. Los principales compuestos fenólicos encontrados en las lías del cava son el ácido caftárico, la catequina y la epicatequina, que son también los fenoles más abundantes en los vinos espumosos (Aguilera, 2016). Se ha descrito que las paredes celulares de las levaduras poseen una gran capacidad de adsorción de compuestos fenólicos del vino, siendo su contenido frecuentemente mayor que el de otros tipos de subproductos vitivinícolas, como las semillas, los tallos y la piel de la uva (Razmkhab et al., 2002; Morata et al., 2005; Mazauric and Salmon, 2006; Gallardo-Chacón et al., 2010; Barcia et al., 2014).

El efecto antimicrobiano del LPE contra *Salmonella* y *L. monocytogenes*, solo o combinado con *L. sakei* CTC494 o *L. sakei* BAP110, se muestra en la Figura 9. En los lotes en los que no se añadió ningún cultivo iniciador, la adición del LPE tuvo muy poco efecto sobre *Salmonella*, cuyo crecimiento durante los primeros días de fermentación fue similar al del control (sin LPE ni cultivo iniciador). Sin embargo, al final del proceso de curado sí se observó una mayor reducción, con recuentos de este patógeno 0,71 unidades $\log_{10}$ inferiores a los del control. En el caso de *L. monocytogenes*, no se observaron diferencias significativas respecto al control debido a la adición de LPE.

La inoculación de los derivados cárnicos con los cultivos iniciadores, y tal como era de esperar, mostró un fuerte efecto antimicrobiano sobre *Salmonella* y *L. monocytogenes*, dando como resultado recuentos significativamente menores (en 3–4 unidades $\log_{10}$) al final del proceso de curado en comparación con los lotes control fermentados espontáneamente. No se observó ningún efecto adicional cuando se añadió el LPE junto con los cultivos iniciadores. Si comparamos el efecto de ambos cultivos iniciadores, en el caso de *Salmonella*, *L. sakei* CTC494 y *L. sakei* BAP110 mostraron el mismo efecto antimicrobiano. En cuanto a *L. monocytogenes*, *L. sakei* CTC494 no sólo impidió su crecimiento, sino que ejerció un efecto listericida desde el inicio de la fermentación. Sin embargo, *L. sakei* BAP110 (no bacteriocinogénico) no previno el crecimiento de *L. monocytogenes* durante la fermentación, pero sí a lo largo del curado. Esta mayor letalidad puede estar relacionada con el ya reportado efecto específico anti-*Listeria* de *L. sakei* CTC494 en diferentes matrices alimentarias (Garriga et al., 2002; Aymerich et al., 2019; Serra-Castelló et al., 2021b).

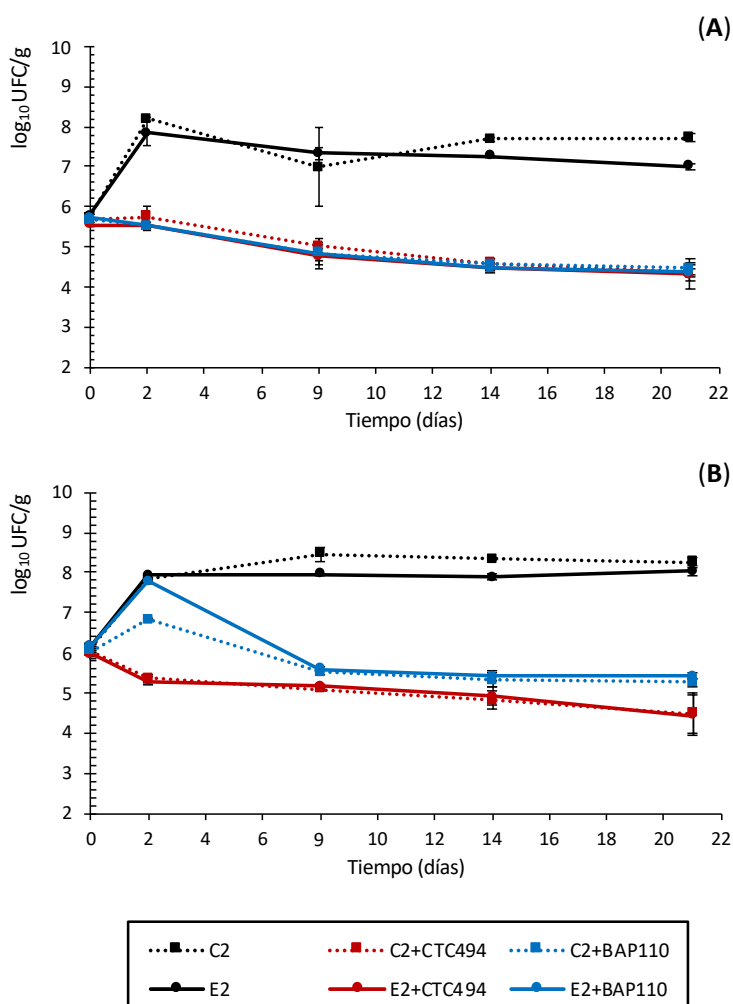


Figura 9. Recuentos de cepas de *Salmonella* (A) y *L. monocytogenes* (B) en derivados cárnicos crudos-curados fermentados espontáneamente sin (C2) o con (E2) la adición de 0,3% de LPE o fermentados con el cultivo iniciador *L. sakei* CTC494 o *L. sakei* BAP110 sin (C2+CTC494 o C2+BAP110) o con (E2+CTC494 o E2+BAP110) el LPE.

En la literatura se encuentra ampliamente descrito el efecto antimicrobiano *in vitro* de los polifenoles contra varias bacterias patógenas, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* (Payne et al., 1989; Taguri et al., 2004; Serra et al., 2008; Cetin-Karaca and Newman, 2015; Silva et al., 2018; Piekarska-Radzick and Klewicka, 2021). Los resultados obtenidos en este trabajo acerca del efecto del LPE en el crecimiento de *Salmonella* (Experimento 2) sugieren que el efecto anti-*Salmonella* de las lías del cava (Experimento 1) podría atribuirse

parcialmente a la fracción fenólica de este subproducto. Sin embargo, no se observó ningún efecto del LPE contra *L. monocytogenes*. Aunque la mayoría de los estudios describen que las bacterias Gram-positivas son mucho más susceptibles a los polifenoles que las Gram-negativas, esta tendencia no fue respaldada por los resultados del presente experimento (Papadopoulou et al., 2005; Serra et al., 2008; Klancnik et al., 2009; Silva et al., 2018).

La eficacia antimicrobiana descrita para los extractos ricos en polifenoles contra las bacterias patógenas es muy variable, dependiendo tanto de la estructura fenólica como de la especie bacteriana (Taguri et al., 2004; Klancnik et al., 2009; Sánchez-Maldonado et al., 2011). Cetin-Karaca and Newman (2015), evaluaron el potencial antimicrobiano de diferentes compuestos fenólicos frente a tres especies de *Salmonella*, reportando que la (-)epicatequina, uno de los principales polifenoles que se encuentran en las lías del cava, era el más eficaz, aunque con diferentes grados de sensibilidad según la especie (Cetin-Karaca and Newman, 2015). Por el contrario, un extracto fenólico elaborado a partir de subproductos obtenidos de la elaboración del vino mostró una elevada actividad antimicrobiana contra dos cepas de *L. monocytogenes*, pero no contra *Salmonella* (Silva et al., 2018). De hecho, la actividad antimicrobiana de los polifenoles depende no sólo del tipo de bacteria sino también de la cepa o serotipo específico (Taguri et al., 2004).

Por otro lado, los derivados cárnicos fermentados con los cultivos iniciadores de *L. sakei* mostraron una reducción significativa de los recuentos de *Salmonella* y *L. monocytogenes*, sin verse influenciado este efecto por la presencia de LPE. De forma similar, Tremonte et al. (2020) tampoco observaron una potenciación del efecto anti-Listeria de una cepa bioprotectora de *L. plantarum* al añadir un subproducto de limón rico en polifenoles en derivados cárnicos fermentados crudos-curados (Tremonte et al., 2020). Se ha descrito que las BAL pueden ser capaces de metabolizar los compuestos fenólicos, comprometiendo significativamente su potencial antimicrobiano (Curiel et al., 2010; Sánchez-Maldonado et al., 2011; Tabasco et al., 2011; Piekarska-Radzik and Klewicka, 2021). En nuestro estudio, se podría inferir que las BAL presentes en los derivados cárnicos fermentados podrían ser responsables de la reducción de la fracción fenólica tanto

de las lías del cava como del LPE, comprometiendo así su potencial efecto antimicrobiano.

3.3 Efecto de la adición de lías del cava o de su extracto fenólico en la reducción de la formación de aminas biógenas en derivados cárnicos fermentados.

PUBLICACIÓN 3

Inhibition of biogenic amines formation in fermented foods by the addition of cava lees

Salvador Hernández-Macias, Alba Martín-García, Nuria Ferrer-Bustins, Oriol Comas-Basté, Montserrat Riu-Aumatell, Elvira López-Tamames, Anna Jofré, M. Luz Latorre-Moratalla, Sara Bover-Cid, M. Carmen Vidal-Carou
Frontiers in Microbiology, 2021 (En revisión)

Índice de impacto (SJR 2020): 1,701

Posición en el área de conocimiento "Microbiology": Q1 (30/152)

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVO

Además de las bacterias patógenas, algunos compuestos bioactivos, como las aminas biógenas, pueden suponer un riesgo desde el punto de vista de la seguridad alimentaria. Las aminas biógenas son metabolitos microbianos que se pueden encontrar en casi todos los tipos de alimentos en un amplio y variable rango de concentraciones, incluso dentro de un mismo tipo de producto. Estas aminas (*i.e.*, tiramina, histamina, putrescina y cadaverina) se forman principalmente por la descarboxilación de sus correspondientes aminoácidos precursores por parte de bacterias presentes en los alimentos. La histamina y la tiramina de los alimentos pueden ser causantes de la aparición de ciertos trastornos, tales como la intoxicación histamínica, la intolerancia a la histamina o crisis hipertensivas producidas por la interacción entre tiramina y fármacos IMAO (Latorre-Moratalla et al., 2017). De hecho, la histamina y la intoxicación histamínica son uno de los peligros y de las enfermedades transmitidas por los alimentos que se incluyen anualmente en el informe emitido por la EFSA y el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) (EFSA, 2021). Además, la histamina también puede ser el agente causante de la intolerancia a la histamina, un trastorno que aparece en personas sensibles a niveles de histamina generalmente tolerados por la población sana como consecuencia, principalmente, de un déficit de la enzima diamino oxidasa (DAO), encargada de la degradación de la histamina a nivel intestinal (Comas-Basté et al., 2020).

Además de la seguridad alimentaria, y debido a que la acumulación de aminas biógenas puede estar asociada con la actividad de bacterias contaminantes, contenidos elevados de estos compuestos se consideran marcadores químicos de una falta de frescura o de una deficiente calidad higiénica en los procesos de fabricación y/o conservación de los alimentos (Comas-Basté et al., 2019). Asimismo, los alimentos fermentados, como los derivados cárnicos fermentados crudos-curados, son un tipo de productos que pueden acumular altos contenidos de aminas como consecuencia de la actividad microbiana procedente tanto de los microorganismos responsables de la fermentación como de la presencia de microorganismos alterantes (Latorre-Moratalla et al., 2017). En las últimas décadas, las mejoras higiénicas aplicadas en todas las etapas de la cadena alimentaria, junto con otras recomendaciones específicas, como el uso de cultivos iniciadores sin capacidad de formar aminas, han contribuido a reducir los niveles de estos compuestos en productos fermentados. Sin embargo, los datos sobre el contenido de aminas biógenas en este tipo de productos demuestran que su control sigue siendo un reto de la industria alimentaria (Vidal-Carou et al., 2014a). Actualmente, se están desarrollando nuevas estrategias basadas en el uso de productos naturales que permitan complementar o incluso sustituir a las tradicionalmente utilizadas para prevenir la presencia o crecimiento de microorganismos aminogénicos (Zhang et al., 2017).

En este sentido, se planteó investigar si, además de los efectos antimicrobianos mostrados anteriormente, la adición de lías del cava o de su extracto fenólico en la formulación de derivados cárnicos fermentados podría ser también una estrategia útil para ayudar a reducir la formación de aminas biógenas en este tipo de productos.

DISEÑO EXPERIMENTAL

El efecto de la adición de lías del cava o de su extracto fenólico en la formación de aminas biógenas se estudió en las muestras de derivados cárnicos crudos-curados utilizadas en el *challenge test* (apartado 3.2), las cuales estaban inoculadas con cepas patógenas de *Salmonella* spp., un género bacteriano que generalmente presenta una elevada capacidad para formar aminas (Gokdogan et al., 2012). En un

primer experimento, se consideró la adición de un 5% de lías y, a continuación, en un segundo experimento un 0,3% de extracto fenólico de lías (LPE). La Tabla 9 muestra los diferentes lotes de derivados cárnicos fermentados para cada uno de los experimentos planteados. Los diferentes lotes de derivados cárnicos fueron elaborados según la metodología descrita en la correspondiente sección del apartado 3.2.

La evolución de la acumulación de aminas biógenas se estudió a lo largo del proceso de elaboración de los derivados cárnicos fermentados, analizando muestras correspondientes a la materia prima (tiempo 0), a los 8-9 días de curado (dependiendo del experimento) y en el producto acabado tras 21 días de curado. También se analizó el contenido de aminas biógenas en las lías del cava.

Tabla 9. Lotes de derivados cárnicos fermentados crudos-curados formulados sin o con un 5% (p/p) de lías del cava o con un 0,3% (p/p) el extracto fenólico de lías (LPE) y/o diferentes cepas de *L. sakei* como cultivo iniciador.

Experimento	Lote	Ingrediente	Cepa de cultivo iniciador
1	C1	-	-
	L1	Lías del cava	-
	C1+CTC494	-	<i>L. sakei</i> CTC494 ¹
	L1+CTC494	Lías del cava	<i>L. sakei</i> CTC494
2	C2	-	-
	E2	LPE	-
	C2+CTC494	-	<i>L. sakei</i> CTC494 ¹
	E2+CTC494	LPE	<i>L. sakei</i> CTC494
	C2+BAP110	-	<i>L. sakei</i> BAP110
	E2+BAP110	LPE	<i>L. sakei</i> BAP110

¹Productor de la bacteriocina sakacina K (Garriga et al., 2002)

Análisis de aminas biógenas y actividad descarboxilasa bacteriana

La determinación de doce aminas biógenas (octopamina, dopamina, tiramina, putrescina, serotonina, cadaverina, histamina, agmatina, β -feniletilamina, triptamina, espermidina y espermina) se realizó mediante cromatografía líquida de ultra alta eficacia acoplada a detección fluorométrica (UHPLC-FL) (Latorre-Moratalla et al., 2009). Brevemente, se mezclaron aproximadamente 5 g de muestra con 10 mL de ácido perclórico 0,6 M durante 20 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron (20.000 rpm, 4 °C, 25 min) y el sobrenadante se recogió en un

matraz aforado de 25 mL. Este proceso de extracción se repitió dos veces más y el volumen final del extracto se ajustó con ácido perclórico 0,6 M. Las muestras se filtraron a través de un filtro GHP de 0,22 µm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

La separación cromatográfica de las aminas biógenas se realizó a través de una columna de fase reversa Acquity UPLC BEH C18 de 1,7 µm (2,1 mm x 50 mm) (Waters Corp., Milford, MA, EE. UU.), seguida de una derivatización post-columna en línea con ortoftaldehído y de una detección fluorométrica (Ex: 340 nm y Em: 445 nm).

Las muestras de derivados cárnicos a lo largo del proceso de fermentación/curado sufren una pérdida de agua con el consiguiente efecto de concentración de sus componentes. Para evitar este efecto, se determinó el contenido acuoso (AOAC, 2000) para poder expresar el contenido de aminas en peso seco (ps).

La actividad aminoácido-descarboxilasa de las cepas (*L. sakei* BAP110 y *Salmonella* spp.) fue evaluada mediante el método descrito por (Latorre-Moratalla et al., 2010). La ausencia de actividad descarboxilasa de la cepa *L. sakei* CTC494 se encuentra previamente descrita en (Bover-Cid et al., 2001).

Análisis estadístico

Para determinar las diferencias estadísticas en los contenidos de aminas biógenas entre los diferentes lotes de derivados cárnicos se realizó un ANOVA de una vía y la prueba post-hoc de Tukey HSD (IBM SPSS Statistics 23.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EE. UU.)). Las diferencias con $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los derivados cárnicos fermentados fueron inoculados con diferentes cepas de *Salmonella* spp., un género bacteriano con una reconocida capacidad para formar aminas biógenas (Gokdogan et al., 2012). Sin embargo, la capacidad aminogénica es cepa-dependiente y, por lo tanto, es necesario llevar a cabo una evaluación caso

a caso de esta capacidad (Comas-Basté et al., 2019; Tabanelli, 2020). Las cepas de *Salmonella spp.* presentaron una intensa actividad aminogénica *in vitro*, formando niveles elevados de cadaverina y putrescina (2.500 mg/L y 2.300 mg/L, respectivamente), y moderados de histamina (200 mg/L). Estas cepas no fueron capaces de formar tiramina. La producción de putrescina, cadaverina e histamina se asocia frecuentemente a la actividad de bacterias alterantes Gram-negativas (*Pseudomonas* y *Enterobacterias*), pero también a especies de bacterias patógenas transmitidas por los alimentos (Suzzi and Gardini, 2003; Latorre-Moratalla et al., 2012; Kukleci et al., 2019). En un estudio comparativo, Gokdogan et al., (2012) reportó que *Salmonella* fue una de las bacterias patógenas que mostraron una mayor capacidad para formar estas aminos.

Las cepas de *L. sakei* utilizadas en este estudio como cultivos iniciadores fueron aminoácido-d Descarboxilasa negativas *in vitro*. En el caso de *L. sakei* CTC494 esta falta de capacidad aminogénica ya fue previamente demostrada por Bover-Cid et al. (2001). Las especies de *L. sakei* han sido frecuentemente descritas como microorganismos sin o con una débil capacidad para formar aminos (Latorre-Moratalla et al., 2012; Özogul and Hamed, 2018).

En las muestras iniciales de carne cruda (pre-fermentación), la espermina y la espermidina fueron las dos únicas aminos encontradas en todos los lotes, con contenidos de $89,2 \pm 0,2$ mg/Kg ps y $3,4 \pm 0,1$ mg/Kg ps, respectivamente, y no experimentaron cambios significativos a lo largo del proceso de fermentación y curado de los diferentes lotes de derivados cárnicos. Estos resultados confirman el origen principalmente fisiológico de estas aminos. A pesar de que las lías del cava presentaron ciertos niveles de espermidina (10,5 mg/Kg), la baja proporción en la que se añadieron en los derivados cárnicos (5%) hizo que no se observaran diferencias entre los lotes con o sin lías.

Durante el proceso de elaboración de los derivados cárnicos fermentados, solo se detectó la presencia de tres aminos, cadaverina, putrescina y tiramina, aunque en concentraciones muy diferentes dependiendo del experimento y/o lote considerado (Figura 10). Los parámetros fisicoquímicos y los recuentos microbiológicos de estos lotes se muestran en los apartados 3.1 y 3.2.

En el caso de los lotes control fermentados espontáneamente (C1 y C2), la cadaverina fue la amina mayoritaria, alcanzando niveles de 1.484 mg/Kg ps en el experimento 1 (Figura 10A) y de 525 mg/Kg ps en el experimento 2 (Figura 10B). La putrescina también se formó de manera significativa a lo largo del proceso de elaboración, con niveles en el producto acabado de 479 mg/Kg ps y 212 mg/Kg ps en los experimentos 1 y 2, respectivamente. Presumiblemente, estos elevados contenidos de diaminas pueden atribuirse a la fuerte capacidad mostrada por *Salmonella* para formar cadaverina y putrescina. La presencia de putrescina y cadaverina en derivados cárnicos fermentados es bastante común, aunque normalmente en niveles relativamente bajos (con valores medios de alrededor de 50 mg/Kg según la evaluación del riesgo desarrollada por la EFSA en este tipo de productos) (EFSA, 2011). Sin embargo, en algunos casos, sus niveles pueden llegar a ser extremadamente altos (hasta 1.500 mg/Kg), atribuibles a una contaminación de las materias primas o del producto acabado (Latorre-Moratalla et al., 2008; EFSA, 2011; Ruiz-Capillas and Herrero, 2019). Además de a la presencia de bacterias contaminantes, la formación de cadaverina y putrescina en productos cárnicos fermentados puede estar afectada por numerosas variables, tanto intrínsecas (pH, formulación, diámetro del derivado cárnico fermentado, etc.) como tecnológicas (temperatura y humedad) (Vidal-Carou et al., 2014b; Ruiz-Capillas and Herrero, 2019; Tabanelli, 2020). Por eso, y teniendo en cuenta que los derivados cárnicos fermentados procedentes del experimento 1 y 2 presentan la misma formulación, diámetro y condiciones de elaboración, el mayor descenso de pH experimentado en C2 al final del curado (con una diferencia de 1 unidad de pH entre ambos lotes) podría ayudar a explicar, en parte, porque los niveles de cadaverina y putrescina de este lote fueron más bajos que los encontrados en C1. El efecto del pH sobre la aminogénesis es controvertido. A pesar de que se ha reportado que un pH ácido puede favorecer la actividad descarboxilasa como mecanismo de defensa del microorganismo contra las condiciones desfavorables de un medio ácido, también se ha visto cómo una rápida y fuerte disminución en el pH inhibe el crecimiento de bacterias alterantes potencialmente aminogénicas, reduciendo en consecuencia la formación de aminas (Comas-Basté et al., 2019; Ruiz-Capillas and Herrero, 2019).

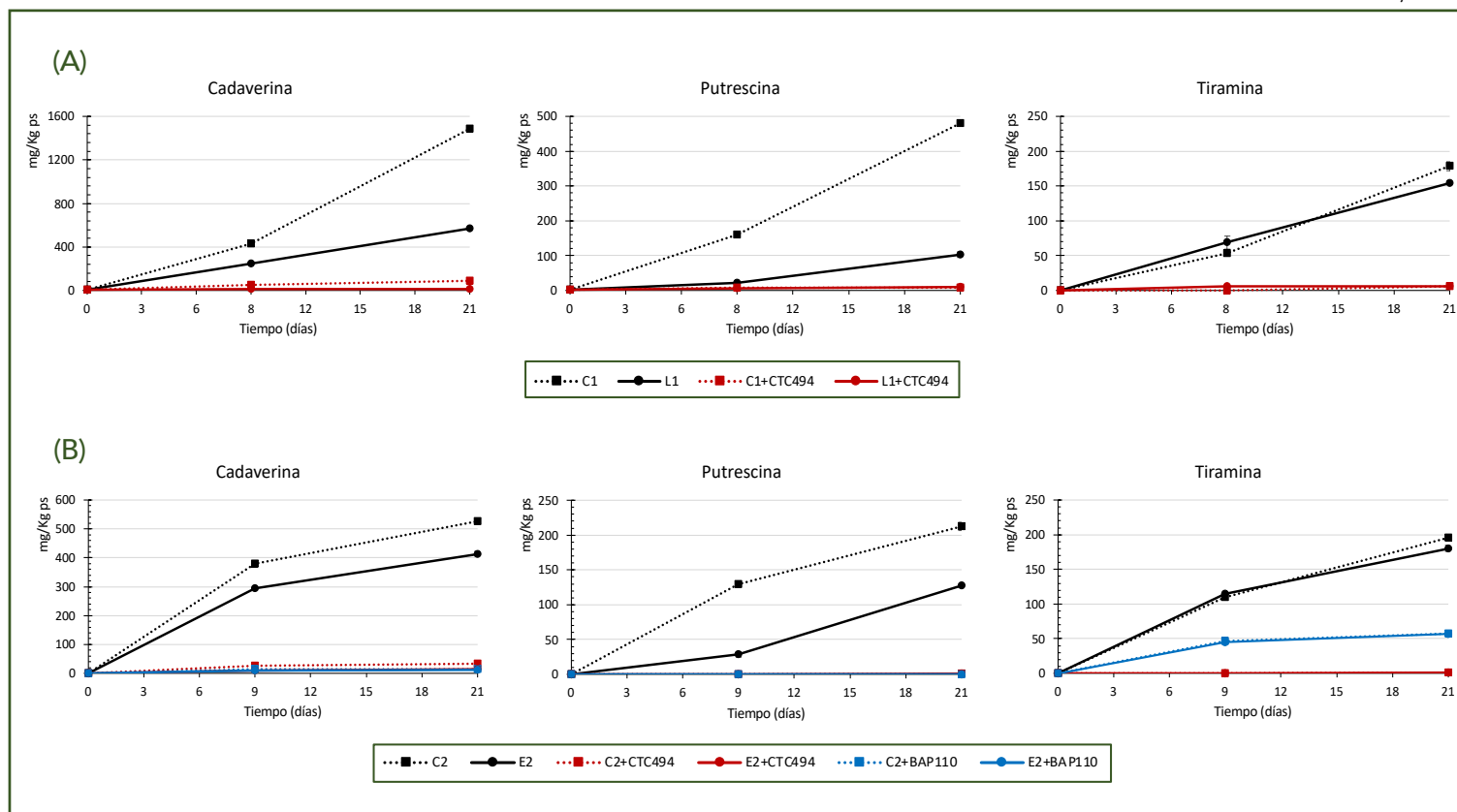


Figura 10. Contenidos de cadaverina, putrescina y tiramina (mg/Kg ps) en derivados cárnicos crudos-curados: A) Fermentados espontáneamente sin (C1) o con (L1) la adición de 5% de lías del cava o fermentados con el cultivo iniciador *L. sakei* CTC494 sin (C1+CTC494) o con (L1+CTC494) lías. B) Fermentados espontáneamente sin (C2) o con (E2) la adición de 0,3% de LPE o fermentados con el cultivo iniciador *L. sakei* CTC494 o *L. sakei* BAP110 sin (C2+CTC494 o C2+BAP110) o con (E2+CTC494 o E2+BAP110) el LPE.

En estos mismos lotes control, también se observó una formación progresiva de tiramina a lo largo de la elaboración, aunque en menor medida que las otras dos aminas. En ambos experimentos, los productos acabados mostraron valores muy similares de tiramina, alrededor de 190 mg/Kg ps (Figura 10A y 10B). Según las evaluaciones del riesgo realizadas por la EFSA, los valores medios de tiramina encontrados en diferentes derivados cárnicos fermentados de Europa son de aproximadamente 130 mg/Kg, pero pudiendo llegar a alcanzar niveles máximos por encima de 1.700 mg/Kg. La formación de tiramina se puede atribuir a la actividad de bacterias lácticas, principalmente responsables de la fermentación (Anderegg et al., 2020). Por este motivo, la tiramina tiende a ser la amina mayoritaria y más característica de los derivados cárnicos fermentados elaborados bajo unas condiciones higiénicas correctas (Latorre-Moratalla et al., 2017). En nuestro estudio, la inoculación de *Salmonella* con una elevada capacidad de producir cadaverina y putrescina, pero no tiramina, podría explicar que los contenidos de cadaverina y putrescina excedan los de tiramina.

La adición de lías del cava o de su extracto (LPE) afectó únicamente a la formación de cadaverina y putrescina. Concretamente, en el lote L1 elaborado con lías (Figura 10A) los contenidos de cadaverina y putrescina fueron significativamente más bajos durante todo el proceso en comparación con el control C1, con porcentajes de reducción en el producto acabado del 62% y 78%, respectivamente ($p < 0,05$). La menor formación de estas aminas se puede atribuir a la clara reducción por parte de las lías de los recuentos de *Salmonella* (Figura 8). El extracto fenólico de las lías del cava (lote E2) también fue capaz de reducir de manera significativa los niveles de estas diaminas en comparación con el control (C2), en un 21% para la cadaverina y un 40% para la putrescina (Figura 10B). Al final del proceso de elaboración, los niveles de *Salmonella* del lote E2 fueron ligeramente inferiores que los de C2 (diferencias de 0,71 log₁₀). Los polifenoles presentes en el LPE podrían ser, en parte, los responsables de la reducción de aminas observada en E2. Algunos estudios realizados en derivados cárnicos han descrito el efecto de diferentes compuestos fenólicos sobre la acumulación de ciertas aminas biógenas. Por ejemplo, se ha observado que la adición de extractos fenólicos procedentes de té, uva, bambú o rosas provoca una reducción en los niveles de cadaverina, tiramina, histamina y/o

putrescina de diferentes tipos de productos cárnicos (Fan et al., 2015; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2017). En todos estos trabajos, esta reducción ha sido correlacionada con menores recuentos de especies de bacterias alterantes en los derivados cárnicos enriquecidos con polifenoles.

En cuanto a la tiramina, no se observaron diferencias significativas entre los lotes sin (C1 y C2) y con lías (L1) o LPE (E2). El hecho de que los recuentos de BAL no se vieran influenciados por la presencia de lías (Figura 7), podría explicar que no se haya observado ningún efecto de estos sub-productos sobre la formación de tiramina.

Finalmente, la formación de cadaverina, putrescina y tiramina se vio inhibida en todos aquellos lotes elaborados con los diferentes cultivos iniciadores. La inoculación del cultivo iniciador *L. sakei* CTC494, un lactobacilo muy competitivo y no productor de aminos, redujo drásticamente la acumulación de estos compuestos, permitiendo la elaboración de productos cárnicos fermentados libres o prácticamente exentos de aminos biógenos. Por otro lado, el cultivo *L. sakei* BAP110, también sin capacidad aminogénica *in vitro*, no pudo evitar totalmente la formación de tiramina, pero sí la de putrescina y cadaverina (Figura 10B). Numerosos estudios, tanto *in vitro* como en derivados cárnicos fermentados, han descrito una reducción en la formación de aminos biógenos por parte de bacterias patógenas transmitidas por alimentos debido a la inoculación de ciertas cepas de BAL (Özogul and Hamed, 2018). Concretamente, entre las diferentes cepas de BAL utilizadas como cultivos iniciadores en derivados cárnicos fermentados, *L. sakei* muestra la mayor eficacia en la reducción de la acumulación de aminos (Latorre-Moratalla et al., 2012). Bover-Cid et al. (2000) ya describieron un efecto protector de la cepa *L. sakei* CTC494 ante la formación de aminos en fuet, con reducciones de hasta el 91% para la putrescina, 88% para la tiramina y 74% para la cadaverina.

La prácticamente total inhibición de la formación de aminos por parte de los cultivos iniciadores hizo que, en la mayoría de los lotes fuese imposible observar un potencial efecto sinérgico de la combinación de éstos con las lías del cava o su extracto. En el caso del lote E2+BAP110, el uso combinado de extracto y cultivo

iniciador no supuso una menor formación de tiramina, en comparación con su control (C2+ BAP110).

Es necesario destacar que en ningún lote se observó la producción de histamina. Según diversos trabajos, su presencia en derivados cárnicos es poco frecuente y en cantidades generalmente bajas. A pesar de esto, se ha reportado la presencia puntual de niveles extremadamente elevados de histamina en derivados cárnicos vinculados a defectos higiénicos de las materias primas (EFSA, 2011; Comas-Basté et al., 2019).

En resumen, los resultados de este estudio demuestran que la adición de lías del cava o su extracto fenólico en derivados cárnicos fermentados puede ser una estrategia efectiva para evitar o reducir la formación de ciertas aminas biógenas, como la putrescina y la cadaverina. A la vista de estos resultados, sería conveniente realizar más estudios en los que se evalúe la adición de lías del cava o su extracto fenólico en un mayor rango de concentraciones, así como también su aplicación en otros productos fermentados. Igualmente, será necesario confirmar el efecto inhibidor de las lías o del LPE sobre el crecimiento de otros microorganismos productores de aminas biógenas.

3.4 Evaluación *in vitro* del efecto prebiótico de las lías del cava en el crecimiento de bacterias probióticas.

PUBLICACIÓN 1

Growth-Promoting Effect of Cava Lees on Lactic Acid Bacteria Strains: A Potential Revalorization Strategy of a Winery By-Product

Salvador Hernández-Macias, Oriol Comas-Basté, Anna Jofré, Sara Bover-Cid, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Carmen Vidal-Carou
Foods, 2021, 10(7), 1636.

Índice de impacto (SJR 2020): 0,774

Posición en el área de conocimiento "Food Science": Q1 (73/332)

COMUNICACIÓN ORAL | Premio a la mejor comunicación oral

Salvador Hernández-Macias, Sonia Sánchez-Pérez, Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. **Prebiotic Effect of Cava Lees on Probiotic Strains with DAO Activity**. *III Workshop del Institut de Investigació en Nutrició y Seguridad Alimentaria (INSA·UB)*, 2017, Santa Coloma de Gramenet.

COMUNICACIÓN ESCRITA

Salvador Hernández-Macias, M. Luz Latorre-Moratalla, Oriol Comas-Basté, Sonia Sánchez-Pérez, Montserrat Riu-Aumatell, M. Teresa Veciana-Nogués, Elvira López-Tamames, M. Carmen Vidal-Carou. **Cava lees as promoters of the growth of fermentative and probiotic bacteria**. *XVII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición (SEÑ) y X Jornada de l'Associació Catalana de Ciències de l'Alimentació (ACCA)*, 2018, Barcelona.

