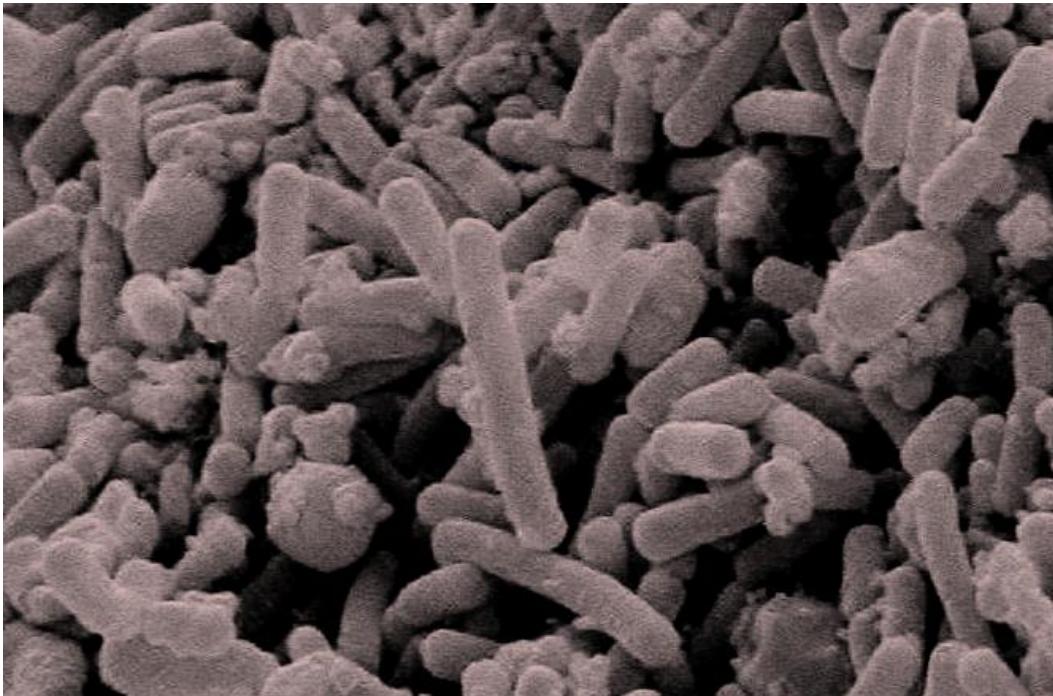


Capítulo 2: Selección y caracterización de lactobacilos aislados de kefir capaces de producir exopolisacáridos



Introducción

1.- Bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos en la industria de alimentos.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son utilizadas ancestralmente para fermentar la leche con el objetivo de aumentar su vida útil. Actualmente, la industria de los productos lácteos presta especial atención a aquellas bacterias ácido lácticas capaces de producir exopolisacáridos (EPS) debido a que éstos aumentan la viscosidad y mejoran la percepción de textura por parte de los consumidores (Jolly *et al.*, 2002). Existen además algunos estudios sobre la potencialidad de ejercer efectos benéficos sobre la salud que poseen estos polímeros. Estas propiedades están directamente relacionadas con las características fisicoquímicas de cada EPS, su composición de monosacáridos, número y tipo de enlaces, tamaño del polímero y estructura espacial (Ruijsenaars *et al.*, 2000; Looijesteijn *et al.*, 2001; Ruas-Madiedo *et al.*, 2008).

Las BAL representen una fuente de polisacáridos natural que se pueden utilizar en diversos productos fermentados, ya sea incluyendo el microorganismo productor en el fermento o utilizando los EPS que producen como espesantes, emulsificantes y estabilizantes (Jolly *et al.*, 2002; Ruas-Madiedo *et al.*, 2005; Piermaria *et al.*, 2008). Por lo tanto, el estudio de la producción y la caracterización de polisacáridos de BAL es relevante para la industria de alimentos.

1.1.- Características y clasificación de polisacáridos producidos por bacterias ácido lácticas.

Los polisacáridos secretados por las BAL pueden asociarse firmemente a la superficie de la célula, y se los denomina capsulares (CPS), o

bien pueden ser liberados al medio de cultivo extracelular otorgándole viscosidad, y son llamados simplemente exopolisacáridos (EPS) (Babel *et al.*, 2011).

