

## ARTICLE / INVESTIGACIÓN

## Evaluación de la expresión genética de Linalool en genotipos de cacao nacional altamente homocigóticos proveniente de las principales zonas cacaoteras tradicionales del Ecuador

Genetic expression of Linalool in highly homozygotic national cocoa genotypes from the leading traditional cocoa-growing areas in Ecuador

Eduardo Morillo\*<sup>1</sup>, Johana Buitron<sup>1</sup> and James Quiroz-Vera<sup>2</sup>

DOI. 10.21931/RB/2023.08.02.20

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Santa Catalina, Mejía, Ecuador.

<sup>2</sup>Programa de Cacao, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Litoral Sur, Yaguachi, Ecuador.

Corresponding author: [eduardo.morillo@iniap.gob.ec](mailto:eduardo.morillo@iniap.gob.ec)

**Resumen:** Ecuador es reconocido a nivel internacional como el principal productor de cacao fino tipo Nacional o sabor “Arriba”. Con la secuenciación del genoma del cacao se identificaron genes que regulan la producción de monoterpenos, entre ellos el gen LIS que codifica a la enzima linalool sintasa, y cataliza la síntesis de linalool que caracteriza al cacao Nacional. El objetivo del presente estudio fue evaluar la expresión del gen LIS en un grupo de clones altamente homocigóticos de una colección de cacaos centenarios (CCNC) mediante qPCR. Para el estudio se obtuvieron almendras de mazorcas autofecundadas de siete accesiones CCNC y tres clones comerciales: EET103 (Tipo Nacional), y dos clones no Nacionales (CCN51 e ICS95-Trinitario). Para cada clon se muestrearon almendras a las 20 (M1) y 22 (M2) semanas de autofecundación y 22 semanas más 24 horas de microfermentación (M3), obteniéndose en total 30 muestras para el análisis (tres momentos por genotipo). El ARN para el análisis de expresión se extrajo a partir de un pool de 10 almendras por muestra. El ARN obtenido se purificó y normalizó para la amplificación de dos genes: el gen SAND usado como gen de referencia y el gen LIS. Para cada muestra se corrieron tres réplicas técnicas por gen. La cuantificación de la expresión relativa se realizó mediante el método  $\Delta\Delta Ct$ . A partir del análisis se determinó que en los tres momentos analizados (M1, M2 y M3), la expresión del gen LIS varió entre las accesiones CCNC respecto a los calibradores ICS95 y CCN51. El clon comercial EET-103 y accesiones CCNC mostraron una mayor expresión en M2 y M3; la accesión CCNC-210M, altamente homocigótica, registró la mayor expresión del gen LIS en M3 y el clon comercial EET-103 en M2. Los resultados obtenidos son útiles para el mejoramiento genético del cacao Nacional en INIAP y una apropiada utilización y valoración de los recursos genéticos locales.

**Palabras clave:** qPCR, gen LIS,  $\Delta\Delta Ct$ , sabor Arriba

**Abstract:** Ecuador is internationally recognized as producing fine National-type or “Arriba” flavor cocoa. With the sequencing of the cocoa genome, genes that regulate the production of monoterpenes were identified, including the LIS gene that encodes the enzyme linalool synthase, which catalyzes the synthesis of linalool, an acyclic monoterpene considered to be the main aromatic component that characterizes National cocoa. The objective of the present study was to evaluate the expression of linalool in a group of highly homozygous clones from a collection of cocoas from the main traditional cocoa-growing areas (CCNC) using qPCR. Almonds were obtained from selfed cobs of seven CCNC accessions selected for their high level of homozygosity, and also three commercial clones: EET103 (Nacional), CCN51, and ICS95 (Trinitario). For each clone, beans were sampled at 20 (M1) and 22 (M2) weeks of selfing, and 22 weeks plus 24 hours of micro fermentation (M3), obtaining a total of 30 samples for the study (3 moments per genotype). RNA was extracted from a pool of 10 beans for each sample. The RNA obtained was purified and normalized to amplify two genes: SAND (reference) and LIS (linalool). For each sample, three technical replicates were run per analyzed gene. Relative expression quantification of the LIS gene was performed using the  $\Delta\Delta Ct$  method. The analysis determined that at times M1 and M2, the expression of the LIS gene varied between the CCNC genotypes analyzed with respect to the Trinitario ICS 95 genotype, used as a calibrator. The commercial clone EET-103 and CCNC accessions showed higher expression in M2 and M3. The acquisition CCNC-210M, highly homozygous, registered the highest expression of the LIS gene in M3 and the commercial clone EET-103 in M2. Our results are helpful for the INIAP cocoa breeding program promoting the use and valorization of local genetic resources.