COMUNICACIÓN ORAL

Salvador Hernández-Macias, M. Luz Latorre-Moratalla, Oriol Comas-Basté, Sonia Sánchez-Pérez, Montserrat Riu-Aumatell, M. Teresa Veciana-Nogués, Elvira López-Tamames, M. Carmen Vidal-Carou. **Cava lees as promoters of the growth of fermentative and probiotic bacteria**. *V Reunión de Jóvenes Investigadores de la Sociedad Española de Nutrición (SEÑ)*, 2018, Barcelona.

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVO

Desde el punto de vista de la salud, se ha comprobado que la fibra soluble tiene un efecto prebiótico que mejora la supervivencia e implantación de especies de la microbiota intestinal con efectos beneficiosos para el huésped (Slavin, 2013).

Recientemente, se han publicado resultados prometedores sobre el potencial efecto prebiótico de subproductos ricos en fibra sobre la viabilidad de ciertas cepas probióticas, principalmente lactobacilos (Matoušková et al., 2016; Przyborska et al., 2019a; Mateos-Aparicio et al., 2020; Silva de Andrade et al., 2020). En este sentido, se ha demostrado como diferentes tipos de subproductos alimentarios, como cáscara de limón, pulpa de remolacha azucarera, semillas de castaño de Indias, harina de frutas y verduras y pulpa de manzana, son capaces de potenciar el crecimiento de diferentes probióticos *in vitro* (Matoušková et al., 2016; Przyborska et al., 2019a; Mateos-Aparicio et al., 2020; Silva de Andrade et al., 2020).

La composición de las lías del cava, con una elevada proporción de β -glucanos y MOS, las sitúa como potenciales candidatas a utilizarse como agente prebiótico. El objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* el potencial efecto promotor de las lías del cava sobre el crecimiento de diferentes cepas comúnmente utilizadas como probióticos.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se seleccionaron un total de 11 cepas de especies bacterianas ampliamente utilizadas por su papel probiótico, todas ellas incluidas en la lista de microorganismos con estatus de presunción cualificada de seguridad (QPS, por sus siglas en inglés) (Tabla 10).

La metodología para la obtención de las lías del cava, los recuentos microbiológicos y la determinación de los valores de pH se encuentran descritos en las correspondientes secciones del apartado 3.1. El efecto prebiótico de las lías del cava se evaluó mediante la adición de un 5% de este subproducto al medio de cultivo. Esta proporción fue seleccionada porque mostró una mayor eficiencia en la promoción del crecimiento de diferentes cepas de BAL (resultados del apartado 3.1).

El análisis estadístico de los resultados se efectuó como se encuentra descrito en la correspondiente sección del apartado 3.1.

Tabla 10. Cepas probióticas seleccionadas para este estudio.

Especie	Cepa	Temperatura óptima de crecimiento	Fuente (Colección)	Crecimiento promovido por las lías del cava
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	CECT4180	37 °C	Colección Española de Cultivos Tipo	Sí
	CECT220			Sí
	CECT221			No
	CECT224			No
	CECT749			No
	ATCC14917	37 °C	Colección Americana de Cultivos Tipo	No
<i>Lacticaseibacillus casei</i>	CECT7600	37 °C	Colección Española de Cultivos Tipo	No
	BAP341		Grupo de investigación	Sí
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	CECT285	37 °C	Colección Española de Cultivos Tipo	Sí
<i>Lactobacillus gasseri</i>	BAP513	37 °C	Grupo de investigación	No
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	CECT8330	37 °C	Colección Española de Cultivos Tipo	No

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 10 resume, para cada una de las 11 cepas ensayadas, la respuesta, en términos de crecimiento, frente a la adición de un 5% (p/v) de lías del cava. De todas ellas, únicamente cuatro cepas mostraron recuentos significativamente superiores cuando crecían en presencia de lías (Figura 11). Contrariamente, cuatro cepas de *L. plantarum*, una de *L. casei*, una de *L. gasseri* y una de *P. pentosaceus* no se vieron influenciadas por la presencia de lías.

Respecto a *L. fermentum* CECT275 y *L. casei* BAP341, y tal como se puede observar en la Figura 11, fue a partir de las 24 horas de cultivo cuando se observaron diferencias significativas en la densidad de población máxima y/o supervivencia de estas cepas, con incrementos generalmente superiores a 0,5 log₁₀ UFC/mL en comparación con el control ($p < 0,05$). Sin embargo, en el caso del pH, sólo se observó un efecto significativo sobre la acidez en la cepa *L. casei* BAP341, con valores finales de 0,5 unidades de pH más bajos que el control ($p < 0,05$).

De las seis cepas de *L. plantarum* ensayadas, sólo dos (CECT220 y CECT4180) se vieron influenciadas por la presencia de lías, y únicamente a nivel de supervivencia.

La adición de lías del cava al medio de cultivo aumentó significativamente el crecimiento de *L. plantarum* CECT220 en 1,4 unidades $\log_{10}$ y el de *L. plantarum* CECT4180 en 2 unidades $\log_{10}$ en comparación con el cultivo control a las 72 h de ensayo ($p < 0,05$). No se observaron diferencias en los valores de pH entre los medios de cultivo suplementados y no suplementados, lo que podría explicarse por la falta de efecto de las lías del cava en la fase de crecimiento en ambas cepas.

Como en el caso de las cepas tecnológicas del apartado 3.1, sería interesante ensayar el efecto prebiótico utilizando porcentajes mas altos de lías.

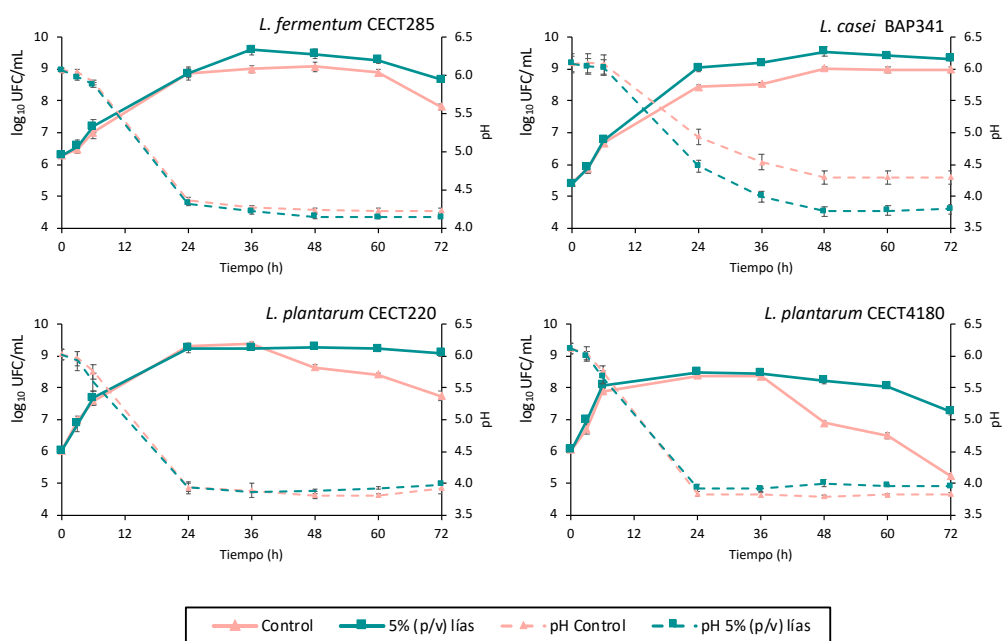


Figura 11. Cinética de crecimiento y evolución en los valores de pH de las cepas probióticas cultivadas sin (control) y con un 5% (p/v) de lías del cava. Los resultados corresponden al promedio y desviación estándar (barras) de tres experimentos independientes.

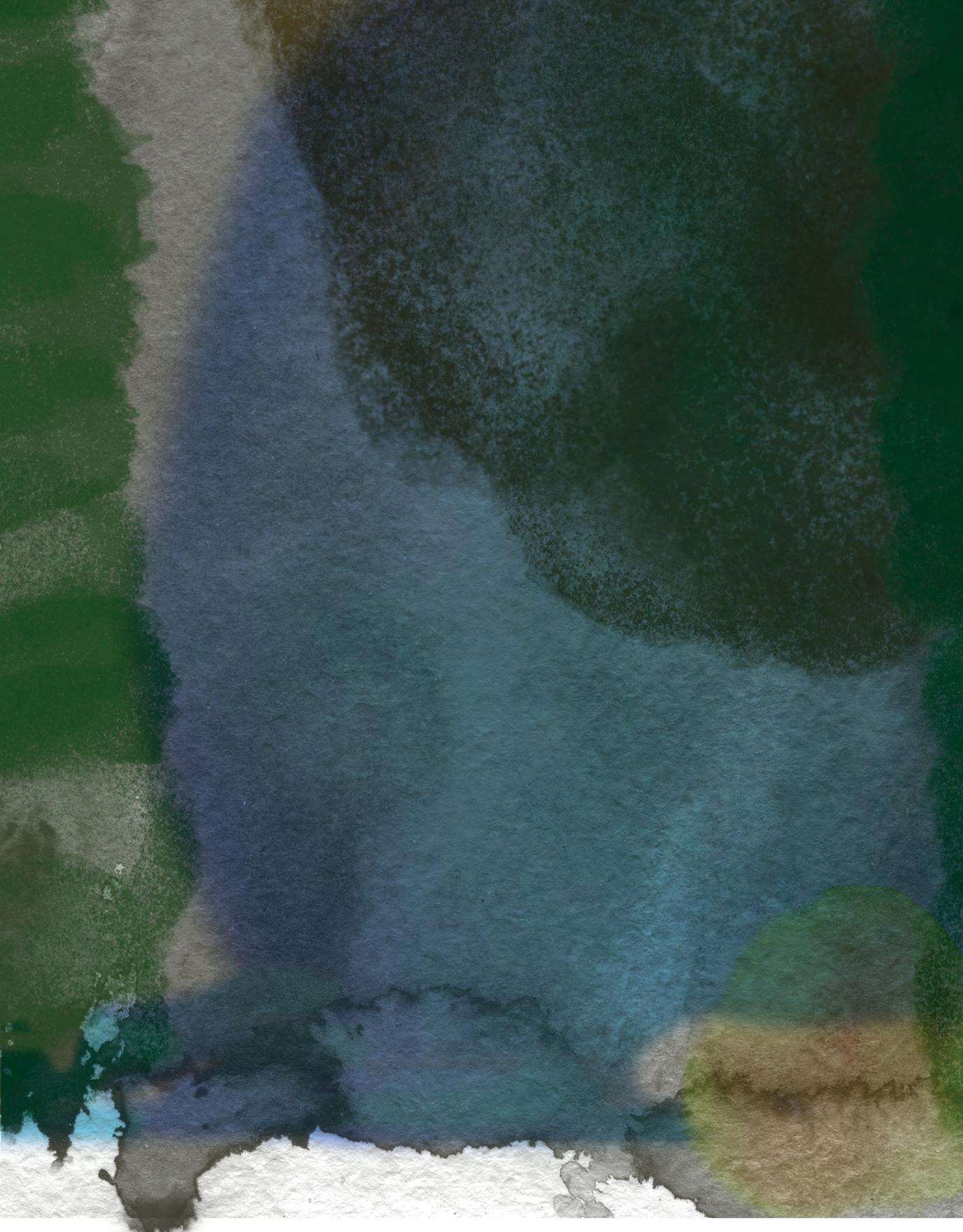
Recientemente, varios estudios se han centrado en la revalorización de subproductos de la industria alimentaria por su potencial papel como prebióticos (Jiménez-Zamora et al., 2015a; Matoušková et al., 2016; Gómez et al., 2019a; Przyborska et al., 2019a; Lacerda Massa et al., 2020a; Mateos-Aparicio et al., 2020; Silva de Andrade et al., 2020). Przyborska et al. (2019) describieron la capacidad

prebiótica de un subproducto procedente del castaño de Indias, capaz de inducir un mayor crecimiento *in vitro* de varias cepas probióticas de *L. plantarum*, *L. casei* y *L. fermentum* (Przyborska et al., 2019a). Al igual que en nuestro estudio, la capacidad de fermentar este sustrato vegetal varió sustancialmente entre las cepas ensayadas. En 2020, Silva de Andrade et al., comprobaron *in vitro* como un 3% de harina de frutas y verduras (subproducto procedente de la elaboración de bebidas isotónicas), incrementaba los recuentos de cuatro cepas probióticas de lactobacilos (Silva de Andrade et al., 2020). Posteriormente, estos mismos autores confirmaron el efecto prebiótico de este subproducto rico en fibra en la microbiota intestinal obtenida de muestras fecales. Por último, Lacerda Massa et al. (2020) reportaron resultados muy similares respecto al efecto prebiótico *in vitro* de la cáscara y las semillas de jabuticaba, una fruta brasileña (Lacerda Massa et al., 2020a).

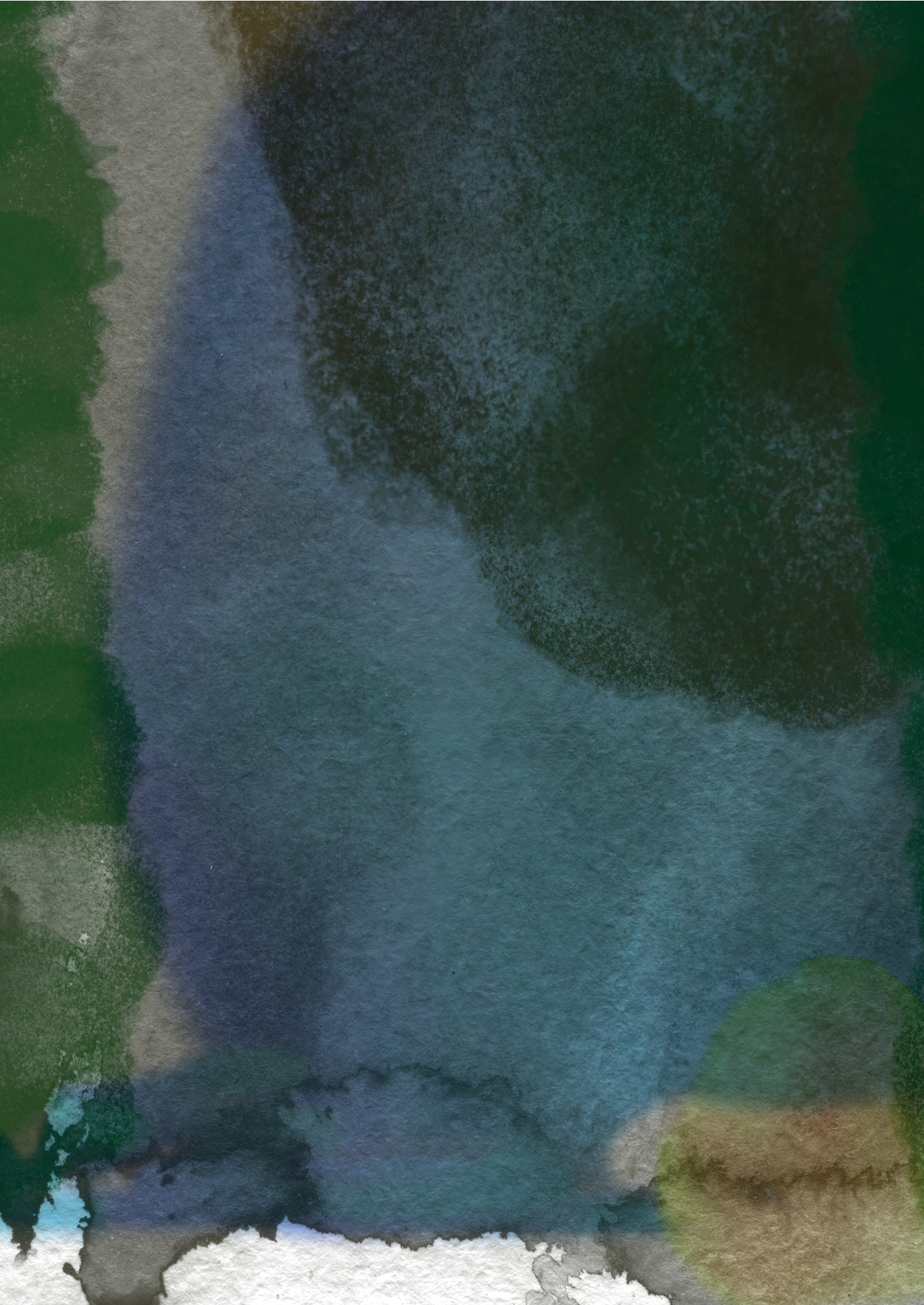
Los efectos promotores del crecimiento bacteriano de los subproductos anteriormente mencionados se han atribuido, principalmente, a su contenido en oligo o polisacáridos (por ejemplo, β -glucanos, arabinanos, arabinogalactanos, galactanos, xiloglucanos y galactomananos) y sustancias pécticas. De hecho, el aumento del crecimiento bacteriano inducido por las lías del cava podría deberse al uso de β -glucanos y MOS (que constituyen más del 90% de la pared celular) como fuente de carbono. Se ha reportado ampliamente la capacidad de los β -glucanos (normalmente obtenidos de las paredes celulares microbianas, de la avena o del centeno) y de los MOS para estimular el crecimiento de varias especies del género *Lactobacillus* (Kneifel, 2000; Russo et al., 2012; Kiliç and Akpinar, 2013; Chauhan et al., 2014; Chen et al., 2014; Pongsapipatana et al., 2016; Shi et al., 2018; Cao et al., 2019; Yuca et al., 2019).

El metabolismo de este tipo de carbohidratos de cadena larga requiere, como primer paso, su hidrólisis en azúcares fermentables más pequeños por parte de las glucosidasas (Russo et al., 2012). La presencia de estas enzimas ha sido identificada en bacterias del género *Lactobacillus*, lo que puede conferir a estas bacterias la capacidad de utilizar oligo o polisacáridos como fuente de carbono (Hernandez-Hernandez et al., 2012; Russo et al., 2012). Esto es consistente con los resultados del estudio de Russo et al. (2012), en el que los β -glucanos mostraron una mayor

actividad prebiótica en una cepa recombinante de *L. plantarum* con una enzima β -glicosidasa sobreexpresada. Sin embargo, las enzimas responsables de esta vía metabólica pueden estar inhabilitadas en ciertas cepas bacterianas, comprometiendo así su capacidad para fermentar estos sustratos (Honda et al., 2007; Huebner et al., 2007; O' Donnell et al., 2011). Este hecho respalda los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, de acuerdo con los cuales la suplementación con lías del cava mostró un comportamiento cepa-dependiente en el efecto promotor del crecimiento de bacterias probióticas.



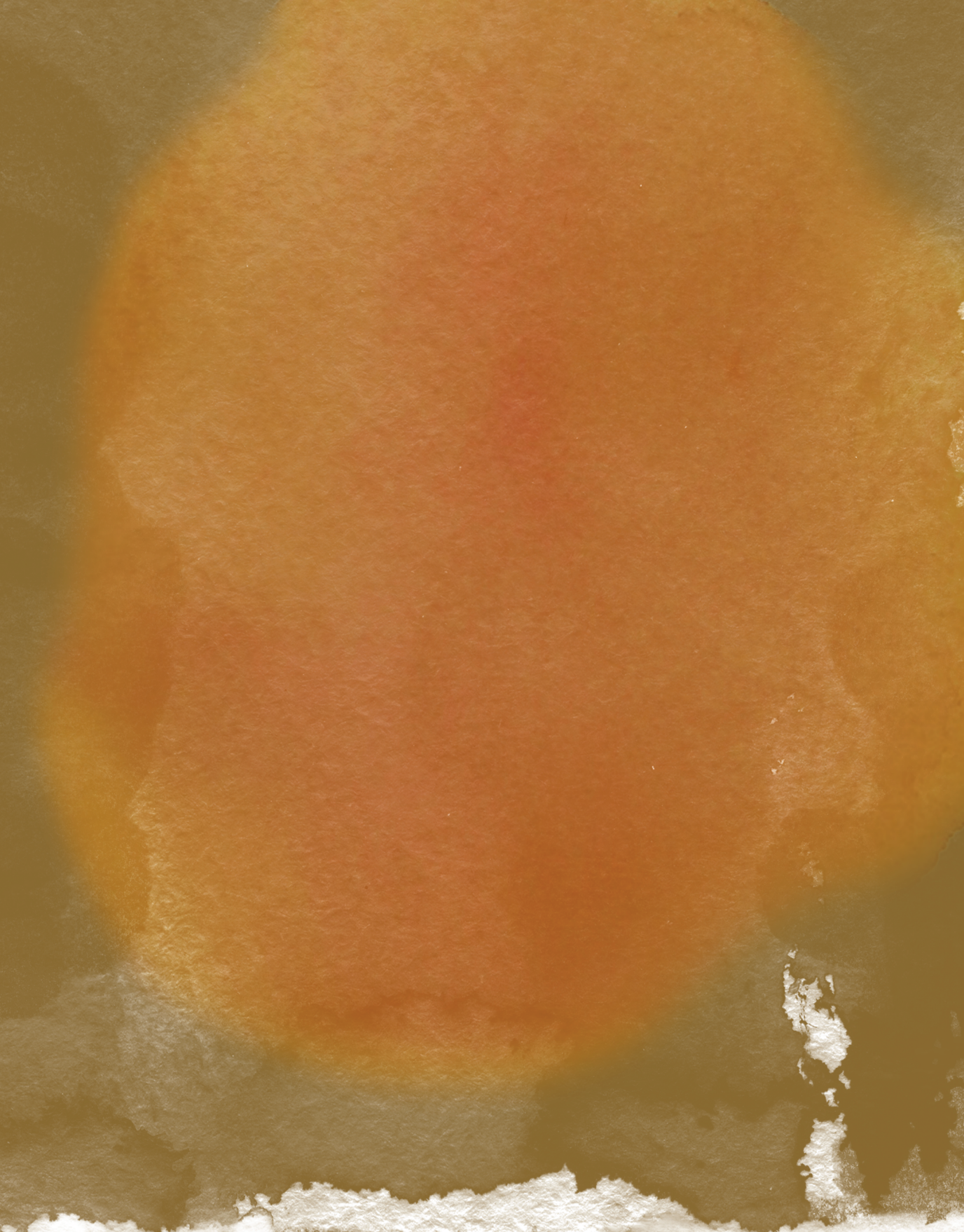
4. CONCLUSIONES



4. CONCLUSIONES

1. Se ha demostrado *in vitro* que las lías del cava poseen un efecto promotor del crecimiento de diferentes especies de BAL comúnmente utilizadas como cultivos iniciadores, mostrando un efecto dosis y cepa-dependiente. Tras estudiar el efecto de la adición de un 0,5%, 1%, 2% y 5% de lías, se comprobó que el 5% fue la proporción que mostró el mayor efecto potenciador del crecimiento bacteriano.
2. La adición de lías del cava en la formulación de derivados cárnicos fermentados crudos-curados no provocó un mayor crecimiento de BAL, aunque sí se tradujo en una mayor acidificación inicial y final de los derivados cárnicos fermentados.
3. Las lías del cava inhibieron de manera significativa el crecimiento de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en derivados cárnicos fermentados. Este efecto inhibitorio fue muy similar al ejercido por el cultivo iniciador *L. sakei* CTC494. Además, el uso combinado de las lías del cava con el cultivo iniciador tuvo un efecto sinérgico sobre *Salmonella*. Este efecto antimicrobiano de las lías podría deberse a la mayor acidificación producida por la adición de este subproducto vitivinícola.
4. El extracto fenólico de las lías del cava mostró un ligero efecto antimicrobiano frente *Salmonella* en el producto acabado. Sin embargo, la adición de este extracto no tuvo ningún efecto anti-listeria. En las condiciones estudiadas, la presencia del extracto fenólico de las lías del cava no potenció el efecto inhibidor del crecimiento de patógenos de los cultivos iniciadores.
5. La adición de lías del cava o de su extracto fenólico en la formulación de derivados cárnicos fermentados se ha mostrado como una estrategia efectiva para la reducción de aminas biógenas, como cadaverina y putrescina.
6. Se ha demostrado que las lías del cava potencian el crecimiento de diferentes cepas de especies de BAL consideradas probióticas y por ello se presume que las lías pueden tener también aplicaciones como sustratos prebióticos.

7. Los resultados de esta tesis doctoral confirman el uso de las lías del cava como ingredientes naturales para mejorar la seguridad microbiológica de derivados cárnicos fermentados crudos-curados, así como por su potencial carácter prebiótico. Ambas son estrategias de revalorización alineadas con los principios de la economía circular y aportan un valor añadido a un subproducto de la industria vitivinícola generado en gran volumen.



5. BIBLIOGRAFÍA

5. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, M. Á. (2016). Characterization of recovered lees from sparkling wines. *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. Available at: <http://www.tdx.cat/handle/10803/399910>.
- Albuquerque, M. A. C., Bedani, R., LeBlanc, J. G., and Saad, S. M. I. (2017). Passion fruit by-product and fructooligosaccharides stimulate the growth and folate production by starter and probiotic cultures in fermented soymilk. *International Journal of Food Microbiology* 261, 35–41. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.001.
- Alcázar, V., Elba, M., Arrizon, G., Javier, P., Gschaedler, M., Anne, C., et al. (2016). Extraction and Quantification of the Yeast Cell Wall. 14, 1–7.
- Alexandre, H., and Guilloux-Benatier, M. (2006a). Yeast autolysis in sparkling wine - A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12, 119–127. doi:10.1111/j.1755-0238.2006.tb00051.x.
- Alexandre, H., and Guilloux-Benatier, M. (2006b). Yeast autolysis in sparkling wine - A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12, 119–127. doi:10.1111/j.1755-0238.2006.tb00051.x.
- Amaya-Cruz, D. M., Rodríguez-González, S., Pérez-Ramírez, I. F., Loarca-Piña, G., Amaya-Llano, S., Gallegos-Corona, M. A., et al. (2015). Juice by-products as a source of dietary fibre and antioxidants and their effect on hepatic steatosis. *Journal of Functional Foods* 17, 93–102. doi:10.1016/j.jff.2015.04.051.
- Ammor, S., Dufour, E., Zagorec, M., Chaillou, S., and Chevallier, I. (2005). Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food Microbiology* 22, 529–538. doi:10.1016/j.fm.2004.11.016.
- Anderegg, J., Fischer, M., Dürig, J., Die, A., Lacroix, C., and Meile, L. (2020). Detection of Biogenic Amines and Tyramine-Producing Bacteria in Fermented Sausages from Switzerland. *Journal of Food Protection* 83, 1512–1519. doi:10.4315/JFP-19-468.
- AOAC (2000). Official Methods of Analysis, 17th ed.
- Asano, I., Nakamura, Y., Hoshino, H., Aoki, K., Fujii, S., Imura, N., et al. (2001). Use of Mannooligosaccharides from Coffee Mannan by Intestinal Bacteria. *Journal of the agricultural chemical society of Japan* 75, 1077–1083. doi:10.1271/nogeikagaku1924.75.1077.
- Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M., and Hugas, M. (2003). Microbial Quality and Direct PCR Identification of Lactic Acid Bacteria and Nonpathogenic Staphylococci from Artisanal Low-Acid Sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4583–4594. doi:10.1128/AEM.69.8.4583-4594.2003.

- Aymerich, T., Rodríguez, M., Garriga, M., and Bover-Cid, S. (2019). Assessment of the bioprotective potential of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 8 °C. *Food Microbiology* 83, 64–70. doi:10.1016/j.fm.2019.04.011.
- Babayan, T. L., Bezrukov, M. G., Latov, V. K., Belikov, V. M., Belavtseva, E. M., and Titova, E. F. (1981). Induced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*: Morphological effects, rheological effects, and dynamics of accumulation of extracellular hydrolysis products. *Current Microbiology* 5, 163–168. doi:10.1007/BF01578522.
- Barcia, M. T., Pertuzatti, P. B., Gómez-Alonso, S., Godoy, H. T., Hermosín-Gutiérrez, I., Teixeira, M., et al. (2014). Phenolic composition of grape and winemaking by-products of Brazilian hybrid cultivars BRS Violeta and BRS Lorena. *Food Chemistry* 159, 95–105. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.163.
- Benito, M. J., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., Ruiz-Moyano, S., and Córdoba, M. G. (2007). Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented salchichón and chorizo sausages. *Journal of Food Science* 72. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00419.x.
- Borrelli, R. C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A., and Fogliano, V. (2004). Characterization of a New Potential Functional Ingredient: Coffee Silverskin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 1338–1343. doi:10.1021/jf034974x.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., and Vidal-Carou, M. C. (2000). Reduction of Biogenic Amine Formation Using a Negative Amino Acid-Decarboxylase Starter Culture for Fermentation of Fuet Sausages. *Journal of Food Protection* 63, 237–243. doi:10.4315/0362-028X-63.2.237.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., and Vidal-Carou, M. C. (1999). Effect of proteolytic starter cultures of *Staphylococcus* spp. on biogenic amine formation during the ripening of dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 46, 95–104. doi:10.1016/S0168-1605(98)00170-6.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., and Vidal-Carou, M. C. (2001). Effectiveness of a *Lactobacillus sakei* starter culture in the reduction of biogenic amine accumulation as a function of the raw material quality. *Journal of Food Protection* 64, 367–373. doi:10.4315/0362-028X-64.3.367.
- Bustos, G., Moldes, A. B., Cruz, J. M., and Domínguez, J. M. (2004a). Evaluation of Vinification Lees as a General Medium for *Lactobacillus* Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 5233–5239. doi:10.1021/jf049763m.
- Bustos, G., Moldes, A. B., Cruz, J. M., and Domínguez, J. M. (2004b). Formulation of Low-Cost Fermentative Media for Lactic Acid Production with *Lactobacillus rhamnosus* Using Vinification Lees as Nutrients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 801–808. doi:10.1021/jf030429k.

- Bustos, G., Moldes, A. B., Cruz, J. M., and Domínguez, J. M. (2004c). Formulation of Low-Cost Fermentative Media for Lactic Acid Production with *Lactobacillus rhamnosus* Using Vinification Lees as Nutrients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 801–808. doi:10.1021/jf030429k.
- Cameron, D. R., Cooper, D. G., and Neufeld, R. J. (1988). The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1420–1425. doi:10.1128/aem.54.6.1420-1425.1988.
- Cao, P., Wu, L., Wu, Z., Pan, D., Zeng, X., Guo, Y., et al. (2019). Effects of oligosaccharides on the fermentation properties of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Dairy Science* 102, 2863–2872. doi:10.3168/jds.2018-15410.
- Carlson, J. L., Erickson, J. M., Lloyd, B. B., and Slavin, J. L. (2018). Health effects and sources of prebiotic dietary fiber. *Current Developments in Nutrition* 2, 1–8. doi:10.1093/cdn/nzy005.
- Cetin-Karaca, H., and Newman, M. C. (2015). Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia Coli*. *Food Bioscience* 11, 8–16. doi:10.1016/j.fbio.2015.03.002.
- Chauhan, P. S., Sharma, P., Puri, N., and Gupta, N. (2014). Purification and characterization of an alkali-thermostable β -mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11 and its application in mannooligosaccharides preparation having prebiotic potential. *European Food Research and Technology* 238, 927–936. doi:10.1007/s00217-014-2170-7.
- Chen, W. L., Liang, J. B., Jahromi, M. F., Abdullah, N., Ho, Y. W., and Tufarelli, V. (2014). Enzyme Treatment Enhances Release of Prebiotic Oligosaccharides from Palm Kernel Expeller. *BioResources* 10, 196–209. doi:10.15376/biores.10.1.196-209.
- Cocconcelli, P. S., and Fontana, C. (2010). "Starter Cultures for Meat Fermentation," in *Handbook of Meat Processing* (Oxford, UK: Wiley-Blackwell), 199–218. doi:10.1002/9780813820897.ch10.
- Cocconcelli, P. S., and Fontana, C. (2014). "Bacteria," in *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, eds. F. Toldrá and R. Talon. Fidel Toldrá; associate editors, Y.H. Hui, I. Astiasarán, J.G. Sebranek (Wiley), 117–128. doi:10.1002/9781118522653.ch14.
- Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M. L., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M. T., and Vidal-Carou, M. C. (2019). "Histamine and Other Biogenic Amines in Food. From Scombroid Poisoning to Histamine Intolerance," in *Biogenic Amines* (IntechOpen). doi:10.5772/intechopen.84333.
- Comas-Basté, O., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M., and Vidal-Carou, M. C. (2020). Histamine intolerance: The current state of the art. *Biomolecules* 10, 1–26. doi:10.3390/biom10081181.

