



## Tipificación con secuencias multilocus en *Lactobacillus casei* procedentes de ensilados de cáscara de piña<sup>1</sup>

### Multilocus typing sequences in *Lactobacillus casei* isolates from pineapple peels silages

Rodolfo WingChing-Jones<sup>2</sup>, Mauricio Redondo-Solano<sup>3</sup>, Jessie Usaga<sup>4</sup>, Lidieth Uribe<sup>5</sup>, Natalia Barboza<sup>4,6</sup>

<sup>1</sup> Recepción: 9 de junio, 2020. Aceptación: 20 de octubre, 2020. Este trabajo formó parte del proyecto 801-B5-505: Valorización de subproductos del procesamiento industrial de piña (RPIP): Aplicación de herramientas biotecnológicas que promueven la I+D.

<sup>2</sup> Universidad de Costa Rica (UCR), Escuela de Zootecnia, Centro de Investigación en Nutrición Animal (CINA), San José, 11501-2060, Costa Rica. rodolfo.wingching@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0002-8009-2210>).

<sup>3</sup> Universidad de Costa Rica (UCR), Facultad de Microbiología, Centro de Investigación para enfermedades tropicales (CIET) y Laboratorio de Microbiología de Alimentos, San José, 11501-2060, Costa Rica. mauricio.redondosolano@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0003-4047-6014>).

<sup>4</sup> Universidad de Costa Rica (UCR), Centro Nacional en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), San José, 11501-2060, Costa Rica. jessie.usaga@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0001-9445-2144>).

<sup>5</sup> Universidad de Costa Rica (UCR), Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA). San José, 11501-2060, Costa Rica. lidieth.uribe@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0002-8276-7824>).

<sup>6</sup> Universidad de Costa Rica (UCR), Escuela de Tecnología de Alimentos, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM). San José, 11501-2060, Costa Rica. natalia.barboza@ucr.ac.cr (autora para correspondencia, <https://orcid.org/0000-0003-0881-6867>).

## Resumen

**Introducción.** *Lactobacillus casei* se caracteriza por adaptarse al medio durante el proceso fermentativo. **Objetivo.** Caracterizar con tipificación de secuencias multilocus (MTLS), aislamientos de *L. casei* presentes en ensilados de cáscara de piña con niveles crecientes de urea. **Materiales y métodos.** Durante 2017 y con un diseño irrestricto al azar se prepararon veinte silos (2 kg). Cada cinco bolsas, se adicionaron 0, 0,5, 1 y 1,5 % de urea (p/p en base fresca). Después de treinta días, se tomó una muestra de cada repetición para realizar análisis bromatológicos. Se analizó materia seca (MS), proteína cruda (PC), carbohidratos no fibrosos, fibra en detergente ácido (FDA), fibra en detergente neutro (FDN), digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), hemicelulosa, extracto etéreo (EE), cenizas, nitrógeno amoniacal y pH. Se determinó el recuento de bacterias ácido-lácticas (BAL) para cada uno de los tratamientos. La identificación de las BAL se realizó con la secuencia del ARNr 16S. Los aislamientos de *L. casei* fueron analizados con MTLS. **Resultados.** Los cuatro tratamientos evaluados no presentaron diferencias significativas en la MS (12,10 a 12,86%), FDA (31,44 a 32,18 %), FDN (58,46 a 58,56 %), hemicelulosa (26,36 a 27,02 %), EE (2,45 a 2,96 %), cenizas (4,96 a 5,12%), nitrógeno amoniacal (0,45 a 0,49 %) y pH (3,36 a 3,48). No así, en PC (6,94 a 9,12 %) y DIVMS (82,84 a 84,72 %). La adición de urea se asoció a cambios en las poblaciones de BAL (6,56 a 6,90 UFC). Siete aislamientos de *L. casei* se identificaron y tipificaron con cinco genes distintos. Se encontraron entre dos (polA) y cinco (nrdD, pgm, mutL) alelos; esto permitió identificar un total de seis secuencias tipo (ST) distintas en los aislados de Costa Rica. **Conclusión.** Los aislamientos de *L. casei* se encontraron emparentados a bacterias del tracto gastrointestinal en humanos.

**Palabras clave:** bacterias ácido-lácticas, proceso fermentativo, calidad nutricional, urea, tipificación de secuencias de multilocus.



## Abstract

**Introduction.** *Lactobacillus casei* is characterized by adapting to the environment during the fermentation process. **Objective.** To characterize with multilocus typing sequences (MTLS) isolates of *L. casei* present in pineapple peel silage with increasing levels of urea. **Materials and methods.** During 2017 and using an unrestricted random design, twenty silos (2 kg) were prepared. Every five bags, 0, 0.5, 1 and 1.5 % urea (w/w on fresh basis) were added. After thirty days, a sample was taken from each repetition for bromatological analysis. Dry matter (DM), crude protein (PC), non-fibrous carbohydrates, fiber in acid detergent (ADF), fiber in neutral detergent (NDF), *in vitro* digestibility of dry matter (IVDDM), hemicellulose, ethereal extract (EE), ashes, ammonia nitrogen, and pH. The Lactic Acid Bacteria (LAB) count was determined for each one of the treatments. Identification of LABs was carried out using the 16S rRNA sequence. The isolates of *L. casei* were analyzed using MTLS. **Results.** The four evaluated treatments did not present significant differences in DM (12.10 to 12.86 %), ADF (31.44 to 32.18 %), NDF (58.46 to 58.56 %), hemicellulose (26.36 to 27.02 %), EE (2.45 to 2.96 %), ash (4.96 to 5.12 %), ammonia nitrogen (0.45 to 0.49 %) and pH (3.36 to 3.48). Not so, in CP (6.94 to 9.12 %), and IVDDMS (82.84 to 84.72 %). The addition of urea was associated with changes in the BAL populations (6.56 to 6.90 CFU). Seven isolates of *L. casei* were identified and typed with five different genes. Between two (*polA*) and five (*nrpD*, *pgm*, *mutL*) alleles were found. This allowed the identification of a total of six different type sequences (ST) in the Costa Rican isolates. **Conclusion.** The *L. casei* isolates were found to be related to bacteria from the gastrointestinal tract in humans.

**Keywords:** lactic acid bacteria, fermentation process, nutritional quality, urea, multilocus typing sequences.

## Introducción

La piña fresca es uno de los principales productos agrícolas de exportación de Costa Rica. En el año 2018 se alcanzó un valor de \$1 028 202 millones de dólares americanos (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria, 2019). Sin embargo, no toda la piña producida a nivel nacional cumple con los parámetros de calidad para su exportación. Según datos de la Cámara Nacional de Productores y Exportadores de Piña (CANAPEP), solo 10 % corresponde a fruta de rechazo que se destina al mercado nacional o es procesada (Quesada, 2013), sobre todo para la producción de jugos. Al respecto, Costa Rica exporta 97 000 t de jugo de piña concentrado a la Unión Europea (UE), lo que representa 41,6 % del total de importaciones de esta región (European Fruit Juice Association, 2012). Además, es necesario señalar que el proceso industrial de la piña genera un volumen considerable de subproductos, los cuales se desechan y representan un importante impacto ambiental.