**Key words:** qPCR, LIS gene,  $\Delta\Delta Ct$ , “Arriba” flavor.

**Citation:** Morillo E, Buitron J, Quiroz-Vera J. Evaluación de la expresión genética de Linalool en genotipos de cacao nacional altamente homocigóticos proveniente de las principales zonas cacaoteras tradicionales del Ecuador. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 20. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.20>

**Received:** 2 January 2023 / **Accepted:** 19 April 2023 / **Published:** 15 June 2023

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

**Copyright:** © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## Introducción

El Ecuador es productor del 75 % de cacao fino y aporta el 60% de la producción mundial con el cacao tipo "Nacional" o "Sabor Arriba"<sup>1</sup>. A principios del siglo XX, el cacao Nacional era el único cacao que se cultivaba en el Ecuador, árboles de este tipo con más de 80 años de edad han sido identificados y se ha conformado una colección de materiales de las principales zonas cacaoteras tradicionales, denominada Colección Cacao Nacional Centenario (CCNC). Estos materiales se conservan ex situ en la Estación Experimental Litoral Sur (EELS) del INIAP y en la Estación Experimental Portoviejo (EEP)<sup>2</sup>.

El cacao ecuatoriano tiene gran demanda en el mercado internacional por su aroma y sabor. Estas características están determinadas por la almendra, las prácticas agrícolas, el tratamiento pos cosecha y su procesamiento<sup>3</sup>. Los polifenoles de mayor concentración encontrados en el cacao son la epicatequina y las leucocianidinas; estos compuestos pueden representar hasta el 10-15 % del peso de la almendra, y durante la fermentación, se observa una disminución del 70 al 80 % de los contenidos de polifenoles solubles, principalmente constituidos por epicatequina y procianidinas<sup>4</sup>. Una caracterización de los cambios que ocurren en el perfil volátil de las semillas fermentadas de cacao de tipo Criollo, Forastero y Nacional, reportó que el cacao Criollo y Nacional produjeron volátiles con aromas florales y frutales como bencenoetanol, acetato de pentanol y linalool, mientras que el cacao Forastero presentó niveles muy bajos de estos compuestos<sup>5</sup>. Estudios sobre las propiedades organolépticas del cacao confirman que los polifenoles y los terpenos son los principales contribuyentes a su aroma<sup>6</sup>. Adicionalmente se investigó la contribución del linalool al sabor del cacao y encontró que el cacao suave y aromático contenía niveles más altos de linalool que el cacao no aromático<sup>7</sup>. Más recientemente se reportan dos rutas de biosíntesis relacionadas principalmente con la nota floral del cacao Nacional: la ruta de biosíntesis de monoterpenos y la ruta de degradación de L-fenilalanina<sup>8</sup>.

El linalool (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol) es un monoterpeno de cadena abierta que se encuentra en aceites esenciales de varias especies vegetales. Sus dos enantiómeros R-linalool y S-linalool son diferentes en los vapores fragantes que producen, R-linalool tiene un aroma a madera y un aroma fresco similar a la lavanda. S-linalool tiene un aroma dulce, floral y ligeramente amaderado<sup>9</sup>. Existen genes pertenecientes a la familia TPS que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de terpenos importantes para la producción y la regulación de compuestos volátiles aromáticos<sup>10</sup>. Con la secuenciación del genoma del cacao, se identificaron genes que conforman la familia génica TPS, dentro de estos genes existen algunos que regulan la producción de monoterpenos, como es el caso del gen LIS este codifica a la enzima linalool sintasa, la cual cataliza la síntesis de linalool<sup>11</sup>. Mas recientemente se reportan un número mayor de genes potencialmente implicados en la síntesis de aromas afrutados en cacao; resultados preliminares en la expresión de genes candidatos que sintetizan enzimas responsables de la producción de ciertos compuestos volátiles tendrían lugar durante el desarrollo de la almendra y el proceso de fermentación<sup>12</sup>.