De acuerdo a su composición química estos EPS se dividen en homopolisacáridos (HoPS), y heteropolisacáridos (HePS) (De Vuyst & Degeest, 1999; Font de Valdez *et al.*, 2003; De Vuyst & Vanningelgem, 2004).

En base a su estructura, los HoPS se dividen en cuatro grupos: (i) α -D-glucanos; (ii) β -D-glucanos (iii) β -D-fructanos y, (iv) polygalactanos. Poseen pesos moleculares altos (superiores a 10^7 Da) y diferentes grados de ramificación, tipos de uniones y longitud de cadena (Monsan *et al.*, 2001; van Hijum *et al.*, 2006).

Los HePS están compuestos por una estructura de subunidades repetidas, ramificadas o no, que contienen de 3 a 8 monosacáridos. Estos HePS están constituidos generalmente por D-galactosa, D-glucosa, y L-ramnosa en distintas proporciones. Algunos también poseen fucosa, ribosa, amino azúcares acetilados (N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina), ácidos urónicos, así como otros compuestos de naturaleza no glucosídica tales como fosfato, acetato y glicerol (De Vuyst & Degeest, 1999; De Vuyst *et al.*, 2001).

Existe una gran diversidad entre los HePS de BAL que varían en composición, estructura, masa molecular, producción y funcionalidad (Font de Valdez, *et al.*, 2003; De Vuyst & Vanningelgem 2004; Vanningelgem *et al.*, 2004a; Mozzi *et al.*, 2006). Como consecuencia de su composición y masa molecular los HePS pueden variar su carga, arreglo espacial, rigidez y capacidad de interaccionar con las proteínas (Duboc & Mollet, 2001). Todas estas características contribuyen fuertemente a las características específicas del EPS, tales como solubilidad, propiedades reológicas y funcionalidad fisicoquímica y biológica (Monchois *et al.*, 1999; Ruas-Madiedo *et al.*, 2008).

Entre las BAL de gran importancia en la industria con capacidad de sintetizar HePS encontramos cepas pertenecientes a las especies *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus casei*, *Lb paracasei*, *Lb rhamnosus*, *Lb sakei*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lb acidophilus*, *Lb delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb helveticus*, *Streptococcus thermophilus* y *Streptococcus macedonicus* entre otros (Mozzi *et al.*, 2006).

1.2.- Rol fisiológico de exopolisacáridos bacterianos

El rol fisiológico que los EPS juegan en las bacterias que los producen no es claro pero, la gran cantidad de energía que se consume en su producción hace suponer que otorgan importantes ventajas a los microorganismos que los originan. El uso de los EPS como fuente de carbono para los microorganismos que los producen no es claro debido a que son pocas las bacterias que poseen las enzimas necesarias para degradar sus propios polisacáridos (Wolfaardt *et al.*, 1999). Diferentes estudios indican que los EPS no actúan como fuente de energía o de carbono sino que se relacionan con la adaptación y reconocimiento de factores ambientales, mejorando así la adaptación de los microorganismos a diferentes ecosistemas. Así, los EPS constituyen una barrera hidrofílica que puede proteger a la bacteria y contribuir a su adhesión a superficies por ejemplo a la mucosa intestinal. Además, el ambiente hidrofílico creado por el EPS alrededor de las estructuras celulares externas podría favorecer la absorción de nutrientes e iones metálicos; o bien actuar como mecanismo de desintoxicación bloqueando el contacto de compuestos tóxicos con la pared y membrana celular. Tales características hacen que los EPS de BAL puedan ser usados con objetivos de biorremediación (Ruas-Madiedo *et al.*, 2008).

Está documentado que los EPS de BAL cumplen en la célula funciones de protección contra la desecación, ataques de bacteriófagos y componentes antimicrobianos, como también interfieren en procesos relacionados a la

adhesión a superficie y formación de biofilms (Ruas-Madiedo *et al.*, 2008). En cuanto al uso a nivel comercial de éstos EPS, el dextrano es el único EPS comercializado hasta el momento. Este EPS es sintetizado por el microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* y se utiliza para la producción de soportes cromatográficos empleados en la separación mediante permeación en gel (Sephadex) y aditivo en sustitutos del plasma sanguíneo (Monsan *et al.*, 2001).