- Comisión Europea (2011). Decisión 2011/762/UE relativa a la autorización de comercialización de betaglucanos de levadura como nuevo ingrediente alimentario.
- Comisión Europea (2012). Reglamento UE 432/2012 del 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los ni.
- Consejo de la Unión Europea (2008). Reglamento (CE) nº 479/2008 del Consejo, de 29 de abril de 2008 , por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX:32008R0479%5Cnhttp://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R0479&from=ES%5Cnhttp://www.mapa.ma.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-agroalimentaria/calidad-diferenciada/%5Cnhttp://>
- Consejo Regulador de la denominación Cava (2021). El método tradicional o champenoise. *El método tradicional o champenoise*. Available at: <https://www.cava.wine/es/origen/el-metodo-tradicional-o-champenoise/> [Accessed July 29, 2021].
- Consejo Regulador de la Denominación de Origen Protegida Cava (2020). Datos económicos 2020. *Datos Economicos 2020*. Available at: https://www.cava.wine/documents/262/Dossier_Datos_Economicos_2020_ESP.pdf [Accessed July 30, 2021].
- Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., et al. (2015). Prebióticos; Concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutricion Hospitalaria* 31, 99–118. doi:10.3305/nh.2015.31.sup1.8715.
- Curiel, J. A., Rodríguez, H., Landete, J. M., de las Rivas, B., and Muñoz, R. (2010). Ability of *Lactobacillus brevis* strains to degrade food phenolic acids. *Food Chemistry* 120, 225–229. doi:10.1016/j.foodchem.2009.10.012.
- de Iseppi, A., Lomolino, G., Marangon, M., and Curioni, A. (2020). Current and future strategies for wine yeast lees valorization. *Food Research International* 137, 109352. doi:10.1016/j.foodres.2020.109352.
- Devesa-Rey, R., Vecino, X., Varela-Alende, J. L., Barral, M. T., Cruz, J. M., and Moldes, A. B. (2011). Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste Management* 31, 2327–2335. doi:10.1016/j.wasman.2011.06.001.
- EFSA (2011). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* 9, 2393. doi:10.2903/j.efsa.2011.2393.
- EFSA (2021). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 19. doi:10.2903/j.efsa.2021.6406.

- Erkkilä, S., Suihko, M. L., Eerola, S., Petäjä, E., and Mattila-Sandholm, T. (2001). Dry sausage fermented by *Lactobacillus rhamnosus* strains. *International Journal of Food Microbiology* 64, 205–210. doi:10.1016/S0168-1605(00)00457-8.
- Fan, W., Yi, Y., Zhang, Y., and Diao, P. (2015). Effect of an antioxidant from bamboo leaves combined with tea polyphenol on biogenic amine accumulation and lipid oxidation in pork sausages. *Food Science and Biotechnology* 24, 421–426. doi:10.1007/s10068-015-0055-6.
- FAO (2015). La apuesta por la economía circular en la Unión Europea. *La apuesta por la economía circular en la Unión Europea*. Available at: <http://www.fao.org/in-action/territorios-inteligentes/articulos/experiencias-territoriales/detalle/es/c/288758/> [Accessed August 2, 2021].
- Fernández-Ginés, J. M., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., Sendra, E., and Pérez-Álvarez, J. A. (2004). Lemon albedo as a new source of dietary fiber: Application to bologna sausages. *Meat Science* 67, 7–13. doi:10.1016/j.meatsci.2003.08.017.
- Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., Navarro, C., and Pérez-Alvarez, J. A. (2008). Physico-chemical and microbiological profiles of “salchichón” (Spanish dry-fermented sausage) enriched with orange fiber. *Meat Science* 80, 410–417. doi:10.1016/j.meatsci.2008.01.010.
- Fernández-López, J., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., Navarro, C., and Pérez-Alvarez, J. A. (2007). Orange fibre as potential functional ingredient for dry-cured sausages. *European Food Research and Technology* 226, 1–6. doi:10.1007/s00217-006-0501-z.
- FIAB (2021). El Pacto Verde Europeo. *Transformación sostenible de la industria de alimentación y bebidas: El Pacto Verde Europeo*, 27.
- Fornairon-Bonnefond, C., Camarasa, C., Moutounet, M., and Salmon, J.-M. (2002). New trends on yeast autolysis and wine ageing on lees: a bibliographic review. *OENO One* 36, 49. doi:10.20870/oeno-one.2002.36.2.974.
- Gainza, O., and Romero, J. (2017). Manano oligosacaridos como prebioticos en acuicultura de crustaceos. *Latin American Journal of Aquatic Research* 45, 246–260. doi:10.3856/vol45-issue2-fulltext-2.
- Gallardo-Chacón, J. J., Vichi, S., López-Tamames, E., and Buxaderas, S. (2010). Changes in the Sorption of Diverse Volatiles by *Saccharomyces cerevisiae* Lees during Sparkling Wine Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 12426–12430. doi:10.1021/jf103086e.
- Gallardo-Chacón, J. J., Vichi, S., Urpí, P., López-Tamames, E., and Buxaderas, S. (2010). Antioxidant activity of lees cell surface during sparkling wine sur lie aging. *International journal of food microbiology* 143, 48–53. doi:10.1016/j.jfoodmicro.2010.07.027.

- García, M. L., Dominguez, R., Galvez, M. D., Casas, C., and Selgas, M. D. (2002). Utilization of cereal and fruit fibres in low fat dry fermented sausages. *Meat Science* 60, 227–236. doi:10.1016/S0309-1740(01)00125-5.
- Garriga, M., Aymerich, M. T., Costa, S., Monfort, J. M., and Hugas, M. (2002). Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiology* 19, 509–518. doi:10.1006/fmic.2002.0498.
- Giacobbo, A., Dias, B. B., Onorevoli, B., Bernardes, A. M., de Pinho, M. N., Caramão, E. B., et al. (2019). Wine lees from the 1st and 2nd rackings: valuable by-products. *Journal of Food Science and Technology* 56, 1559–1566. doi:10.1007/s13197-019-03665-1.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., et al. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 14, 491–502. doi:10.1038/nrgastro.2017.75.
- Gokdogan, S., Özogul, Y., Kuley, E., Özogul, F., Kacar, C., and Ucar, Y. (2012). The Influences of Natural Zeolite (cliptinolite) on Ammonia and Biogenic Amine Formation by Foodborne Pathogen. *Journal of Food Science* 77. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02822.x.
- Gómez, B., Peláez, C., Martínez-Cuesta, M. C., Parajó, J. C., Alonso, J. L., and Requena, T. (2019a). Emerging prebiotics obtained from lemon and sugar beet byproducts: Evaluation of their in vitro fermentability by probiotic bacteria. *LWT* 109, 17–25. doi:10.1016/j.lwt.2019.04.008.
- Gómez, B., Peláez, C., Martínez-Cuesta, M. C., Parajó, J. C., Alonso, J. L., and Requena, T. (2019b). Emerging prebiotics obtained from lemon and sugar beet byproducts: Evaluation of their in vitro fermentability by probiotic bacteria. *Lwt* 109, 17–25. doi:10.1016/j.lwt.2019.04.008.
- Gouveinhas, I., Santos, R. A., Queiroz, M., Leal, C., Saavedra, M. J., Domínguez-Perles, R., et al. (2018). Monitoring the antioxidant and antimicrobial power of grape (*Vitis vinifera* L.) stems phenolics over long-term storage. *Industrial Crops and Products* 126, 83–91. doi:10.1016/j.indcrop.2018.10.006.
- Guergoletto, K. B., Magnani, M., Martin, J. S., Andrade, C. G. T. de J., and Garcia, S. (2010). Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11, 415–421. doi:10.1016/j.ifset.2009.11.003.
- Hammes, W. P., Bantleon, A., and Min, S. (1990). Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Letters* 87, 165–174. doi:10.1111/j.1574-6968.1990.tb04886.x.

- Hernandez-Hernandez, O., Muthaiyan, A., Moreno, F. J., Montilla, A., Sanz, M. L., and Ricke, S. C. (2012). Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. *Food Microbiology* 30, 355–361. doi:10.1016/j.fm.2011.12.022.
- Honda, H., Kataoka, F., Nagaoka, S., Kawai, Y., Kitazawa, H., Itoh, H., et al. (2007). β -Galactosidase, phospho- β -galactosidase and phospho- β -glucosidase activities in lactobacilli strains isolated from human faeces. *Letters in Applied Microbiology* 45, 461–466. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02176.x.
- Huebner, J., Wehling, R. L., and Hutkins, R. W. (2007). Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal* 17, 770–775. doi:10.1016/j.idairyj.2006.10.006.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, T., and Monfort, J. M. (1993). Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 18, 107–113. doi:10.1016/0168-1605(93)90215-3.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (1996). "Microbiological specifications of food pathogens," in *Microorganisms in foods 5.*, eds. T. A. Roberts, A. C. Baird-Parker, and R. B. Tompkin (Springer US), 514.
- Jara-Palacios, M. J. (2019a). Wine Lees as a Source of Antioxidant Compounds. *Antioxidants* 8, 45. doi:10.3390/antiox8020045.
- Jara-Palacios, M. J. (2019b). Wine lees as a source of antioxidant compounds. *Antioxidants* 8, 1–10. doi:10.3390/antiox8020045.
- Jara-Palacios, M. J. (2019c). Wine Lees as a Source of Antioxidant Compounds. *Antioxidants* 8, 45. doi:10.3390/antiox8020045.
- Jiménez-Zamora, A., Pastoriza, S., and Rufián-Henares, J. A. (2015a). Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology* 61, 12–18. doi:10.1016/j.lwt.2014.11.031.
- Jiménez-Zamora, A., Pastoriza, S., and Rufián-Henares, J. A. (2015b). Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology* 61, 12–18. doi:10.1016/j.lwt.2014.11.031.
- Jofré, A., Aymerich, T., and Garriga, M. (2009). Improvement of the food safety of low acid fermented sausages by enterocins A and B and high pressure. *Food Control* 20, 179–184. doi:10.1016/j.foodcont.2008.04.001.
- Julendra, H., Sofyan, A., Abinawanto, and Yasman (2019). Improving antibacterial activity and viability of *Lactobacillus plantarum* AKK30 as feed additive by addition of different oligosaccharides. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 251, 1–7. doi:10.1088/1755-1315/251/1/012051.

- Kath, F., and Kulicke, W. M. (1999). Mild enzymatic isolation of mannan and glucan from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Angewandte Makromolekulare Chemie* 268, 59–68. doi:10.1002/(sici)1522-9505(19990701)268:1<59::aid-apmc59>3.3.co;2-6.
- Kawamoto, S., Kaneoke, M., Ohkouchi, K., Amano, Y., Takaoka, Y., Kume, K., et al. (2011). Sake Lees Fermented with Lactic Acid Bacteria Prevents Allergic Rhinitis-Like Symptoms and IgE-Mediated Basophil Degranulation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75, 140–144. doi:10.1271/bbb.100541.
- Kiliç, G. B., and Akpınar, D. (2013). The effects of different levels of β -glucan on yoghurt manufactured with *Lactobacillus plantarum* strains as adjunct culture. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 11, 281–287.
- Klančnik, A., Guzej, B., Kolar, M. H., Abramovic, H., Mozina, S. S., Klančnik, A., et al. (2009). In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection* 72, 1744–1752. doi:10.4315/0362-028X-72.8.1744.
- Klis, F. M. (1994). Review: Cell wall assembly in yeast. *Yeast* 10, 851–869. doi:10.1002/yea.320100702.
- Klis, F. M., Boorsma, A., and de Groot, P. W. J. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 185–202. doi:10.1002/yea.1349.
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., and Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 239–256. doi:10.1111/j.1574-6976.2002.tb00613.x.
- Kneifel, W. (2000). In vitro growth behaviour of probiotic bacteria in culture media with carbohydrates of prebiotic importance. *Microbial Ecology in Health and Disease* 12, 27–34. doi:10.1080/089106000435563.
- Kogan, G., and Kocher, A. (2007). Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livestock Science* 109, 161–165. doi:10.1016/j.livsci.2007.01.134.
- Kollár, R., Petráková, E., Ashwell, G., Robbins, P. W., and Cabib, E. (1995). Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta(1-->3)-glucan. *The Journal of biological chemistry* 270, 1170–8. doi:10.1074/jbc.270.3.1170.
- Kukleci, E., Smulders, F. J. M., Hamidi, A., Bauer, S., and Paulsen, P. (2019). Prevalence of foodborne pathogenic bacteria, microbial levels of hygiene indicator bacteria, and concentrations of biogenic amines in ready-to-eat meat products at retail in the republic of Kosovo. *Journal of Food Protection* 82, 1135–1140. doi:10.4315/0362-028X.JFP-19-060.
- Lacerda Massa, N. M., Dantas Duarte Menezes, F. N., de Albuquerque, T. M. R., de Oliveira, S. P. A., Lima, M. dos S., Magnani, M., et al. (2020a). Effects of digested jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) by-product on growth and

- metabolism of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* indicate prebiotic properties. *LWT* 131, 109766. doi:10.1016/j.lwt.2020.109766.
- Lacerda Massa, N. M., Dantas Duarte Menezes, F. N., de Albuquerque, T. M. R., de Oliveira, S. P. A., Lima, M. dos S., Magnani, M., et al. (2020b). Effects of digested jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) by-product on growth and metabolism of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* indicate prebiotic properties. *Lwt* 131, 109766. doi:10.1016/j.lwt.2020.109766.
- Latorre-Moratalla, M. L., Bosch-Fusté, J., Lavizzari, T., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T., and Vidal-Carou, M. C. (2009). Validation of an ultra high pressure liquid chromatographic method for the determination of biologically active amines in food. *Journal of Chromatography A* 1216, 7715–7720. doi:10.1016/j.chroma.2009.08.072.
- Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Talon, R., Aymerich, T., Garriga, M., Zanardi, E., et al. (2010). Distribution of aminogenic activity among potential autochthonous starter cultures for dry fermented sausages. *Journal of Food Protection* 73, 524–528. doi:10.4315/0362-028X-73.3.524.
- Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T., and Vidal-Carou, M. C. (2012). Control of biogenic amines in fermented sausages: Role of starter cultures. *Frontiers in Microbiology* 3, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2012.00169.
- Latorre-Moratalla, M. L., Comas-Basté, O., Bover-Cid, S., and Vidal-Carou, M. C. (2017). Tyramine and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish population. *Food and Chemical Toxicology* 99, 78–85. doi:10.1016/j.fct.2016.11.011.
- Latorre-Moratalla, M. L., Veciana-Nogués, T., Bover-Cid, S., Garriga, M., Aymerich, T., Zanardi, E., et al. (2008). Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European countries. *Food Chemistry* 107, 912–921. doi:10.1016/j.foodchem.2007.08.046.
- Lavelli, V., Torri, L., Zeppa, G., Fiori, L., and Spigno, G. (2016). Recovery of Winemaking By-Products. *Italian Journal of Food Science* 28, 542–564.
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55, 181–186. doi:10.1016/S0168-1605(00)00161-6.
- Lesage, G., and Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 70, 317–43. doi:10.1128/MMBR.00038-05.
- Lipke, P. N., and Ovalle, R. (1998). Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *Journal of Bacteriology* 180, 3735–3740. doi:10.1128/JB.180.15.3735-3740.1998.

- Liu, X., Wang, Q., Cui, S., and Liu, H. (2008). A new isolation method of β -d-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Hydrocolloids* 22, 239–247. doi:10.1016/j.foodhyd.2006.11.008.
- Liu, Y., Wu, Q., Wu, X., Algharib, S. A., Gong, F., Hu, J., et al. (2021). Structure, preparation, modification, and bioactivities of β -glucan and mannan from yeast cell wall: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 173, 445–456. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.01.125.
- Mateos-Aparicio, I., de la Peña Armada, R., Pérez-Cózar, M. L., Rupérez, P., Redondo-Cuenca, A., and Villanueva-Suárez, M. J. (2020). Apple by-product dietary fibre exhibits potential prebiotic and hypolipidemic effects in high-fat fed Wistar rats. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 23. doi:10.1016/j.bcdf.2020.100219.
- Matoušková, P., Vrtná, M., Šnadarová, K., Bokrová, J., and Márová, I. (2016). The effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on the viability of probiotic bacteria. *NANOCON 2016 - Conference Proceedings, 8th International Conference on Nanomaterials - Research and Application*, 548–553.
- Mattos, G. N., Tonon, R. v., Furtado, A. A. L., and Cabral, L. M. C. (2017). Grape by-product extracts against microbial proliferation and lipid oxidation: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97, 1055–1064. doi:10.1002/jsfa.8062.
- Mazauric, J.-P. P., and Salmon, J.-M. M. (2006). Interactions between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging. II. Analysis of desorbed polyphenol compounds from yeast lees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3876–3881. doi:10.1021/jf060037o.
- Menchetti, L., Taticchi, A., Esposto, S., Servili, M., Ranucci, D., Branciarri, R., et al. (2020). The influence of phenolic extract from olive vegetation water and storage temperature on the survival of *Salmonella Enteritidis* inoculated on mayonnaise. *LWT* 129, 109648. doi:10.1016/j.lwt.2020.109648.
- Mendes, A. C. G., Rettore, D. M., Ramos, A. de L. S., da Cunha, S. de F. V., de Oliveira, L. C., and Ramos, E. M. (2014). Salames tipo milano elaborados com fibras de subprodutos da produção de vinho tinto. *Ciencia Rural* 44, 1291–1296. doi:10.1590/0103-8478cr20130389.
- Mikami, N., Tsukada, Y., Pelpolage, S. W., Han, K. H., Fukushima, M., and Shimada, K. (2020). Effects of Sake lees (Sake-kasu) supplementation on the quality characteristics of fermented dry sausages. *Heliyon* 6, e03379. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03379.
- Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (1991). Reglamento de la Denominación de Origen Cava.

- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Colomo, B., and Suárez, J. A. (2005). Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes. *European Food Research and Technology* 220, 341–346. doi:10.1007/s00217-004-1053-8.
- Mudgil, D., Barak, S., Patel, A., and Shah, N. (2018). Partially hydrolyzed guar gum as a potential prebiotic source. *International Journal of Biological Macromolecules* 112, 207–210. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.01.164.
- Nerantzis, E. T., and Taritidis, P. (2006). Integrated Enology- Utilization of winery by-products into high added value. *E-journal of Science and Technology* 1, 79–89.
- O' Donnell, M. M., Forde, B. M., Neville, B., Ross, P. R., and O' Toole, P. W. (2011). Carbohydrate catabolic flexibility in the mammalian intestinal commensal *Lactobacillus ruminis* revealed by fermentation studies aligned to genome annotations. *Microbial Cell Factories* 10, S12. doi:10.1186/1475-2859-10-S1-S12.
- ONU (2015). 17 Goals to Transform Our World. Available at: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/> [Accessed August 2, 2021].
- Ordoñez, J. A., and de la Hoz, L. (2001). "Embutidos crudos curados. Tipos. Fenómenos madurativos. Alteraciones.," in *Enciclopedia de la carne y los productos cárnicos vol. 2*, ed. S. Martin Bejarano (Plascencia, España: Ediciones Martin & Macias), 1063–1090.
- Özogul, F., and Hamed, I. (2018). The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58, 1660–1670. doi:10.1080/10408398.2016.1277972.
- Papadopoulou, C., Soulti, K., and Roussis, I. G. (2005). Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *staphylococcus aureus*, *escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technology and Biotechnology* 43, 41–46.
- Payne, K. D., Rico-Munoz, E., and Davidson, P. M. (1989). The Antimicrobial Activity of Phenolic Compounds Against *Listeria monocytogenes* and Their Effectiveness in a Model Milk System. *Journal of Food Protection* 52, 151–153. doi:10.4315/0362-028X-52.3.151.
- Piekarska-Radzik, L., and Klewicka, E. (2021). Mutual influence of polyphenols and *Lactobacillus* spp. bacteria in food: a review. *European Food Research and Technology* 247, 9–24. doi:10.1007/s00217-020-03603-y.
- Pongsapipatana, N., Damrongteerapap, P., Chantorn, S., Sintuprapa, W., Keawsompong, S., and Nitisinprasert, S. (2016). Molecular cloning of kman coding for mannanase from *Klebsiella oxytoca* KUB-CW2-3 and its hybrid mannanase

- characters. *Enzyme and microbial technology* 89, 39–51. doi:10.1016/j.enzmictec.2016.03.005.
- Przyborska, J., Hall, M. C., and Concannon, M. (2019a). In vitro determination of prebiotic potential of aqueous extract of horse chestnut by-product. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 19, 100190. doi:10.1016/j.bcdf.2019.100190.
- Przyborska, J., Hall, M. C., and Concannon, M. (2019b). In vitro determination of prebiotic potential of aqueous extract of horse chestnut by-product. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 19, 100190. doi:10.1016/j.bcdf.2019.100190.
- Quitmann, H., Fan, R., and Czermak, P. (2014). *Biotechnology of Food and Feed Additives*. , eds. H. Zorn and P. Czermak Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg doi:10.1007/978-3-662-43761-2.
- Ramachandraiah, K., and Chin, K. B. (2021). Antioxidant, antimicrobial, and curing potentials of micronized celery powders added to pork sausages. *Food Science of Animal Resources* 41, 110–121. doi:10.5851/kosfa.2020.e86.
- Razmkhab, S., Lopez-Toledano, A., Ortega, J. M., Mayen, M., Merida, J., and Medina, M. (2002). Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeasts and their cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 7432–7437. doi:10.1021/jf025733c.
- Ricci, A., Bernini, V., Maoloni, A., Cirlini, M., Galaverna, G., Neviani, E., et al. (2019). Vegetable by-product lacto-fermentation as a new source of antimicrobial compounds. *Microorganisms* 7. doi:10.3390/microorganisms7120607.
- Romero-Díez, R., Rodríguez-Rojo, S., Cocero, M. J., Duarte, C. M. M., Matias, A. A., and Bronze, M. R. (2018). Phenolic characterization of aging wine lees: Correlation with antioxidant activities. *Food Chemistry* 259, 188–195. doi:10.1016/j.foodchem.2018.03.119.
- Ruiz-Capillas, C., and Herrero, A. M. (2019). Impact of biogenic amines on food quality and safety. *Foods* 8. doi:10.3390/foods8020062.
- Russo, P., López, P., Capozzi, V., de Palencia, P. F., Dueñas, M. T., Spano, G., et al. (2012). Beta-Glucans Improve Growth, Viability and Colonization of Probiotic Microorganisms. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 6026–6039. doi:10.3390/ijms13056026.
- Sagar, N. A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E. M., and Lobo, M. G. (2018). Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 17, 512–531. doi:10.1111/1541-4337.12330.
- Salgado, J. M., Rodríguez, N., Cortés, S., and Domínguez, J. M. (2009). Development of cost-effective media to increase the economic potential for larger-scale bioproduction of natural food additives by *Lactobacillus rhamnosus*, *Debaryomyces*

- Hansen, I., and *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 10414–10428. doi:10.1021/jf901911c.
- Sánchez-Maldonado, A. F., Schieber, A., and Gänzle, M. G. (2011). Structure-function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 111, 1176–1184. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05141.x.
- Sánchez-Zapata, E., Zunino, V., Pérez-Alvarez, J. A., and Fernández-López, J. (2013). Effect of tiger nut fibre addition on the quality and safety of a dry-cured pork sausage ("Chorizo") during the dry-curing process. *Meat Science* 95, 562–568. doi:10.1016/j.meatsci.2013.05.026.
- Sanz-Puig, M., Moreno, P., Pina-Pérez, M. C., Rodrigo, D., and Martínez, A. (2017). Combined effect of high hydrostatic pressure (HHP) and antimicrobial from agro-industrial by-products against *S. Typhimurium*. *Lwt* 77, 126–133. doi:10.1016/j.lwt.2016.11.031.
- Sayas-Barberá, E., Viuda-Martos, M., Fernández-López, F., Pérez-Alvarez, J. A., and Sendra, E. (2012). Combined use of a probiotic culture and citrus fiber in a traditional sausage 'Longaniza de Pascua.' *Food Control* 27, 343–350. doi:10.1016/j.foodcont.2012.04.009.
- Sendra, E., Fayos, P., Lario, Y., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., and Pérez-Alvarez, J. A. (2008a). Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. *Food Microbiology* 25, 13–21. doi:10.1016/j.fm.2007.09.003.
- Sendra, E., Fayos, P., Lario, Y., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., and Pérez-Alvarez, J. A. (2008b). Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. *Food Microbiology* 25, 13–21. doi:10.1016/j.fm.2007.09.003.
- Serra, A. T., Matias, A. A., Nunes, A. V. M., Leitão, M. C., Brito, D., Bronze, R., et al. (2008). In vitro evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9, 311–319. doi:10.1016/j.ifset.2007.07.011.
- Serra-Castelló, C., Bover-Cid, S., Garriga, M., Hansen, T. B., Gunvig, A., and Jofré, A. (2021a). Risk management tool to define a corrective storage to enhance *Salmonella* inactivation in dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 346. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109160.
- Serra-Castelló, C., Costa, J. C. C. P., Jofré, A., Bolívar, A., Pérez-Rodríguez, F., and Bover-Cid, S. (2021b). A mathematical model to predict the antilisteria bioprotective effect of *Lactobacillus sakei* CTC494 in vacuum packaged cooked ham. *International Journal of Food Microbiology*.

- Shi, Y., Liu, J., Yan, Q., You, X., Yang, S., and Jiang, Z. (2018). In vitro digestibility and prebiotic potential of curdlan (1 → 3)- β -D-glucan oligosaccharides in *Lactobacillus* species. *Carbohydrate Polymers* 188, 17–26. doi:10.1016/j.carbpol.2018.01.085.
- Silva de Andrade, R. M., Silva, S., Costa, C. M. da S. F., Veiga, M., Costa, E., Ferreira, M. S. L., et al. (2020). Potential prebiotic effect of fruit and vegetable byproducts flour using in vitro gastrointestinal digestion. *Food Research International* 137, 109354. doi:10.1016/j.foodres.2020.109354.
- Silva, V., Igrejas, G., Falco, V., Santos, T. P., Torres, C., Oliveira, A. M. P., et al. (2018). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds extracted from wine industry by-products. *Food Control* 92, 516–522. doi:10.1016/j.foodcont.2018.05.031.
- Slavin, J. (2013). Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. *Nutrients* 5, 1417–1435. doi:10.3390/nu5041417.
- Suzzi, G., and Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: A review. *International Journal of Food Microbiology* 88, 41–54. doi:10.1016/S0168-1605(03)00080-1.
- Tabanelli, G. (2020). Biogenic Amines and Food Quality: Emerging Challenges and Public Health Concerns. *Foods* 9, 7–10. doi:10.3390/foods9070859.
- Tabasco, R., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Bartolomé, B., Victoria Moreno-Arribas, M., Peláez, C., et al. (2011). Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: Resistance and metabolism. *Food Microbiology* 28, 1345–1352. doi:10.1016/j.fm.2011.06.005.
- Taguri, T., Tanaka, T., and Kouno, I. (2004). Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27, 1965–1969. doi:10.1248/bpb.27.1965.
- Torresi, S., Frangipane, M. T., and Anelli, G. (2011). Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review. *Food Chemistry* 129, 1232–1241. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.006.
- Tremonte, P., Pannella, G., Lombardi, S. J., Iorizzo, M., Vergalito, F., Cozzolino, A., et al. (2020). Low-Fat and High-Quality Fermented Sausages. *Microorganisms* 8, 1025. doi:10.3390/microorganisms8071025.
- Tsukada, M., Sheng, H., Kamachi, T., and Niwano, Y. (2016). Microbicidal action of photoirradiated aqueous extracts from wine lees. *Journal of Food Science and Technology* 53, 3020–3027. doi:10.1007/s13197-016-2273-1.
- Vallverdú-Queralt, A., Medina-Remón, A., Martínez-Huélamo, M., Jáuregui, O., Andres-Lacueva, C., and Lamuela-Raventos, R. M. (2011). Phenolic profile and hydrophilic antioxidant capacity as chemotaxonomic markers of tomato varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 3994–4001. doi:10.1021/jf104400g.

- van Ba, H., Seo, H. W., Cho, S. H., Kim, Y. S., Kim, J. H., Ham, J. S., et al. (2016). Antioxidant and anti-foodborne bacteria activities of shiitake by-product extract in fermented sausages. *Food Control* 70, 201–209. doi:10.1016/j.foodcont.2016.05.053.
- van Ba, H., Seo, H. W., Cho, S. H., Kim, Y. S., Kim, J. H., Ham, J. S., et al. (2017). Effects of extraction methods of shiitake by-products on their antioxidant and antimicrobial activities in fermented sausages during storage. *Food Control* 79, 109–118. doi:10.1016/j.foodcont.2017.03.034.
- Vazquez-Armenta, F. J., Bernal-Mercado, A. T., Lizardi-Mendoza, J., Silva-Espinoza, B. A., Cruz-Valenzuela, M. R., Gonzalez-Aguilar, G. A., et al. (2018). Phenolic extracts from grape stems inhibit *Listeria monocytogenes* motility and adhesion to food contact surfaces. *Journal of Adhesion Science and Technology* 32, 889–907. doi:10.1080/01694243.2017.1387093.
- Vázquez-Armenta, F. J., Silva-Espinoza, B. A., Cruz-Valenzuela, M. R., González-Aguilar, G. A., Nazzaro, F., Fratianni, F., et al. (2017). Antibacterial and antioxidant properties of grape stem extract applied as disinfectant in fresh leafy vegetables. *Journal of Food Science and Technology* 54, 3192–3200. doi:10.1007/s13197-017-2759-5.
- Vidal-Carou, M. C., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M. L., and Bover-Cid, S. (2014a). "Biogenic Amines: Risks and Control," in *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, ed. & R. Talon. Fidel Toldrá ; associate editors, Y.H. Hui, I. Astiasarán, J.G. Sebranek (Wiley), 413–428. doi:10.1002/9781118522653.ch47.
- Vidal-Carou, M. C., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M. L., and Bover-Cid, S. (2014b). "Biogenic Amines: Risks and Control," in *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, ed. & R. Talon. Fidel Toldrá ; associate editors, Y.H. Hui, I. Astiasarán, J.G. Sebranek (Wiley), 413–428. doi:10.1002/9781118522653.ch47.
- Wang, Y., Li, F., Zhuang, H., Li, L., Chen, X., and Zhang, J. (2015). Effects of Plant Polyphenols and α -Tocopherol on Lipid Oxidation, Microbiological Characteristics, and Biogenic Amines Formation in Dry-Cured Bacons. *Journal of Food Science* 80, C547–C555. doi:10.1111/1750-3841.12796.
- Yalinkiliç, B., Kaban, G., and Kaya, M. (2012a). The effects of different levels of orange fiber and fat on microbiological, physical, chemical and sensorial properties of sucuk. *Food Microbiology* 29, 255–259. doi:10.1016/j.fm.2011.07.013.
- Yalinkiliç, B., Kaban, G., and Kaya, M. (2012b). The effects of different levels of orange fiber and fat on microbiological, physical, chemical and sensorial properties of sucuk. *Food Microbiology* 29, 255–259. doi:10.1016/j.fm.2011.07.013.
- Yang, B., Prasad, K. N., Xie, H., Lin, S., and Jiang, Y. (2011). Structural characteristics of oligosaccharides from soy sauce lees and their potential prebiotic effect on lactic

acid bacteria. *Food Chemistry* 126, 590–594.
doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.048.

Yuca, B., Topçu, İ., Yağcılar-Aydemir, H., Özer, C. O., Kılıç, B., and Başığit-Kılıç, G. (2019). Effects of beta-glucan addition on the physicochemical and microbiological characteristics of fermented sausage. *Journal of Food Science and Technology* 56, 3439–3448. doi:10.1007/s13197-019-03830-6.

Zhang, Q. Q., Jiang, M., Rui, X., Li, W., Chen, X. H., and Dong, M. S. (2017). Effect of rose polyphenols on oxidation, biogenic amines and microbial diversity in naturally dry fermented sausages. *Food Control* 78, 324–330. doi:10.1016/j.foodcont.2017.02.054.

Zokaityte, E., Cernauskas, D., Klupsaite, D., Lele, V., Starkute, V., Zavistanaviciute, P., et al. (2020). Bioconversion of Milk Permeate with Selected Lactic Acid Bacteria Strains and Apple By-Products into Beverages with Antimicrobial Properties and Enriched with Galactooligosaccharides. *Microorganisms* 8, 1182. doi:10.3390/microorganisms8081182.





6. ANEXOS

5.1. Contribuciones científicas derivadas de las tesis doctoral

5.1.1 PUBLICACIONES

PUBLICACIÓN 1 | página 107

Growth-Promoting Effect of Cava Lees on Lactic Acid Bacteria Strains: A Potential Revalorization Strategy of a Winery By-Product

Salvador Hernández-Macias, Oriol Comas-Basté, Anna Jofré, Sara Bover-Cid, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Carmen Vidal-Carou
Foods, 2021, 10(7), 1636.

Índice de impacto (SJR 2020): 0,774

Posición en el área de conocimiento "Food Science": Q1 (73/332)

PUBLICACIÓN 2 | página 117

Revalorization of Cava Lees to Improve the Safety of Fermented Sausages.

Salvador Hernández-Macias, Nuria Ferrer-Bustins, Oriol Comas-Basté, Anna Jofré, M. Luz Latorre-Moratalla, Sara Bover-Cid, M. Carmen Vidal-Carou
Foods, 2021, 10(8), 1916.