En Ecuador se cuantificó la producción del linalool en almendras frescas y tostadas de cacao Nacional, CCN-51, Ghana e ICS-95; se encontró que los granos de cacao

frescos tenían un mayor contenido de linalool que otros genotipos<sup>13</sup>. Se reportó además que las almendras tostadas de Cacao Nacional tenían un mayor contenido de linalool que las almendras crudas. En base a la hipótesis de que el linalool es considerado como uno de los principales componentes aromáticos que caracteriza el aroma floral del cacao Nacional, el objetivo de este estudio fue evaluar la expresión genética de linalool en un grupo de clones altamente homocigóticos identificados en una colección proveniente de las principales zonas cacaoteras tradicionales (CCNC) usando como materiales de referencia a clones comerciales de cacao.

## Materiales y métodos

**Material biológico:** Se colectaron mazorcas provenientes de autofecundación de siete accesiones de la CCNC y clones comerciales en INIAP-EELS. Cinco de estas accesiones se seleccionaron por su alto nivel de homocigosis (78-90%) identificadas en un estudio anterior de caracterización molecular de esta colección: CCNC-001M, CCNC-012LR, CCNC-012M, CCNC-051M y CCNC-210M<sup>2</sup>. Se incluyeron además otras dos accesiones de la colección, CCNC-006M y CCNC-092M, y clones comerciales para comparación: un Tipo Nacional de reconocido perfil aromático Arriba (EET-103), un Trinitario (ICS95) y CCN51. Para cada clon se cosecharon mazorcas a las 20 y 22 semanas de maduración (Momentos 1 y 2: M1 y M2). Las almendras de mazorcas de 22 semanas se sometieron a un proceso de micro fermentación durante 24 horas y representaron el tercer momento de muestreo (M3). Por cada mazorca se tomaron 10 almendras que se preservaron en RNA Later a -80°C.

**Extracción y purificación del ARN:** el ARN se extrajo de un pool de diez almendras preservadas en RNA Later. Se utilizó el reactivo PureLink Plant RNA (Thermo Fisher Scientific) y el procedimiento descrito por el fabricante. Los ARN obtenidos fueron purificados mediante dos procedimientos; el primero se realizó con el fin de eliminar restos de ADN genómico (ADNg) y el segundo para eliminar residuos de lípidos y polifenoles. La primera purificación se realizó con el procedimiento reportado en un análisis del transcriptoma de clones comerciales de cacao Nacional<sup>14</sup>. Para una segunda purificación se empleó el kit PureLink™ RNA Mini siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Thermo Fisher Scientific). Una segunda purificación del ARN resultó necesaria para mejorar la amplificación del cDNA, se reportó el protocolo reportado en la estandarización del método de cuantificación por qPCR del marcador asociado al linalool<sup>15</sup>.

**RT-qPCR:** El ARN purificado se cuantificó mediante fluorometría empleando el equipo Qubit con el kit Qubit™ RNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific). Se realizó la RT-qPCR utilizando el kit GoTaq® 1-Step RT-qPCR System de PROMEGA, según las especificaciones del fabricante. Se emplearon 20 ng de ARN purificado por cada una de las reacciones. Las reacciones se ensamblaron a una temperatura de alineamiento de 60 °C y con una concentración de primer de 0, 5µM para la cuantificación de los genes. Se empleó el termociclador Mx3005P (Agilent, Edinburgh, UK) con el software MxPro, y el sistema de detección SYBR Green para el análisis de los genes en estudio conforme al procedimiento reportado por (15).

**Cuantificación relativa del gen LIS:** Para cada genotipo

en estudio (siete accesiones de la CCNC y los tres genotipos comerciales), se ensamblaron tres reacciones para la amplificación del gen LIS y el gen de referencia SAND. Se emplearon primers reportados en la estandarización de la RT-qPCR para genes de referencia en almendras de cacao<sup>16</sup>. La cuantificación de la expresión relativa se realizó mediante el método  $\Delta\Delta Ct$ <sup>17</sup>. En el ensayo se emplearon como calibradores a los genotipos ICS95 y CCN51 ya que éstos materiales no poseen el aroma floral característico del cacao Nacional.