La producción sostenible de alimentos y la valorización de residuos de la actividad agroindustrial se han convertido en problemas importantes que requieren soluciones viables, desde el punto de vista técnico y económico, para lo cual se deben considerar aspectos de productividad y eficiencia de los procesos. Dentro de las iniciativas evaluadas en Costa Rica para el manejo de la piña, se describe el uso de los rastrojos en procesos de bio-refinería (Chen et al., 2020; Hernández-Chaverri & Prado-Barragán, 2018), como fuente de alimento para animales rumiantes (López-Herrera et al., 2014), en la elaboración de pulpas industriales (Jiménez, 2015), resinas de poliéster (Quesada-Solís et al., 2005) y pellets (Montero, 2016).

El aprovechar los desechos generados por las empresas agroindustriales, permite la disminución del impacto ambiental al prevenir la contaminación, con la consecuente mejora de la imagen empresarial. La conservación de forraje por medio de la técnica del ensilaje, estrategia utilizada para mitigar los efectos del ambiente sobre el forraje y el semoviente, permiten mantener las unidades animales en el sistema productivo. El uso de subproductos de la cosecha y el procesamiento de cultivos agrícolas como la yuca, pejíbaye, cítricos, piña (Gutiérrez et al., 2003; Gowda et al., 2015), musáceas (De-la-Cruz-Hernández & Gutiérrez-Fernández, 2006), entre otros, son ejemplos del

potencial que presentan estos residuos al integrarse con otros sistemas productivos. Donde la calidad del material ensilado está asociada a las materias primas que se utilicen para su preparación, ya que los mismos determinarán la microbiota y su composición química, además del pretratamiento que se le dé (Ni et al., 2017).

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son importantes para optimizar el proceso fermentativo en ensilados, al transformar los azúcares del material en ácido láctico (AL), lo que disminuye el pH hasta valores menores de 4, condición que permite conservar los ensilados por largo plazo, siempre y cuando las condiciones no se cambien (Kung et al., 2018). Es importante conocer el efecto que presentan prácticas habituales en la elaboración de ensilajes, como la aplicación de melaza, nitrógeno no proteico (Rodríguez-Chacón et al., 2014), materiales ricos en proteína y aditivos microbiales (Cubero et al., 2010), sobre la población de BAL, para generar estrategias que favorezcan el crecimiento natural de estos microorganismos, con la finalidad de optimizar el proceso del ensilaje. La temperatura, el tipo y la composición del sustrato (carbohidratos, aminoácidos, péptidos, lípidos, vitaminas, minerales y sustancias amortiguadoras de pH) son factores que limitan el crecimiento de estas bacterias (Guerra et al., 2001; Hayek & Ibrahim, 2013; Parra, 2010).

El uso de aditivos de nitrógeno no proteico (NNP) como la urea, incrementa el aporte de nitrógeno al sistema, lo que reduce la tasa de C/N del material. Este aporte de nitrógeno soluble ofrece a las bacterias un sustrato para la obtención de energía, lo que favorece un posible crecimiento de las poblaciones microbianas durante el proceso de conservación, ya que el material ensilado, rico en fuentes de carbono y con bajo aporte de nitrógeno, limita el desarrollo de las BAL.

Conocer las especies de las BAL presentes, permite un mejor entendimiento del proceso bioquímico que se desarrolla durante el ensilado, debido a que se pueden presentar dos reacciones: las lideradas por las bacterias homofermentativas, donde predomina la transformación de los azúcares y AL. En este proceso participan especies como *Lactobacillus casei*, *L. coryniformis* ssp. *coryniformis*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *P. cerevisiae*, *P. pentosaceus*, *Streptococcus faecalis* y *S. faecium*; o bien las producidas por bacterias heterofermentativas, donde se obtiene AL, ácido acético, etanol y otros productos. Entre las BAL heterofermentadoras se encuentran *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. viridescens*, *Leuconostoc cremoris*, *L. dextranicum* y *L. mesenteroides* (Elghandour et al., 2019; McDonald, 1981).

El grupo *L. casei* se caracteriza por estar presente en distintos ambientes y tener aplicaciones en varias áreas de la industria de alimentos, por lo que estudiar su adaptación y los cambios que pueden darse a nivel de genoma es importante para distintas aplicaciones en los que este microorganismo pueda ser utilizado (Cai et al., 2009; Salvetti et al., 2018; Stefanovic & McAuliffe, 2018).

Distintas investigaciones han sugerido que existe una asociación entre el genoma de las BAL y el medio ambiente donde estas se encuentran. Avances en la secuenciación de distintas especies han mostrado que esa diversidad a nivel molecular le ha permitido habitar en ambientes heterogéneos (Feng et al., 2018). De acuerdo con Diancourt et al. (2007), el conocer la diversidad y las relaciones filogenéticas de cada cepa de *L. casei* es importante y relevante para comprender la evolución de sus propiedades ecológicas y/o biológicas, además de optimizar su aplicación para usos industriales o médicos. Uno de los métodos empleados para evaluar la diversidad a nivel de genomas es la aplicación de la tipificación con secuencias multilocus (MTLS, por sus siglas en inglés) (Feng et al., 2018; Sharma et al., 2020). Estas consisten en determinar la secuencia de una porción interna de un número pequeño de genes constitutivos. El objetivo de este trabajo fue caracterizar con MTLS aislamientos de *L. casei* presentes en ensilados de cáscara de piña con niveles crecientes de urea.

## Materiales y métodos

### Preparación de los silos

Residuos de agroindustria de piña (pulpa y cáscara) se recolectaron en el segundo semestre de 2017, de una empresa que se dedica a la producción de jugos en Costa Rica. Estos subproductos se utilizaron para determinar los

contenidos de materia seca (MS), proteína cruda (PC), solubilidad de la proteína (nitrógeno soluble, insoluble pero aprovechable e insoluble), según Licitra et al. (1996), fraccionamiento de la pared celular (fibra en detergente ácido (FDA), fibra en detergente neutro (FDN), lignina y hemicelulosa), extracto etéreo (EE), cenizas y la digestibilidad de la materia seca a 48 h (DIVMS).

Debido a que la cáscara se encontraba en mayor proporción (80 %) que la pulpa, se decidió trabajar solo con el subproducto mayoritario. Para tal fin se utilizaron bolsas transparentes de empaque al vacío, con 2 kg de material contenido, se le adicionó urea comercial en una proporción (p/p en base fresca) de 0, 0,5, 1 y 1,5 %. Para cada tratamiento se realizaron cinco repeticiones, para un total de veinte microsilos. Los mismos se almacenaron durante treinta días a temperatura ambiente  $25\pm 2$  °C y, posteriormente, se analizaron en el laboratorio de Bromatología del Centro de Investigación en Nutrición Animal (CINA) de la Universidad de Costa Rica.