1.3.- Producción de exopolisacáridos por bacterias ácido lácticas

La producción de EPS por BAL varía según se sinteticen homopolisacáridos o heteropolisacáridos. Los HoPS son sintetizados en grandes cantidades. Normalmente, los niveles de producción de este tipo de EPS se encuentra alrededor de 1 g/l (Babel *et al.*, 2011). Incluso, algunas cepas de *Lactobacillus reuteri* son capaces de producir glucano en concentración de 10 g/l (Van Geel-Schutten *et al.*, 1999; Schwab & Gänzle, 2006). En cuanto a los HePS, la baja cantidad de polímero que son capaces de sintetizar constituye una desventaja para su uso a nivel industrial. Por ejemplo, las BAL producen HePS dentro del rango de 25 a 600 mg por litro de leche fermentada (Cerning & Marshall, 1999; Kleerebezem *et al.*, 1999; Mozzi *et al.*, 2006; Van der Meulen *et al.*, 2007; Ruas-Madiedo *et al.*, 2008).

Los factores que afectan la síntesis de HePS son la temperatura, periodo de fermentación, pH y composición del medio (fuentes de carbono y nitrógeno), nivel de oxígeno disuelto y la presencia de otros componentes tales como citrato, manganeso, calcio (De Vuyst & Degeest, 1999, Font de Valdez *et al.*, 2003) y bases nitrogenadas (por ejemplo adenina) (Torino *et al.*, 2005). Los EPS también pueden ser producidos en respuesta a factores de estrés, hecho que suele utilizarse como estrategia para aumentar su producción.

Cambios en las condiciones de cultivo pueden traer consecuencias que se reflejan en los niveles de producción de EPS por parte de las BAL. Por

ejemplo, la fuente de carbono del medio de cultivo utilizado juega un rol importante en la detección de los fenotipos de BAL productoras de polisacáridos y la cantidad total de polisacárido producido esta influenciado por la naturaleza y cantidad del azúcar libre en el medio. A su vez, no hay un único azúcar con el que se pueda obtener el mejor resultado porque el hidrato de carbono más conveniente para la producción depende de la cepa (Ruas-Madiedo & Reyes Gavilan, 2005). Por lo tanto, para alcanzar una producción eficiente de polímero, las condiciones de cultivo específicas deben ser optimizadas para cada microorganismo.

1.3.1.- Cuantificación de los exopolisacáridos producidos por bacterias lácticas.

Los métodos utilizados para el aislamiento y purificación del polisacárido del medio donde se produce tiene gran incidencia en la cantidad final obtenida. Para la elección del método se deben tener en cuenta tanto las características de la matriz como el grado de pureza requerido (Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilán, 2005). Para la cuantificación no es necesario que la muestra se encuentre completamente pura, siempre y cuando las impurezas no interfieran en la cuantificación (Rimada & Abraham, 2003). Generalmente las moléculas que podrían interferir en la cuantificación son proteínas o azúcares provenientes del medio de cultivo.

Las técnicas empleadas en la separación y purificación de polisacáridos provenientes de bacterias lácticas incluyen la utilización de proteasas, etapas de calentamiento o eliminación de proteínas por precipitación con ácido tricloroacético, diálisis, precipitaciones con diferentes volúmenes de etanol o combinaciones de las anteriores (Marshall *et al.*, 1995; Mozzi *et al.*, 1996; Kimmel & Roberts, 1998; Gorret *et al.*, 2003; Rimada & Abraham, 2003; Canquil *et al.*, 2007).

Cuando el objetivo es la cuantificación de EPS producidos por BAL en leche o suero, la extracción y purificación mediante calentamiento seguido de dos precipitaciones con alcohol en frío y diálisis y la cuantificación por métodos colorimétricos sencillos tales como el método de fenol-sulfúrico descrito por Dubois *et al.* (1956) y el método de antrona resulta muy conveniente debido a su simplicidad y bajo costo (Rimada & Abraham, 2003).