Comparación de la expresión del gen LIS: Los valores de la expresión relativa se linealizaron mediante una transformación logarítmica para minimizar la varianza que existe entre los datos y se realizó la construcción de gráficos en EXCEL.

#### Parámetros de fermentación

La toma de muestras para determinar el pH y el recuento de BAL se realizó a los días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 del proceso de fermentación. La determinación del pH se realizó con un pH-metro calibrado modelo Orion 410. El recuento se realizó en agar Man Rogosa Sharpe (MRS) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina) a 30 °C durante 24-48 h. Los resultados se expresaron en Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/ml).

#### Determinación de fosfato libre

Las muestras se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min en una centrífuga Rolco CP 2036 (Buenos Aires, Argentina). El fosfato libre se determinó utilizando 100 µl de sobrenadante y 900 µl de una solución que contenía 0,6 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 % (m/v) de ácido ascórbico y 0,5 % (m/v) de molibdato de amonio. Luego de una incubación a 50 °C durante 30 min se realizó la lectura de la densidad óptica a 820 nm. Para la curva de calibración se utilizó una solución patrón de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Los resultados fueron expresados en mg de fósforo/100 ml<sup>18</sup>.

#### Determinación de ácido fítico

La concentración de ácido fítico en los sobrenadantes se determinó utilizando el kit comercial Megazyme Internacional (Wicklow, Irlanda) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo se basa en la hidrólisis del ácido fítico por la actividad de la fitasa en mio-inositol-fosfato y fósforo libre, y la posterior actividad de la fosfatasa alcalina que libera el resto de los fosfatos de la molécula de mio-inositol<sup>17</sup>. El fosfato libre se determinó según se describió anteriormente y los resultados se expresaron en mg ácido fítico/100 ml, utilizando la siguiente ecuación:

#### Determinación de hierro libre

Se trataron 200 µl de sobrenadante con 1 ml de una solución 30 mM de ácido ascórbico en buffer citrato (0,05 M, pH 4,5). Luego de una incubación a 37 °C durante 5 min se agregó 200 µl de una solución de ferrozime (5 mM). Se incubó a 37 °C durante 40 min y se midió la densidad óptica a 562 nm en un espectrofotómetro Jenway modelo 6405 (Londres, Reino Unido). Se realizó una curva patrón con Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. Los resultados se expresaron en mg hierro/100 ml<sup>18</sup>.

### Resultados

En la tabla 1 se muestran los valores de la cuantificación relativa del gen LIS en los genotipos Nacional analizados comparados con los clones ICS95 y CCN51 que se utilizaron como calibradores. Respecto a ICS95 se observa que los valores para los clones 012LR, 051M, 210M, 092M y EET103 oscilaron entre 0.40 y 1,56 para M1; y entre 0,67 y 2,5 para M2. Los clones 001M y 012M presentaron una represión en la expresión del gen LIS (valores de -0.58 y -0.92 para M1; -0.17 y -0.48 para M2). El genotipo 006M presentó una sobreexpresión para M1 con un valor de 0,12 y represión del gen LIS para M2 con un valor de -0.63.

GENOTIPO	M1		M2		M3	
CCNC-001M	-0,580	-2,516	-0,174	-0,950	1,039	1,502
CCNC-012LR	0,724	-1,211	0,850	0,075	0,975	1,437
CCNC-012M	-0,915	-2,851	-0,481	-1,257	0,876	1,338
CCNC-051M	0,472	-1,463	1,866	1,090	0,699	1,161
CCNC-210M	0,785	-1,149	0,672	-0,103	<b>1,713</b>	<b>2,176</b>
CCNC-006M	0,125	-1,809	-0,627	-1,403	1,020	1,483
CCNC-092M	0,407	-1,528	0,751	-0,024	0,579	1,042
EET-103	1,561	-0,374	<b>2,563</b>	<b>1,788</b>	1,118	1,581
CCN51	1,935	0	0,775	0	-0,462	0
ICS95	0	-2,066	0	-0,775	0	0,462

**Tabla 1.** Valores de expresión del gen LIS calibrados en valores de Log 2-  $\Delta\Delta Ct$  para los tres momentos analizados (ICS95 y CCN51 a la izquierda y derecha respectivamente).