Para cada uno de los tratamientos de ensilaje realizados, se aplicaron análisis bromatológicos [MS, PC, cenizas, EE según los métodos oficiales (Association of Official Analytical Chemist, 1998), carbohidratos no fibrosos (National Research Council, 2001), FDN, FDA, DIVMS y hemicelulosa, mediante la metodología descrita por Van-Soest & Robertson (1985)], y análisis fermentativos [(nitrógeno amoniacal (Tobía et al., 2004) y pH (Gutiérrez et al., 2003)]. Mediante un diseño irrestricto al azar, los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza con el programa estadístico Statistical Analysis System (2011) versión 9.3, cuando se determinaron efectos significativos producto de los efectos principales, se aplicó la prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ) para separar las medias de los tratamientos evaluados.

#### **Aislamiento y caracterización de las bacterias ácido-lácticas (BAL) de los silos**

Se tomaron 10 g de muestra de cada una de las repeticiones y tratamientos y se realizaron diluciones seriadas 1/10 en agua desionizada estéril al 0,1 %. Un volumen de 100 ml de las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$ , se colocaron, por el método de esparcimiento y por duplicado, en placas de Petri con agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (DIFCO, Francia), correspondientes a las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-7}$ . Las placas se incubaron a  $30\pm 2$  °C por 48 h en jarras de anaerobiosis. Se determinó el número de colonias correspondientes a lactobacilos (bacilos Gram positivos, catalasa negativos y no esporulados) presentes en cada repetición. De igual forma que con el análisis nutricional de los ensilados, se realizó un análisis de varianza con INFOSTAT al logaritmo en base 10 del número de unidades formadoras de colonias (UFC). De cada repetición realizada, se aislaron los diferentes morfo tipos identificados en la placa. Los cultivos puros crecieron en caldo MRS (DIFCO) a 30 °C por 24 h y las cepas purificadas se almacenaron en glicerol al 20 % (v/v) a -80 °C hasta su uso posterior.

#### **Identificación molecular**

La identificación molecular se realizó en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica. La extracción del ADN se realizó de acuerdo con el protocolo modificado de Birnboim & Doly (1979). Con la finalidad de seleccionar los aislamientos de *L. casei*, se realizó una identificación preliminar por PCR de la región del ARNr 16S con los imprimadores 27F (Edwards et al., 1989) y 1492R (Weisburg et al., 1991). Los aislamientos de *L. casei* se seleccionaron para un análisis de tipificación posterior por MTLs. Se amplificaron las regiones que corresponden a los genes: ribonucleótido trifosfato reductasa (*nrdD*, por sus siglas en inglés) (ubicación: 129 746...130 540), alfa-fosfoglucomutasa (*pgm*, por sus siglas en inglés) (ubicación: 927 617...928 409), ADN polimerasa I (*polA*, por sus siglas en inglés) (ubicación: 1 702 740...1 703 578), proteína reparadora del ADN (*mutL*, por sus siglas en inglés) (2 225 886...2 226 701), la subunidad alfa polimerasa (*rpoA*, por sus siglas en inglés) (2 458 334...2 459 129) y la metionil-tARN sintetasa (*metRS*, por sus siglas en inglés) (2 586 141...2 586 862). La secuencia de *L. paracasei* ATCC 334 (accesión del *GenBank* no. CP000423) se utilizó

como referencia para dar las coordenadas de la ubicación de los imprimadores antes citados. La reacción de PCR se realizó con la polimerasa iProof High-Fidelity DNA (Bio-Rad, USA). El perfil térmico consistió en las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial de 98 °C por 30 s, luego 35 ciclos de 98 °C por 30 s, el anillamiento a 60 °C por 30 s, y una extensión a 72 °C por 30 s. La extensión final se realizó a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se corrieron en agarosa al 1 % (alta resolución) y se tiñeron con Gel Red (10 000X) (Biotum, USA). Posteriormente, se enviaron a Macrogen® (Seúl, Corea), para el análisis de las secuencias en ambas orientaciones.

#### Análisis de las secuencias de las bacterias ácido-lácticas (BAL)

Todas las secuencias obtenidas se ensamblaron con el programa Staden (Bonfield et al., 1995). Con la finalidad de comparar las secuencias obtenidas en esta investigación (Cuadro 1), se realizó una búsqueda con la información disponible en el *GenBank* (www.ncbi.com), se utilizó la herramienta BlastN (Altschul et al., 1990). Se seleccionaron fragmentos de 734 nucleótidos (nt) del gen *nrdD*, 697 nt del gen *pgm*, 731 nt del gen *polA*, 746 nt del gen *mutL* y 636 nt del gen *metRS*. Se construyó una base de datos considerando 38 aislamientos que agrupan con *L. casei*, los cuales incluyen siete aislamientos obtenidos en esta investigación y 31 secuencias de aislamientos disponibles en el *GenBank* (www.ncbi.com). La herramienta MUSCLE (Tamura et al., 2013) se utilizó con la finalidad de alinear las secuencias obtenidas. Las secuencias idénticas por cada alelo y por cada gen se estimaron con el programa DnaSP package (Librado & Rozas, 2009); las secuencias idénticas se denotaron con el mismo número, el cual define su perfil alélico y su tipo de secuencia (ST).

**Cuadro 1.** Números de accesoión del *GenBank* que corresponden a los aislamientos de *L. casei*, provenientes de ensilajes de cáscara de piña. Laboratorio de Bromatología del Centro de Investigación en Nutrición Animal (CINA) de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 2017.

**Table 1.** *GenBank* accession numbers that correspond to for *L. casei* isolates from pineapple peel silages. Laboratory of Bromatology of the Research Center in Animal Nutrition (CINA), Universidad de Costa Rica. San Jose, Costa Rica. 2017.

Aislamiento	Código de accesoión en el GenBank*				
	<i>nrdD</i>	<i>pgm</i>	<i>polA</i>	<i>mutL</i>	<i>metRS</i>
<i>L. casei</i> _6709	MH752106	MH752113	MH752120	MH752099	MH752092
<i>L. casei</i> _6710	MH752102	MH752109	MH752116	MH752095	MH752088
<i>L. casei</i> _6711	MH752103	MH752110	MH752117	MH752096	MH752089
<i>L. casei</i> _6712	MH752104	MH752111	MH752118	MH752097	MH752090
<i>L. casei</i> _6713	MH752107	MH752114	MH752121	MH752100	MH752093
<i>L. casei</i> _6714	MH752105	MH752112	MH752119	MH752098	MH752091
<i>L. casei</i> _6715	MH752108	MH752115	MH752122	MH752101	MH752094

\*ribonucleótido trifosfato reductasa (*nrdD*), alfa-fosfoglucomutasa (*pgm*), ADN polimerasa I (*polA*), proteína reparadora del ADN (*mutL*), subunidad alfa polimerasa (*rpoA*) y la metionil-tARN sintetasa (*metRS*) / \*anaerobicribonucleoside-triphosphatereductase (*nrdD*), alpha-phosphoglucomutase (*pgm*), DNA polymerase I (*polA*), DNA mis match repair protein (*mutL*), polymerase alpha subunit (*rpoA*), and methionyl-tRNA synthetase (*metRS*).

El árbol filogenético se construyó con base en el total de los aislamientos de *L. casei* obtenidos en esta investigación y 45 secuencias de aislamientos disponibles en el *GenBank*, por medio de un análisis Bayesiano (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Todos los genes se concatenaron siguiendo el orden antes mencionado. La filogenia se elaboró utilizando un modelo mixto, considerando diez millones de generaciones, ocho cadenas de

Markov y muestreado cada mil generaciones. La secuencia de *L. rhamnosus* (ATCC 53103) se utilizó como grupo externo de comparación.