Índice de impacto (SJR 2020): 0,774

Posición en el área de conocimiento "Food Science": Q1 (73/332)

PUBLICACIÓN 3 | página 131

Inhibition of biogenic amines formation in fermented foods by the addition of cava lees

Salvador Hernández-Macias, Alba Martín-García, Nuria Ferrer-Bustins, Oriol Comas-Basté, Montserrat Riu-Aumatell, Elvira López-Tamames, Anna Jofré, M. Luz Latorre-Moratalla, Sara Bover-Cid, M. Carmen Vidal-Carou
Frontiers in Microbiology, 2021 (En revisión)

Índice de impacto (SJR 2020): 1,701

Posición en el área de conocimiento "Microbiology": Q1 (30/152)

Communication

Growth-Promoting Effect of Cava Lees on Lactic Acid Bacteria Strains: A Potential Revalorization Strategy of a Winery By-Product

Salvador Hernández-Macias ^{1,2,3}, Oriol Comas-Basté ^{1,2,3}, Anna Jofré ⁴, Sara Bover-Cid ⁴, M. Luz Latorre-Moratalla ^{1,2,3} and M. Carmen Vidal-Carou ^{1,2,3,*}

- ¹ Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Campus de l'Alimentació de Torribera, Universitat de Barcelona (UB), Av. Prat de la Riba 171, 8921 Santa Coloma de Gramenet, Spain; salva.hernandez@ub.edu (S.H.-M.); oriolcomas@ub.edu (O.C.-B.); mariluzlatterre@ub.edu (M.L.L.-M.)
- ² Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona (UB), Av. Prat de la Riba 171, 8921 Santa Coloma de Gramenet, Spain
- ³ Xarxa d'Innovació Alimentària (XIA), C/Baldiri Reixac 4, 8028 Barcelona, Spain
- ⁴ Food Safety and Functionality Programme, Institute of Agrifood Research and Technology (IRTA), Finca Camps i Armet s/n, 17121 Monells, Spain; anna.jofre@irta.cat (A.J.); sara.bovercid@irta.cat (S.B.-C.)
- * Correspondence: mcvidal@ub.edu; Tel.: +34-934-031-984



Citation: Hernández-Macias, S.; Comas-Basté, O.; Jofré, A.; Bover-Cid, S.; Latorre-Moratalla, M.L.; Vidal-Carou, M.C. Growth-Promoting Effect of Cava Lees on Lactic Acid Bacteria Strains: A Potential Revalorization Strategy of a Winery By-Product. *Foods* **2021**, *10*, 1636. <https://doi.org/10.3390/foods10071636>

Academic Editor: Maria Rosaria Corbo

Received: 7 June 2021

Accepted: 12 July 2021

Published: 15 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The growing trend of circular economy has prompted the design of novel strategies for the revalorization of food industry by-products. Cava lees, a winery by-product consisting of non-viable cells of *Saccharomyces cerevisiae* rich in β -glucans and mannan-oligosaccharides, can be used as a microbial growth promoter, with potential food safety and health applications. The aim of this study was to assess in vitro the effect of cava lees on the growth of 21 strains of lactic acid bacteria (LAB) species commonly used as starter cultures and/or probiotics. Firstly, 5% of cava lees was selected as the most effective amount for enhancing microbial counts. After screening different LAB, statistically significantly ($p < 0.05$) higher microbial counts were found in 12 strains as a consequence of cava lees supplementation. Moreover, a greater and faster reduction in pH was observed in most of these strains. The growth-promoting effects of cava lees on LAB strains supports the potential revalorization of this winery by-product, either to improve the safety of fermented products or as a health-promoting prebiotic that may be selectively fermented by probiotic species.

Keywords: cava lees; by-product; winery; β -glucans; mannanoligosaccharides (MOS); lactic acid bacteria (LAB); prebiotics; probiotics; revalorization; circular economy

1. Introduction

The production of cava, a highly appreciated Spanish sparkling wine, traditionally involves a second fermentation in the bottle and a subsequent biological aging of the base wine on lees for at least 9 months [1]. Cava lees are non-viable cells of *Saccharomyces cerevisiae* naturally plasmolyzed due to the sustained contact with wine [2–4]. In general, approximately one gram of lees, containing approximately 10^8 dead cells of *S. cerevisiae*, is obtained for each bottle of cava [5]. Thus, considering that in 2020 around 215 million bottles of cava were produced in Spain, it can be estimated that about 215 tons of lees are generated annually [6]. These lees are currently considered a by-product of the cava industry that, according to its compositional characteristics, could potentially achieve a high added value.

Cava lees are rich in antioxidant compounds, as well as in soluble and insoluble fibers mainly derived from the yeast cell wall [7]. The principle components of the *S. cerevisiae* cell wall are β -1,3-glucan (50–55%) and β -1,6-glucan (5–10%), together with mannoproteins (35–40%), and chitin (1–2%) [8,9]. In recent years, β -glucans have attracted growing interest

as an ingredient in food formulations [10,11] and, in 2011, β -glucans from yeast and fungi were approved by the European Commission as novel food ingredients [12,13]. Several studies have demonstrated the ability of β -glucans to promote the growth and survival of lactic acid bacteria (LAB) [14–17]. Similarly, mannan-oligosaccharides (MOS) have the capacity to stimulate the growth of different beneficial lactobacilli species of the intestinal microbiota, both in humans and animals [18–20].

The technological functionality of dietary fiber is increasingly being explored for food applications, especially in fermented products [21–31]. The addition of fiber can enhance the fermentation rate and help to achieve a greater decrease in pH, a desirable effect in terms of food safety. In this context, food industry by-products, reused as ingredients in the formulation of fermented meat products, have been found to stimulate the growth of certain LAB and provide safety advantages while maintaining or even improving the organoleptic quality of these foods [32,33].

From a health point of view, soluble fiber is well known to have a prebiotic effect that improves the survival and implantation of species within the intestinal microbiota with beneficial effects for the host [34]. Promising results have been recently reported about the potential prebiotic effect of fiber-rich by-products on the viability of certain probiotic strains, mainly lactobacilli. Thus, different tested probiotic strains showed an enhanced growth when cultured in vitro with a variety of food by-products, such as lemon peel, sugar beef pulp, horse chestnut seeds, fruit and vegetable sours, and apple pomace, although the growth-promoting effect has been described as strain-dependent [35–38].

Considering cava lees are rich in different types of fibers (mainly β -glucans and MOS), they have potential application as a microbial growth promoter, with benefits for food safety and health. If confirmed, this could be a novel strategy for the revalorization of this winery by-product in alignment with current circular economy initiatives. To date, cava lees have not been studied from this perspective. Therefore, the aim of this study was to assess in vitro the potential promoting effect of cava lees on the growth of different strains of LAB from species commonly used as starter cultures and/or probiotics.

2. Materials and Methods

2.1. Obtaining Cava Lees

Cava lees were provided by the winery Freixenet S.A. (Sant Sadurní d'Anoia, Spain). To eliminate remaining cava, wet lees were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C. The lees were subsequently frozen in an ultra-low temperature freezer (−80 °C), freeze-dried (Cryodos-50, Telstar, Terrassa, Spain), ground, and preserved in sealed tubes protected from the light and humidity until use.

2.2. Assessment of the Effect of Different Amounts of Cava Lees on the Growth of LAB Strains

A scheme of the overall experimental procedure is provided in Figure 1. In order to select the most effective concentration, the growth promoter effect of different amounts of cava lees was assessed in 6 bacterial strains of *Latilactobacillus sakei* (CTC494 and BAP111), *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* (CECT4180 and CECT220), *Latilactobacillus curvatus* (BAP202), and *Lactocaseibacillus casei* (BAP341). An overnight culture of each strain was performed in MRS broth (Condalab®, Madrid, Spain) incubated in optimal growth conditions (Table 1). Then, a 100 μ L aliquot from the overnight culture was subcultured in 25 mL of MRS broth without (control) or with increasing amounts of lees (0.5%, 1%, 2%, and 5% (w/v)) at the optimal temperature, and with constant shaking (200 rpm) under aerobic conditions. Amounts above 5% of lees were not considered, as they technically hindered the cultivation of the bacterial strains. Plate microbial counts, expressed as log₁₀ CFU/mL, were determined in duplicate at incubation times 0 to 72 h. Three independent assays were performed for each bacterial strain.

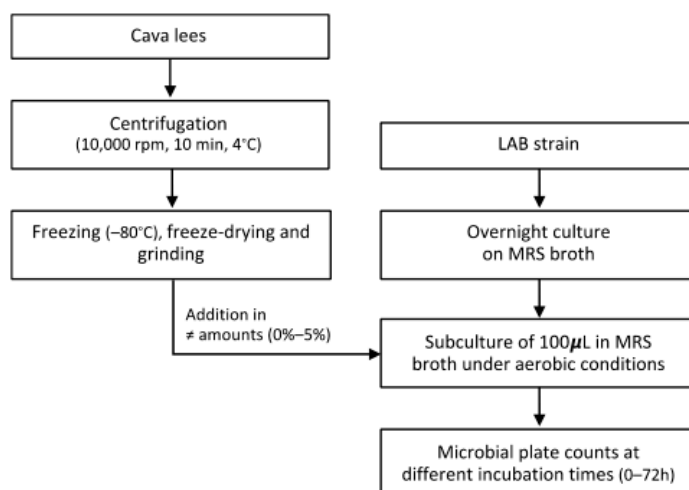


Figure 1. Overall experimental procedure for the in vitro assessment of the effect of cava lees on the growth of different LAB strains.

Table 1. Lactic acid bacteria (LAB) strains used in this study.

Species	Strain	Optimal Growth Temperature	Source (Collection)	Growth Promoted by Cava Lees
<i>Latilactobacillus sakei</i>	BAP101	30 °C	Research Group Collection	YES
	BAP102			YES
	BAP110			YES
	BAP111			YES
	BAP115			YES
	CTC494		IRTA culture collection ¹ CHR Hansen®	YES
	SM181			NO
	FSC111			NO
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	BAP201	30 °C	Research Group Collection	YES
	BAP202			YES
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	CECT4180	37 °C	Spanish Type Culture Collection	YES
	CECT220			YES
	CECT221			NO
	CECT224			NO
	CECT749			NO
<i>Lactocaseibacillus casei</i>	ATCC14917	37 °C	American Type Culture Collection	NO
	CECT7600	37 °C	Spanish Type Culture Collection	NO
	BAP341		Research Group Collection	YES
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	CECT285	37 °C	Spanish Type Culture Collection	YES
<i>Lactobacillus gasseri</i>	BAP513	37 °C	Research Group Collection	NO
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	CECT8330	37 °C	Spanish Type Culture Collection	NO

¹ Institute of Agrifood Research and Technology.

2.3. Screening of the Effect of Cava Lees on the Growth of LAB Strains

A total of 21 strains of LAB species were selected for their special interest from a technological (starter cultures) and health (probiotics) perspective, and all of them are included in the list of microorganisms with QPS (qualified presumption of safety) status (Table 1). The effect of the addition of 5% of cava lees (previously selected for showing the highest growth promoter effect) on each strain was tested as described in the previous section (Figure 1). Three independent assays were performed for each bacterial strain.

Changes in the pH of the culture media during the assay were measured by a digital instrument (pH 60 DHS® ©XS instruments, Carpi, Italy). Due to the acidity conferred by lees, the pH value of the culture media supplemented with lees was adjusted with KOH (1M) to equilibrate the pH to that of the control sample.

2.4. Data Analysis

Statistical analysis of data was performed using the IBM SPSS Statistics 23.0 statistical software package (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Data of the growth promoter effect of different amounts of cava lees were assessed by an ANOVA and post hoc Tukey tests. Student's *t*-test was applied to assess the statistical significance of log₁₀ counts and pH values of each LAB strain cultured with and without lees. Differences with *p* < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results and Discussion

3.1. Assessment of the Effect of Different Amounts of Cava Lees on the Growth of LAB Strains

Supplementation of the growth medium with cava lees resulted in a higher concentration of viable cells of the different LAB strains in comparison with the control medium (without lees). Overall, a strain-dependent and a dose-dependent effect was observed. As can be seen in Figure 2, the higher microbial counts of some strains due to cava lees was already observed after 6 h of culture, although statistically significant differences at this time were only obtained for *L. sakei* strains (*p* < 0.05). This effect was much more evident after 24 h, when the counts were significantly higher (*p* < 0.05) for four strains (*L. sakei* CTC494, *L. sakei* BAP111, *L. curvatus* BAP202, and *L. casei* BAP341) at all tested amounts of cava lees. The effect of cava lees differed according to the amount used, 2% and 5% producing the strongest statistically significant effect (*p* < 0.05) on bacterial growth (24 h) and/or survival after the stationary phase (at 48 h). Regarding *L. plantarum* strains, significantly different results associated with the concentration were not found until 48 h of incubation (*p* < 0.05). The highest microbial counts of *L. plantarum* were also obtained with 2% and 5% of lees, indicating that, at lower amounts or control conditions, microbial survival after the stationary growth phase was lower. Therefore, among the different assessed amounts of cava lees, the addition of 5% proved to be the most effective for all the tested strains, resulting in LAB microbial concentrations 0.6 to 1.3 log₁₀ units higher than in the control cultures, either at 24 h or 48 h of incubation. Other studies have also reported a stimulatory effect on LAB growth of different plant-derived by-products at concentrations ranging from 1 to 10% [25,35,37,39,40]. Higher amounts (up to 20%) of purified oligosaccharides from soy sauce have also been described as beneficial for the growth of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* (previously *Lactobacillus bulgaricus*) and *Streptococcus thermophilus* after 48 h of supplemented culture [41].

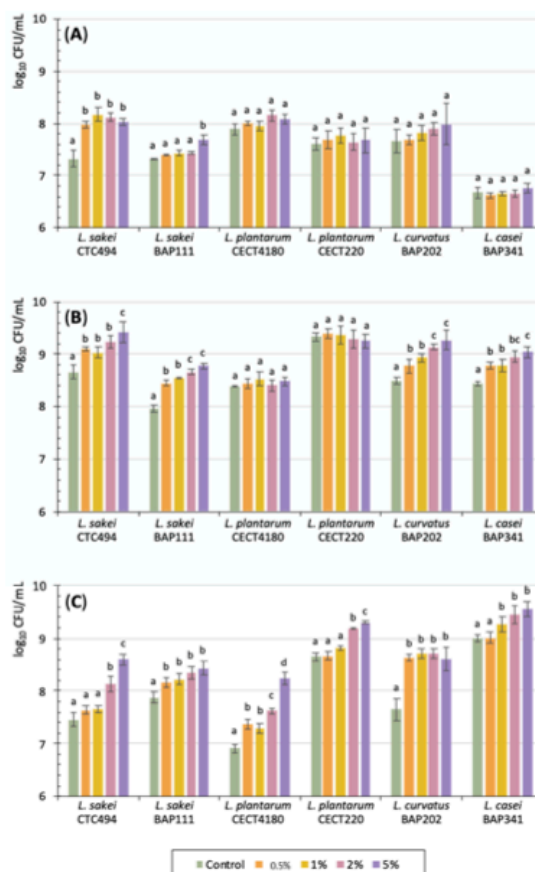


Figure 2. Concentration of 6 LAB strains in growth media without (control) and with different amounts of cava lees after 6 h (A), 24 h (B), and 48 h (C) of incubation. The average and standard deviation (bars) of three independent experiments are displayed. Different letters denote statistically significant differences ($p < 0.05$) between amounts of added cava lees.

3.2. Screening of the Effect of Cava Lees on the Growth of LAB Strains

The effect, in terms of growth, of adding 5% (w/v) of cava lees to the 21 tested LAB strains is shown in Table 1. A statistically significantly higher microbial count due to the presence of cava lees was observed at some time point in 12 strains; their growth kinetics and the pH decrease are depicted in Figure 3. The only species that did not show this effect were *L. gasseri* and *P. pentosaceus*.

Overall, the higher microbial counts due to the addition of lees varied according to the strain (Figure 3). Regarding *L. sakei*, six out of eight strains showed a higher growth rate compared to the control (during the exponential growth phase in the first hours of incubation) when 5% of cava lees was added. Thus, significantly higher microbial counts were obtained at the end of the exponential phase for *L. sakei* BAP101, BAP102, BAP110, BAP111, BAP115, and CTC494, with differences in the maximum population density ranging from 0.7 to 1.1 $\log_{10}$ units with respect to the control ($p < 0.05$). Higher counts were generally maintained until the end of the 72 h incubation period (death phase).

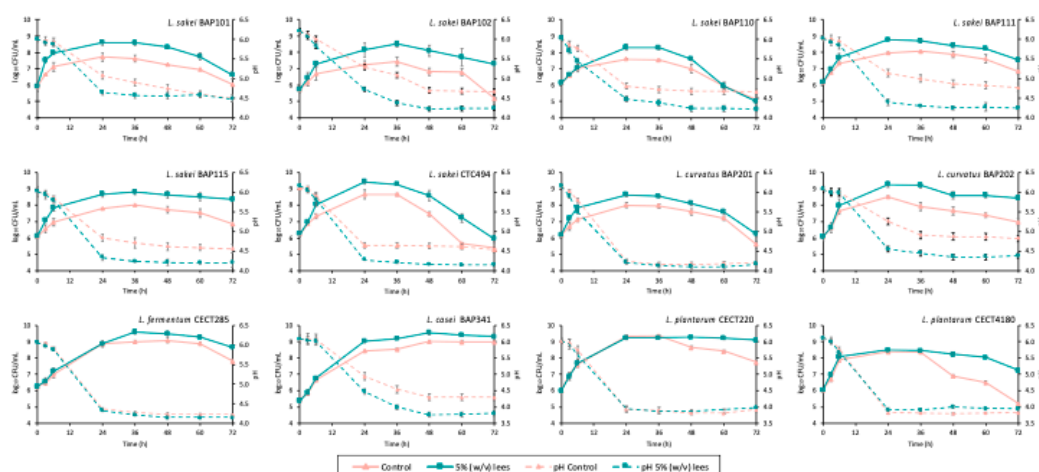


Figure 3. Growth kinetics and changes of pH values of LAB strains cultured without (control) and with 5% cava lees. The average and standard deviation of three independent experiments are shown. The enhanced bacterial growth in *L. sakei* strains cultured with cava lees also resulted in a greater decrease in pH in all strains (Figure 3). The increase in acidity of the culture media was significantly higher and faster during the first 24 h (pH values of 4.2–4.7, depending on the strain), coinciding with the exponential growth phase ($p < 0.05$). The pH of the control culture medium (without cava lees) was always higher, with values of 4.7–5.3.

Regarding *L. curvatus*, a significant promotion of growth was observed for both tested strains compared with the control ($p < 0.05$). *L. curvatus* BAP202, whose growth rate was not affected in the first hours of incubation, reached a higher maximum population density, with concentrations up to 1.5 $\log_{10}$ greater than the control, and a pH 0.7 points lower. In the case of *L. curvatus* BAP201, despite an enhanced growth in the presence of cava lees, the level of acidification was very similar with or without the addition of lees.

L. fermentum CECT275 and *L. casei* BAP341 were also influenced by the addition of lees, although to a lesser extent than the *L. sakei* and *L. curvatus* strains (Figure 3). Significant differences in maximum population density and/or survival of both bacterial strains appeared after 24 h of culture, with increases generally higher than 0.5 $\log_{10}$ cfu/mL compared to the control ($p < 0.05$). However, a significant effect on acidity was only observed for *L. casei* BAP341, the final pH value being 0.5 units lower compared to the control ($p < 0.05$).

L. plantarum were the bacterial species least affected by the presence of cava lees. Of the six strains tested, only two (*L. plantarum* CECT220 and *L. plantarum* CECT4180) showed any differences with respect to the control, though only regarding the survival on the last day of the incubation period. In fact, the addition of cava lees to the culture media significantly enhanced the viability after 36 h ($p < 0.05$), *L. plantarum* CECT220 (1.4 $\log_{10}$) and CECT4180 (2 $\log_{10}$), showing a higher concentration compared to the control culture. No differences were observed in the pH values between the supplemented and unsupplemented culture media, which could be explained by the lack of effect of cava lees in the growth phase in both strains.

Various plant-based by-products have been successfully applied to improve the nutritional, textural and sensory properties of dairy and meat fermented products [24,25,28,29]. However, there are few data about the enhancing effect of by-products on the microbiological safety of fermented products [32,33]. Sayas-Barberá et al. [32] demonstrated a positive effect of a 1% fiber-rich by-product of orange juice production on the food safety of dry fermented sausages when combined with the probiotic strain *L. casei* CTC475. Supplemen-

tation with this citrus by-product promoted the growth and survival of LAB, resulting in a higher acidification of sausages without affecting their sensory properties. More recently, the effect of sake lees (i.e., the residue of the brewing process of the Japanese fermented rice beverage) on dry-fermented sausages was assessed, and higher LAB counts and lower pH values during the aging period were observed [33].

Several recent studies have focused on the revalorization of by-products with a potential role as prebiotics [35–40,42]. Przyborska et al. [36] reported the prebiotic capacity of a horse chestnut by-product, which induced a higher in vitro growth of various probiotic strains of *L. plantarum*, *L. casei* and *L. fermentum*, among others. As in the current study, the capacity to ferment this substrate varied among strains. Andrade et al. [37] found an increased growth of four probiotic lactobacilli strains cultured in vitro with 3% of fruit and vegetable flour. Later, the prebiotic effect of this fiber-rich by-product was further confirmed on gut microbiota obtained from fecal samples. Similar results were obtained by Massa et al. [39] regarding the in vitro prebiotic effect of peel and seeds from jabuticaba, a Brazilian fruit.

The bacterial growth-promoting effects of the above-mentioned by-products have been mainly attributed to their content of oligo- or polysaccharides (e.g., β -glucans, arabinans, arabinogalactans, galactans, xyloglucans, and galactomannans) and pectic substances. Likewise, the observed growth enhancement induced by cava lees could be due to the bacterial use of β -glucans and MOS (constituting more than 90% of the cell wall) as a carbon source. In this regard, the capacity of β -glucans (usually obtained from microbial cell walls, oat, or rye) and MOS to stimulate the growth of several lactobacilli has been extensively reported [15,16,23,27,43–47].

The metabolism of these large carbohydrates requires, as a first step, their hydrolysis into fermentable smaller sugars by glycosidases [15]. The presence of these enzymes has been reported in the *Lactobacillus* genus, which may endow these bacteria with the ability to use oligo- or polysaccharides as a carbon source [15,48]. This is consistent with the results of a study by Russo et al. [15], in which β -glucans showed higher prebiotic activity on a recombinant *L. plantarum* strain with an overexpressed B-glycosidase enzyme. However, the enzymes responsible for this metabolic pathway may be disabled in certain bacterial strains, thus compromising their ability to ferment these substrates [49–51]. This fact supports the results obtained herein, according to which the supplementation with cava lees showed a strain-dependent behavior on the growth-promoting effect of technological and probiotic LAB strains.

Overall, the enhancement of LAB strain growth in vitro and reduction in pH values induced by cava lees supports the potential revalorization of this winery by-product with applications to improve the safety of fermented foods. Furthermore, the selective fermentation of cava lees by certain probiotic species suggests they could be exploited as prebiotics in health applications. Higher amounts of cava lees could potentially have a growth-promoting effect on those species in which no in vitro effect has been observed. Thus, the results obtained here need to be confirmed in real models of fermented foods, which would also allow us to assess both the effects of higher amounts of cava lees and the impact on organoleptic properties. It should be noted that the observed strain-dependency of the effects of cava lees warrants case-by-case study. The proposed recycling of cava lees represents a novel strategy for the revalorization of a by-product generated in large amounts. This approach is in alignment with the Sustainable Development Goals of the United Nations, focused on reducing food industry waste products and promoting the circular economy.

Author Contributions: Conceptualization, M.L.L.-M., M.C.V.-C., A.J. and S.B.-C.; investigation, S.H.-M., O.C.-B. and M.L.L.-M.; writing—original draft preparation, S.H.-M., O.C.-B. and M.L.L.-M.; writing—review and editing, S.H.-M., O.C.-B., M.L.L.-M., A.J., S.B.-C. and M.C.V.-C.; and supervision, M.C.V.-C., A.J. and S.B.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Interministerial Commission for Science and Technology (CICYT) through the Project AGL2016-78324-R.

Acknowledgments: Salvador Hernández-Macias is a recipient of a doctoral fellowship from the University of Guadalajara, Mexico.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Ministry of Agriculture Fisheries and Food. *Regulation of the Cava Denomination and its Regulatory Board*; Ministry of Agriculture Fisheries and Food: Madrid, Spain, 1991; Volume 91, pp. 1–43.
- Alexandre, H.; Guilloux-Benatier, M. Yeast autolysis in sparkling wine—A review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2006**, *12*, 119–127. [CrossRef]
- Gallardo-Chacón, J.; Vichi, S.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Analysis of Sparkling Wine Lees Surface Volatiles by Optimized Headspace Solid-Phase Microextraction. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3279–3285. [CrossRef]
- Gallardo-Chacón, J.J.; Vichi, S.; Urpí, P.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Antioxidant activity of lees cell surface during sparkling wine sur lie aging. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *143*, 48–53. [CrossRef]
- Gallardo-Chacón, J.J.; Vichi, S.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Changes in the Sorption of Diverse Volatiles by *Saccharomyces cerevisiae* Lees during Sparkling Wine Aging. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 12426–12430. [CrossRef] [PubMed]
- D.O. Cava Regulatory Board. Global Report 2020. Available online: https://www.cava.wine/documents/258/ENG_KEY_FIGURES_2020.pdf (accessed on 31 May 2021).
- Alonso, Á.M.; Guillén, D.A.; Barroso, C.G.; Puertas, B.; García, A. Determination of Antioxidant Activity of Wine Byproducts and Its Correlation with Polyphenolic Content. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5832–5836. [CrossRef]
- Klis, F.M. Review: Cell wall assembly in yeast. *Yeast* **1994**, *10*, 851–869. [CrossRef] [PubMed]
- Alcázar, V.; Elba, M.; Arrizon, G.; Javier, P.; Gschaedler, M.; Anne, C.; Lugo, C.; Eugenia, C. Extraction and quantification of the yeast cell wall. *e-Gnosis* **2016**, *14*, 1–7.
- Brennan, C.; Cleary, L.J. The potential use of cereal (1→3,1→4)-β-d-glucans as functional food ingredients. *J. Cereal Sci.* **2005**, *42*, 1–13. [CrossRef]
- Lazaridou, A.; Biliaderis, C. Molecular aspects of cereal β-glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. *J. Cereal Sci.* **2007**, *46*, 101–118. [CrossRef]
- European Commission. *Commission Decision, of 2 February 2011 Authorising the Placing on the Market of a Chitin-Glucan from Aspergillus Niger as a Novel Food Ingredient Under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council*; European Commission: Brussels, Belgium, 2011; Volume 29, pp. 34–35.
- European Commission. *Commission Implementing Decision of 24 November 2011 Authorising the Placing on the Market of Yeast Beta-glucans as a Novel Food Ingredient Under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council*; European Commission: Brussels, Belgium, 2011; pp. 41–44.
- Guergetto, K.B.; Magnani, M.; Martin, J.S.; Andrade, C.G.T.D.J.; Garcia, S. Survival of Lactobacillus casei (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2010**, *11*, 415–421. [CrossRef]
- Russo, P.; López, P.; Capozzi, V.; De Palencia, P.F.; Dueñas, M.T.; Spano, G.; Fiocco, D. Beta-Glucans Improve Growth, Viability and Colonization of Probiotic Microorganisms. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 6026–6039. [CrossRef]
- Shi, Y.; Liu, J.; Yan, Q.; You, X.; Yang, S.; Jiang, Z. In vitro digestibility and prebiotic potential of curdlan (1→3)-β-d-glucan oligosaccharides in Lactobacillus species. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *188*, 17–26. [CrossRef]
- Liu, Y.; Wu, Q.; Wu, X.; Algharib, S.A.; Gong, F.; Hu, J.; Luo, W.; Zhou, M.; Pan, Y.; Yan, Y.; et al. Structure, preparation, modification, and bioactivities of β-glucan and mannan from yeast cell wall: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *173*, 445–456. [CrossRef] [PubMed]
- Asano, I.; Nakamura, Y.; Hoshino, H.; Aoki, K.; Fujii, S.; Imura, N.; Iino, H. Use of Mannooligosaccharides from Coffee Mannan by Intestinal Bacteria. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* **2001**, *75*, 1077–1083. [CrossRef]
- Kogan, G.; Kocher, A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livest. Sci.* **2007**, *109*, 161–165. [CrossRef]
- Hasan, S.; Junnikkala, S.; Peloniemi, O.; Paulin, L.; Lyyski, A.; Vuorenmaa, J.; Oliviero, C. Dietary supplementation with yeast hydrolysate in pregnancy influences colostrum yield and gut microbiota of sows and piglets after birth. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0197586. [CrossRef] [PubMed]
- García, M.; Domínguez, R.; Galvez, M.; Casas, C.; Selgas, M. Utilization of cereal and fruit fibres in low fat dry fermented sausages. *Meat Sci.* **2002**, *60*, 227–236. [CrossRef]
- Fernández-Ginés, J.; Fernández-López, J.; Sayas-Barberá, E.; Sendra, E.; Pérez-Alvarez, J.A. Lemon albedo as a new source of dietary fiber: Application to bologna sausages. *Meat Sci.* **2004**, *67*, 7–13. [CrossRef]
- Yuca, B.; Topcu, I.; Yağcılar-Aydemir, H.; Özer, C.O.; Kılıç, B.; Başyigit-Kılıç, G. Effects of beta-glucan addition on the physico-chemical and microbiological characteristics of fermented sausage. *J. Food Sci. Technol.* **2019**, *56*, 3439–3448. [CrossRef]
- Fernández-López, J.; Sendra, E.; Sayas-Barberá, E.; Navarro, C.; Pérez-Alvarez, J.A. Physico-chemical and microbiological profiles of “salchichón” (Spanish dry-fermented sausage) enriched with orange fiber. *Meat Sci.* **2008**, *80*, 410–417. [CrossRef]