Los resultados para M3 revelaron una sobre expresión del gen LIS con respecto a ICS95 para los siete clones CCNC analizados e incluido el genotipo EET103 (valores de Log 2-  $\Delta\Delta Ct$ , de -0,58 y 1,71). Respecto a los valores de Log 2-  $\Delta\Delta Ct$  en los siete genotipos de la CCNC usando como calibrador al genotipo CCN51 estos oscilaron entre -2,85 y -0,37 para M1, se evidenció la represión de la expresión del gen LIS en todos los genotipos analizados. Para M2 los valores de expresión variaron entre -1,4 y 1,78. Los resultados para M3 revelaron una sobre expresión del gen LIS con respecto de CCN51 para los siete clones CCNC analizados.

De manera general se observan niveles de expresión del gen Lis en las accesiones CCNC en M3, destacando la accesión 210M con la mayor expresión (Log 2-  $\Delta\Delta Ct$  de 1,7 y 2,1 con los dos calibradores utilizados). Por su parte en M2 el clon EET103 fue el que mayor nivel de expresión registró (Log 2-  $\Delta\Delta Ct$  de 2,5 y 1,7).

En la figura 1 se observa la expresión el gen linalool en valores de Log 2-  $\Delta\Delta Ct$ . En los momentos M1 y M2, la expresión del gen LIS respecto de ICS95 varió entre los genotipos analizados, los clones de la CCNC 012LR, 051M,

210M y 092M presentaron una sobreexpresión, al igual que el clon EET103 en estos dos momentos. En M3 se destaca la expresión en el genotipo 210M; este genotipo presenta la mayor expresión del gen tras la micro fermentación de la almendra por 24H.

En la figura 2 se observa la expresión el gen linalool en valores de Log 2-  $\Delta\Delta Ct$  con CCN51 como calibrador. Se evidencia la represión del gen linalool en todas las muestras de la CCNC analizadas para el momento M1, incluyendo los clones EET103 y ICS95. Para el momento M2 los clones 012LR y 051M de la colección de CCNC presentaron una sobreexpresión del gen (0,075 y 1,09 respectivamente). Para el M3 la sobreexpresión del gen LIS se presentó en todos los genotipos de la CCNC analizados.

## Discusión

En este análisis se verificó una variación de la expresión del gen LIS entre los genotipos de cacao Nacional analizados en los dos momentos de maduración de la mazorca (20 y 22 semanas) y 24h de fermentación de las almendras