## Resultados

### Características nutricionales de los subproductos de piña

Los residuos analizados, producto de la extracción de jugo de la piña, generaron una relación de 4:1 entre la cáscara y la pulpa obtenida como subproductos. La comparación entre ambos subproductos mostró que los valores obtenidos, para las diferentes variables estudiadas, fueron mayores en la cáscara que en la pulpa, con excepción de los datos que correspondieron a MS, carbohidratos no fibrosos y DIVMS (Cuadro 2). Es importante señalar, que el porcentaje de PC fue mayor en 2 % en la cáscara. Así como los valores de FDN y FDA, que duplicaron los resultados en la pulpa.

**Cuadro 2.** Caracterización nutricional de los subproductos de pulpa y cáscara de piña. Laboratorio de Bromatología del Centro de Investigación en Nutrición Animal (CINA) de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 2017.

**Table 2.** Nutritional characterization of pineapple pulp and peel by-products. Laboratory of Bromatology of the Research Center in Animal Nutrition (CINA), Universidad de Costa Rica. San Jose, Costa Rica. 2017.

Variable nutricional	Porcentaje (%)*	
	Pulpa	Cáscara
Materia seca total	12,00±0,50	9,00±0,57
Proteína cruda	4,73±0,15	6,27±0,40
Nitrógeno soluble	0,44±0,02	0,74±0,01
Nitrógeno insoluble pero aprovechable	0,49±0,05	0,98±0,01
Nitrógeno insoluble	0,14±0,04	0,21±0,01
Carbohidratos no fibrosos	58,32±0,26	23,23±0,66
Fibra en detergente neutro	31,37±0,58	63,63±1,37
Fibra en detergente ácida	19,67±0,06	31,80±0,43
Lignina	0,13±0,06	1,00
Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca	98,73±0,21	79,97±3,71
Hemicelulosa	11,70±0,53	31,83±0,94
Extracto etéreo	1,88±0,21	2,23±0,55
Cenizas	3,70±0,53	4,63±0,21

\*promedio ± desviación estándar, n=5 / \*mean ± standar deviation, n=5.

### Caracterización nutricional y fermentativa del ensilaje de subproductos de piña

Al finalizar el periodo de ensilado, los cuatro tratamientos evaluados no presentaron diferencia en el contenido de MS, FDA, FDN, hemicelulosa, EE y cenizas ( $p>0,05$ ). No así en las variables de PC y DIVMS, donde se observaron cambios significativos por la adición de urea a los ensilados ( $p<0,05$ ) (Cuadro 3). Se observó una asociación positiva en el contenido de PC y negativa en los valores de FDA y DIVMS según las adiciones crecientes de urea. En el caso del proceso fermentativo, no se determinaron diferencias significativas en el porcentaje de nitrógeno amoniacal y el valor de pH de los cuatro tratamientos evaluados ( $p>0,05$ ), donde los valores fluctuaron entre 0,45 a 0,49 % N/N-total y 3,36 a 3,48, respectivamente.

**Cuadro 3.** Caracterización nutricional, fermentativa y microbiológica del ensilaje de cáscara de piña con niveles crecientes de urea. Laboratorio de Bromatología del Centro de Investigación en Nutrición Animal (CINA) de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 2017.

**Table 3.** Nutritional, fermentative, and microbiological characterization of pineapple peels silage with increasing levels of urea. Laboratory of Bromatology of the Research Center in Animal Nutrition (CINA), Universidad de Costa Rica. San Jose, Costa Rica. 2017.

Variables nutricionales (%)	Nivel de urea* (%)			
	0	0,5	1	1,5
Materia seca total	12,86±0,65	12,10±0,50	12,66±0,55	12,72±0,45
Proteína cruda	6,94 <sup>c</sup> ±1,45	7,57 <sup>bc</sup> ±0,75	8,56 <sup>ab</sup> ±0,57	9,12 <sup>a</sup> ±0,63
Carbohidratos no fibrosos	27,06±2,74	25,48±1,84	24,91±2,97	24,61±2,64
Fibra detergente ácida	32,18±0,83	32,18±0,76	31,96±1,75	31,44±0,86
Fibra detergente neutro	58,54±1,90	58,56±1,52	58,48±2,89	58,46±2,16
Digestibilidad <i>in vitro</i> (MS)	84,72 <sup>a</sup> ±1,18	82,84 <sup>b</sup> ±1,72	83,04 <sup>b</sup> ±0,90	82,94 <sup>b</sup> ±0,79
Hemicelulosa	26,36±1,11	26,38±1,10	26,52±1,33	27,02±1,39
Extracto etéreo	2,45±0,44	3,27±0,76	2,96±0,52	2,86±0,43
Cenizas	5,02±0,13	5,12±0,09	5,09±0,22	4,96±0,18
Proceso fermentativo				
Nitrógeno amoniacal (%)	0,49±0,09	0,49±0,06	0,45±0,02	0,45±0,04
pH	3,36±0,05	3,41±0,06	3,48±0,12	3,48±0,07
Población microbiana				
Log UFC				
bacterias lácticas/g	6,56 <sup>a</sup> ±0,28	6,88 <sup>b</sup> ±0,08	6,78 <sup>ab</sup> ±0,23	6,90 <sup>b</sup> ±0,14

\*promedio ± desviación estándar, n=5. / \*mean ± standard deviation, n=5.

Letras diferentes en una misma fila, indican diferencias significativas según la prueba de Duncan (p<0,05) /Different letters in the same row indicate significant differences according to Duncan's test (p <0.05).

Los recuentos de BAL mostraron diferencias significativas entre los tratamientos donde se aplicó o no urea (promedios de 6,85 contra 6,56 log UFC, respectivamente) y mostraron una tendencia creciente, donde se alcanzaron diferencias entre los promedios de 0,29 log UFC entre tratamientos con adición de nitrógeno soluble y sin adición de urea (p<0,05) (Cuadro 3).

#### Identificación molecular de aislamientos de las bacterias ácido-lácticas (BAL)

Un total de catorce aislamientos de las bacterias ácido-lácticas (BAL) se obtuvieron de los silos de piña según nivel de urea adicionado. Todos se caracterizaron utilizando la región del ARNr 16 S (datos no mostrados). Un total de doce aislamientos correspondieron al género *Lactobacillus* sp., mientras que se obtuvo un aislado de *Weissella* sp. y otro de *Fructobacillus*. Las secuencias obtenidas permitieron identificar un total de cinco especies distintas: *L. fermentum* (dos cepas), *L. casei* (siete cepas), *L. spicheri* (una cepa), *F. tropaeoli* (una cepa) y *W. ghanensis* (una cepa). Dada la importancia y la presencia de *L. casei* entre los aislamientos de este estudio, se utilizaron cinco genes distintos para caracterizarlos. La comparación entre las secuencias de las BAL obtenidas en esta investigación y las secuencias disponibles en el *GenBank* (www.ncbi.com) mostraron que el número de alelos para cada locus varió entre 10 (*polA*) y 24 (*mutL*), lo anterior permitió identificar un total de 38 secuencias tipo (ST) distintas, estas variaron según su origen de aislamiento (Cuadro 4).