Otras estrategias acoplan métodos separativos y analíticos. Para esto se combina la cromatografía de permeación en gel en un sistema de cromatografía líquida a alta presión (HPLC) que permite la separación de los polímeros por el tamaño y la detección de las moléculas de EPS por su índice de refracción (IR) (Faber *et al.*, 1998, Ruas-Madiedo *et al.*, 2002b) y un detector ultravioleta en línea que provee la información sobre la presencia de proteínas en la muestra (Tuinier *et al.*, 1999; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002b).

1.4.- Selección de bacterias productoras de exopolisacáridos.

La detección de bacterias productoras de EPS según el fenotipo de sus colonias es ampliamente utilizada. Así, las bacterias productoras de EPS son detectadas por la característica filante de sus colonias.

Otro método utilizado es la resistencia a fluir a través de una pipeta del cultivo líquido donde se desarrolla (Ruas-Madiedo & Reyes Gavillan, 2005).

Varios métodos de tinción también han sido desarrollados para determinar la presencia de bacterias productoras de EPS. Entre ellos se pueden mencionar al colorante Rojo Congo que se une mediante uniones no covalentes a los enlaces $\beta(1,3)$ y $\beta(1,4)$ de los polisacáridos y el rojo rutenio, un colorante policatiónico, que es capaz de interactuar con los grupos carboxílicos de los polisacáridos ácidos (Babel *et al.*, 2011).

Las cepas productoras de EPS también pueden determinarse en el producto fermentado mediante la marcación del EPS con lectinas

fluorescentes seguida de la observación con microscopio laser confocal. Entre las lectinas más utilizadas se pueden citar concaavalina A y aglutininas de trigo (Hassan *et al.*, 2002).

En la industria láctea son apreciadas las características otorgadas a los productos lácteos fermentados por las bacterias que se consideran filantes. Estas, conceden a los productos lácteos una consistencia suave, mayor viscosidad y menor susceptibilidad a la sinéresis que las bacterias no filantes. Por ésta razón, se utiliza la evaluación de viscosidad como un parámetro para seleccionar microorganismos productores de EPS que otorguen viscosidad al fermentar la leche y formar el gel lácteo ácido.

1.5.- Formación de geles lácteos ácidos.

Según Clark (1991), un gel es un material formado por una red tridimensional continua que embebe al solvente y lo inmoviliza. Los geles exhiben propiedades microestructurales y mecánicas muy diversas que dificultan su clasificación. Sin embargo, se los denomina "fuertes" o "débiles" según la capacidad para romperse y fluir bajo la aplicación de fuerzas pequeñas (Clark & Ross-Murphy, 1987). Las características de los geles proteicos se ve afectada por el pH, la concentración de sales, azúcares y otros componentes como lípidos y polisacáridos (Pilosof, 2000).

Durante la fermentación bacteriana de la leche se forman geles. Allí, el ácido láctico producido genera un descenso de pH que provoca la desestabilización de las proteínas de la leche. Estos cambios son dependientes tanto del pH final alcanzado como de la cinética de acidificación. Cuando la acidificación se lleva a cabo lentamente, en paralelo con el crecimiento de los microorganismos, se producen cambios en la microestructura de las caseínas: a pH entre 6,6 y 5,5 las micelas de caseína mantienen su integridad, forma y dimensiones. A pH 5,5 las caseínas comienzan a desestabilizarse y el fosfato de calcio coloidal difunde hacia la fase acuosa de la leche. Alrededor de pH 4,5 se pierde casi completamente el

calcio y la integridad de la micela de caseína. El agregado de las micelas caseínicas seguido por el reacomodamiento de las mismas llevan a la formación de un gel proteico ácido donde la fracción acuosa de la leche es retenida (Walstra, 1990).

La utilización de δ -gluconolactona provoca la acidificación lenta de la leche permitiendo obtener químicamente, sin la utilización de microorganismos, geles ácidos con características reológicas y capacidad de retención de agua similares a las alcanzadas por fermentación bacteriana. Este tipo de geles suelen usarse como modelos para el estudio de los geles lácteos ácidos (Rimada & Abraham, 2006).

1.6.- Interacción exopolisacárido-proteína en geles lácteos

Cuando el EPS forma parte de un alimento, además de sus propiedades intrínsecas, se deben tener en cuenta las interacciones que se producen con los componentes del producto alimenticio. Estas interacciones se consideran segregativas cuando el biopolímero repele a las demás sustancias del alimento o bien asociativa cuando el biopolímero las atrae (Tolstoguzov, 2003). Estas interacciones se ven reflejadas en las características organolépticas del producto.