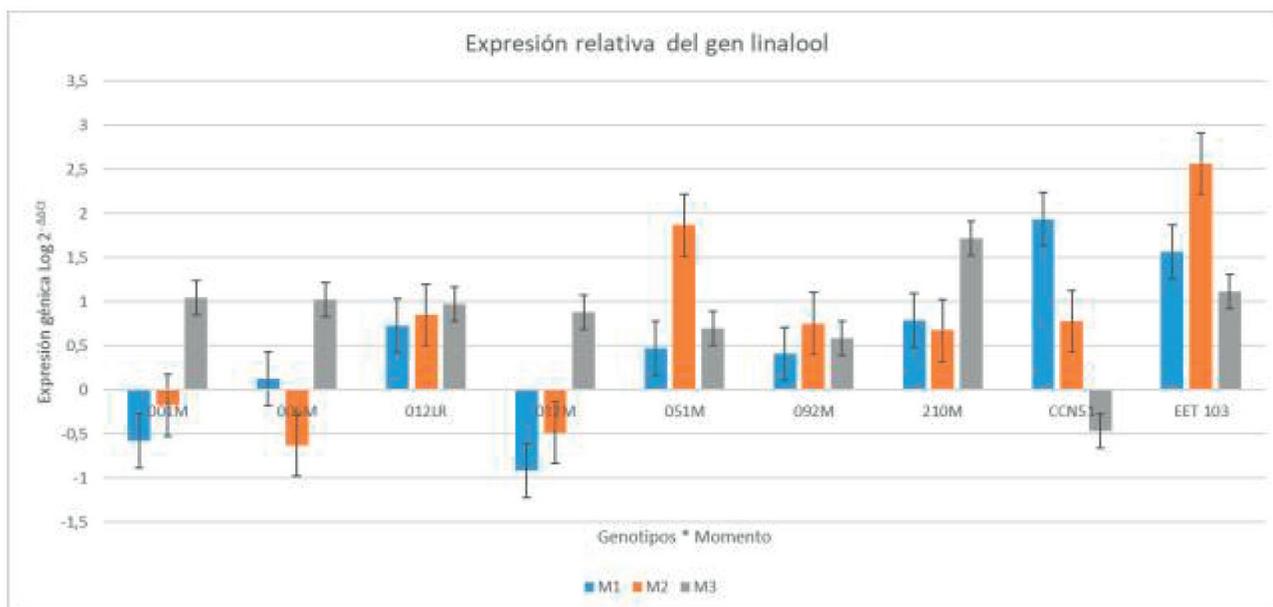


Figura 1. Expresión el gen LIS en valores de Log 2-  $\Delta\Delta Ct$ , calibrador ICS 95.

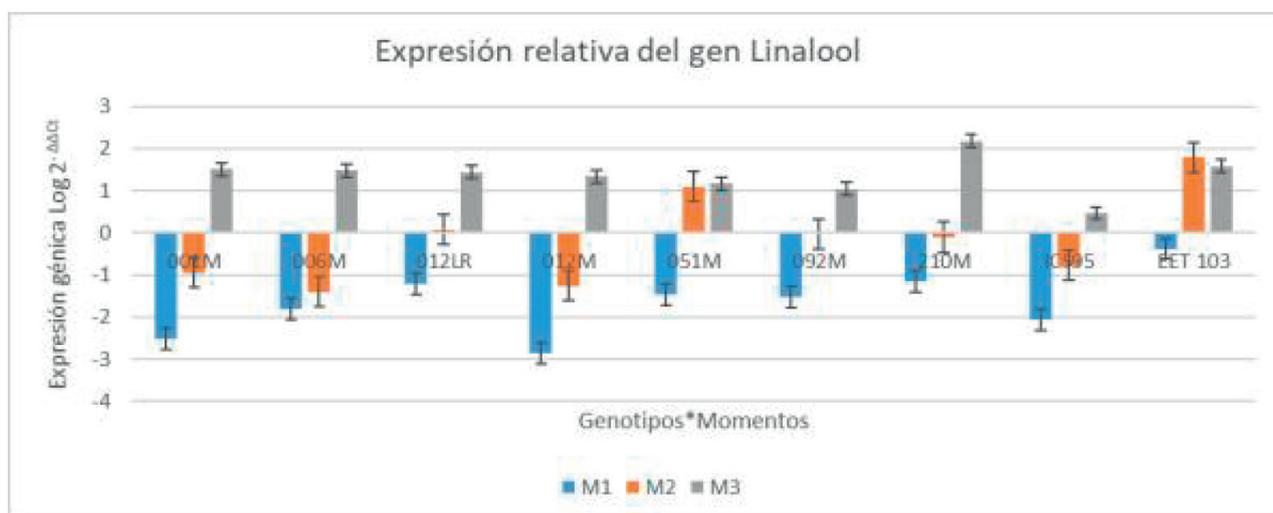


Figura 2. Expresión el gen LIS en valores de Log 2-  $\Delta\Delta Ct$ , calibrador CCN51.

de 22 semanas. Utilizando como calibradores a los clones ICS95 y CCN51, se observó una sobreexpresión del gen linalool en las muestras de almendras de Nacional con micro fermentación (M3), en comparación con las no fermentadas; en función del genotipo se observó sobreexpresión o represión del gen. Este resultado podría asociarse al efecto de la fermentación, ya que está reportado que ésta favorece la intensidad aromática, la acidez y los sabores frutal y floral<sup>18</sup>.