El análisis bayesiano se realizó con base en los cinco genes concatenados y un total de 3544 nt. En el árbol se observó la conformación de distintas agrupaciones entre las cepas *L. casei* consideradas en este trabajo. Los aislamientos obtenidos de ensilajes de cáscara de piña se separaron en dos subgrupos, que se encuentran en ramas

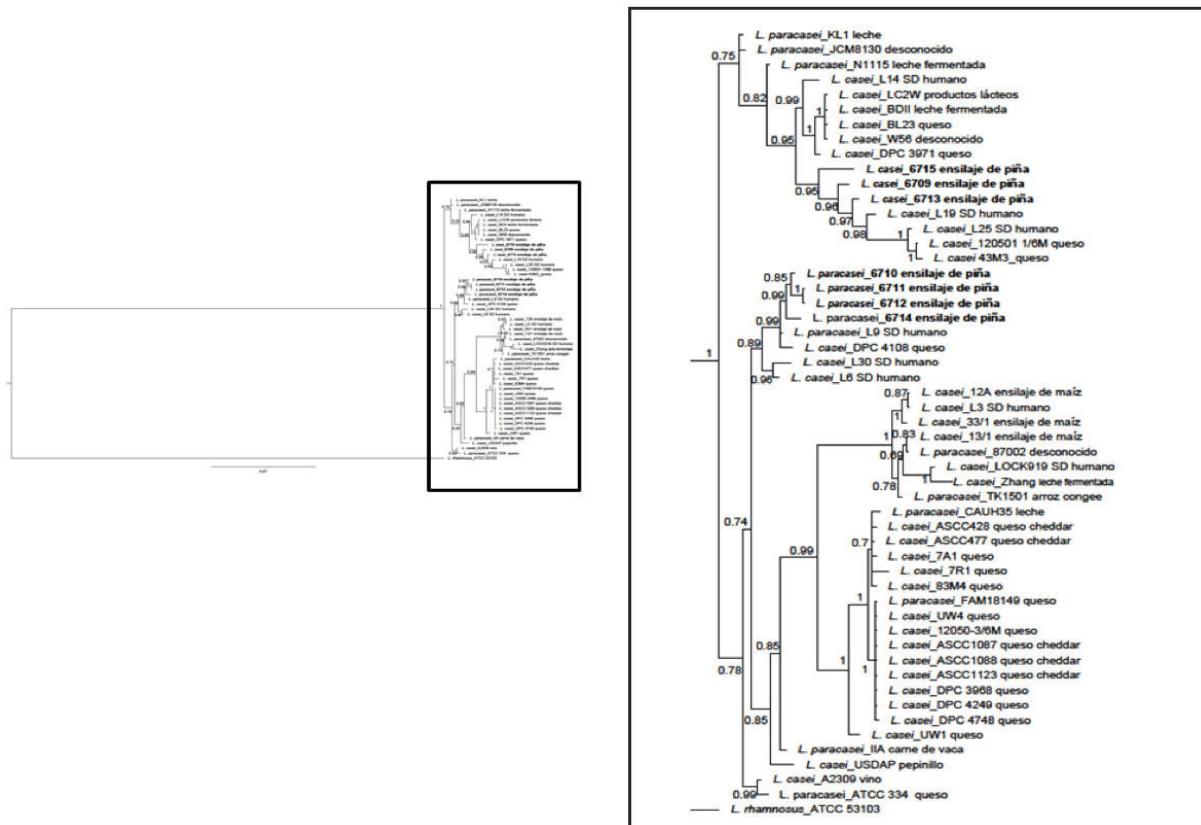
**Cuadro 4.** Perfiles alélicos de *Lactobacillus casei* aisladas de ensilados de cáscara de piña. Laboratorio del Centro Nacional en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 2017.

**Table 4.** Allelic profile of *Lactobacillus casei* isolated from pineapple peels silage. National Research Center in Food Technology of the Universidad of Costa Rica. San Jose, Costa Rica. 2017.

Aislamiento	Origen	Alelo*					ST
		nrdD	pgm	polA	mutL	metRS	
<i>L. casei</i> 6709	Ensilajes de piña	1	1	1	1	1	ST1
<i>L. casei</i> 6713	Ensilajes de piña	2	2	2	2	1	ST2
<i>L. casei</i> 6715	Ensilajes de piña	3	3	3	3	2	ST3
<i>L. casei</i> 6710	Ensilajes de piña	4	1	2	4	3	ST4
<i>L. casei</i> 6711	Ensilajes de piña	5	4	2	4	3	ST5
<i>L. casei</i> 6712	Ensilajes de piña	5	4	2	4	3	ST5
<i>L. casei</i> 6714	Ensilajes de piña	5	5	2	5	3	ST6
<i>L. casei</i> 12A	Ensilajes de maíz	6	6	4	6	4	ST7
<i>L. casei</i> 13/1	Ensilajes de maíz	6	6	4	7	4	ST8
<i>L. casei</i> 33/1	Ensilajes de maíz	6	7	4	6	4	ST9
<i>L. casei</i> LOCK919	SD Humano**	6	8	5	7	5	ST10
<i>L. paracasei</i> L9	SD Humano	4	7	2	4	3	ST11
<i>L. casei</i> L14	SD Humano	1	9	6	8	6	ST12
<i>L. casei</i> L19	SD Humano	4	7	2	9	7	ST13
<i>L. casei</i> L25	SD Humano	4	7	2	10	8	ST14
<i>L. casei</i> L30	SD Humano	1	7	7	11	3	ST15
<i>L. casei</i> L6	SD Humano	6	7	7	4	3	ST16
<i>L. paracasei</i> TK1501	Arroz congee	7	7	4	7	4	ST17
<i>L. paracasei</i> IIA	Carne de vaca	4	7	4	4	3	ST18
<i>L. casei</i> A2-309	Vino	8	3	8	12	3	ST19
<i>L. casei</i> USDA-P	Pepinillo	9	9	9	7	3	ST20
<i>L. casei</i> LC2W	Productos lácteos	10	10	6	13	6	ST21
<i>L. paracasei</i> N1115	Leche fermentada	11	3	6	14	9	ST22
<i>L. paracasei</i> CAUH35	Leche fermentada	12	11	9	15	10	ST23
<i>L. casei</i> Zhang	Leche fermentada	6	9	5	16	4	ST24
<i>L. paracasei</i> KL1	Leche	11	3	8	17	9	ST25
<i>L. paracasei</i> FAM18149	Queso	14	13	10	15	10	ST26
<i>L. paracasei</i> ATCC 334	Queso	15	14	8	19	3	ST27
<i>L. casei</i> UW-4	Queso	14	13	10	15	10	ST26
<i>L. casei</i> 120501-1/6M	Queso	4	7	2	20	8	ST28
<i>L. casei</i> ASCC 428	Queso cheddar	13	13	9	21	10	ST29
<i>L. casei</i> ASCC 477	Queso cheddar	13	13	9	15	10	ST30
<i>L. casei</i> DPC 3971	Queso	10	10	6	14	6	ST31
<i>L. casei</i> DPC 4108	Queso	4	7	2	22	3	ST32
<i>L. casei</i> DPC 4748	Queso	14	15	10	15	10	ST33
<i>L. casei</i> 43M3	Queso	16	7	2	20	11	ST34
<i>L. casei</i> 7A1	Queso	13	13	9	23	10	ST35
<i>L. casei</i> 7R1	Queso	13	13	9	13	12	ST36
<i>L. casei</i> 83M4	Queso	13	13	9	24	10	ST37
<i>L. paracasei</i> JCM 8130	Desconocido	11	3	8	14	13	ST38