25. Sendra, E.; Fayos, P.; Lario, Y.; Fernández-López, J.; Sayas-Barberá, E.; Pérez-Alvarez, J.A. Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. *Food Microbiol.* **2008**, *25*, 13–21. [\[CrossRef\]](#)
26. Eim, V.S.; García-Pérez, J.V.; Rosselló, C.; Femenia, A.; Simal, S. Influence of the Addition of Dietary Fiber on the Drying Curves and Microstructure of a Dry Fermented Sausage (Sobrassada). *Dry. Technol.* **2011**, *30*, 146–153. [\[CrossRef\]](#)
27. Kiliç, G.B.; Akpinar, D. The effects of different levels of β -glucan on yoghurt manufactured with *Lactobacillus plantarum* strains as adjunct culture. *J. Food Agric. Environ.* **2013**, *11*, 281–287.
28. Sánchez-Zapata, E.; Zunino, V.; Pérez-Alvarez, J.A.; Fernández-López, J. Effect of tiger nut fibre addition on the quality and safety of a dry-cured pork sausage (“Chorizo”) during the dry-curing process. *Meat Sci.* **2013**, *95*, 562–568. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Mendes, A.C.G.; Rettore, D.M.; Ramos, A.d.L.S.; Cunha, S.d.F.V.d.; de Oliveira, L.C.; Ramos, E.M. Salames tipo Milano elaborados com fibras de subprodutos da produção de vinho tinto. *Ciência Rural* **2014**, *44*, 1291–1296. [\[CrossRef\]](#)
30. Barretto, A.C.d.S.; Pacheco, M.T.B.; Pollonio, M.A.R. Effect of the addition of wheat fiber and partial pork back fat on the chemical composition, texture and sensory property of low-fat bologna sausage containing inulin and oat fiber. *Food Sci. Technol.* **2015**, *35*, 100–107. [\[CrossRef\]](#)
31. Varga, L.; Andok, T. Viability of bifidobacteria in soft-frozen ice cream supplemented with a *Saccharomyces cerevisiae* cell wall product. *Acta Aliment.* **2018**, *47*, 387–392. [\[CrossRef\]](#)
32. Sayas-Barberá, E.; Viuda-Martos, M.; Fernández-López, J.A.; Pérez-Alvarez, J.A.; Sendra, E. Combined use of a probiotic culture and citrus fiber in a traditional sausage ‘Longaniza de Pascua’. *Food Control* **2012**, *27*, 343–350. [\[CrossRef\]](#)
33. Mikami, N.; Tsukada, Y.; Pelpolage, S.W.; Han, K.-H.; Fukushima, M.; Shimada, K. Effects of Sake lees (Sake-kasu) supplementation on the quality characteristics of fermented dry sausages. *Heliyon* **2020**, *6*, e03379. [\[CrossRef\]](#)
34. Slavin, J. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. *Nutrients* **2013**, *5*, 1417–1435. [\[CrossRef\]](#)
35. Matoušková, P.; Vrtná, M.; Šnadarová, K.; Bokrová, J.; Márová, I. The effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on the viability of probiotic bacteria. In Proceedings of the NANOCON 2016—8th International Conference on Nanomaterials—Research & Application, Brno, Czech Republic, 19–21 October 2016.
36. Przyborska, J.; Hall, M.C.; Concannon, M. In vitro determination of prebiotic potential of aqueous extract of horse chestnut by-product. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre* **2019**, *19*, 100190. [\[CrossRef\]](#)
37. De Andrade, R.M.S.; Silva, S.; Costa, C.M.d.S.F.; Veiga, M.; Costa, E.; Ferreira, M.S.L.; Gonçalves, E.C.B.d.A.; Pintado, M.E. Potential prebiotic effect of fruit and vegetable byproducts flour using in vitro gastrointestinal digestion. *Food Res. Int.* **2020**, *137*, 109354. [\[CrossRef\]](#)
38. Mateos-Aparicio, I.; De la Peña Armada, R.; Pérez-Cózar, M.L.; Rupérez, P.; Redondo-Cuenca, A.; Villanueva-Suárez, M.J. Apple by-product dietary fibre exhibits potential prebiotic and hypolipidemic effects in high-fat fed Wistar rats. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre* **2020**, *23*, 100219. [\[CrossRef\]](#)
39. Massa, N.M.L.; Menezes, F.N.D.D.; de Albuquerque, T.M.R.; de Oliveira, S.P.A.; Lima, M.; Magnani, M.; de Souza, E.L. Effects of digested jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) by-product on growth and metabolism of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* indicate prebiotic properties. *LWT* **2020**, *131*, 109766. [\[CrossRef\]](#)
40. Gómez, B.; Peláez, C.; Martínez-Cuesta, M.C.; Parajó, J.C.; Alonso, J.L.; Requena, T. Emerging prebiotics obtained from lemon and sugar beet byproducts: Evaluation of their *in vitro* fermentability by probiotic bacteria. *LWT* **2019**, *109*, 17–25. [\[CrossRef\]](#)
41. Yang, B.; Prasad, N.; Xie, H.; Lin, S.; Jiang, Y. Structural characteristics of oligosaccharides from soy sauce lees and their potential prebiotic effect on lactic acid bacteria. *Food Chem.* **2011**, *126*, 590–594. [\[CrossRef\]](#)
42. Jiménez-Zamora, A.; Pastoriza, S.; Rufián-Henares, J.Á. Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. *LWT Food Sci. Technol.* **2015**, *61*, 12–18. [\[CrossRef\]](#)
43. Kneifel, W. In vitro growth behaviour of probiotic bacteria in culture media with carbohydrates of prebiotic importance. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2000**, *12*, 27–34. [\[CrossRef\]](#)
44. Chen, W.L.; Liang, J.B.; Jahromi, M.F.; Abdullah, N.; Ho, Y.W.; Tufarelli, V. Enzyme Treatment Enhances Release of Prebiotic Oligosaccharides from Palm Kernel Expeller. *Bioresources* **2014**, *10*, 196–209. [\[CrossRef\]](#)
45. Pongsapitana, N.; Damrongteerapap, P.; Chantorn, S.; Sintuprapa, W.; Keawsompong, S.; Nitisinprasert, S. Molecular cloning of kman coding for mannanase from *Klebsiella oxytoca* KUB-CW2-3 and its hybrid mannanase characters. *Enzym. Microb. Technol.* **2016**, *89*, 39–51. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Cao, P.; Wu, L.; Wu, Z.; Pan, D.; Zeng, X.; Guo, Y.; Lian, L. Effects of oligosaccharides on the fermentation properties of *Lactobacillus plantarum*. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 2863–2872. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Chauhan, P.S.; Sharma, P.; Puri, N.; Gupta, N. Purification and characterization of an alkali-thermostable β -mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11 and its application in mannooligosaccharides preparation having prebiotic potential. *Eur. Food Res. Technol.* **2014**, *238*, 927–936. [\[CrossRef\]](#)
48. Hernandez-Hernandez, O.; Muthaiyan, A.; Moreno, F.; Montilla, A.; Sanz, M.L.; Ricke, S. Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. *Food Microbiol.* **2012**, *30*, 355–361. [\[CrossRef\]](#)
49. Huebner, J.; Wehling, R.; Hutkins, R. Functional activity of commercial prebiotics. *Int. Dairy J.* **2007**, *17*, 770–775. [\[CrossRef\]](#)

-
50. Donnell, M.M.O.; Forde, B.M.; Neville, B.; Ross, P.R.; Toole, P.W.O. Carbohydrate catabolic flexibility in the mammalian intestinal commensal *Lactobacillus ruminis* revealed by fermentation studies aligned to genome annotations. *Microb. Cell Factories* **2011**, *10*, S12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 51. Honda, H.; Kataoka, F.; Nagaoka, S.; Kawai, Y.; Kitazawa, H.; Itoh, H.; Kimura, K.; Taketomo, N.; Yamazaki, Y.; Tateno, Y.; et al. β -Galactosidase, phospho- β -galactosidase and phospho- β -glucosidase activities in lactobacilli strains isolated from human faeces. *Lett. Appl. Microbiol.* **2007**, *45*, 461–466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Article

Revalorization of Cava Lees to Improve the Safety of Fermented Sausages

Salvador Hernández-Macias ^{1,2,3}, Núria Ferrer-Bustins ⁴, Oriol Comas-Basté ^{1,2,3}, Anna Jofré ⁴, Mariluz Latorre-Moratalla ^{1,2,3}, Sara Bover-Cid ⁴ and María del Carmen Vidal-Carou ^{1,2,3,*}

- ¹ Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Campus de l'Alimentació de Torribera, Universitat de Barcelona (UB), Av. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain; salva.hernandez@ub.edu (S.H.-M.); oriolcomas@ub.edu (O.C.-B.); mariluzlatorre@ub.edu (M.L.-M.)
- ² Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona (UB), Av. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain
- ³ Xarxa d'Innovació Alimentària (XIA), C/Baldiri Reixac 4, 08028 Barcelona, Spain
- ⁴ Food Safety and Functionality Programme, Institute of Agrifood Research and Technology (IRTA), Finca Camps i Armet s/n, 17121 Monells, Spain; nuria.ferrer@irta.cat (N.F.-B.); anna.jofre@irta.cat (A.J.); sara.bovercid@irta.cat (S.B.-C.)
- * Correspondence: mcvidal@ub.edu; Tel.: +34-934-031-984



Citation: Hernández-Macias, S.; Ferrer-Bustins, N.; Comas-Basté, O.; Jofré, A.; Latorre-Moratalla, M.; Bover-Cid, S.; Vidal-Carou, M.d.C. Revalorization of Cava Lees to Improve the Safety of Fermented Sausages. *Foods* **2021**, *10*, 1916. <https://doi.org/10.3390/foods10081916>

Academic Editors: Simona Grasso, Konstantinos Papoutsis, Claudia Ruiz-Capillas and Ana Herrero Herranz

Received: 27 July 2021
Accepted: 17 August 2021
Published: 18 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The revalorization of food processing by-products not only reduces the environmental impact of their disposal, but also generates added economic value. Cava lees consist of inactive cells of *Saccharomyces cerevisiae*, and though regarded as a valueless winery by-product, they are rich in fiber and phenolic compounds. In this study, a challenge test was performed to assess the effect of cava lees and a phenolic extract (LPE) derived therefrom on the behaviour of technological microbiota (lactic acid bacteria used as a starter culture) and the foodborne pathogens *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* during the fermentation and ripening of pork sausages. Ten batches of fermented sausages were prepared with and without cava lees or the LPE, and with or without different strains of *Lactilactobacillus sakei* (CTC494 or BAP110). The addition of cava lees reduced the pH values of the meat batter throughout the fermentation and ripening process. No growth-promoting effect on spontaneous lactic acid bacteria (LAB) or the starter culture was observed. In contrast, the presence of cava lees prevented the growth of the tested pathogens (*Salmonella* and *L. monocytogenes*), as did the starter culture, resulting in significantly lower counts compared to the control batch. In addition, the combination of cava lees with *L. sakei* CTC494 had a bactericidal effect on *Salmonella*. LPE supplementation did not affect the pH values or LAB counts but reduced the mean counts of *Salmonella*, which were 0.71 log₁₀ lower than the control values at the end of the ripening. The LPE did not exert any additional effect to that of the starters applied alone. The revalorization of cava lees as a natural ingredient to improve the microbiological safety of fermented sausages is a feasible strategy that would promote a circular economy and benefit the environment.

Keywords: cava lees; phenolic extract; food by-product; lactic acid bacteria; fermented sausages; *Salmonella* spp.; *Listeria monocytogenes*; revalorization

1. Introduction

The food industry generates large amounts of by-products, whose disposal is costly from both an economic and environmental point of view [1]. Nowadays, there is growing interest in the revalorization of by-products rich in components such as polyphenols, proteins, fiber or lipids, which may have technological, nutritional and food safety applications [2].

The use of fiber-rich by-products as natural ingredients is being widely evaluated as an innovative reformulation strategy of fermented foods to achieve positive nutritional

effects, such as the reduction of fat and/or the increase of dietary fiber content [3–8]. From a technological perspective, plant-derived by-products have been used in fermented food manufacture to promote the growth of lactic acid bacteria (LAB) and thus accelerate the fermentation process, with promising preliminary results [8–11]. Another widely explored revalorization strategy has focused on upcycling phenolic compounds from plant by-products as natural antioxidants or antimicrobial compounds for the formulation of different food products [12–19]. It has been demonstrated, although mostly in vitro assays, that phenolic extracts from by-products, such as grape (seeds, skins and stems), olive and apple pomace, and shitake stems, have a protective effect against foodborne pathogens [18,20–26]. In fact, it has been verified that some phenolic extracts help reduce the growth of some of the most common foodborne pathogenic bacteria (i.e., *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*) [27–30]. However, the minimum inhibitory concentration against a specific pathogen can vary depending on factors such as the type of polyphenol or the bacterial strain [27].

Cava lees are a by-product of the second fermentation of cava (Spanish sparkling wine), with an estimated annual production of ca. 300 tons [31]. Cava lees consist of inactive and plasmolyzed cells of *Saccharomyces cerevisiae* and are naturally rich in fiber (β -glucans and mannan-oligosaccharides). Moreover, sustained contact with the wine during the aging process enriches cava lees with significant amounts of phenolic compounds and organic acids. Despite their interesting composition, and the fact that cava lees account for a high percentage of total winery by-products (ca. 25%), their revalorization in food applications has not been explored to date [32]. Our research group recently demonstrated that under in vitro laboratory conditions cava lees have a growth-promoting effect on specific strains of LAB species commonly used as probiotics and/or starter cultures [33].

Considering the richness of cava lees in different types of fiber, polyphenols and organic acids, they have potential for revalorization in food applications. A possible function is to improve the microbiological safety of fermented sausage, as cava lees can enhance the implantation and growth of fermentative LAB and have an antimicrobial effect against pathogenic bacteria. In this framework, the aim of the present study was to assess the effect of cava lees and a derived phenolic extract on technological microbiota (i.e., LAB) and the foodborne pathogens *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* during the fermentation and ripening of pork sausages using a challenge test. To the best of our knowledge, this is the first time that the use of cava lees and its phenolic extract has been studied with an application in food safety through a challenge test in a more complex food matrix.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strains

Listeria monocytogenes strains CTC1034 (serotype 4b), 12MOB045LM (genoserotype II) and Scott A (serotype 4b) and *Salmonella enterica* strains CTC1003 (serotype London), CTC1756 (serotype Derby) and CCUG34136 (serotype Enteritidis, Type strain) were used for the challenge test. Cultures were prepared by growing each strain independently in brain heart infusion (BHI, Beckton Dickinson, Sparks, MD, USA) at 37 °C for 7 h and subsequently sub-cultured again at the same temperature for 18 h to reach the stationary phase. The bioprotective *Latilactobacillus sakei* (formerly *Lactobacillus sakei*) CTC494, a meat isolate producing sakacin k [34], and *L. sakei* BAP110 grown at 30 °C for 19 h in MRS broth were used as starter cultures. All cultures were preserved frozen at –80 °C in the growth medium supplemented with 20% glycerol as the cryoprotectant until used.

2.2. Preparation of Cava Lees

Cava lees were provided by the winery Freixenet S.A. (Sant Sadurní d'Anoia, Spain). The characterization of the composition of cava lees is detailed by Aguilera-Curiel [35] and they are mainly composed of polysaccharides (72.3% in wet weight) and a lesser percentage of proteins (8.5% in wet weight). Wet lees were centrifuged at 18,000 × g for

10 min to remove the remaining cava. The lees were subsequently frozen in an ultra-low temperature freezer (-80°C), freeze-dried (Cryodos-50, Telstar, Terrassa, Spain) and ground. Lyophilized lees ($\text{pH} = 3.2 \pm 0.02$) were preserved in sealed tubes protected from the light and humidity.

2.3. Phenolic Extract Preparation

The cava lees phenolic extract (LPE) was obtained according to the method described by Silva et al. [24] with some modifications. Thus, 1 g of powder lees was added to 10 mL of a mixture of ethanol/water/acetic acid (80/20/0.05) and sonicated for 30 min. The supernatant was isolated by centrifugation ($2500 \times g$ for 10 min at 4°C), transferred into a flask, and the pellet was re-extracted. The collected supernatants were evaporated under vacuum on a rotatory evaporator at 37°C . The dry residue was weighted and stored at 4°C until used in the sausage elaboration. The total phenolic content of the extract, expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/g, was determined using the method described by Vallverdú-Queralt et al. [36].

2.4. Elaboration of Inoculated Fermented Pork Sausages

Meat batter was prepared on a pilot scale under biosafety conditions by mixing minced lean pork meat and fat (8:2) ground through a 6 mm plate and inoculating it with a mixture of the three *L. monocytogenes* and three *Salmonella* strains (same amount for each strain) at a level of ca. $6 \log_{10}$ CFU/g. Subsequently, the ground meat was mixed with (in g/kg) sodium chloride (25), dextrose (7), black pepper (3), sodium ascorbate (0.5), sodium nitrite (0.15) and potassium nitrate (0.15). In the corresponding batches, 5% (*w/w*) of cava lees or 0.3% (*w/w*) of LPE was also added (corresponding to the content of phenolic compounds expected in 5% of lees). According to a previous study, 5% of cava lees was the most effective concentration for enhancing the *in vitro* bacterial growth [33]. In addition, this percentage of lees is also similar to those of others plant-based by-products used in some other studies [4–6,10]. The total amount of water of the sausage recipe was 2.6 mL/kg, including the volume used as a vehicle to add the pathogen mixture to the ground meat and the starter culture if required. In total, 10 batches were prepared for the two experiments (Table 1).

For each batch, 80 g portions of the prepared meat batter were stuffed into Tublin10 (Tub-Ex, Tass, Denmark) permeable plastic bags using vacuum packaging and were submitted to a process of fermentation and drying consisting of 2 days at 23°C and subsequently 19 days at 15°C .

Table 1. Batches of fermented sausages formulated with or without cava lees or the lees phenolic extract (LPE) and/or different strains of *L. sakei* as the starter culture.

Experiment	Batch	Ingredient	Starter Culture
1	C1		
	L1	Cava lees	
	C1 + CTC494		<i>L. sakei</i> CTC494 ¹
	L1 + CTC494	Cava lees	<i>L. sakei</i> CTC494 ¹
2	C2		
	E2	LPE	
	C2 + CTC494		<i>L. sakei</i> CTC494
	E2 + CTC494	LPE	<i>L. sakei</i> CTC494
	C2 + BAP110		<i>L. sakei</i> BAP110
	E2 + BAP110	LPE	<i>L. sakei</i> BAP110

¹ Producer of the bacteriocin sakacin K [34].

2.5. Microbiological and Physicochemical Analysis

For the microbiological analysis, ca. 15 g of sausage was diluted 10-fold in saline solution (0.85% NaCl and 0.1% Bacto Peptone (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ,

USA), homogenized in a Blender Smasher® bag (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) for 1 min and again 10-fold serially diluted in saline solution. *L. monocytogenes* was enumerated on the chromogenic agar CHROMagar Listeria (CHROMagar, Paris, France) after incubation at 37 °C for 48 h. *Salmonella* was enumerated on the chromogenic agar CHROMagar Salmonella Plus (CHROMagar, Paris, France) after incubation at 37 °C for 24 h. LAB were enumerated in MRS (de Man, Rogosa and Sharpe; Merck, Darmstadt, Germany) agar plates incubated at 30 °C for 72 h under anaerobiosis using sealed jars with an AnaeroGen sachet (Oxoid Ltd., Altrincham, UK).

The pH was measured with a puncture electrode 5232 (Crison Instruments S.A., Alella, Spain) and a portable pHmeter PH25 (Crison Instruments S.A., Alella, Spain) and a_w with an Aqualab 3TE device (Decagon Devices, Inc. Pullman, WA, USA) at 25 °C. Analysis was performed in duplicate at selected sampling times throughout the fermentation and ripening process.

2.6. Isolation and Monitoring of Starter Culture Strains

To monitor the implantation of the starter cultures, eight colonies per batch were isolated from MRS plates at day 0, 8 or 9 and 21 and submitted to Repetitive Extragenic Palindromic (REP)-PCR and Enterobacteria Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)-PCR with primers FW-REP1R-I (5'-IIICGICGICATCIGGC-3') and RV-REP2-II (5'-ICGICTATCI GGCCTAC-3'), and FW-ERIC R1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') and RV-ERIC 2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), respectively, under the conditions described in Rubio et al. [37].

2.7. Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA) and the post-hoc Tukey HSD test at a $p < 0.05$ significance level was done using JMP software (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). To determine statistical differences in bacterial counts, pH and a_w of each batch during the manufacturing or storage period, one-way ANOVA was performed, using "Time" as a fixed factor.

3. Results and Discussion

3.1. Effect of Cava Lees Applied in Fermented Pork Sausages (Experiment 1)

Firstly, a challenge test with *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* was carried out in fermented sausages spontaneously fermented or inoculated with the starter culture *L. sakei* CTC494, both with and without the addition of 5% of lyophilized cava lees.

3.1.1. Characterization of Physicochemical Parameters

Sausages supplemented with 5% (w/w) of cava lees initially had lower pH values than the unsupplemented batches due to the acidity of this winery by-product ($\text{pH } 3.2 \pm 0.02$) (Table 2). During fermentation, the pH of sausages inoculated with the starter culture dropped significantly to values < 5.3 ($p < 0.05$), while spontaneously fermented sausages underwent slower and slighter acidification (L1 and C1), due to the initial low levels of LAB (Figure 1). The subsequent increase in pH values in all batches throughout the ripening process could be explained by the formation of alkaline compounds during proteolysis [38]. In all cases, the presence of lees was associated with lower pH values. The difference in pH units in spontaneously fermented sausages with and without lees (L1 and C1, respectively) ranged from 0.46 at time zero to 0.85 at the end of the ripening. Studies on the use of citrus by-products in fermented sausages also report lower pH values due to their intrinsic acidity (e.g., orange fiber by-product $\text{pH} = 3.28$) [8,10,39]. A synergic effect was observed when cava lees were combined with *L. sakei* CTC494 (L1 + CTC494), resulting in a final pH value 1.23 units lower than in the control (C1, without cava lees or starter culture).

Values of a_w gradually decreased over the 21 days of ripening (Table 2) due to the sausage drying process, with no significant differences among batches ($p > 0.05$), neither by the inoculation of the starter culture nor by the addition of cava lees.

Table 2. Values of pH and a_w (mean $\pm$ standard deviation) during the fermentation and ripening of pork sausages. Batches included sausages formulated without (C1) or with (L1) cava lees, spontaneously fermented or with the addition of a starter culture (*L. sakei* CTC494).

		Batch			
	Day	C1	L1	C1 + CTC494	L1 + CTC494
pH	0	5.67 $\pm$ 0.01 ^a	5.20 $\pm$ 0.14 ^b	5.66 $\pm$ 0.02 ^a	5.22 $\pm$ 0.09 ^b
	2	5.74 $\pm$ 0.01 ^a	5.43 $\pm$ 0.04 ^b	5.07 $\pm$ 0.01 ^c	4.89 $\pm$ 0.01 ^d
	4	5.62 $\pm$ 0.02 ^a	5.39 $\pm$ 0.01 ^b	4.93 $\pm$ 0.01 ^c	4.76 $\pm$ 0.01 ^d
	8	5.44 $\pm$ 0.02 ^a	5.35 $\pm$ 0.01 ^b	5.01 $\pm$ 0.02 ^c	4.80 $\pm$ 0.01 ^d
	14	5.36 $\pm$ 0.05 ^a	5.18 $\pm$ 0.03 ^{ab}	5.40 $\pm$ 0.15 ^a	4.91 $\pm$ 0.00 ^b
	21	6.26 $\pm$ 0.38 ^a	5.41 $\pm$ 0.05 ^b	5.28 $\pm$ 0.05 ^b	5.03 $\pm$ 0.05 ^b
a_w	0	0.973 $\pm$ 0.001 ^a	0.972 $\pm$ 0.000 ^a	0.973 $\pm$ 0.000 ^a	0.972 $\pm$ 0.001 ^a
	2	0.972 $\pm$ 0.000 ^a	0.971 $\pm$ 0.000 ^a	0.972 $\pm$ 0.000 ^a	0.972 $\pm$ 0.000 ^a
	4	0.974 $\pm$ 0.000 ^a	0.972 $\pm$ 0.000 ^a	0.969 $\pm$ 0.000 ^a	0.970 $\pm$ 0.000 ^a
	8	0.969 $\pm$ 0.000 ^a	0.969 $\pm$ 0.000 ^a	0.967 $\pm$ 0.000 ^b	0.964 $\pm$ 0.000 ^c
	14	0.963 $\pm$ 0.000 ^a	0.964 $\pm$ 0.000 ^b	0.965 $\pm$ 0.000 ^{ab}	0.960 $\pm$ 0.000 ^c
	21	0.960 $\pm$ 0.000 ^b	0.966 $\pm$ 0.000 ^a	0.962 $\pm$ 0.000 ^{ab}	0.961 $\pm$ 0.000 ^b

Values are mean $\pm$ standard deviation of triplicates. For each sampling day, significant differences between batches are indicated by different superscript letters ($p < 0.05$).

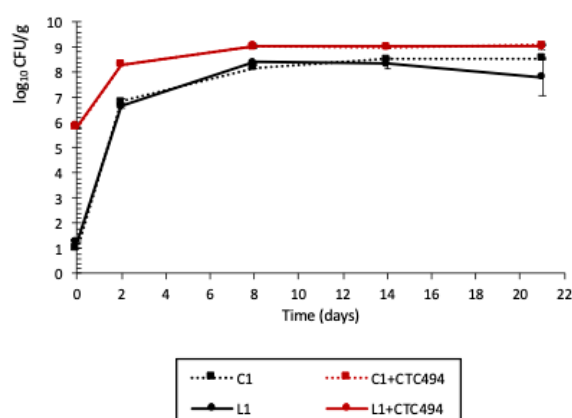


Figure 1. Growth of LAB in spontaneously fermented pork sausages with (L1) or without (C1) the addition of 5% of cava lees or fermented with the starter culture *L. sakei* CTC494, with (L1 + CTC494) or without (C1 + CTC494) cava lees.

3.1.2. Behavior of LAB during Fermentation and Ripening

Figure 1 shows the growth of LAB in the different batches of sausages during fermentation and ripening. The batches formulated with a starter culture (C1 + CTC494 and L1 + CTC494) exhibited the highest LAB counts throughout the process, ranging from the initial inoculated level of 5.9 log₁₀ CFU/g to more than 9 log₁₀ CFU/g from day 8, and remaining stable thereafter. The implantation of the *L. sakei* CTC494 starter culture was confirmed by RAPD-PCR, with 100% (eight out of eight) of the isolated colonies showing the same RAPD profile as the starter culture strain at the end of the ripening process. In contrast, LAB levels in sausages produced without a starter culture (C1 and L1) were initially ca. 1.2 log₁₀ CFU/g and reached 8.3 log₁₀ CFU/g at day 8. During the subsequent ripening process, the levels remained slightly lower than in sausages with a starter culture.

With the current study design and matrix composition, the addition of cava lees did not promote LAB growth compared to the control batches throughout the manufacturing process, whether using spontaneous fermentation or *L. sakei* CTC494. These results are not

in accordance with those previously obtained in vitro, also using *L. sakei* CTC494. In that study, the supplementation of the culture medium with the same amount of cava lees (5%) resulted in a significantly higher concentration of cells in different LAB strains compared to the control (without lees); in the case of *L. sakei* CTC494, the maximum population density was $0.8 \log_{10}$ units higher [33]. The lower amount of readily fermentable substrate in the fermented sausage formulation (i.e., 0.7% dextrose) compared to the in vitro culture media (i.e., MRS broth with 2% dextrose [33]) did not favor the use of cava lees fiber by LAB to promote their growth. A significant growth-promoting effect of other fiber-rich by-products on specific LAB strains has been demonstrated in laboratory media [40,41], whereas the addition of various by-products (from lemon, orange, tiger nut, peach or apple) in fermented sausages that also contained easily fermentable carbohydrates (e.g., glucose, dextrose, sucrose, lactose) did not improve LAB growth [3,5,8,42]. On the other hand, in the study of Yalınkılıç et al. [10], higher LAB counts were obtained in fermented sausages with 4% orange fiber compared to the control (without added fiber), although the difference in mean counts was low ($0.24 \log_{10}$ units).

3.1.3. Impact of Cava Lees on Pathogenic Bacteria

Figure 2 shows the behavior of the pathogenic bacteria during the fermentation and ripening of the four batches of pork sausages. The sakacin k-producing strain *L. sakei* CTC494 was selected as a bioprotective culture able to inhibit the growth of *L. monocytogenes* [34]. Although sakacin has no specific inhibitory effect on Gram-negative bacteria such as *Salmonella*, the presence of the starter culture accelerated acidification and resulted in a lower pH, which is known to enhance the inactivation of *Salmonella* [43]. The presence of 5% of cava lees also had an anti-pathogenic effect, reducing the load of *Salmonella* and *L. monocytogenes* in both types of fermented sausages (Figure 2).

Regarding the antimicrobial (growth inhibition) effect against *Salmonella*, significantly lower counts were recorded in sausages formulated with lees (L1) at all sampling times, being up to $2.7 \log_{10}$ and $0.6 \log_{10}$ lower than in C1 ($p < 0.05$) at day 8 and 21, respectively. It is important to highlight that the effect of cava lees on the *Salmonella* levels was similar to that exerted by the starter culture. Moreover, combining cava lees with *L. sakei* CTC494 (L1 + CTC494) enhanced the antimicrobial effect, resulting in a reduction of $3 \log_{10}$ in *Salmonella* during the fermentation and ripening, which was due to both bacteriostatic and strong bactericidal effects. At the end of the process (day 21), *Salmonella* counts were $4.3 \log_{10}$ lower than in control sausages (C1, $p < 0.05$).

The growth inhibitory effect of cava lees against *L. monocytogenes* was similar to that of bacteriocin-producing *L. sakei* CTC494. Compared to the control, *L. monocytogenes* counts were $2.3 \log_{10}$ and $2.9 \log_{10}$ lower in fermented sausages formulated with cava lees applied alone or together with *L. sakei* CTC494, respectively ($p < 0.05$).

To date, few studies have focused on the revalorization of by-products with antimicrobial effects against food-borne bacteria, especially in fermented products. A recent study revealed that a celery by-product powder produced a significant decrease in total *Enterobacteriaceae* counts in cooked sausages [44]. An inhibitory effect against pathogenic and opportunistic bacteria of an apple by-product added to fermented milk permeate beverages has also been recently reported [45]. Conversely, in a study on fermented sausages supplemented with a lemon by-product, higher levels of *Listeria innocua* (used as a surrogate of *L. monocytogenes*) were recorded in comparison with the unsupplemented sausages [8]. In contrast, far more studies have assessed the antimicrobial effect of food by-product extracts rich in bioactive compounds such as polyphenols [14,18,19,24,46].

In the current study, besides the growth-inhibitory effect of the starter culture *L. sakei* CTC494, the lower pH values achieved at the beginning of fermentation (ca. 5.2 at day 0) in sausages supplemented with cava lees (L1 and L1 + CTC494) could be another major factor responsible for the lower pathogen counts in these batches. In fact, in hurdle technology for food preservation, the pH is considered a crucial hurdle in the control of pathogenic bacteria in fermented sausages, especially in combination with a lower a_w [47]. Compared

to *Salmonella*, *L. monocytogenes* is more tolerant of the harsh environment usually found at the last stages of ripening, characterized by a low pH and a_w [43,48,49], which could explain its lower reduction in the batches formulated with cava lees. Finally, besides the effect of pH, components of cava lees such as polyphenols and/or organic acids could also play a role in the antimicrobial activity of this by-product. It is worth highlighting that polyphenols tend to be more active against Gram-positive than Gram-negative bacteria, which can be attributed to the different bacterial cell wall structures [19,24,27,29,50].

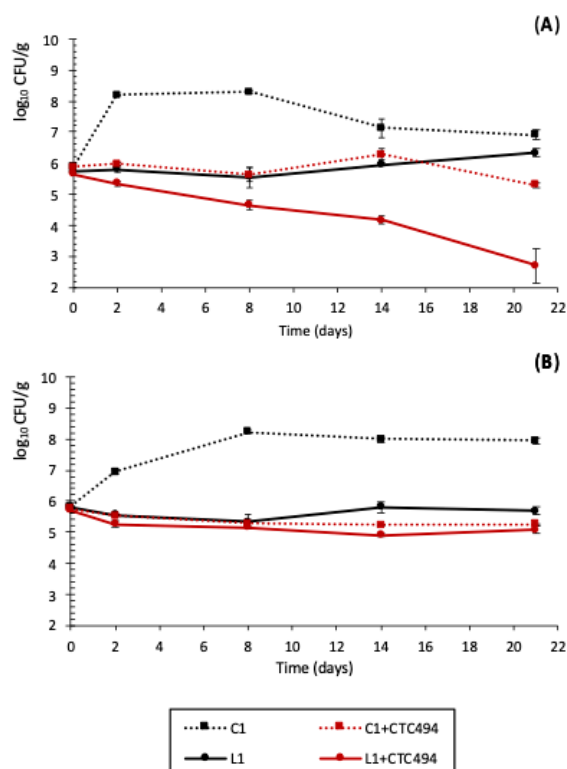


Figure 2. Counts of *Salmonella* (A) and *Listeria monocytogenes* (B) strains in pork sausages spontaneously fermented with (L1) and without (C1) the addition of 5% of cava lees or fermented with the starter culture *L. sakei* CTC494 with (L1+ CTC494) or without (C1+ CTC494) lees.

3.2. Effect of the LPE in Fermented Pork Sausages (Experiment 2)

In order to investigate whether the antimicrobial activity of cava lees could be also attributed to its phenolic fraction, a second challenge test with *Salmonella* and *L. monocytogenes* was carried out in fermented pork sausages formulated with LPE instead of cava lees. Additionally, the effect of a bacteriocinogenic (*L. sakei* CTC494) and a non-bacteriocinogenic (*L. sakei* BAP110) starter culture was evaluated.

The total phenolic content of the LPE was 152.2 ± 3.5 mg GAE/g. According to the literature, the total phenolic content of cava or wine lees differs widely, even among studies using the same extraction and determination methodology, with mean values ranging from 26 to 254 mg GAE/g [35,51,52]. Jara-Palacios et al. describe that the phenolic content in wine lees depends on the grape variety and other factors related with the vinification process [52]. The main phenolic compounds found in cava lees are caftaric

acid, catechin and epicatechin, which are also the most abundant phenols in sparkling wines [35]. It has been reported that yeast cell walls possess a high capacity to adsorb phenolic compounds from wine [53–56], the contents often being greater than in other types of winery by-products (e.g., grape seeds, stems and skin) [57].

3.2.1. Characterization of Physicochemical Parameters and LAB Counts

Table 3 shows the pH and a_w values of the different batches of fermented sausages. Overall, supplementation with the LPE did not affect the acidity of the product at day 0. Batches inoculated with starter cultures underwent a faster acidification. The lowest pH values were reached at days 5 and 14 of ripening in sausages prepared with *L. sakei* CTC494 and *L. sakei* BAP110, respectively. A reducing effect on the pH was also observed when the starter culture was applied with the LPE. Acidification in non-inoculated fermented sausages (C2 and E2) was slower and weaker, the lowest pH value being recorded at the end of the ripening process (ca. 5.3), as usually occurs in spontaneously fermented sausages [43,58]. The rise in pH is due to proteolysis phenomena that take place at the end of the ripening period. pH values up to 6.5 have been reported in Spanish fermented sausages [59]. However, this process is highly variable and not very controllable, especially in spontaneous fermented sausages. In fact, in the current study, a great variability could be observed at this point (day 21) in batch C1 (6.26 ± 0.38) than in C2 (5.28 ± 0.17). The use of different meat raw materials in the preparation of experiments 1 and 2 could also explain these differences, even though the batches were prepared under the same conditions. No differences in a_w were observed between batches during the process, as the same drying conditions were applied in each case.