Resulta de particular interés que entre las accesiones analizadas en este estudio, la accesión CCNC-201M es la que evidenció los mayores valores de expresión del gen LIS en el momento 3. El clon EET103 el cual es un material con aroma floral bajo en cambio presentó el valor más alto de expresión en M2. Cabe indicar que la accesión CCNC-201M resultó asignada en el grupo Nacional<sup>2</sup>, es altamente homogocítica (85,4%) y está clasificada en nivel 4 (Sabor floral alto) en los test sensoriales realizados por ECUAKAO y MEIJI (Japón)<sup>19</sup>. En cambio el clon EET-103 es un material altamente heterocigótico (catalogado como híbrido y con 79,5% de heterocigosis) y con una calidad aromática floral baja<sup>20,21</sup>.

Por otro lado los resultados del aumento de la expresión en el proceso de micro fermentación son similares a reportados anteriormente<sup>22</sup>, se observó un aumento de la expresión del gen LIS en las almendras a los dos días de la fermentación. La tendencia de la expresión en el momento M3 es una sobreexpresión en los genotipos Nacionales, ya que se observó un incremento de la expresión del gen LIS con los dos calibradores utilizados. En un estudio preliminar<sup>22</sup>, también se observó que en el genotipo Nacional analizado, la expresión del gen LIS aumentó cuando la almendra se fermentó; además, el valor de expresión del gen LIS en el genotipo Nacional fue superior a los observados en los genotipos Trinitario. En otro trabajo anterior<sup>13</sup> se cuantificaron compuestos volátiles en genotipos Nacional, ICS95, CCN51 y provenientes de Ghana y se determinó que el contenido de linalool se ve influenciado por los tiempos de fermentación. La presencia de linalool se incrementó por el proceso de tostado de las almendras, éste fue superior en los cacaos de tipo Nacional comparado con los provenientes de Ghana, y para ICS95 y CCN51 estuvo ausente. Trabajos similares corroboran estos resultados, en un trabajo más reciente<sup>23</sup> se determinó que la biosíntesis del linalool depende en un principio del genotipo de cacao, además, éste contenido se ve modificado por las condiciones de fermentación a la que esté sometida la almendra. El tiempo de fermentación de los granos de cacao parece ser el factor clave que controla la síntesis de aromas. Así mismo otro estudio<sup>24</sup> identificó y cuantificó compuestos volátiles de genotipos CCN51 y EETs y los resultados mostraron que los genotipos EET contienen mayor concentración de compuestos afrutados y florales en comparación con el clon CCN51.

## Conclusiones

Los análisis mostrados en este estudio detectan claras diferencias de expresión del gen LIS entre los genotipos de cacao nacional y los clones usados como calibradores ICS95 y CCN51 y corroboran a estudios similares realizados anteriormente. El valor encontrado en las almendras fermentadas de 24 horas muestran niveles superiores de expresión en los cacaos centenarios (CCNC), destacan-

dose la accesión CCNC- 210M altamente homogocítica y catalogada como Nacional.

Nuestros resultados deben complementarse con estudios del perfil sensorial de los materiales con el fin de establecer una correlación positiva de expresión del gen LIS como indicador de calidad aromática de cacao Nacional o fino de aroma.

## Contribuciones de los autores

Conceptualización, E.M, J.Q.; metodología, E.M, J.B, J.Q.; software y validación, J.B; análisis formal, J.B.; escritura, revisión y edición, J.B. y E.M; gestión financiamiento, J.Q. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

## Financiamiento

Esta investigación fue financiada por INIAP y con aporte complementario de la Cooperación técnica Alemana (GIZ). Esta investigación se realizó con autorización según contrato marco No. MAAE-DNB-CM-2020-0138 suscrita con el Ministerio del Ambiente.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo técnico del INIAP, particularmente de la EELS para el establecimiento de los ensayos experimentales en campo y otros insumos utilizados en la investigación.