En los yogures la reología está influenciada por los EPS producidos por las cepas iniciadoras. La viscosidad aparente de estos productos aumenta con la viscosidad del cultivo iniciador de producir EPS pero no hay una relación directa con la cantidad del EPS producida. Esto se debe a que la estructura de los polisacáridos determina el tipo de interacción que se producirá con las proteínas de la leche (Babel *et al.*, 2011). Las bacterias y/o el EPS que ellas producen pueden afectar la agregación de las proteínas, la interacción con los componentes de la leche, y las interacciones entre los EPS y la superficie de la célula bacteriana (Marshall & Rawson, 1999). Además, el momento en el cual se produce el EPS durante la formación del gel también influye en las características del producto lácteo fermentado

afectando la capacidad de los geles lácteos de retener el suero (Ruas-Madiedo & Zoon, 2003).

La organización estructural de la red de caseína en el gel lácteo también desempeña un papel importante en la viscosidad de yogures (van Marle & Zoon, 1995; Ruas-Madiedo & Zoon, 2003). El contenido de sólidos de la leche es otro factor a tener en cuenta, ya que la sinéresis en yogures originados por cepas productoras o no productoras de EPS, depende del contenido sólidos de la leche de partida y del cociente caseína/proteínas totales presentes (Amatayakul *et al.*, 2006). El análisis de la viscosidad y comportamiento de flujo de estos sistemas sirve para evaluar la interacción de las proteínas de la leche con los EPS bacterianos (Hassan *et al.*, 2003; Rimada & Abraham, 2006). La microscopía confocal y las medidas reológicas dinámicas constituyen también buenas herramientas para comprender el comportamiento del sistema en relación a la interacción proteína-bacteria-EPS.

1.7.- Propiedades de exopolisacáridos en solución acuosa.

Para determinar las propiedades físicas de los polímeros en solución se debe tener en cuenta el solvente, la temperatura y la concentración del polímero. Entre las características de interés del EPS encontramos el PM, la presencia o no de ramificaciones que inciden en el radio de giro de cada EPS. En soluciones muy diluidas las moléculas de los EPS se encuentran separadas unas de otras y son libres de moverse independientemente. En esta situación cada cadena ocupa un volumen esférico con un determinado radio de giro (R_g), se minimizan las interacciones polímero-polímero y el volumen que ocupa la molécula está determinado por la interacción con el solvente. Por esta razón se considera que estas esferas tienen un radio hidrodinámico efectivo y las soluciones diluidas son utilizadas para determinar la viscosidad intrínseca de los polímeros. En el caso de polímeros cargados se utilizan soluciones salinas diluidas para la medida de

la viscosidad intrínseca. El valor que toma este parámetro es proporcional al volumen específico del polisacárido en solución y puede ser expresada como función de la masa molar y el radio de giro. Para polisacáridos con estructura *random coil* el radio de giro depende de la masa molar observándose una relación directa entre ambos parámetros. Por lo tanto un aumento de la viscosidad intrínseca estaría relacionado con un aumento tanto del radio de giro como de la masa molar del polímero.

El comportamiento de flujo también proporciona datos sobre la interacción de los EPS con el solvente. Así, soluciones muy diluidas de EPS bacterianos suelen comportarse como fluidos newtonianos. En cambio a mayores concentraciones muestran comportamiento pseudoplástico. Este comportamiento se observó para soluciones de EPS producidos por *Propionibacterium* (Gorret *et al.*, 2003), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Tuinier *et al.*, 1999), microorganismos de los gránulos de kefir (Piermaria *et al.*, 2007) y cultivos iniciadores de yogurt (Petry *et al.*, 2003; Canquil, *et al.*, 2007).

1.8- Evaluación de las características reológicas de geles lácteos.

Existen diferentes metodologías que permiten evaluar y caracterizar las propiedades fisicoquímicas de los geles lácteos, entre ellas podemos mencionar la viscosimetría rotacional y reometría oscilatoria de pequeña amplitud de deformación.

1.8.1.-Viscosimetría rotacional.