\*ribonucleótido trifosfato reductasa (*nrdD*), alfa-fosfoglucomutasa (*pgm*), ADN polimerasa I (*polA*), proteína reparadora del ADN (*mutL*), subunidad alfa polimerasa (*rpoA*), y la metionil-tARN sintetasa (*metRS*). \*\*Sistema digestivo humano / \*anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase (*nrdD*), alpha-phosphoglucomutase(*pgm*), DNA polymerase I (*polA*), DNA mismatch repair protein (*mutL*), polymerase alpha subunit(*rpoA*), and methionyl-tRNA synthetase (*metRS*). \*\*Human digestive tract system.

distintas del árbol filogenético, ambos fueron cercanos a BAL procedentes del sistema digestivo del ser humano (SDsH). También se encontró que los aislamientos provenientes de queso fueron muy cercanos entre ellos. Estos resultados permiten mostrar la cercanía entre los distintos aislamientos y las secuencias tipo anteriormente denotadas (Figura 1).



**Figura 1.** Árbol filogenético de las secuencias de *L. casei* basada en análisis bayesiano (en negrita las secuencias obtenidas de este trabajo). Laboratorio del Centro Nacional en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 2017.

**Figure 1.** Phylogenetic tree of *L. casei* sequences using Bayesian analysis (in bold the sequences obtained from this work). National Research Center in Food Technology of the Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 2017.

## Discusión

Los dos subproductos analizados, tanto pulpa como cáscara, presentaron limitantes para la nutrición de rumiantes por su bajo contenido de materia seca y proteína cruda (López-Herrera et al., 2014). Por tal motivo, no se podrían utilizar como única fuente forrajera, debido a que provocaría disminución de la eficiencia ruminal, por no alcanzar el valor mínimo requerido de 7 % de PC en un material (Rojas-Bourrillón et al., 1998). El valor energético de estos materiales es importante retomarlo, debido a que presentaron una digestibilidad mayor al 80 %, con valores de FDN y FDA que permiten un consumo de materia seca equivalente al 1,88 y 3,82 % de PV

del animal, respectivamente (Cuadro 2). Trabajos realizados en diferentes subproductos del cultivo de la piña, indicaron valores de energía neta de lactancia entre 1,31 y 1,44 (López-Herrera et al., 2014). Estas condiciones se potencian en presencia de materiales altos en proteína con características solubles (Gutiérrez et al., 2003). Este tipo de material requiere la complementación con materiales con un mayor contenido de proteína y de una fibra larga, si se considera dentro de la ración de los animales, para así lograr mantener un rumen saludable.

Los *Lactobacillus* fueron el género que se identificó en mayor proporción entre los aislamientos de las BAL. Estos resultados son consistentes con otros reportes de bacterias aisladas de frutas y vegetales (Nascimento et al., 2019). La importancia de sus miembros radica en la cantidad de especies descritas y diversidad genética (Dicagno et al., 2010). Lo anterior, ha permitido en los últimos años el desarrollo de nuevas investigaciones que proponen reagrupaciones considerando el análisis genómico de distintas especies (Salveti et al., 2018; Zheng et al., 2020). Las BAL se han aislado de distintos sustratos tales como los vegetales (Arshad et al., 2018; Endo et al., 2019), productos frescos y fermentados (Saéz et al., 2018), desechos orgánicos (Arshad et al., 2018) e incluso la piña (Mardalena & Erina, 2016). Este interés por aislarlas de diferentes matrices y caracterizarlas, radica en su importancia dentro de la industria de alimentos, farmacéutica, entre otras (Evivie et al., 2017).

En esta investigación también se encontró un aislamiento de *W. ghanensis* y otro de *F. tropaeoli*. Es importante mencionar que el género *Weissella* (antes *Leuconostoc* sp.), contiene hasta veintidós especies distintas, que se han aislado de varias matrices tales como los alimentos fermentados (Li et al., 2020). Sin embargo, algunos autores también han asociado algunas especies del grupo con el deterioro de alimentos (Fusco et al., 2015; Sáez et al., 2018). *F. tropaeoli*, por su parte, incluye cinco especies, cuatro miembros (*F. fructosus*, *F. durionis*, *F. ficulneus*, y *F. pseudoficulneus*) pertenecieron al género *Leuconostoc* sp., sin embargo, luego de revisar su morfología, características bioquímicas y filogenia fueron reclasificados como *Fructobacillus* (Endo et al., 2015). *F. tropaeoli* fue reportado como una nueva especie aislada de una flor (Endo et al., 2011).

Las bacterias de *L. casei* aisladas en esta investigación mostraron un origen común (ensilaje de cáscara de piña), pero se agruparon en dos ramas separadas, sobre todo con BAL aisladas del tracto gastrointestinal (TGI) en ambos casos. En humanos, los lactobacillus se han encontrado a través del TGI, desde la cavidad oral hasta la materia fecal, se han aislado también en la saliva y en la placa dental (Verma et al., 2018). La cercanía entre ambos grupos de aislamientos podría explicarse por el contacto que tienen los residuos de piña con trabajadores de campo y durante el procesamiento de la fruta. Por ejemplo, aislamientos de *L. casei* procedentes de queso presentaron un origen común, lo que se relacionó a fenómenos de migración hacia Estados Unidos y Australia por personas procedentes de Europa (Cai et al., 2007). Además, se encontraron diferencias sustanciales en el genoma de *L. casei* en cepas que fueron aisladas del mismo nicho ecológico (Stefanovic & McAuliffe, 2018). Distintos autores han propuesto, que en el grupo de los *Lactobacillus* algunos de sus miembros son especialistas de nicho, esto ha conducido a que tengan genomas más pequeños que otras especies miembro y que tengan una distribución ecológica muy estrecha entre las especies (O'Donnell et al., 2013). En el caso de especies como *L. plantarum* y *L. casei*, Papizadeh et al. (2017) propusieron que son especies generalistas de nicho, lo cual conlleva a que tengan genomas mucho más grandes, además de distintas propiedades evolutivas.

Es importante tomar estos resultados como preliminares. Una comparación entre catorce especies de *Lactobacillus* no encontró genes que fueran específicos del nicho (Kant et al., 2011). Se sugiere una posible causa, que la matriz de donde se aíslan las BAL no siempre es su hábitat real, sino más bien transitorio. Esto podría estar sucediendo con los siete aislamientos de *L. casei* procedentes del ensilado de cáscaras de piña obtenidos en la presente investigación, al ser este un residuo de agroindustria y estar trabajando con una especie que se puede encontrar en distintos ambientes. Una comparación con aislados de *L. paracasei* procedentes de productos lácteos no mostraron genes relacionados con este nicho (Stefanovic & McAuliffe, 2018).