Table 3. Values of pH and a_w (mean $\pm$ standard deviation) during the fermentation and ripening of pork sausages. Batches included sausages elaborated without (C2) or with (E2) a cava lees phenolic extract, spontaneously fermented or with the addition of a starter culture (*L. sakei* CTC494 or *L. sakei* BAP110).

		Batch					
	Day	C2	E2	C2 + CTC494	E2 + CTC494	C2 + BAP110	E2 + BAP110
pH	0	5.88 ± 0.02^a	5.86 ± 0.01^a	5.88 ± 0.01^a	5.86 ± 0.02^a	5.85 ± 0.01^a	5.77 ± 0.05^b
	2	5.84 ± 0.01^a	5.81 ± 0.02^a	5.10 ± 0.03^c	5.10 ± 0.03^c	5.42 ± 0.10^b	5.38 ± 0.11^b
	5	5.71 ± 0.07^a	5.73 ± 0.04^a	4.96 ± 0.03^c	4.95 ± 0.01^c	5.24 ± 0.03^b	5.33 ± 0.04^b
	9	5.56 ± 0.07^a	5.56 ± 0.02^a	4.98 ± 0.01^b	4.96 ± 0.01^b	4.99 ± 0.02^b	4.98 ± 0.02^b
	14	5.38 ± 0.04^b	5.46 ± 0.03^a	5.01 ± 0.01^c	5.00 ± 0.01^{cd}	4.96 ± 0.02^{cd}	4.95 ± 0.00^d
	21	5.28 ± 0.17^a	5.38 ± 0.09^a	5.01 ± 0.01^b	5.01 ± 0.04^b	5.02 ± 0.02^b	4.99 ± 0.02^b
a_w	0	0.972 ± 0.001^a	0.971 ± 0.001^a	0.972 ± 0.001^a	0.971 ± 0.001^a	0.972 ± 0.001^a	0.971 ± 0.001^a
	2	0.970 ± 0.001^a	0.970 ± 0.001^a	0.972 ± 0.001^a	0.971 ± 0.001^a	0.971 ± 0.001^a	0.971 ± 0.001^a
	5	0.971 ± 0.002^a	0.969 ± 0.002^a	0.970 ± 0.001^a	0.970 ± 0.001^a	0.969 ± 0.001^a	0.969 ± 0.001^a
	9	0.972 ± 0.001^a	0.971 ± 0.001^a	0.971 ± 0.002^a	0.972 ± 0.001^a	0.969 ± 0.001^a	0.970 ± 0.001^a
	14	0.966 ± 0.001^{bc}	0.970 ± 0.002^{ab}	0.968 ± 0.001^{abc}	0.971 ± 0.002^a	0.964 ± 0.002^c	0.969 ± 0.001^{ab}
	21	0.964 ± 0.001^a	0.963 ± 0.001^a	0.963 ± 0.001^a	0.963 ± 0.002^a	0.962 ± 0.001^a	0.963 ± 0.001^a

Values are mean $\pm$ standard deviation of triplicates. For each sampling day, significant differences between batches are indicated by different superscript letters ($p < 0.05$).

As shown in Figure 3, batches with a fermentation process driven by all the strains of *L. sakei* starter culture (C2 + CTC494, E2 + CTC494, C2 + BAP110 and E2 + BAP110) achieved values of up to $9 \log_{10}$ CFU/g of LAB at the first 2 days of ripening. These counts remained more or less stable until the end of the ripening process. The implantation of starter cultures was monitored by RAPD-PCR analysis, which showed that 100% (eight out of eight) of the isolates from the MRS plates at the end of the ripening had the same RAPD profile as the corresponding starter culture strain, thus confirming their competitiveness and dominance over the endogenous LAB. In batches without a starter culture, the initial levels of LAB were $<1 \log_{10}$ CFU/g, increasing up to 6.3 and $8 \log_{10}$ CFU/g at 2 and 21 days, respectively.

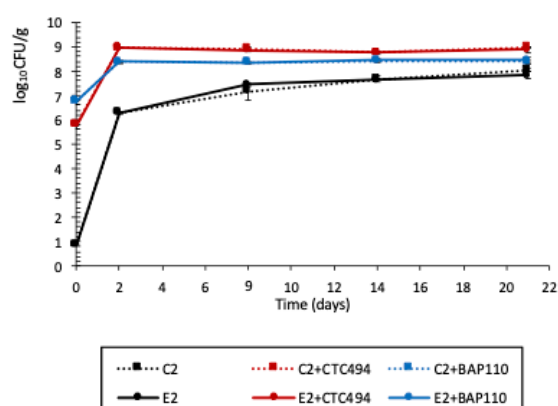


Figure 3. Growth of LAB in pork sausages spontaneously fermented with (E2) and without (C2) the addition of 0.3% LPE or fermented with the starter culture *L. sakei* CTC494 or *L. sakei* BAP110 and with (E2 + CTC494 or E2 + BAP110) or without (C2 + CTC494 or C2 + BAP110) the LPE.

Overall, the addition of the LPE did not affect the LAB counts in any batch. In this context, LAB have been described as highly tolerant to polyphenols in the growth environment [50,60]. Our results agree with those of Wang et al. [61] and Zhang et al. [62], who found that LAB counts were unaltered by the addition of different polyphenols to meat products. Nevertheless, fermented sausages produced with a shiitake by-product extract had higher levels of LAB [16,17]. Ultimately, LAB tolerance of phenolic compounds, and their ability to metabolize them, seems to be strain- or species-specific [50,63].

3.2.2. Impact of the LPE on Pathogenic Bacteria

The effect of the LPE, alone or combined with *L. sakei* CTC494 or *L. sakei* BAP110, against *Salmonella* and *L. monocytogenes* is shown in Figure 4. When no starter culture was added, the addition of the LPE had very little effect on *Salmonella*, whose growth during the first days of fermentation was similar to that of the control (without the LPE and starter culture). However, the mean counts of the pathogen at the end of the ripening were 0.71 log₁₀ lower than in the control sausages. A similar effect was observed for *L. monocytogenes*, although in this case the final counts in the E2 batch were similar to the control sausages (C2).

As expected, *L. sakei*-based starter culture strains exerted a strong antimicrobial effect on *Salmonella* and *L. monocytogenes*, resulting in significantly lower pathogen counts (by 3–4 log₁₀ units) at the end of ripening compared to the spontaneously fermented control sausages. No additional effect was observed when the LPE was added together with the starter cultures. No strain-specific effect was observed against *Salmonella*, which exhibited similar behavior with both starter cultures, in contrast with *L. monocytogenes*, whose behavior differed. The bacteriocinogenic strain *L. sakei* CTC494 not only prevented the growth of *L. monocytogenes* but exerted a listericidal effect from the early stages of fermentation and ripening. The non-bacteriocinogenic *L. sakei* BAP110 reduced but did not prevent the growth of *L. monocytogenes* during fermentation and had an inactivation effect during ripening; at the end of the process, the count was 1 log₁₀ higher than in the batches containing the bacteriocinogenic *L. sakei* CTC494 (C2 + CTC494 and E3 + CTC494). This enhanced lethality can be related to the already reported specific antilisterial effect of *L. sakei* CTC494 in other food matrixes [34,64,65].

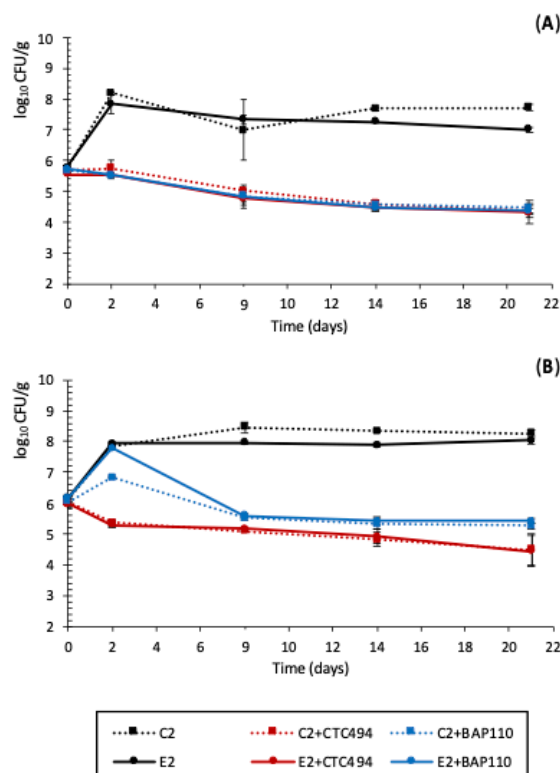


Figure 4. Behavior of *Salmonella* (A) and *Listeria monocytogenes* (B) strains in sausages spontaneously fermented with (E2) and without (C2) the addition of 0.3% of LPE or fermented with the starter culture *L. sakei* CTC494 or *L. sakei* BAP110 with (E2 + CTC494 or E2 + BAP110) or without (C2 + CTC494 or C2 + BAP110) the LPE.

Polyphenols are widely reported to have an antimicrobial effect against several pathogenic bacteria, including *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*, mostly in the context of microbial cultures [20,24,27,29,50,66]. The results obtained here indicate that the anti-*Salmonella* effect of whole cava lees in spontaneously fermented pork sausages may be partially attributed to the phenolic fraction of this by-product (Figure 4A). However, no effect of the LPE was observed against *L. monocytogenes*. Although most reports describe Gram-positive bacteria as far more susceptible to polyphenols than Gram-negative bacteria [20,24,28,67], this trend was not supported by the results of the current study.

The antimicrobial efficacy of polyphenol-rich extracts against pathogenic bacteria varies greatly, depending on both the phenolic structure and the bacterial species [27,63,67]. Cetin-Karaca et al. [29] assessed the antimicrobial potential of different plant phenolic compounds against three *Salmonella* species, reporting that (-)epicatechin, one of the main polyphenols found in cava lees, was the most effective, although with varying degrees of sensitivity according to the species. Conversely, among the range of bacterial species tested by Silva et al. [24], a winery by-product consisting of a grape polyphenol extract showed high antimicrobial activity against two food-borne strains of *L. monocytogenes*, but

not *Salmonella*. It seems that the phenolic antimicrobial activity depends not only on the type of bacteria but also on the specific strain or serotype [27].

On the other hand, sausages fermented with *L. sakei* starter cultures exhibited a significant reduction in *Salmonella* and *L. monocytogenes* counts, regardless of the presence of the LPE. Similarly, Tremonte et al. [8] found that the addition of a polyphenol-rich lemon by-product did not enhance the anti-*Listeria* effect of a bioprotective strain of *Lactiplantibacillus plantarum* during the ripening of fermented sausages. Considering that LAB may be able to metabolize plant-derived polyphenols, thus significantly compromising their antimicrobial potential [50,60,63,68], it may be envisaged that in the current study, the endogenous LAB and the inoculated *L. sakei* technological strains could have reduced the polyphenol fraction of both the cava lees and LPE.

Further studies could be designed to elucidate the role of specific components of cava lees in the antimicrobial effect observed in pork fermented sausages, which could at least be attributed to the lower pH and, most probably to acidic compounds (such as tartaric acid) and phenolic compounds (such as caftaric acid, catechin and epicatechin) determining the by-product acidity or other bacteriostatic properties. Furthermore, considering that sensory qualities are essential for consumer acceptance of food, the potential impact of cava lees on the sensorial profile of the final product should also be addressed.

Author Contributions: Conceptualization, M.L.-M., M.d.C.V.-C., A.J. and S.B.-C.; investigation, S.H.-M., N.F.-B., O.C.-B. and M.L.-M.; writing—original draft preparation, S.H.-M., O.C.-B. and M.L.-M.; writing—review and editing, S.H.-M., N.F.-B., O.C.-B., M.L.-M., A.J., S.B.-C. and M.d.C.V.-C.; supervision, M.d.C.V.-C., A.J. and S.B.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Spanish Government through the Interministerial Commission for Science and Technology (CICYT) project AGL2016-78324-R and the Ministry of Science and Innovation project RTI2018-099195-R-I00 and by the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya. Salvador Hernández-Macias and Nuria Ferrer were a recipient of a doctoral fellowships from the University of Guadalajara, Mexico and Ministry of Science and Innovation (PRE2019-087847), respectively.

Acknowledgments: The authors thanks Freixenet S.A. for providing the cava lees used in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- De Iseppi, A.; Lomolino, G.; Marangon, M.; Curioni, A. Current and future strategies for wine yeast lees valorization. *Food Res. Int.* **2020**, *137*, 109352. [\[CrossRef\]](#)
- Mirabella, N.; Castellani, V.; Sala, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: A review. *J. Clean. Prod.* **2014**, *65*, 28–41. [\[CrossRef\]](#)
- García, M.; Domínguez, R.; Galvez, M.; Casas, C.; Selgas, M. Utilization of cereal and fruit fibres in low fat dry fermented sausages. *Meat Sci.* **2002**, *60*, 227–236. [\[CrossRef\]](#)
- Fernández-Ginés, J.M.; Fernández-López, J.; Sayas-Barberá, E.; Sendra, E.; Pérez-Álvarez, J.A. Lemon albedo as a new source of dietary fiber: Application to bologna sausages. *Meat Sci.* **2004**, *67*, 7–13. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sánchez-Zapata, E.; Zunino, V.; Pérez-Alvarez, J.A.; Fernández-López, J. Effect of tiger nut fibre addition on the quality and safety of a dry-cured pork sausage ('Chorizo') during the dry-curing process. *Meat Sci.* **2013**, *95*, 562–568. [\[CrossRef\]](#)
- Mendes, A.C.G.; Rettore, D.M.; Ramos, A.d.L.S.; da Cunha, S.d.F.V.; de Oliveira, L.C.; Ramos, E.M. Salames tipo milano elaborados com fibras de subprodutos da produção de vinho tinto. *Cienc. Rural* **2014**, *44*, 1291–1296. [\[CrossRef\]](#)
- Younis, K.; Ahmad, S. Waste utilization of apple pomace as a source of functional ingredient in buffalo meat sausage. *Cogent Food Agric.* **2015**, *1*, 1119397. [\[CrossRef\]](#)
- Tremonte, P.; Pannella, G.; Lombardi, S.J.; Iorizzo, M.; Veralito, F.; Cozzolino, A.; Maiuro, L.; Succi, M.; Sorrentino, E.; Coppola, R. Low-fat and high-quality fermented sausages. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1025. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sayas-Barberá, E.; Viuda-Martos, M.; Fernández-López, F.; Pérez-Alvarez, J.A.; Sendra, E. Combined use of a probiotic culture and citrus fiber in a traditional sausage 'Longaniza de Pascua'. *Food Control* **2012**, *27*, 343–350. [\[CrossRef\]](#)
- Yalinkılıç, B.; Kaban, G.; Kaya, M. The effects of different levels of orange fiber and fat on microbiological, physical, chemical and sensory properties of sucuk. *Food Microbiol.* **2012**, *29*, 255–259. [\[CrossRef\]](#)
- Mikami, N.; Tsukada, Y.; Pelpolage, S.W.; Han, K.H.; Fukushima, M.; Shimada, K. Effects of sake lees (sake-kasu) supplementation on the quality characteristics of fermented dry sausages. *Heliyon* **2020**, *6*, e03379. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

12. Fernández-López, J.; Zhi, N.; Aleson-Carbonell, L.; Pérez-Alvarez, J.A.; Kuri, V. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: Application in beef meatballs. *Meat Sci.* **2005**, *69*, 371–380. [CrossRef] [PubMed]
13. Lorenzo, J.M.; González-Rodríguez, R.M.; Sánchez, M.; Amado, I.R.; Franco, D. Effects of natural (grape seed and chestnut extract) and synthetic antioxidants (butylatedhydroxytoluene, BHT) on the physical, chemical, microbiological and sensory characteristics of dry cured sausage “chorizo”. *Food Res. Int.* **2013**, *54*, 611–620. [CrossRef]
14. Fasolato, L.; Carraro, L.; Facco, P.; Cardazzo, B.; Balzan, S.; Taticchi, A.; Andreani, N.A.; Montemurro, F.; Martino, M.E.; Di Lecce, G.; et al. Agricultural by-products with bioactive effects: A multivariate approach to evaluate microbial and physicochemical changes in a fresh pork sausage enriched with phenolic compounds from olive vegetation water. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *228*, 34–43. [CrossRef]
15. Marchiani, R.; Bertolino, M.; Belviso, S.; Giordano, M.; Ghirardello, D.; Torri, L.; Piochi, M.; Zeppa, G. Yogurt enrichment with grape pomace: Effect of grape cultivar on physicochemical, microbiological and sensory properties. *J. Food Qual.* **2016**, *39*, 77–89. [CrossRef]
16. Van Ba, H.; Seo, H.W.; Cho, S.H.; Kim, Y.S.; Kim, J.H.; Ham, J.S.; Park, B.Y.; Nam, S.P. Antioxidant and anti-foodborne bacteria activities of shiitake by-product extract in fermented sausages. *Food Control* **2016**, *70*, 201–209. [CrossRef]
17. Van Ba, H.; Seo, H.W.; Cho, S.H.; Kim, Y.S.; Kim, J.H.; Ham, J.S.; Park, B.Y.; Pil-Nam, S. Effects of extraction methods of shiitake by-products on their antioxidant and antimicrobial activities in fermented sausages during storage. *Food Control* **2017**, *79*, 109–118. [CrossRef]
18. Vázquez-Armenta, F.J.; Silva-Espinoza, B.A.; Cruz-Valenzuela, M.R.; González-Aguilar, G.A.; Nazzaro, F.; Fratianni, F.; Ayala-Zavala, J.F. Antibacterial and antioxidant properties of grape stem extract applied as disinfectant in fresh leafy vegetables. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54*, 3192–3200. [CrossRef]
19. Menchetti, L.; Taticchi, A.; Esposto, S.; Servili, M.; Ranucci, D.; Branciarri, R.; Miraglia, D. The influence of phenolic extract from olive vegetation water and storage temperature on the survival of *Salmonella enteritidis* inoculated on mayonnaise. *LWT* **2020**, *129*, 109648. [CrossRef]
20. Serra, A.T.; Matias, A.A.; Nunes, A.V.M.; Leitão, M.C.; Brito, D.; Bronze, R.; Silva, S.; Pires, A.; Crespo, M.T.; San Romão, M.V.; et al. In vitro evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2008**, *9*, 311–319. [CrossRef]
21. Tsukada, M.; Sheng, H.; Kamachi, T.; Niwano, Y. Microbicidal action of photoirradiated aqueous extracts from wine lees. *J. Food Sci. Technol.* **2016**, *53*, 3020–3027. [CrossRef] [PubMed]
22. Sanz-Puig, M.; Moreno, P.; Pina-Pérez, M.C.; Rodrigo, D.; Martínez, A. Combined effect of high hydrostatic pressure (HHP) and antimicrobial from agro-industrial by-products against *S. Typhimurium*. *LWT* **2017**, *77*, 126–133. [CrossRef]
23. Vázquez-Armenta, F.J.; Bernal-Mercado, A.T.; Lizardi-Mendoza, J.; Silva-Espinoza, B.A.; Cruz-Valenzuela, M.R.; González-Aguilar, G.A.; Nazzaro, F.; Fratianni, F.; Ayala-Zavala, J.F. Phenolic extracts from grape stems inhibit *Listeria monocytogenes* motility and adhesion to food contact surfaces. *J. Adhes. Sci. Technol.* **2018**, *32*, 889–907. [CrossRef]
24. Silva, V.; Igrejas, G.; Falco, V.; Santos, T.P.; Torres, C.; Oliveira, A.M.P.; Pereira, J.E.; Amaral, J.S.; Poeta, P. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds extracted from wine industry by-products. *Food Control* **2018**, *92*, 516–522. [CrossRef]
25. Gouvêas, I.; Santos, R.A.; Queiroz, M.; Leal, C.; Saavedra, M.J.; Domínguez-Perles, R.; Rodrigues, M.; Barros, A.I.R.N.A. Monitoring the antioxidant and antimicrobial power of grape (*Vitis vinifera* L.) stems phenolics over long-term storage. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *126*, 83–91. [CrossRef]
26. Ricci, A.; Bernini, V.; Maoloni, A.; Cirilini, M.; Galaverna, G.; Neviani, E.; Lazzi, C. Vegetable by-product lacto-fermentation as a new source of antimicrobial compounds. *Microorganisms* **2019**, *7*, 607. [CrossRef]
27. Taguri, T.; Tanaka, T.; Kouno, I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 1965–1969. [CrossRef]
28. Papadopoulou, C.; Soulti, K.; Roussis, I.G. Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technol. Biotechnol.* **2005**, *43*, 41–46.
29. Cetin-Karaca, H.; Newman, M.C. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Food Biosci.* **2015**, *11*, 8–16. [CrossRef]
30. Mattos, G.N.; Tonon, R.V.; Furtado, A.A.L.; Cabral, L.M.C. Grape by-product extracts against microbial proliferation and lipid oxidation: A review. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 1055–1064. [CrossRef] [PubMed]
31. D.O. Cava Regulatory Board Global Report. 2020. Available online: https://www.cava.wine/documents/258/ENG_KEY_FIGURES_2020.pdf (accessed on 31 May 2021).
32. Lavelli, V.; Torri, L.; Zeppa, G.; Fiori, L.; Spigno, G. Recovery of Winemaking By-Products. *Ital. J. Food Sci.* **2016**, *28*, 542–564.
33. Hernández-Macias, S.; Comas-Basté, O.; Jofré, A.; Bover-Cid, S.; Latorre-Moratalla, M.L.; Vidal-Carou, M.C. Growth-promoting effect of cava lees on lactic acid bacteria strains: A potential revalorization strategy of a winery by-product. *Foods* **2021**, *10*, 1636. [CrossRef]
34. Garriga, M.; Aymerich, M.T.; Costa, S.; Monfort, J.M.; Hugas, M. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiol.* **2002**, *19*, 509–518. [CrossRef]
35. Aguilera, M.Á. Characterization of Recovered Lees from Sparkling Wines. Ph.D. Thesis, University of Barcelona, Barcelona, Spain, 2016.

36. Vallverdú-Queralt, A.; Medina-Remón, A.; Martínez-Huélamo, M.; Jáuregui, O.; Andres-Lacueva, C.; Lamuela-Raventós, R.M. Phenolic profile and hydrophilic antioxidant capacity as chemotaxonomic markers of tomato varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 3994–4001. [\[CrossRef\]](#)
37. Rubio, R.; Jofré, A.; Aymerich, T.; Guàrdia, M.D.; Garriga, M. Nutritionally enhanced fermented sausages as a vehicle for potential probiotic lactobacilli delivery. *Meat Sci.* **2014**, *96*, 937–942. [\[CrossRef\]](#)
38. Bover-Cid, S.; Izquierdo-Pulido, M.; Vidal-Carou, M.C. Effect of proteolytic starter cultures of *Staphylococcus* spp. on biogenic amine formation during the ripening of dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, *46*, 95–104. [\[CrossRef\]](#)
39. Fernández-López, J.; Viuda-Martos, M.; Sendra, E.; Sayas-Barberá, E.; Navarro, C.; Pérez-Alvarez, J.A. Orange fibre as potential functional ingredient for dry-cured sausages. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, *226*, 1–6. [\[CrossRef\]](#)
40. Yang, B.; Prasad, K.N.; Xie, H.; Lin, S.; Jiang, Y. Structural characteristics of oligosaccharides from soy sauce lees and their potential prebiotic effect on lactic acid bacteria. *Food Chem.* **2011**, *126*, 590–594. [\[CrossRef\]](#)
41. Gómez, B.; Peláez, C.; Martínez-Cuesta, M.C.; Parajó, J.C.; Alonso, J.L.; Requena, T. Emerging prebiotics obtained from lemon and sugar beet byproducts: Evaluation of their in vitro fermentability by probiotic bacteria. *LWT* **2019**, *109*, 17–25. [\[CrossRef\]](#)
42. Fernández-López, J.; Sendra, E.; Sayas-Barberá, E.; Navarro, C.; Pérez-Alvarez, J.A. Physico-chemical and microbiological profiles of 'salchichón' (Spanish dry-fermented sausage) enriched with orange fiber. *Meat Sci.* **2008**, *80*, 410–417. [\[CrossRef\]](#)
43. Serra-Castelló, C.; Bover-Cid, S.; Garriga, M.; Hansen, T.B.; Gunvig, A.; Jofré, A. Risk management tool to define a corrective storage to enhance *Salmonella* inactivation in dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **2021**, *346*, 109160. [\[CrossRef\]](#)
44. Ramachandraiah, K.; Chin, K.B. Antioxidant, antimicrobial, and curing potentials of micronized celery powders added to pork sausages. *Food Sci. Anim. Resour.* **2021**, *41*, 110–121. [\[CrossRef\]](#)
45. Zokaityte, E.; Cernauskas, D.; Klupsaite, D.; Lele, V.; Starkute, V.; Zavistanaviciute, P.; Ruzauskas, M.; Gruzauskas, R.; Juodeikiene, G.; Rocha, J.M.; et al. Bioconversion of milk permeate with selected lactic acid bacteria strains and apple by-products into beverages with antimicrobial properties and enriched with galactooligosaccharides. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1182. [\[CrossRef\]](#)
46. Wang, Y.; Li, F.; Zhuang, H.; Li, L.; Chen, X.; Zhang, J. Effects of plant polyphenols and α -tocopherol on lipid oxidation, microbiological characteristics, and biogenic amines formation in dry-cured bacon. *J. Food Sci.* **2015**, *80*, C547–C555. [\[CrossRef\]](#)
47. Leistner, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *55*, 181–186. [\[CrossRef\]](#)
48. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Microbiological specifications of food pathogens. In *Microorganisms in Foods 5*; Roberts, T.A., Baird-Parker, A.C., Tompkin, R.B., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 1996; p. 514, ISBN 9780412473500.
49. Jofré, A.; Aymerich, T.; Garriga, M. Improvement of the food safety of low acid fermented sausages by enterocins A and B and high pressure. *Food Control* **2009**, *20*, 179–184. [\[CrossRef\]](#)
50. Piekarska-Radzik, L.; Klewicka, E. Mutual influence of polyphenols and *Lactobacillus* spp. bacteria in food: A review. *Eur. Food Res. Technol.* **2021**, *247*, 9–24. [\[CrossRef\]](#)
51. Romero-Díez, R.; Rodríguez-Rojo, S.; Cocero, M.J.; Duarte, C.M.M.; Matias, A.A.; Bronze, M.R. Phenolic characterization of aging wine lees: Correlation with antioxidant activities. *Food Chem.* **2018**, *259*, 188–195. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Jara-Palacios, M.J. Wine Lees as a Source of Antioxidant Compounds. *Antioxidants* **2019**, *8*, 45. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Razmkhab, S.; Lopez-Toledano, A.; Ortega, J.M.; Mayen, M.; Merida, J.; Medina, M. Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeasts and their cell walls. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7432–7437. [\[CrossRef\]](#)
54. Morata, A.; Gómez-Cordovés, M.C.; Colomo, B.; Suárez, J.A. Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes. *Eur. Food Res. Technol.* **2005**, *220*, 341–346. [\[CrossRef\]](#)
55. Mazaauric, J.-P.P.; Salmon, J.-M.M. Interactions between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging. II. Analysis of desorbed polyphenol compounds from yeast lees. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3876–3881. [\[CrossRef\]](#)
56. Gallardo-Chacón, J.J.; Vichi, S.; Urpi, P.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Antioxidant activity of lees cell surface during sparkling wine sur lie aging. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *143*, 48–53. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Barcia, M.T.; Pertuzatti, P.B.; Gómez-Alonso, S.; Godoy, H.T.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Teixeira, M.; Becker, P.; Gómez-Alonso, S.; Teixeira, H.; Hermosín-Gutiérrez, I. Phenolic composition of grape and winemaking by-products of Brazilian hybrid cultivars BRS Violeta and BRS Lorena. *Food Chem.* **2014**, *159*, 95–105. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Marcos, B.; Aymerich, T.; Guardia, M.D.; Garriga, M. Assessment of high hydrostatic pressure and starter culture on the quality properties of low-acid fermented sausages. *Meat Sci.* **2007**, *76*, 46–53. [\[CrossRef\]](#)
59. Latorre-Moratalla, M.L.; Veciana-Nogués, T.; Bover-Cid, S.; Garriga, M.; Aymerich, T.; Zanardi, E.; Ianieri, A.; Fraqueza, M.J.; Patarata, L.; Drosinos, E.H.; et al. Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European countries. *Food Chem.* **2008**, *107*, 912–921. [\[CrossRef\]](#)
60. Curiel, J.A.; Rodríguez, H.; Landete, J.M.; de las Rivas, B.; Muñoz, R. Ability of *Lactobacillus brevis* strains to degrade food phenolic acids. *Food Chem.* **2010**, *120*, 225–229. [\[CrossRef\]](#)
61. Wang, Y.; Li, F.; Zhuang, H.; Chen, X.; Li, L.; Qiao, W.; Zhang, J. Effects of plant polyphenols and α -tocopherol on lipid oxidation, residual nitrites, biogenic amines, and N-nitrosamines formation during ripening and storage of dry-cured bacon. *LWT Food Sci. Technol.* **2015**, *60*, 199–206. [\[CrossRef\]](#)
62. Zhang, J.; Wang, Y.; Pan, D.D.; Cao, J.X.; Shao, X.F.; Chen, Y.J.; Sun, Y.Y.; Ou, C.R. Effect of black pepper essential oil on the quality of fresh pork during storage. *Meat Sci.* **2016**, *117*, 130–136. [\[CrossRef\]](#)

63. Sánchez-Maldonado, A.F.; Schieber, A.; Gänzle, M.G. Structure-function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *111*, 1176–1184. [[CrossRef](#)]
64. Aymerich, T.; Rodríguez, M.; Garriga, M.; Bover-Cid, S. Assessment of the bioprotective potential of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 8 °C. *Food Microbiol.* **2019**, *83*, 64–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Serra-Castelló, C.; Costa, J.C.C.P.; Jofré, A.; Bolívar, A.; Pérez-Rodríguez, F.; Bover-Cid, S. A mathematical model to predict the antilisteria bioprotective effect of *Lactilactobacillus sakei* CTC494 in vacuum packaged cooked ham. *Int. J. Food Microbiol.* **2021**, in press.
66. Payne, K.D.; Rico-Munoz, E.; Davidson, P.M. The antimicrobial activity of phenolic compounds against *Listeria monocytogenes* and their effectiveness in a model milk system. *J. Food Prot.* **1989**, *52*, 151–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Klančnik, A.; Guzej, B.; Kolar, M.H.; Abramovic, H.; Mozina, S.S.; Klančnik, A.; Guzej, B.; Kolar, M.H.; Abramovič, H.; Možina, S.S.; et al. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *J. Food Prot.* **2009**, *72*, 1744–1752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Tabasco, R.; Sánchez-Patán, F.; Monagas, M.; Bartolomé, B.; Victoria Moreno-Arribas, M.; Peláez, C.; Requena, T. Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: Resistance and metabolism. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 1345–1352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Inhibition of biogenic amines formation in fermented foods by the addition of cava lees

Salvador Hernández-Macias¹, Alba Martín-García¹, Núria Ferrer-Bustins², Oriol Comas-Basté¹, Montserrat Riu-Aumatell¹, Elvira López-Tamames¹, Anna Jofré², Mariluz Latorre-Moratalla¹, Sara Bover-Cid², M Carmen Vidal-Carou^{1*}

¹Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Campus de l'Alimentació de Torribera, Universitat de Barcelona, Spain, ²Programa de Funcionalitat i Seguretat Alimentàries, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Spain

Submitted to Journal:
Frontiers in Microbiology

Specialty Section:
Food Microbiology

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
818565

Received on:
19 Nov 2021

Journal website link:
www.frontiersin.org

Conflict of interest statement

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

Author contribution statement

Conceptualization, M.L.L.-M., M.C.V.-C., A.J., S.B.-C.; investigation, S.H.-M., N.F.-B., A.M.-G., O.C.-B., M.L.L.-M.; writing—original draft preparation, S.H.-M., O.C.-B., M.L.L.-M.; writing—review and editing, S.H.-M., N.F.-B., O.C.-B., M.R.-A., E.L.-T., M.L.L.-M., A.J., S.B.-C., M.C.V.-C.; supervision, M.C.V.-C., A.J., S.B.-C.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Keywords

cava lees, Food by-product, fermented foods, Bread, fermented sausages, Biogenic Amines, Cadaverine, Putrescine

Abstract

Word count: 235

Food safety can be compromised by some bioactive compounds such as biogenic amines that can be specially found in fermented food due to the bacterial decarboxylation of some amino acids by fermentative or spoilage bacteria. Cava lees are a winery by-product generated rich in fiber and phenolic compounds. Previous works have raised the revalorization of cava lees from a food safety point of view, by their growth promoting effect on lactic acid bacteria (LAB) and against food borne pathogens. The aim of the current work was to investigate whether the use of cava lees can help to control biogenic amine formation in bread and fermented sausages. In bread, only very low levels of biogenic amines (putrescine, cadaverine, and/or spermidine) were found, whose content did not vary with the addition of different amounts of lees. However, the addition of lees in fermented sausages significantly reduced the formation of tyramine and cadaverine. In sausages spontaneously fermented and inoculated with *Salmonella* spp., the presence of cadaverine and putrescine diminished by 62% and 78%, respectively, due to the addition of cava lees. The addition of a lees phenolic extract also showed an anti-aminogenic effect (21% for cadaverine and 40% for putrescine), although in a lesser extent than cava lees. Cava lees and its phenolic extract were shown to be an effective strategy to control the undesirable accumulation of high levels of biogenic amines during the production of fermented products.