## Conflictos de Interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

## Referencias bibliográficas

1. Di Cagno, R.; Coda, R., De Angelis, M.; Gobbetti, M. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol.* 2013, 33, 1–10.
2. Settanni, L.; Corsetti, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int. J. Food* 2008, 121, 123–138.
3. Septembre-Malaterre, A.; Remize, F.; Poucheret P. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Res. Int.* 2018, 104, 86–99.
4. Fernández-León, A.M.; Lozano, M.; González, D.; Ayuso, M.C.; Fernández-León, M. F. Bioactive compounds content and total antioxidant activity of two savoy cabbages. *Czech. J. Food Sci.* 2014, 32, 549–554.
5. Traka, M.H. Health Benefits of Glucosinolates. In: *Glucosinolates*, Kopriva SB (ed.); Academic Press, 2016, Volume 80, pp 247–279.
6. Vale, A.P.; Santos, J.; Brito, N.V.; Fernandes, D.; Rosa, E.; Oliveira, MB. Evaluating the impact of sprouting conditions on the glucosinolate content of Brassica oleracea sprouts. *Phytochemistry* 2015, 115, 252–260.
7. Gemedé, F.H.; Ratta, N. Antinutritional Factors in Plant Foods: Potential Health Benefits and Adverse Effects. *Int. J. Nutr. Food Sci.* 2014, 3, 284–289.
8. Rao, D.; Rao, K.V.; Reddy, T.P.; Reddy, V.D. Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: An overview. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2009, 29, 182–198.
9. Kumar, V.; Sinha, A.; Makkar, H.; De Boeck, G.; Becker, K. Phytate and phytase in fish nutrition. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2011, 96, 335–364.
10. Kumar, A.; Chanderman, A.; Makolomakwa, M.; Perumal, K.; Singh, S. Microbial production of phytases for combating environmental phosphate pollution and other diverse applications. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2016, 46, 556–591.

11. Kumar, V.; Sinha, A.K.; Makkar, H.P.S.; Becker, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chem.* 2010, 120, 945–959.
12. Teucher, B.; Olivares, M.; Cori, H. Enhancers of iron absorption: ascorbic acid and other organic acids. *J. Int. Vitaminol. Nutr.* 2004, 74, 403–419.
13. Azeem, M. Microbial phytase activity and their role in organic P mineralization. *Arch. Agron. Soil Sci.* 2015, 61, 751–766.
14. Singh, B; Kunze, G; Satyanarayana, T. Developments in biochemical aspects and biotechnological applications of microbial phytases. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 2011, 63, 69–87.
15. Riad, G.; Ahmed, A.; El-Baky, M.; Ghoname ElSayed, A., Hegazi A. Cabbage Nutritional Quality as Influenced by Planting Density and Nitrogen Fertilization. *Fruit. Veg. Cereal. Sci. Biotech.* 2009, 3, 68-74.
16. Marguet, E.R.; Ledesma, P.; Vallejo, M. Disponibilidad de fósforo soluble en ensilado experimental fermentado con una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* con alta actividad de fitasa. *Rev. Soc. Ven. Microb.* 2013, 33, 116–121.
17. Mikulski, D.; Klosowski, G. Phytic acid concentration in selected raw materials and analysis of its hydrolysis rate with the use of microbial phytases during the mashing process. *J. Inst. Brew.* 2015, 121, 213–218.
18. Braunschweig, J.; Bosch, J.; Heister, K.; Kuebeck, C.; Meckenstock, R.U. Reevaluation of colorimetric iron determination methods commonly used in geomicrobiology. *J. Microbiol. Methods* 2012, 89, 41–48.
19. USDA. United States Department of Agriculture 2020. Food-Data Center. In <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#?query=cabbage>. [Accessed 25 October 2020].
20. Christiansen, J.K.; Hughes, J.E.; Welker, D.L.; Rodríguez, B.T.; Steele, J.L.; Broadbent, J.R. Phenotypic and genotypic analysis of amino acid auxotrophy in *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74, 416–423.
21. Fossi, B.T.; Akwanwi, C.M.; Takop, N.G.; Bille, E.Y.; Wanji, S. Phytic acid degradation by selected lactobacilli isolated from fruits and vegetables and their potential as probiotics. *Eur. J. Biotechnol. Biosci.* 2016, 4, 34–41.
22. Haros, M.; Bielecka, M.; Honke, J.; Sanz Y. Phytate-Degrading Activity in Lactic Acid Bacteria. *Polish J. Food Nutr. Sci.* 2008, 58, 33–40.
23. De Angelis, M.; Gallo, G.; Corbo, M.R.; McSweeney, P.L.H.; Faccia, M.; Giovine, M. et al. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 87, 259–270.