## Conclusiones

Los aislamientos de *L. casei* procedentes de cáscaras de ensilajes de piña poseían distintos alelos cuando se compararon entre ellos y otras secuencias disponibles en bases de datos. El número varió entre 10 (*polA*) y 24 (*mutL*) alelos, esto permitió identificar un total de 38 secuencias tipo (ST).

Las relaciones filogenéticas mostraron que las bacterias ácido-lácticas (BAL) de silos de piña se encontraron emparentadas a bacterias del TGI en humanos.

La adición de urea permitió incrementar la población BAL del ensilaje al mejorar la tasa C/N del material, e incrementar el contenido de nitrógeno soluble que las bacterias utilizaron como sustrato para la obtención de energía.

Es importante, además de la técnica evaluada en este trabajo, conocer y caracterizar otras aplicaciones de las BAL en el proceso de ensilaje, tales como protección contra bacterias patógenas, producción de AL y otros subproductos como compuestos volátiles que mejoren el aroma y palatabilidad del alimento, además de ofrecer beneficios nutricionales a los animales que los consuman.

## Agradecimiento

Los autores agradecen el apoyo al Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT), a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica y a las estudiantes Jannette Weng Fang Wu y María Fernanda Miranda.

## Referencias

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myersand, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Association of Official Analytical Chemist. (1998). *Official methods of analysis of AOAC International* (16<sup>th</sup> Ed.). Association of Official Analytical Chemist.
- Arshad, F. A., Mehmood, R., Hussain, S., Annus-Khan, M., & Khan, M. S. (2018). Lactobacilli as probiotics and their isolation from different sources. *British Journal of Research*, 5(3), Article 43. <https://doi.org/10.21767/2394-3718.100043>
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513-1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
- Bonfield, J. K., Smith, K. F., & Staden, R. (1995). A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Research*, 23(24), 4992-4999. <https://doi.org/10.1093/nar/23.24.4992>
- Cai, H., Rodríguez, B. T., Zhang, W., Broadbent, J. R. & Steele, J. L. (2007). Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology*, 153(8), 2655–2665. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/006452-0>
- Cai, H., Thompson, R., Budinich, M. F., Broadbent, J. R., & Steele, J. L. (2009). Genome sequence and comparative genome analysis of *Lactobacillus casei*: insights into their niche-associated evolution. *Genome Biology and Evolution*, 1, 239-257. <https://doi.org/10.1093/gbe/evp019>
- Chen, A., Guan, Y. J., Bustamante, M., Uribe, L., Uribe-Lorío, L., Roos, M. M., & Liu, Y. (2020). Production of renewable fuel and value-added bioproducts using pineapple leaves in Costa Rica. *Biomass and Bioenergy*, 141, 105675.

- Cubero, J. F., Rojas, A., & WingChing, R. (2010). Uso del inóculo microbial elaborado en finca en ensilaje de maíz (*Zea mays*). Valor nutricional y fermentativo. *Agronomía Costarricense*, 34(2), 237-250. <https://doi.org/10.15517/RAC.V34I2.3634>
- De la Cruz-Hernández, J. C., & Gutiérrez-Fernández, G. A. (2006). Alimentación de bovinos con ensilados de mezcla de banana de rechazo y raquis en diferentes proporciones. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 10(3), 29-39.
- Diancourt, L., Passet, V., Chervaux, C., Garault, P., Smokvina, T., & Brisse, S. (2007). Multilocus sequence typing of *Lactobacillus casei* reveals a clonal population structure with low levels of homologous recombination. *Applied Environmental Microbiology*, 73(20), 6601–6611. <https://doi.org/10.1128/AEM.01095-07>
- Dicagno, R., Cardinalo, G., Minervini, G., Antonielli, L., Rizzello, C., Ricciuti, P., & Gobbetti, M. (2010). Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. *Food Microbiology*, 27(3), 381-389. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.012>
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., & Bötter, E. C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17(19), 7843–7853. <https://doi.org/10.1093/nar/17.19.7843>.
- Elghandour, M. M., Adegbeye, M. J., Vallejo, L. H., Elahi, M. Y., Barbabosa-Pliego, A., Recillas-Morales, S., & Salem, A. Z. M. (2019). Role of dose dependent *Lactobacillus farciminis* on ruminal microflora biogases and fermentation activities of three silage based rations. *Journal of Applied Microbiology*, 127, 1627-1634. <https://doi.org/10.1111/jam.14422>
- Endo, A., Irisawa, T., Futagawa-Endo, Y., Sonomoto, K., Itoh, K., Takano, K., Okada, S., & Dicks, L.M. (2011). *Fructobacillus tropeoli* sp. nov., a fructophilic lactic acid bacterium isolated from a flower. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(4), 898–902. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.023838-0>
- Endo, A., Tanizawa, Y., & Arita, M. (2019). Isolation and identification of lactic acid bacteria from environmental samples. In J. M. Walker (Ed.), *Lactic acid bacteria. Methods in molecular biology* (vol. 1887, pp. 3-13). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8907-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8907-2_1)
- Endo, A., Tanizawa, Y., Tanaka, N., Maeno, S., Kumar, H., Shiwa, Y., Okada, S., Yoshikawa, H., Dicks, L., Nakagawa, J., & Arita, M. (2015). Comparative genomics of *Fructobacillus* spp. and *Leuconostoc* spp. reveals niche-specific evolution of *Fructobacillus* spp. *BMC Genomics*, 16, Article 1117. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2339-x>
- European Fruit Juice Association (2012). *Liquid fruit market report*. <https://aijn.eu/en/publications/market-reports-1>
- Evivie, S. E., Huo, G. C., Igene, J. O., & Bian, X. (2017). Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. *Food & Nutrition Research*, 61, Article 1318034. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1318034>
- Feng, J., Jiang, Y., Li, M., Zhao, S., Zhang, Y., Li, X., Wang, H., Lin, G., Wang, H., Li, T., & Man, C. (2018). Diversity and evolution of *Lactobacillus casei* group isolated from fermented dairy products in Tibet. *Archives of Microbiology*, 200(7), 1111-1121. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1528-9>
- Fusco, V., Quero, G. M., Cho, G. S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., Bockelmann, W., & Franz, C. M. (2015). The genus *Weissella*: Taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, 6, Article 155. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00155>
- Gowda, N. K. S., Vallesha, N. C., Awachat, V. B., Anandan, S., Pal, D. T., & Prasad, C.S. (2015). Study on evaluation of silage from pineapple (*Ananas comosus*) fruit residue as livestock feed. *Tropical Animal Health and Production*, 47, 557–561. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0762-2>