Contribution to the field

Dear editor, We are submitting the manuscript entitled "Inhibition of biogenic amines formation in fermented foods by the addition of cava lees". This manuscript studies the effect of cava lees on the biogenic amine formation by microbiota of fermented foods, specifically in bread and dry-fermented sausages. Cava lees are a by-product from the production of cava (Spanish sparkling wine) consisting of inactive cells of *Saccharomyces cerevisiae* with a potential role in the improvement of food safety of fermented products. We consider that this manuscript fits with the topic of the Special Issue and may be an interesting contribution. The results and discussion sections of the manuscript are combined, as agreed with the Editorial Office.

Funding statement

This research was funded by the Spanish Government through the Interministerial Commission for Science and Technology (CICYT) project AGL2016-78324-R and the Ministry of Science and Innovation project RTI2018-099195-R-I00 and by the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya. Salvador Hernández-Macias and Nuria Ferrer were a recipient of a doctoral fellowships from the University of Guadalajara (Mexico) and the Ministry of Science and Innovation (PRE2019-087847), respectively.



Inhibition of biogenic amines formation in fermented foods by the addition of cava lees

Salvador Hernández-Macias^{1,2,3}, Alba Martín-García^{1,2,3}, Núria Ferrer-Bustins⁴, Oriol Comas-Basté^{1,2,3}, Montserrat Riu-Aumatell^{1,2,3}, Elvira López-Tamames^{1,2,3}, Anna Jofré⁴, M. Luz Latorre-Moratalla^{1,2,3}, Sara Bover-Cid⁴, M. Carmen Vidal-Carou^{1,2,3,*}

¹Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Campus de l'Alimentació de Torribera, Universitat de Barcelona (UB), Av. Prat de la Riba 171, 8921 Santa Coloma de Gramenet, Spain;

²Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona (UB), Av. Prat de la Riba 171, 8921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

³Xarxa d'Innovació Alimentària (XIA), C/Baldiri Reixac 4, 8028 Barcelona, Spain

⁴Programa de Funcionalitat i Seguretat Alimentàries, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Finca Camps i Armet s/n, Monells, Spain.

*** Correspondence:**

M. Carmen Vidal-Carou

mcvidal@ub.edu, Tel.: +34-934-031-984

Keywords: cava lees, food by-product, fermented foods, bread, fermented sausages, biogenic amines, cadaverine, putrescine

Abstract

Food safety can be compromised by some bioactive compounds such as biogenic amines that can be specially found in fermented food due to the bacterial decarboxylation of some amino acids by fermentative or spoilage bacteria. Cava lees are a winery by-product generated rich in fiber and phenolic compounds. Previous works have raised the revalorization of cava lees from a food safety point of view, by their growth promoting effect on lactic acid bacteria (LAB) and against food borne pathogens. The aim of the current work was to investigate whether the use of cava lees can help to control biogenic amine formation in bread and fermented sausages. In bread, only very low levels of biogenic amines (putrescine, cadaverine, and/or spermidine) were found, whose content did not vary with the addition of different amounts of lees. However, the addition of lees in fermented sausages significantly reduced the formation of tyramine and cadaverine. In sausages spontaneously fermented and inoculated with *Salmonella spp.*, the presence of cadaverine and putrescine diminished by 62% and 78%, respectively, due to the addition of cava lees. The addition of a lees phenolic extract also showed an anti-aminogenic effect (21% for cadaverine and 40% for putrescine), although in a lesser extent than cava lees. Cava lees and its phenolic extract were shown to be an effective strategy to control the undesirable accumulation of high levels of biogenic amines during the production of fermented products.

1 Introduction

Food safety can be compromised not only by food-borne pathogens but also by some bioactive compounds of bacterial origin such as biogenic amines. These microbial metabolites (i.e., tyramine, histamine, putrescine, and cadaverine) are formed by a decarboxylation of their precursor amino acids and can be found in almost all types of food in a wide range of concentrations, which may vary even within the same type of product. Histamine and tyramine can have adverse health effects, such as histamine intoxication, histamine intolerance or hypertensive crises caused by the interaction between tyramine and MAOI drugs (Latorre-Moratalla et al., 2017). In fact, histamine and histamine intoxication are one of the hazards and foodborne diseases annually included in report issued by the European Food Safety Authority (EFSA) and the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (EFSA and ECDC, 2021). In addition, histamine can also be the causative agent of histamine intolerance, a disorder that appears in individuals sensitive to histamine levels generally tolerated by healthy population mainly as a consequence of a deficiency of diamine oxidase (DAO), an enzyme responsible for its intestinal degradation (Comas-Basté et al., 2020).

Besides the food safety issue, because the accumulation of biogenic amines in foods can be associated with the activity of spoilage bacteria, a high content of these compounds is considered a chemical marker of insufficient food freshness or poor hygiene in the manufacturing and/or food preservation processes (Comas-Basté et al., 2019). Additionally, fermented foods are also susceptible to accumulate significant levels of amines, not only associated with the activity of the undesired contaminant bacteria, but also with fermentative microorganisms (Latorre-Moratalla et al., 2017). In recent decades, hygienic improvements at all stages of the food chain, as well as the implementation of specific recommendations, such as the use of non-aminogenic starter cultures, have contributed to minimize the levels of these compounds in fermented products. However, current data on the occurrence of biogenic amines in this kind of products show that this area of food safety continues to be a challenge for the food industry. New strategies based on natural products are being developed and can complement or even replace traditional systems used to prevent or inhibit the growth of aminogenic microorganisms (Zhang et al., 2017).

Cava lees are a by-product from the production of cava (Spanish sparkling wine) consisting of plasmolyzed and inactive cells of *Saccharomyces cerevisiae* (Tudela et al., 2012). Lees are the second most generated by-product of the wine industry, and an estimated 300 tons of cava lees are produced in Spain per year (Hernández-Macias et al., 2021b). It has recently been pointed out that the addition of cava lees in the formulation of certain fermented foods can have positive effects regarding microbiological safety. In particular, their richness in fiber could promote the growth of fermentative bacteria and thus bring about a more rapid and greater reduction in pH (Hernández-Macias et al., 2021a). Moreover, the lower pH of cava lees and/or to other compounds found in lees, such as polyphenols and organic acids, could also exert an antimicrobial effect against undesired foodborne microorganisms. A recent study reported that cava lees added to fermented sausages significantly inhibit the growth of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* (Hernández-Macias et al., 2021b).

The aim of the current work was to investigate whether the use of cava lees can reduce biogenic amine formation in fermented foods, specifically in bread and fermented sausages. If confirmed, this revalorization strategy for cava lees would provide a new advantage from the food safety point of view, in addition to the control of food-borne pathogens. According to our knowledge, this is the first time that the applicability of cava lees to control the accumulation of biogenic amines in fermented foods have been studied.

2 Materials and Methods

82 2.1 Cava lees and cava lees phenolic extract

83 Cava lees were provided by the winery Freixenet S.A. (Sant Sadurní d'Anoia, Spain). To remove any
84 remaining cava, the wet lees were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 ° C. Subsequently, the
85 lees were frozen (-80 ° C), lyophilized (Cryodos-50, Telstar, Terrassa, Spain), ground and stored in
86 tubes protected from light and humidity until use. A lees phenolic extract (LPE) with a total phenolic
87 content of 152.2 ± 3.5 mg GAE/g was obtained from the cava lees using the method described by
88 (Silva et al., 2018).

89 2.2 Preparation of bread

90 Bread was prepared using 500 g of wheat flour, 150 g of sourdough, 285 g of water, 4 g of
91 lyophilized yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and 10 g of salt. Four batches of bread were made:
92 without cava lees (control) and with three different amounts of cava lees (1%, 2% and 5% w/w of
93 flour). These percentages were selected for showing a growth promoting effect on lactic acid bacteria
94 (LAB) counts of the sourdough. The sourdough was prepared following the procedure described by
95 (Wehrle and Arendt, 1998). The ingredients were manually kneaded and then fermented for 2 h at
96 room temperature. The fermented dough was baked at 200°C for 30 min. Each type of bread was
97 made in triplicate.

98 2.3 Preparation of fermented sausages

99 The meat batter was prepared by mixing minced pork lean and ground fat (8:2) through a 6 mm plate.
100 The ground meat was then mixed with (g/kg): sodium chloride (25), dextrose (7), black pepper (3),
101 sodium ascorbate (0.5), sodium nitrite (0.15) and potassium nitrate (0.15).

102 Firstly, two different batches were made: without (control) and with 5% (w/w) cava lees. This
103 percentage of cava lees was the most effective amount of this by-product to enhance the *in vitro*
104 bacterial growth of LAB and inhibit the growth of pathogenic bacteria in fermented sausages as
105 reported in previous studies (Hernández-Macías et., 2021a, 2021b). For each batch, 80 g portions of
106 the prepared meat batter were vacuum stuffed into Tublin10 permeable plastic casings (Tub-Ex, Tass,
107 Denmark), subjected to a fermentation process (2 days at 23°C) and subsequently ripened (19 days at
108 15°C). Each batch was made in triplicate.

109 In addition, the effect of cava lees on biogenic amine formation was also studied in more detail using
110 samples from a previous study, in which different strains of *Salmonella enterica* were inoculated to
111 fermented sausages: CTC1003 (serotype London), CTC1756 (serotype Derby) and CCUG34136
112 (serotype Enteritidis, Type strain) (Hernández-Macías et., 2021b). Table 1 shows the different
113 batches of fermented sausages considered in experiment one, which evaluated the effect of adding
114 5% (w/w) cava lees, and in the experiment two, with the addition of 0.3% of lees phenolic extract
115 (LPE). The starter cultures used were the strains *Latilactobacillus sakei* (formerly *Lactobacillus*
116 *sakei*) CTC494, producer of the bacteriocin sakacin K (Garriga et al., 2002), and *L. sakei* BAP 110.

117 The analyzed samples corresponded to the meat batter (time 0), 8-9 days of ripening (depending on
118 the experiment) and the finished product after 21 days of ripening. Each batch was prepared in
119 triplicate.

120 2.4 Biogenic amine analysis and bacterial decarboxylase activity

121 Twelve biogenic amines (octopamine, dopamine, tyramine, putrescine, serotonin, cadaverine,
122 histamine, agmatine, β -phenylethylamine, tryptamine, spermidine and spermine) were determined in

bread (sourdough and baked bread) and fermented sausages (at different time points during fermentation and ripening by triplicate). The biogenic amine content in the cava lees was also analyzed. Ultra-high efficiency liquid chromatography coupled to fluorometric detection (UHPLC-FL) was used according to (Latorre-Moratalla et al., 2009). Briefly, approximately 7 g of bread and 5 g of fermented sausage were mixed with 10 mL of 0.6 M perchloric acid for 20 min. Subsequently, the samples were centrifuged (20,000 rpm, 4°C, 25 min) and the supernatant was collected in a 25 mL volumetric flask. This extraction process was repeated twice more, and the final volume of the extract was adjusted with 0.6 M perchloric acid. The samples were filtered through a 0.22 µm GHP filter. All determinations were done in triplicate.

Chromatographic separation of the biogenic amines was performed using an Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm (2.1 mm x 50 mm) reversed phase column (Waters Corp., Milford, MA, USA), followed by an on-line post-column derivatization with *ortho*-phthaldehyde and a fluorometric detection (Ex: 340 nm and Em: 445 nm).

The aqueous content was determined (AOAC, 2000) and the biogenic amine content during the manufacturing of fermented sausages was expressed as dry matter (dm) to avoid the increase of concentration due to drying during sausage ripening.

The amino acid decarboxylase activity of the strains (*L. sakei* BAP110 and *Salmonella* spp.) was evaluated using the method described by (Latorre-Moratalla et al., 2010). The absence of decarboxylase activity in *L. sakei* CTC494 was previously established by (Bover-Cid et al., 2001).

2.5 Statistical analysis

To determine the statistical differences in biogenic amine contents between the different batches of fermented products, a one-way ANOVA and the Tukey HSD post-hoc test were performed (SPSS software). Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3 Results and discussion

3.1 Effect of cava lees on the biogenic amine content in bread and fermented sausages

The biogenic amines detected in the sourdough and different batches of bread are shown in Table 2. Sourdough contains fermenting yeast (*S. cerevisiae*) and LAB, mainly *Lactobacillus* spp. and *Leuconostoc* spp., whose acidifying and proteolytic properties influence the aromatic quality and rheology of bread (Gänzle and Ripari, 2016). Despite this considerable microbial activity, the sourdough was found to contain only low levels of putrescine and spermidine, both naturally present in flour and therefore coming from this ingredient (Karayigit et al., 2020).

As in the sourdough, the only amines detected in bread made without cava lees were putrescine and spermidine, whose content did not change significantly due to the addition of cava lees, irrespectively of the amount used. Bread made with cava lees was also found to contain very little concentration of cadaverine, thus the lees supplementation hardly had a significant effect on its formation. Neither could the lees be the source of cadaverine, considering that the only amine they contained in a significant amount was spermidine.

The fact that no biogenic amines related to microbial activity were found in sourdough or bread could be due either to a lack of aminogenic capacity by fermentative strains of *S. cerevisiae* or LAB, or

162 because the short fermentation that takes place for the preparation of the bread does not allow the
163 formation of these compounds.

164 In contrast with other fermented products, relatively few data are available on biogenic amines in
165 bread. Spermidine and putrescine are the most frequently reported, followed by spermine, and
166 sometimes cadaverine, histamine, tyramine and/or agmatine (Farkas and Hajós, 1998; Nishimura et
167 al., 2006; Cipolla et al., 2007; Diana et al., 2014; Karayigit et al., 2020; Muñoz-Esparza et al., 2021).
168 Quantitatively, the amine contents are usually low, normally below 10 mg/kg, without differences
169 between bread prepared with starter cultures or sourdough (Diana et al., 2014). However, high
170 contents of some of these amines have occasionally been described. For instance, (Cohen et al., 2014)
171 found high levels of putrescine and cadaverine in bread samples that gave off a penetrating odor,
172 which was related to a bacterial spoilage of the product, though the spoilage microorganisms were
173 not identified. In contrast, the high levels of tyramine reported by (Diana et al., 2014) were not due to
174 spoilage, but to the decarboxylase activity of a *Lactobacillus brevis* strain added as a starter culture.
175 Future studies should consider the use of an amine-producing BAL strain as starter culture to better
176 assess the capability of lees to reduce the formation of biogenic amine in bread.

177 The fermented sausages, both with and without cava lees, contained tyramine, putrescine and/or
178 cadaverine (Table 2), amines that can be originated from bacterial decarboxylase activity and are
179 typically found in this kind of products (Latorre-Moratalla et al., 2017). Spermine and spermidine,
180 natural polyamines with a fundamentally physiological origin, were also detected, whose main source
181 would have been the raw meat material. Spermine levels were higher than those of spermidine, as
182 described for this type of food of animal origin (Vidal-Carou et al., 2014).

183 In the control batch, cadaverine was the dominant amine, representing 41% of the total amine
184 content, followed by spermine (23%) and tyramine (18%), whereas putrescine and spermidine were
185 present at the lowest amounts. The effect of cava lees in fermented sausages was only evaluated with
186 the addition of 5% of lees, since this was the amount that showed an antimicrobial effect in this kind
187 of product (Hernández-Macias et al., 2021b). In the same line, the addition of 5% of lees had an
188 effect in reducing the content of amines. Specifically, the presence of lees completely prevented the
189 formation of tyramine and significantly ($p < 0.05$) reduced cadaverine accumulation by more than
190 76% compared to the control batch.

191 Based on these promising results, the potential reductor effect of cava lees on biogenic amine
192 formation during the production of fermented sausages was studied in more depth using different
193 batches of fermented sausages from a previous study (Hernández-Macias et al., 2021b).

194 **3.2 Effect of cava lees on the evolution of biogenic amines during the production of fermented** 195 **sausages inoculated with aminogenic bacteria**

196 Fermented sausages were inoculated with different strains of *Salmonella*, a bacterial genus generally
197 linked with a high capacity to form biogenic amines. However, as aminogenic capacity varies among
198 strains, it is necessary to carry out a case-by-case evaluation (Comas-Basté et al., 2019; Tabanelli,
199 2020). The three inoculated strains of *Salmonella* spp. displayed strong aminogenic activity *in vitro*,
200 forming high levels of cadaverine and putrescine (2,500 mg/L and 2,300 mg/L, respectively), and
201 moderate levels of histamine (200 mg/L); the strains were not able to form tyramine. The production
202 of putrescine, cadaverine, and histamine is frequently associated with the activity of Gram-negative
203 spoilage bacteria (*Pseudomonas* and *Enterobacteria*) and food-borne pathogenic bacteria (Suzzi and
204 Gardini, 2003; Latorre-Moratalla et al., 2012; Kukleci et al., 2019). In a comparative study,

(Gokdogan et al., 2012) reported that *Salmonella* was among the pathogenic bacteria with the highest capacity to produce these amines.

Moreover, some batches were also inoculated with *L. sakei* strains used as starter cultures. Both *L. sakei* strains were amino acid decarboxylase-negative *in vitro*. (Bover-Cid et al., 2001) previously demonstrated that *L. sakei* CTC494 cannot form biogenic amines, a capacity generally described as weak or absent in this specie (Latorre-Moratalla et al., 2012; Özogul and Hamed, 2018).

Biogenic amine content during sausages manufacture at different sampling points are referred to dry matter (dm) to avoid the concentration effect of the drying process. In the meat batter used in the manufacturing of fermented sausages, spermine and spermidine were the only two amines detected, with contents of 89.2 ± 0.2 mg/kg dm and 3.4 ± 0.1 mg/kg dm, respectively, which did not change significantly during the fermentation and ripening process in any of the batches. These results confirm the physiological origin of these polyamines from meat. Although the cava lees contained spermidine, the proportion in which the lees were added to the sausages (5%) was too low to create significant differences with the control batches.

During the fermented sausage processing, three amines were detected, cadaverine, putrescine and tyramine, the concentrations varying considerably between experiments and/or batches (Figure 1). Physicochemical parameters and microbiological counts of all batches of fermented sausages were previously reported in (Hernández-Macias et al., 2021b)

In the spontaneously fermented control sausages (C1 and C2), cadaverine was the major amine, reaching levels of 1,484 mg/kg dm in experiment 1 (Figure 1A) and 525 mg/kg dm in experiment 2 (Figure 1B). Significant amounts of putrescine were also formed throughout the production process, with levels of 479 mg/kg dm and 212 mg/kg dm in the finished product in experiments 1 and 2, respectively. The high contents of cadaverine and putrescine can presumably be attributed to the strong capacity of the inoculated *Salmonella* strains to synthesize these diamines. Both amines are commonly found in fermented meat products, although usually at relatively low levels (around 50 mg/kg, according to the risk assessment by EFSA) (EFSA, 2011). However, in some cases, their levels can increase dramatically (up to 1,500 mg/kg) attributable to contamination of raw materials with enterobacteria (Latorre-Moratalla et al., 2008; EFSA, 2011; Ruiz-Capillas and Herrero, 2019). The formation of biogenic amines in fermented meat products can be affected by numerous variables, both intrinsic (pH, formulation, sausage diameter, etc.) and technological (temperature and humidity) (Vidal-Carou et al., 2014; Ruiz-Capillas and Herrero, 2019; Tabanelli, 2020). Therefore, considering that the sausages from experiments 1 and 2 shared the same formulation, diameter and processing conditions, the considerably lower levels of cadaverine and putrescine in C2 versus C1 could be attributed in part to the greater reduction of pH in the C2 batch (final pH values of 6.26 in C1 versus 5.28 in C2) (Hernández-Macias et al., 2021b). The effect of pH on aminogenesis is nevertheless a subject of controversy. Although an acidic pH is known to promote decarboxylase activity, which serves as a microbial defense mechanism against unfavorable acidic conditions, a rapid and pronounced decrease in pH will inhibit the growth and/or the metabolism of potentially aminogenic spoilage bacteria, consequently reducing aminogenesis (Comas-Basté et al., 2019; Ruiz-Capillas and Herrero, 2019).

The content of tyramine in control batches increased progressively throughout the production process, although to a lesser extent than the other two amines. In both experiments the finished products had very similar values of tyramine (around 190 mg/kg dm). According to EFSA (2011), the average tyramine value found in different European fermented sausages is about 130 mg/kg, but

Running Title

reaching a maximum of more than 1,700 mg/kg. Tyramine formation can be partially attributed to the activity of LAB, including enterococci and lactobacilli, some of them mainly responsible for fermentation, but also associated with contamination of raw materials (Anderegg et al., 2020). For this reason, tyramine tends to be the predominant and most characteristic amine of fermented meat products (Latorre-Moratalla et al., 2017). In the current work, the inoculation of sausages with *Salmonella* spp., which has a high capacity to produce cadaverine and putrescine but not tyramine, could explain that the contents of cadaverine and putrescine exceed those of tyramine.

The addition of cava lees or the phenolic extract only affected the formation of cadaverine and putrescine. In the batch L1 produced with cava lees (Figure 1A), cadaverine and putrescine contents were significantly lower than in the control batch C1 throughout the process, the values in the finished product being 62% and 78% lower, respectively ($p < 0.05$). The markedly lower counts of *Salmonella* (up to 2.7 log₁₀) found in fermented sausages formulated with cava lees (Hernández-Macias et al., 2021b) could explain the lower putrescine and cadaverine levels. The LPE also had a significant aminogenesis reducing effect (E2), 21% lower content for cadaverine and 40% for putrescine compared with the control (C2) (Figure 1B). The batch formulated with LPE (E2) showed slightly lower levels of *Salmonella* than C2 at the end of the ripening (differences of 0.71 log₁₀) (Hernández-Macias et al., 2021b). Therefore, the reduction in amine levels of E2 could be due to the polyphenols from LPE, as indicated by some other studies performed on different types of meat products. For example, the addition of phenolic extracts from tea, grape, bamboo, or roses induced a significant decrease in levels of cadaverine, tyramine, histamine and/or putrescine, which was always correlated with lower counts of spoilage bacteria in the polyphenol-enriched products (Fan et al., 2015; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2017).

Regarding tyramine, no significant differences were observed between batches without (C1 and C2) and with lees (L1) or the LPE (E2). The fact that the LAB counts were not influenced by the addition of cava lees or LPE (Hernández-Macias et al., 2021b) could explain why this by-product supplementation had no effect on tyramine formation.

Finally, the formation of cadaverine, putrescine and tyramine was inhibited in all batches elaborated with starter cultures. This effect was especially pronounced when using *L. sakei* CTC494, a highly competitive and non-aminogenic strain, resulting in fermented sausages free, or practically free, of biogenic amines as previously reported (Bover-Cid et al., 2000). In contrast, the *L. sakei* BAP110 culture, also without aminogenic capacity *in vitro*, prevented the formation of putrescine and cadaverine but not totally that of tyramine (Figure 1B). Numerous studies, both *in vitro* and in fermented meat products, have described a reduction in biogenic amine formation by foodborne pathogens after inoculation with LAB strains (Özogul and Hamed, 2018). Among them, *L. sakei* is the most effective in reducing amine accumulation (Latorre-Moratalla et al., 2012). (Bover-Cid et al., 2000) reported that the strain *L. sakei* CTC494 had a protective effect against amine formation in *fuet* (a Catalan fermented sausage), with reductions of up to 91% for putrescine, 88% for tyramine, and 74% for cadaverine.

The high efficacy with which the starter culture inhibited amine formation meant it was impossible to observe any synergistic effect with cava lees or the LPE in most of the batches. In the case of E2+BAP110, the combined use of the LPE and a starter culture did not reduce tyramine formation more than in the control (C2+BAP110).

It should be noted that the formation of histamine was not observed in any batch of fermented sausages. According to various studies, histamine is found in less frequency in meat products or only

in low quantities. However, the occasional presence of extremely high levels of histamine has been linked to hygienically defective raw materials (EFSA, 2011; Comas-Basté et al., 2019).

4 Conclusions

The two fermented products considered in this study showed important differences regarding the occurrence of biogenic amines. In the case of bread, only very low putrescine, cadaverine and/or spermidine contents were found, mainly proceeding from raw materials, and without significant differences depending on whether or not cava lees were added. On the contrary, the addition of cava lees or its phenolic extract in the formulation of fermented meat products has been shown to be an effective strategy to reduce the high levels of biogenic amines, such as putrescine and cadaverine. In view of the obtained successful results on the anti-aminogenic effect in meat fermented products, it would be convenient to carry out further studies assessing a wider range of concentrations of cava lees or its phenolic extract and also to extend it to other fermented products.

5 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.

6 Author Contributions

Conceptualization, M.L.L.-M., M.C.V.-C., A.J., S.B.-C.; investigation, S.H.-M., N.F.-B., A.M.-G., O.C.-B., M.L.L.-M.; writing—original draft preparation, S.H.-M., O.C.-B., M.L.L.-M.; writing—review and editing, S.H.-M., N.F.-B., O.C.-B., M.R.-A., E.L.-T., M.L.L.-M., A.J., S.B.-C., M.C.V.-C.; supervision, M.C.V.-C., A.J., S.B.-C.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

7 Funding

This research was funded by the Spanish Government through the Interministerial Commission for Science and Technology (CICYT) project AGL2016-78324-R and the Ministry of Science and Innovation project RTI2018-099195-R-I00 and by the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya. Salvador Hernández-Macias and Nuria Ferrer were a recipient of a doctoral fellowships from the University of Guadalajara (Mexico) and the Ministry of Science and Innovation (PRE2019-087847), respectively.

8 Acknowledgments

The authors thanks Freixenet S.A. for providing the cava lees used in this study.

9 References

- AOAC (2000). Official Methods of Analysis, 17th ed.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., and Vidal-Carou, M. C. (2000). Reduction of Biogenic Amine Formation Using a Negative Amino Acid-Decarboxylase Starter Culture for Fermentation of Fuet Sausages. *Journal of Food Protection* 63, 237–243. doi:10.4315/0362-028X-63.2.237.

- 329 Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., and Vidal-Carou, M. C. (2001). Effectiveness of a *Lactobacillus*
330 *sakei* starter culture in the reduction of biogenic amine accumulation as a function of the raw
331 material quality. *Journal of Food Protection* 64, 367–373. doi:10.4315/0362-028X-64.3.367.
- 332 Cipolla, B. G., Havouis, R., and Moulinoux, J. P. (2007). Polyamine contents in current foods: A
333 basis for polyamine reduced diet and a study of its long term observance and tolerance in
334 prostate carcinoma patients. *Amino Acids* 33, 203–212. doi:10.1007/s00726-007-0524-1.
- 335 Cohen, G., Laloush, M., and Karpas, Z. (2014). Biogenic amines in bread as indicators of spoilage.
336 *International Journal for Ion Mobility Spectrometry* 17, 125–129. doi:10.1007/s12127-014-
337 0159-3.
- 338 Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M. L., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M. T., and Vidal-
339 Carou, M. C. (2019). “Histamine and Other Biogenic Amines in Food. From Scombroid
340 Poisoning to Histamine Intolerance,” in *Biogenic Amines* (IntechOpen).
341 doi:10.5772/intechopen.84333.
- 342 Comas-Basté, O., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M., and Vidal-
343 Carou, M. C. (2020). Histamine intolerance: The current state of the art. *Biomolecules* 10, 1–26.
344 doi:10.3390/biom10081181.
- 345 Diana, M., Rafecas, M., and Quílez, J. (2014). Free amino acids, acrylamide and biogenic amines in
346 gamma-aminobutyric acid enriched sourdough and commercial breads. *Journal of Cereal*
347 *Science* 60, 639–644. doi:10.1016/j.jcs.2014.06.009.
- 348 EFSA (2011). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented
349 foods. *EFSA Journal* 9, 2393. doi:10.2903/j.efsa.2011.2393.
- 350 EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and
351 Control), 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 19.
352 doi:10.2903/j.efsa.2021.6406.
- 353 Fan, W., Yi, Y., Zhang, Y., and Diao, P. (2015). Effect of an antioxidant from bamboo leaves
354 combined with tea polyphenol on biogenic amine accumulation and lipid oxidation in pork
355 sausages. *Food Science and Biotechnology* 24, 421–426. doi:10.1007/s10068-015-0055-6.
- 356 Farkas, S., and Hajós, G. (1998). Monitoring of biologically active amines in cereals and cereal based
357 food products by HPLC. *Chromatographia* 48, 37–42. doi:10.1007/BF02467513.
- 358 Gänzle, M., and Ripari, V. (2016). Composition and function of sourdough microbiota: From
359 ecological theory to bread quality. *International Journal of Food Microbiology* 239, 19–25.
360 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.004.
- 361 Garriga, M., Aymerich, M. T., Costa, S., Monfort, J. M., and Hugas, M. (2002). Bactericidal
362 synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food*
363 *Microbiology* 19, 509–518. doi:10.1006/fmic.2002.0498.
- 364 Gokdogan, S., Özogul, Y., Kuley, E., Özogul, F., Kacar, C., and Ucar, Y. (2012). The Influences of
365 Natural Zeolite (cliptinolite) on Ammonia and Biogenic Amine Formation by Foodborne
366 Pathogen. *Journal of Food Science* 77. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02822.x.

- 367 Hernández-Macias, S., Comas-Basté, O., Jofré, A., Bover-Cid, S., Latorre-Moratalla, M. L., and
368 Vidal-Carou, M. C. (2021a). Growth-Promoting Effect of Cava Lees on Lactic Acid Bacteria
369 Strains: A Potential Revalorization Strategy of a Winery By-Product. *Foods* 10, 1636.
370 doi:10.3390/foods10071636.
- 371 Hernández-Macias, S., Ferrer-Bustins, N., Comas-Basté, O., Jofré, A., Latorre-Moratalla, M., Bover-
372 Cid, S., et al. (2021b). Revalorization of Cava Lees to Improve the Safety of Fermented
373 Sausages. *Foods* 10, 1916. doi:10.3390/foods10081916.
- 374 Karayigit, B., Colak, N., Ozogul, F., Gundogdu, A., Inceer, H., Bilgiçli, N., et al. (2020). The
375 biogenic amine and mineral contents of different milling fractions of bread and durum wheat
376 (*Triticum L.*) cultivars. *Food Bioscience* 37, 100676. doi:10.1016/j.fbio.2020.100676.
- 377 Kukleci, E., Smulders, F. J. M., Hamidi, A., Bauer, S., and Paulsen, P. (2019). Prevalence of
378 foodborne pathogenic bacteria, microbial levels of hygiene indicator bacteria, and
379 concentrations of biogenic amines in ready-to-eat meat products at retail in the republic of
380 Kosovo. *Journal of Food Protection* 82, 1135–1140. doi:10.4315/0362-028X.JFP-19-060.
- 381 Latorre-Moratalla, M. L., Bosch-Fusté, J., Lavizzari, T., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T., and
382 Vidal-Carou, M. C. (2009). Validation of an ultra high pressure liquid chromatographic method
383 for the determination of biologically active amines in food. *Journal of Chromatography A* 1216,
384 7715–7720. doi:10.1016/j.chroma.2009.08.072.
- 385 Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Talon, R., Aymerich, T., Garriga, M., Zanardi, E., et al.
386 (2010). Distribution of aminogenic activity among potential autochthonous starter cultures for
387 dry fermented sausages. *Journal of Food Protection* 73, 524–528. doi:10.4315/0362-028X-
388 73.3.524.
- 389 Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T., and Vidal-Carou, M. C. (2012).
390 Control of biogenic amines in fermented sausages: Role of starter cultures. *Frontiers in*
391 *Microbiology* 3, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2012.00169.
- 392 Latorre-Moratalla, M. L., Comas-Basté, O., Bover-Cid, S., and Vidal-Carou, M. C. (2017). Tyramine
393 and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish
394 population. *Food and Chemical Toxicology* 99, 78–85. doi:10.1016/j.fct.2016.11.011.
- 395 Latorre-Moratalla, M. L., Veciana-Nogués, T., Bover-Cid, S., Garriga, M., Aymerich, T., Zanardi, E.,
396 et al. (2008). Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European
397 countries. *Food Chemistry* 107, 912–921. doi:10.1016/j.foodchem.2007.08.046.
- 398 Muñoz-Esparza, N. C., Costa-Catala, J., Comas-Basté, O., Toro-funes, N., Latorre-Moratalla, M. L.,
399 Veciana-Nogués, M. T., et al. (2021). Occurrence of polyamines in foods and the influence of
400 cooking processes. *Foods* 10, 1752. doi:10.3390/foods10081752.
- 401 Nishimura, K., Shiina, R., Kashiwagi, K., and Igarashi, K. (2006). Decrease in Polyamines with
402 Aging and Their Ingestion from Food and Drink. *The Journal of Biochemistry* 139, 81–90.
403 doi:10.1093/jb/mvj003.