- Guerra, P., Rúa, M. L., & Pastrana, L. (2001). Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. *International Journal of Food Microbiology*, 70(3), 267-281. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00551-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00551-7)
- Gutiérrez, F., Rojas-Bourrillon, A., Dormond, H., Poore, M., & WingChing-Jones, R. (2003). Características nutricionales y fermentativas de mezclas ensiladas de desechos de piña y avícolas. *Agronomía Costarricense*, 27(1), 79-89.
- Hayek, S., & Ibrahim, S. (2013). Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 4(11A), 73-87. <https://doi.org/10.4236/fns.2013.411A010>
- Hernández-Chaverri, R., & Prado-Barragán, L. (2018). Impacto y oportunidades de biorrefinería de los desechos agrícolas del cultivo de piña (*Ananas comosus*) en Costa Rica. *Cuadernos de Investigación UNED*, 10(2), 455-468. <https://doi.org/10.22458/urj.v10i2.2059>
- Jiménez, M. (2015). *Desarrollo de una pulpa para uso industrial a partir de los residuos generados durante el procesamiento de jugo de piña en la empresa Florida Products S.A.* [Tesis de licenciatura, Universidad de Costa Rica]. Repositorio de la Universidad de Costa Rica. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/27031/1/38136.pdf>
- Kant, R., J. Blom, A. Palva, R. J. Siezen, & de Vos, W. M. (2011). Comparative genomics of *Lactobacillus*. *Microbial Biotechnology*, 4(3), 323-332. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00215.x>
- Kung, L. Jr., Shaver, R. D., Grant, R. J., & Schmidt, R. J. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial and organoleptic components of silage. *International Journal of Dairy Science*, 101(5), 4020-4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>
- Li, Y. Q., Tian, W. L., & Gu, C. T. (2020). *Weissella sagaensis* sp. Nov., isolated from traditional Chinese yogurt. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2485-2492. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004062>
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Licitra, G., Hernández, T. M., & Van Soest, P. J. (1996). Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science Technology*, 57(4), 347-358. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)00837-3](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)00837-3)
- López-Herrera, M., WingChing-Jones, R., & Rojas-Bourrillon, A. (2014). Metaanálisis de los subproductos de piña (*Ananas comosus*) para la alimentación animal. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 383-392. <https://doi.org/10.15517/AM.V25I2.15453>
- Mardalena, S., & Erina, S. (2016). Molecular characteristics and identification of lactic acid bacteria of pineapple waste as probiotics candidates for ruminants. *Pakistan Journal of Nutrition*, 15(6), 519-523. <https://doi.org/10.3923/pjn.2016.519.523>
- McDonald, P. (1981). *The biochemistry of silage*. John Wiley & Sons Ltd.
- Montero, G. (2016). *Desarrollo de pellets mediante densificación con mezclas de residuos agrícolas de Costa Rica* [Tesis de Licenciatura, Universidad de Costa Rica]. Repositorio de la Universidad de Costa Rica. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/handle/123456789/10284>
- Nascimento, L. C. S., Casarotti, S. N., Todorov, S. D., & Penna, A. L. B. (2019). Probiotic potential and safety of enterococci strains. *Annals of Microbiology*, 69, 241-252. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1412-5>
- National Research Council (2001). *Nutrient requirements of dairy cattle* (7<sup>th</sup> rev. Ed.). National academy press.

- Ni, K., Wang, F., Zhu, B., Yang, J., Zhou, G., Pan, Y., Tao, Y., & Zhong, J. (2017). Effects of lactic acid bacteria and molasses additives on the microbial community and fermentation quality of soybean silage. *Bioresources Technology*, 238, 706–715. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.055>
- O'Donnell, M. M., O'Toole, P. W., & Ross, R. P. (2013). Catabolic flexibility of mammalian-associated lactobacilli. *Microbiology Cell Factories*, 12, Article 48. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-48>
- Papizadeh, M., Rohani, M., Nahrevanian, H., Javadi, A., & Pourshafie, M. R. (2017). Probiotic characters of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* are a result of the ongoing gene acquisition and genome minimization evolutionary trends. *Microbial Pathogens*, 111, 118–131. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.021>
- Parra, R. (2010). Review: Bacterias ácido lácticas: papel funcional de los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8(1), 93-105. <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>
- Quesada, C. (2013). *Determinación de las condiciones óptimas del tratamiento enzimático acoplado a un proceso de microfiltración tangencial para la obtención de jugo clarificado de piña en una empresa procesadora de frutas y vegetales* [Tesis de Licenciatura, Universidad de Costa Rica]. Repositorio de la Universidad de Costa Rica. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/handle/123456789/2597>
- Quesada-Solís, K., Alvarado-Aguilar, P., Sibaja-Ballester, R., & Vega-Baudrit, J. (2005). Utilización de las fibras del rastrojo de piña (*Ananas comusus*, variedad champaka) como material de refuerzo en resinas de poliéster. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 6(2), 157-179.
- Rodríguez-Chacón, S., López-Herrera, M., WingChing-Jones, R., & Rojas-Bourrillón, A. (2014). Adición de melaza deshidratada y urea en ensilados de rastrojos de piña. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 313-321.
- Rojas-Bourrillón, A., Ugalde, H., & Aguirre, D. (1998). Efecto de la adición de fruto de pejíbaye (*Bactris gasipaes*) sobre las características nutricionales del ensilaje de pasto gigante (*Pennisetum purpureum*). *Agronomía Costarricense*, 22(2), 145-151.
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572-1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Sáez, G. D., Flomenbaum, L., & Zárate, G. (2018). Lactic acid bacteria from argentinean fermented foods: Isolation and characterization for their potential use as starters for fermentation of vegetables. *Food Technology and Biotechnology*, 56(3), 398–410. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5631>
- Salvetti, E., Harris, H.M.B., Felis, G., & O'Toole, P.W. (2018). Comparative genomics of the genus *Lactobacillus* reveals robust phylogroups that provide the bases for reclassification. *Applied Environmental Microbiology*, 84, Article e00993-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00993-18>
- Statistical Analysis System. (2011). *The SAS system for Windows* (Versión 9.3) [Software]. SAS Institute.
- Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria. (2019). *Boletín estadístico agropecuario* (Serie cronológica 2016-2019, 30 Ed.). Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria.
- Sharma, A., Lee, S., & Park, Y. (2020). Molecular typing tools for identifying and characterizing lactic acid bacteria: a review. *Food Science and Biotechnology*, 29, 1301–1318. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00802-x>
- Stefanovic, E., & McAuliffe, O. (2018). Comparative genomic and metabolic analysis of three *Lactobacillus paracasei* cheese isolates reveals considerable genomic differences in strains from the same niche. *BMC Genomics*, 19, Article 205. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4586-0>

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tobía, C., Rojas, A., Villalobos, E., Soto, H., & Uribe, L. (2004). Sustitución parcial del alimento balanceado por ensilaje de soya y su efecto en la producción y calidad de la leche de vaca, en el trópico húmedo de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 28(2), 27-35.
- Van Soest, P. J., & Robertson, J. B. (1985). *Analysis of forages and fibrous food. As 613. A laboratory manual*. Cornell University.
- Verma, D., Garg, P. K., & Dubey, A. K. (2018). Insights into the human oral microbiome. *Archives of Microbiology*, 200, 525-540. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1505-3>
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C., Harris, H., Mattarelli, P., O'Toole, P., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G., Gänzle, M., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), Article 4107. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>