- Özogul, F., and Hamed, I. (2018). The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58, 1660–1670. doi:10.1080/10408398.2016.1277972.
- Ruiz-Capillas, C., and Herrero, A. M. (2019). Impact of biogenic amines on food quality and safety. *Foods* 8. doi:10.3390/foods8020062.
- Silva, V., Igrejas, G., Falco, V., Santos, T. P., Torres, C., Oliveira, A. M. P., et al. (2018). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds extracted from wine industry by-products. *Food Control* 92, 516–522. doi:10.1016/j.foodcont.2018.05.031.
- Suzzi, G., and Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: A review. *International Journal of Food Microbiology* 88, 41–54. doi:10.1016/S0168-1605(03)00080-1.
- Tabanelli, G. (2020). Biogenic Amines and Food Quality: Emerging Challenges and Public Health Concerns. *Foods* 9, 7–10. doi:10.3390/foods9070859.
- Tudela, R., Gallardo-Chacón, J. J., Rius, N., López-Tamames, E., and Buxaderas, S. (2012). Ultrastructural changes of sparkling wine lees during long-term aging in real enological conditions. *FEMS Yeast Research* 12, 466–476. doi:10.1111/j.1567-1364.2012.00800.x.
- Vidal-Carou, M. C., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M. L., and Bover-Cid, S. (2014). “Biogenic Amines: Risks and Control,” in *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, ed. & R. Talon. Fidel Toldrá ; associate editors, Y.H. Hui, I. Astiasarán, J.G. Sebranek (Wiley), 413–428. doi:10.1002/9781118522653.ch47.
- Wang, Y., Li, F., Zhuang, H., Li, L., Chen, X., and Zhang, J. (2015). Effects of Plant Polyphenols and α -Tocopherol on Lipid Oxidation, Microbiological Characteristics, and Biogenic Amines Formation in Dry-Cured Bacons. *Journal of Food Science* 80, C547–C555. doi:10.1111/1750-3841.12796.
- Wehrle, K., and Arendt, E. K. (1998). Rheological Changes in Wheat Sourdough During Controlled and Spontaneous Fermentation. *Cereal Chemistry Journal* 75, 882–886. doi:10.1094/CCHEM.1998.75.6.882.
- Zhang, Q. Q., Jiang, M., Rui, X., Li, W., Chen, X. H., and Dong, M. S. (2017). Effect of rose polyphenols on oxidation, biogenic amines and microbial diversity in naturally dry fermented sausages. *Food Control* 78, 324–330. doi:10.1016/j.foodcont.2017.02.054.

Table 1. Batches of fermented sausages included in each experiment, formulated with or without 5% cava lees or 0.3% lees phenolic extract (LPE) and/or different strains of *L. sakei* (CTC494 or BAP110) as the starter culture.

Experiment	Batch	Ingredients	Starter culture strain ¹
1	C1	-	-
	L1	Cava lees	-
	C1+CTC494	-	<i>L. sakei</i> CTC494 ²
	L1+CTC494	Cava lees	<i>L. sakei</i> CTC494
2	C2	-	-
	E2	LPE	-
	C2+CTC494	-	<i>L. sakei</i> CTC494
	E2+CTC494	LPE	<i>L. sakei</i> CTC494
	C2+BAP110	-	<i>L. sakei</i> BAP110
	E2+BAP110	LPE	<i>L. sakei</i> BAP110

¹Batches without starter cultures (-) underwent spontaneous fermentation; ²*L. sakei* CTC494 produces the bacteriocin sakacin K (Garriga et al., 2002).

Table 2. Biogenic amine contents (mean $\pm$ SD in mg/kg fresh matter) in sourdough, in baked bread with and without the addition of different amounts of cava lees (1%, 2%, and 5% [w/w of flour]), and in fermented sausages with and without the addition of 5% (w/w) cava lees after 21 days of ripening.

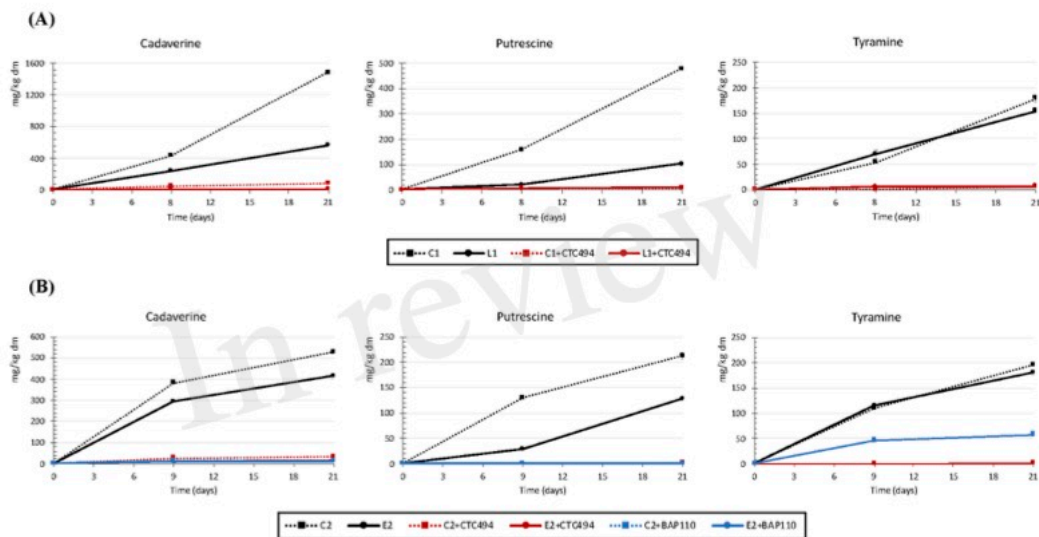
	Tyramine	Putrescine	Cadaverine	Histamine	Spermidine	Spermine
Cava lees	nd	nd	nd	nd	10.5 $\pm$ 0.43	0.10 $\pm$ 0.03
Bread						
Sourdough	nd	2.02 $\pm$ 0.03	nd	nd	1.52 $\pm$ 0.01	nd
Bread	nd	3.79 $\pm$ 0.02 ^a	nd	nd	4.28 $\pm$ 0.02 ^a	nd
Bread + 1% cava lees	nd	4.21 $\pm$ 0.01 ^a	2.87 $\pm$ 0.03 ^a	nd	5.38 $\pm$ 0.01 ^a	nd
Bread + 2% cava lees	nd	5.50 $\pm$ 0.04 ^a	2.78 $\pm$ 0.00 ^a	nd	4.72 $\pm$ 0.05 ^a	nd
Bread + 5% cava lees	nd	3.73 $\pm$ 0.23 ^a	2.93 $\pm$ 0.02 ^a	nd	5.58 $\pm$ 0.04 ^a	nd
Fermented sausages						
Fermented sausage	17.66 $\pm$ 0.46	10.70 $\pm$ 0.34 ^a	39.78 $\pm$ 1.46 ^a	nd	6.42 $\pm$ 0.03 ^a	22.60 $\pm$ 0.47 ^a
Fermented sausage + 5% cava lees	nd	11.04 $\pm$ 0.35 ^a	9.35 $\pm$ 0.32 ^b	nd	6.90 $\pm$ 0.09 ^a	26.32 $\pm$ 1.49 ^a

nd: not detected (< 0.05 mg/kg); Significant differences between control batches and lees supplemented batches are indicated by different superscript letters (p < 0.05).



449 **Figure legends**

450 **Figure 1.** Contents of cadaverine, putrescine and tyramine (mg/kg dry matter) in fermented sausages:
 451 A) spontaneous fermentation without (C1) or with (L1) the addition of 5% cava lees or fermentation
 452 with the starter culture *L. sakei* CTC494 without (C1+CTC494) or with (L1+CTC494) cava lees; B)
 453 spontaneous fermentation without (C2) or with (E2) the addition of 0.3% LPE or fermentation with
 454 the starter culture *L. sakei* CTC494 or *L. sakei* BAP110 without (C2+CTC494 or C2+BAP110) or
 455 with (E2 + CTC494 or E2 + BAP110) the LPE.



5.1.2 COMUNICACIONES ORALES

COMUNICACIÓN ORAL 1 | Premio a la mejor comunicación oral

Salvador Hernández-Macias, Sonia Sánchez-Pérez, Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. **Prebiotic Effect of Cava Lees on Probiotic Strains with DAO Activity**. *III Workshop del Institut de Investigació en Nutrició y Seguridad Alimentaria (INSA·UB)*, 2017, Santa Coloma de Gramenet.

COMUNICACIÓN ORAL 2

Salvador Hernández-Macias, M. Luz Latorre-Moratalla, Oriol Comas-Basté, Sonia Sánchez-Pérez, Montserrat Riu-Aumatell, M. Teresa Veciana-Nogués, Elvira López-Tamames, M. Carmen Vidal-Carou. **Cava lees as promoters of the growth of fermentative and probiotic bacteria**. *V Reunión de Jóvenes Investigadores de la Sociedad Española de Nutrición (SEÑ)*, 2018, Barcelona.

COMUNICACIÓN ORAL 3 | Premio al mejor póster

Salvador Hernández-Macias, Sergio González-Pastor, Oriol Comas-Basté, Sonia Sánchez-Pérez, Nelly Muñoz-Esparza, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Carmen Vidal-Carou. **Histaminase activity of *Lactobacillus sakei* and the promoting effect of cava lees on its growth**. *V Workshop del Instituto de Investigación en Nutrició y Seguridad Alimentaria (INSA·UB)*, 2019, Santa Coloma de Gramenet.

COMUNICACIÓN ORAL 4

Salvador Hernández-Macias, M. Luz Latorre-Moratalla, Oriol Comas-Basté, Nelly Muñoz-Esparza, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. **Efecto promotor de las lías del cava en el crecimiento de cepas de *Lactobacillus sakei*: una estrategia de seguridad y sostenibilidad**. *Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad Alimentaria*, 2020, En línea.

COMUNICACIÓN ORAL 5

Salvador Hernández-Macias, Nuria Ferrer-Bustins, Oriol Comas-Basté, Anna Jofré, M. Luz Latorre-Moratalla, Sara Bover-Cid, M. Carmen Vidal-Carou. **Revalorización de las lías del cava para mejorar la seguridad de derivados cárnicos fermentados**:

Una estrategia hacia un futuro más sostenible. *Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad Alimentaria*, 2021, En línea.

5.1.3 COMUNICACIONES ESCRITAS

COMUNICACIÓN ESCRITA 1

Salvador Hernández-Macias, M. Luz Latorre-Moratalla, Oriol Comas-Basté, Sonia Sánchez-Pérez, Montserrat Riu-Aumatell, M. Teresa Veciana-Nogués, Elvira López-Tamames, M. Carmen Vidal-Carou. **Cava lees as promoters of the growth of fermentative and probiotic bacteria.** *XVII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición (SEÑ) y X Jornada de l'Associació Catalana de Ciències de l'Alimentació (ACCA)*, 2018, Barcelona.

COMUNICACIÓN ESCRITA 2

Salvador Hernández-Macias, S., M. Luz Latorre-Moratalla, Oriol Comas-Basté, Montserrat Riu-Aumatell, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. **¿Pueden las lías del cava mejorar la seguridad de los alimentos fermentados?** *Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad Alimentaria*, 2018, Salamanca.

COMUNICACIÓN ESCRITA 3

Salvador Hernández-Macias, Gemma Rius-Olivella, Oriol Comas-Basté, Sonia Sánchez-Pérez, Nelly Muñoz-Esparza, M. Teresa Veciana-Nogués, Sara Bover-Cid., M. Luz Latorre-Moratalla, M. Carmen Vidal-Carou. **Estudio del efecto promotor de las lías del cava en el crecimiento de bacterias lácticas.** *V Congreso Internacional de Calidad y Seguridad Alimentaria Asociación de Consultores y Formadores de España en Calidad y Seguridad Alimentaria (ACOFESAL)*, 2019, Barcelona.

5.2 Evidencia de las comunicaciones escritas derivadas de la tesis doctoral



V Workshop Anual INSA·UB

Al·lèrgies i intoleràncies alimentàries:
de la sospita a la taula

Salvador Hernández Macias

ha rebut el premi al

Millor Pòster

pel treball titulat "*Histaminase activity of *Lactobacillus sakei* and the promoting effect of cava lees on its growth*"

dels autors Hernández-Macias S, González-Pastor S, Comas-Basté O, Sánchez-Pérez S, Muñoz-Esparza NC, Veciana-Nogués MT, Latorre-Moratalla ML, Vidal-Carou MC.

presentat al V Workshop de l'Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària de la Universitat de Barcelona (INSA·UB) que ha tingut lloc el 13 de novembre de 2019 al Campus de l'Alimentació de Torribera de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació (UB)

Dra. Rosa Lamuela Raventós
Directora de l'INSA·UB



Institut de Recerca en Nutrició
i Seguretat Alimentària



¿CAN CAVA LEES PROMOTE THE GROWTH OF FERMENTATIVE MICROORGANISMS?



Hernández-Macias, S., Comas-Basté, O., Sánchez-Pérez, S., Riu-Aumatell, M., Latorre-Moratalla, M.L., Veciana-Nogués, M.T., Buxaderas, S., López-Tamames, E., & Vidal-Carou, M.C.

Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona (UB), Av. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet (Spain); Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona (UB). mccidal@ub.edu

BACKGROUND

Cava (natural sparkling wine) lees are non-viable cells of *Saccharomyces cerevisiae* naturally plasmolyzed during the cava processing¹. Currently, 300 tones are generated per year and they are a sub-product without added value. Lees are rich in soluble and insoluble fibers and thus could favor the growth of fermentative microorganisms². A faster fermentation could have a positive impact on fermented products from a food safety perspective by accelerating pH drop and allow to reduced the amount of salt needed to formulate some fermented products.

OBJECTIVES

The objective of this work was to characterize cava lees from a compositional point of view and evaluate *in vitro* their potential effect as promoters of the growth of fermentative microorganisms.

METHODOLOGY

Lees were obtained after disgorging cava bottles. In the laboratory, raw lees were separated from the supernatant (remaining sparkling wine) by centrifugation (10.000 rpm, 10 min) and stored in freezing (-18 °C). Lees were characterized by confocal microscopy and their composition was assessed by Bradford protein assay and phenol-sulphuric acid method for total carbohydrates (Figure 1).

The growth of the strain *Lactobacillus sakei* LU10.10 was evaluated after the addition of different proportions of lees (0.2%, 0.5%, 1% and 2% w/v) following the procedure described in figure 1. The culture medium used was MRS after verifying that the presence of yeast extract in its formulation did not mask the effect of the addition of lees. The effect of lees was studied on different fermentative microorganisms (*L. sakei* LU10.10, *L. sakei* ATCC15521, *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 and *L. plantarum* ATCC14917).

RESULTS

In the concentrate of lees, yeast cells maintained the typical ovoid structure and the integrity of the wall (Figure 2). The diameter was 3-5 µm and cell counting was $1,12 \cdot 10^{10}$ - $2,76 \cdot 10^{10}$ cells/g dry weight. Polysaccharides were the main compounds of lees (70-75%) followed by proteins (9-15%).

The addition of lees significantly increased ($p < 0.05$) the growth of *L. sakei* LU10.10 in comparison with a medium without lees (control) after 24 h of culture.

This effect was gradually incremented depending on the concentration of lees. The addition of 1% and 2% of lees showed maximum growth, with cell countings up to 8.6 and 8.7 log UFC/mL, respectively; thus being 1% the concentration chosen for subsequent trials. Figure 3 shows the effect of the addition of 1% of lees on the growth of *L. sakei* in comparison with control.

A clear growth promoting effect was observed after 24 hours of contact between lees and *L. sakei* LU10.10, with differences of more than 1 log CFU/mL with respect to the control, representing an increase up to 22% (Figure 4). In the same conditions, the other assayed strains showed a slight growth with no statistical significance.

CONCLUSION

The results show that cava lees can promote the growth of some fermentative microorganisms. Further studies are needed in order to know whether the growth promoter effect of lees increases when the contact time is extended or with higher lees concentration. Likewise, it is necessary to study if lees also act as growth promoters when added in the food formulation and verify the real impact of this addition in the pH drop during fermentation.

Figure 1. Schematic experimental procedure.

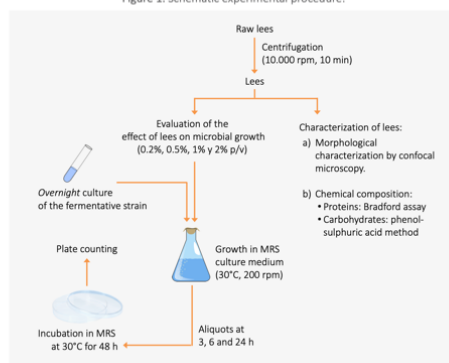


Figure 2. Images obtained by confocal laser scanning microscopy of cava lees.

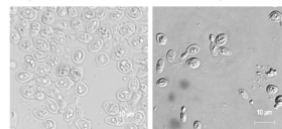


Figure 3. Growth of *L. Sakei* LU10.10 over time in MRS medium without lees (control) and with 1% lees.

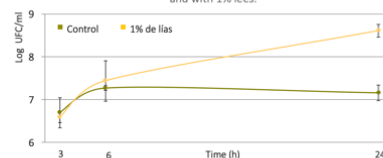
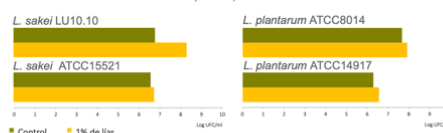


Figure 4. Growth of different fermentative strains in MRS medium without lees (control) and with 1% lees.



References
¹Gallardo-Chacón et al., (2010) Int. J. Food Microbiol. 143:48-53; ²Shokri et al., (2008) Nat. Product Res. 22:414-21.

Acknowledgements
 This work was supported by Direcció General de Recerca de la Generalitat de Catalunya (2014-1438 SGR) and by the Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias del Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2016-78324-R).



CAVA LEES AS PROMOTERS OF THE GROWTH OF FERMENTATIVE AND PROBIOTIC BACTERIA

Hernández-Macias, S., Latorre-Moratalla, M.L., Comas-Basté, O., Sánchez-Pérez, S., Riu-Aumatell, M., Veciana-Nogués, M.T., López-Tamames, E., Vidal-Carou, M.C.

Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia. Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació. Universitat de Barcelona (UB). Av. Prat de la Riba 171, Santa Coloma de Gramenet (Spain); INSA-UB - XaRTA. mccidal@ub.edu

Introduction

Cava (natural sparkling wine) lees are non-viable cells of *Saccharomyces cerevisiae*, naturally plasmolyzed during cava processing¹. They are a currently generated for 300 tons/year as a sub-product without added value. Lees are rich in soluble and insoluble fibers and may favor the growth of probiotic and fermentative microorganisms². A faster growth could have a positive impact on food safety of fermented products by accelerating pH drop.

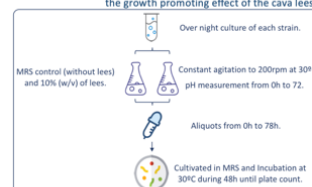
Methods

The effect of lees (10% w/v) on two LAB species in comparison with controls without lees was studied. The strains evaluated were *Lactobacillus sakei* (LU10.10) and *Lactobacillus plantarum* ATCC8014, ATCC14917, CECT220, CECT221, CECT224, CECT749 and CECT4180. Microbial counts and pH were determined at different growth times (from 0 to 78 hours) after incubation in MRS culture media at 30°C and 200rpm (Figure. 1).

Objective

To evaluate the *in vitro* effect of cava lees as growth promoters of lactic acid bacteria (LAB) used as probiotic or starter cultures.

Figure 1. Flow chart of the *in vitro* assay design to evaluate the growth promoting effect of the cava lees.



Results

The effect of lees was different depending on the strain. Lees significantly increased ($p < 0.05$) the growth of *L. sakei*, with differences of more than 1.5 log CFU/mL respect to the control after 30 h of incubation (Figure 2), representing an increase up to 28%. Likewise, a higher acidification of the medium in the presence of lees than in the control was observed. In case of *L. plantarum* ATCC14917, CECT220 and CECT4180, the presence of lees increased significantly its survival, with counts until 2 log CFU/mL higher than the control after 48 h of incubation (Figure 2). Lees did not have any effect on *L. plantarum* ATCC8014, CECT221, CECT224 and CECT749.

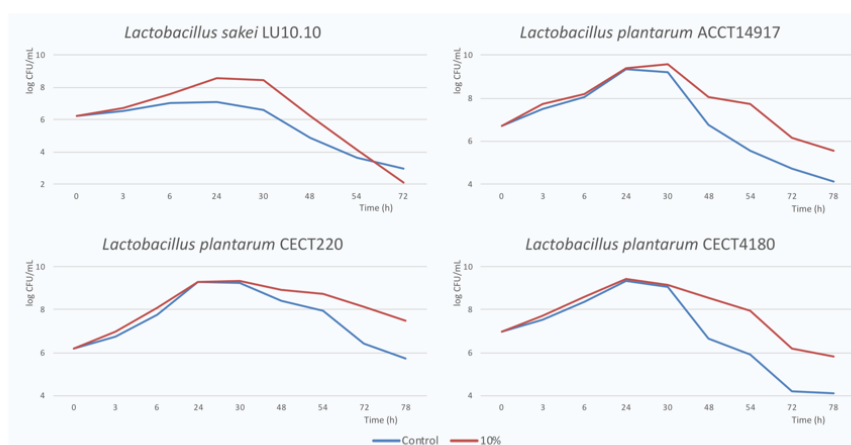


Figure 2. Microbial counts of *L. sakei* LU10.10, *L. plantarum* ATCC14917, CECT220 and CECT4180, grown in control medium and with 10% added lees.

Conclusions

The results confirm that cava lees promote the growth or survival of some lactobacilli, but as this effect is strain-dependent, case-by-case studies are required. The use of cava lees deserves more attention, not only because it could reduce by-products, but also by their potential role as a prebiotic and as a growth promoters of starter cultures that could enhance the safety of fermented foods.

Acknowledgements: This work was supported by Direcció General de Recerca de la Generalitat de Catalunya (2014-1438 SGR) and by the Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias de the Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2016-78324-R). Salvador Hernández Macías is a recipient of a doctoral fellowship from the University of Guadalajara, México.

References: 1. Gallardo-Chacón et al., (2010) Int. J. Food Microbiol. 143:48-53; 2. Shokri et al., (2008) Nat. Product Res. 22:414-21.

¿PUEDEN LAS LÍAS DEL CAVA MEJORAR LA SEGURIDAD DE ALIMENTOS FERMENTADOS?



Hernández-Macias, S., Latorre-Moratalla, M.L., Comas-Basté, O., Riu-Aumatell, M., Veciana-Nogués, M.T., Vidal-Carou, M.C.

Departamento de Nutrición, Ciencias de la Alimentación y Gastronomía, Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, Universidad de Barcelona (UB). Av. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet (España); Instituto de Investigación en Nutrición y Seguridad Alimentaria (INSA - UB), Universidad de Barcelona(UB); Red de Referencia en Tecnología los Alimentos de la Generalidad de Cataluña (XaRTA). mcvidal@ub.edu

Introducción

En los últimos años ha crecido el interés por el uso de diferentes tipos de fibras de origen alimentario en la formulación de alimentos fermentados con el objetivo de acelerar la fermentación y, por tanto, el descenso del pH, ejerciendo un impacto positivo en la seguridad de estos productos (Tabla 1). Las lías del cava son células no viables de *Saccharomyces cerevisiae* que en su pared celular contienen una elevada cantidad de polisacáridos (β -glucanos, quitina y manano-oligosacáridos) que podrían actuar favoreciendo el crecimiento de las bacterias lácticas fermentativas. Actualmente se generan unas 300 toneladas al año y son un sub-producto sin valor añadido. Desde del punto de vista de la sostenibilidad, la reutilización de las lías permitirá revalorizar este sub-producto en línea con la actual tendencia encaminada a favorecer la economía circular.

Objetivo

Evaluar in vitro el efecto de las lías del cava como promotores del crecimiento de bacterias del ácido láctico (LAB) frecuentemente utilizadas como cultivos iniciadores de la fermentación.

Metodología

Se estudió el efecto in vitro de la adición de lías (10% p/v) sobre el crecimiento y el pH del medio de cultivo de 9 cepas fermentativas (*Lactobacillus sakei* LU10.10, *Lactobacillus plantarum* ACCT14917, CECT220, CECT4180, ATCC8014, CECT221, CECT224, CECT749 y *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330. Los recuentos microbianos y el pH se determinaron en diferentes tiempos de crecimiento (de 0 - 72 horas) en medio MRS a 30°C y en agitación (200rpm).



Figura 1. Diseño experimental de la evaluación in vitro del efecto de las lías (10% p/v) sobre el crecimiento y la evolución del pH del medio.

Resultados

El efecto de las lías fue diferente dependiendo del microorganismo seleccionado. Las lías aumentaron significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento de la cepa *L. sakei* LU10.10, con diferencias de más de 1,5 log CFU / ml con respecto al control (Figura 2). Asimismo, se observó una mas rápida y mayor acidificación del medio en presencia de lías (pH 4,30) que en el control (pH 5,20). El aumento del crecimiento fue similar al de otros descritos en la literatura mientras que el descenso del pH fue mayor.

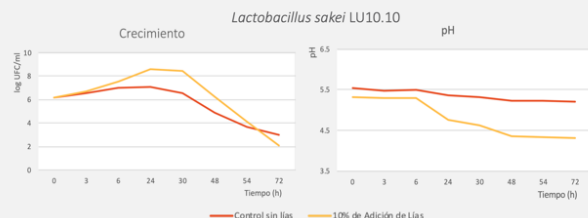


Figura 2. Crecimiento de *L. sakei* LU10.10 y evolución del pH del medio MRS (control) y con 10% de lías añadidas.

En *L. plantarum* ACCT14917, CECT220, CECT4180 la adición de lías causó un aumento en su supervivencia, pero no tuvo efecto significativo sobre el descenso del pH con respecto al control.

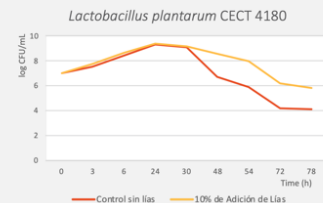


Figura 3. Crecimiento de *L. plantarum* CECT 4180 en medio MRS (control) y con 10% de lías añadidas.

En el resto de las cepas no se observaron diferencias en ningún caso.

Conclusiones

Los resultados confirman el efecto promotor de las lías del cava sobre el crecimiento o la supervivencia de algunas especies de *Lactobacillus*. Este efecto parece ser cepa dependiente. Según nuestro conocimiento, es la primera vez que se documenta que las lías del cava pueden ayudar al crecimiento de microorganismos y afectar al pH del medio. Esto podría tener aplicación en la reformulación de alimentos fermentados con el objeto de mejorar su seguridad. Además, esta estrategia podría ayudar a reducir los contenidos de sal de este tipo de productos.

Estudio de la actividad histaminasa de *Lactobacillus sakei* y del efecto promotor de las lías del cava en su crecimiento.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Hernández-Macias, S.^a, Riús-Olivella, G.^a, Comas-Basté, O.^a, Sánchez-Pérez, S.^a, Muñoz-Esparza, N.C.^a, Veciana-Nogués, M.T.^a, Bover-Cid, S.^a, Latorre-Moratalla, M.L.^a, Vidal-Carou, M.C.^a

^aDepartamento de Nutrición, Ciencias de la Alimentación y Gastronomía, Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, INSA-UB, XaRTA, Universitat de Barcelona, Av. Prats de la Riba, 171, E-08921 Santa Coloma de Gramenet, España ^bIRTA, Programa de Seguridad Alimentaria, Finca Camps i Armet s/n, E-17121, Monells, España.

Introducción. La presencia de histamina en los alimentos es indeseable desde la perspectiva de la seguridad, ya sea como responsable de la intoxicación histamínica o de la intolerancia a la histamina. Los alimentos microbiológicamente deteriorados y los fermentados son susceptibles de contener altos niveles de histamina si sobre ellos se han desarrollado bacterias aminogénicas. La calidad higiénica de las materias primas y la selección de cultivos iniciadores son medidas de control eficaces para reducir o evitar la acumulación de histamina en alimentos fermentados. En los últimos años se está estudiando también la posibilidad de evitar la formación de histamina mediante la utilización de cultivos iniciadores que aportan actividad histaminasa. *Lactobacillus sakei* es una especie que se utiliza comúnmente como cultivo iniciador en la elaboración de derivados cárnicos fermentados y, para la que se ha descrito un efecto protector frente a la aminogénesis¹.

Por otro lado, las lías del cava son células plasmolizadas y no viables de *Saccharomyces cerevisiae* obtenidas como subproducto en la elaboración de cava, y que por su composición rica en distintos tipos de fibras solubles e insolubles pueden favorecer el crecimiento de cultivos iniciadores^{3,4}.

Objetivos

Evaluar *in vitro* la actividad histaminasa de una cepa específica de *L. sakei*. Esta actividad explicaría el efecto protector que se ha descrito para esta cepa frente a la aminogénesis en derivados cárnicos fermentados. Además, también se planea estudiar el efecto promotor de las lías del cava sobre el crecimiento de esta cepa.

Metodología. a) Se evaluó *in vitro* la actividad histaminasa de una cepa específica de *L. sakei* mediante un procedimiento *resting cells* y posterior determinación de la histamina degradada por UHPLC-FL² (Figura 1). b) El efecto de las lías se evaluó comparando el crecimiento de *L. sakei* en presencia de lías (5% p/v) y sin lías (control) durante 72 horas en medio MRS a 30°C y 200rpm (Figura 2).

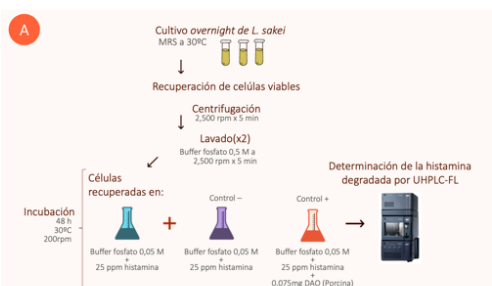


Figura 1. Diseño experimental de la evaluación *in vitro* de la actividad histaminasa de *L. sakei* mediante el método de *resting cells*.



Figura 2. Diseño experimental de la evaluación *in vitro* del efecto de las lías (5% p/v) sobre el crecimiento de *L. sakei*.

Resultados. La cepa de *L. sakei* mostró una capacidad para degradar la histamina *in vitro*, con un porcentaje medio de reducción de un 17% (± 4.1) (figura 3). Por otro lado, en la figura 4 se observa que la adición de un 5% de lías en el medio de cultivo provocó un aumento significativo ($p < 0.05$) en el crecimiento y la supervivencia de esta cepa respecto al medio sin lías (control). Concretamente, el crecimiento de *L. sakei* fue de hasta 1,6 log UFC/ml más alto en el caso de la presencia de lías, lo que representa un incremento del 25% respecto al control. Además, los valores de pH del medio con lías fueron ligeramente más bajo, aunque las diferencias con el control no fueron significativas.

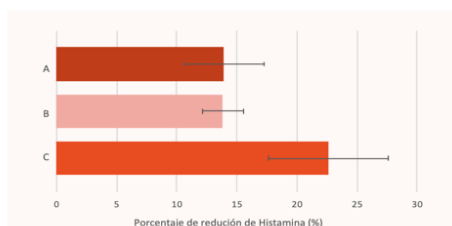


Figura 3. Porcentaje de reducción de histamina por *L. sakei* a las 48 horas. A, B y C se refieren a tres experimentos independientes para la misma cepa.

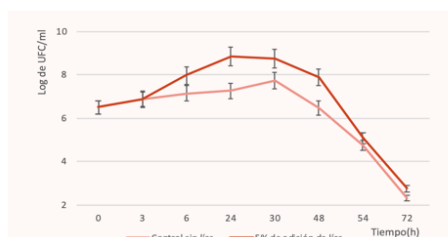


Figura 4. Crecimiento de *L. sakei* en medio MRS sin lías (control) y con 5% de lías añadidas.

Conclusiones. Se ha comprobado la capacidad de degradar la histamina *in vitro* de una cepa fermentativa de *L. sakei*. La utilización de lías del cava en la formulación de embutidos puede favorecer el crecimiento de esta cepa mejorando la seguridad de estos productos por su efecto protector frente a la histaminogénesis.

Agradecimientos: A la Direcció General de Recerca de la Generalitat de Catalunya (2014-1438 SGR) y al Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias del Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2016-78324-R). Salvador Hernández es beneficiario de una beca de la Universidad de Guadalajara, México.
Referencias: ¹Bover-Cid y col., 2000. ²J Food Protec, 63:237-243. ³Latorre-Moratalla y col., 2009. ⁴J Chromat A, 45: 7715-7720. ⁵Alcazar V. y col, (2016) e-Gnosis. 14:1-7. ⁶Shokri y col., (2008) Nat. Product Res. 22:414-21.