Los instrumentos más ampliamente usados en la medida de viscosidad se pueden dividir en tres tipos: capilares, rotacionales y de cuerpo móvil. Los viscosímetros rotacionales constan básicamente de dos componentes que se encuentran separadas por el fluido a estudiar. Uno de ellos es fijo y el otro móvil. Dichos componentes pueden tener diferentes

geometrías. Pueden ser cilindros concéntricos, dos superficies paralelas y una superficie y un cono de pequeño ángulo, de acuerdo al sensor utilizado.

Cuando se aplica un esfuerzo tangencial a la superficie del líquido se genera una velocidad constante en una de las placas. El fluido en contacto con la placa en movimiento se mueve a esa misma velocidad y el fluido en contacto con la placa fija permanece en reposo. Como se puede observar en la Figura 1, en el fluido se genera un perfil de velocidades. La misma aumenta a medida que nos acercamos a la placa en movimiento.

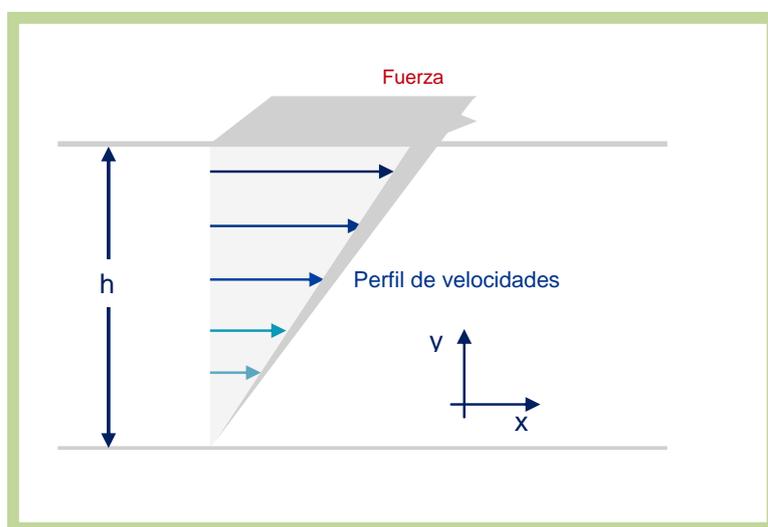


Figura 1: Representación de movimiento de un fluido entre una placa fija y una móvil en los viscosímetros rotacionales.

El perfil de velocidades que se establece en la dirección perpendicular a la superficie del líquido permite definir el gradiente de velocidad ($\dot{\gamma}$), que representa la variación de velocidad de las sucesivas capas de líquido con respecto a la dirección perpendicular a la superficie del mismo. γ es la deformación que sufre el material y a $\dot{\gamma}$ se lo denomina velocidad de deformación relativa o gradiente de velocidad de deformación.

$$\dot{\gamma} = dv_x/dy = (dx/dt)/dy = (dx/dy)/dt = d\gamma / dt$$

A la fuerza por unidad de área tangencial a la superficie necesaria para establecer un determinado gradiente de velocidad en un líquido se denomina esfuerzo de corte (σ) y su magnitud depende del líquido del que se trate y de la temperatura (Figura 2).



Figura 2: Esquema que muestra la deformación sufrida por un material cuando el mismo es sometido a un esfuerzo tangencial.

La gráfica del esfuerzo de corte en función de gradiente de velocidad de deformación se denomina curva de flujo.

Los fluidos se dividen en newtonianos o no newtonianos según el tipo de relación que se produzca entre el esfuerzo de corte y el gradiente de velocidad de deformación. Así, cuando la relación entre ambos parámetros es lineal al fluido se lo denomina newtoniano y la constante de proporcionalidad entre ambos parámetros es la viscosidad (η).

$$\sigma = \eta \dot{\gamma}$$

La curva de flujo correspondiente a estos fluidos es una recta con ordenada al origen cero (Figura 3).

En los fluidos no newtonianos la relación no es lineal y los diferentes comportamientos de flujo posibles son: Pseudoplástico, Dilatante, Herschel Bulckley y Plástico de Bingham. Las curvas de flujo representativas de éstos fluidos se muestran en la Figura 3 junto a la curva de flujo correspondiente a un fluido newtoniano.

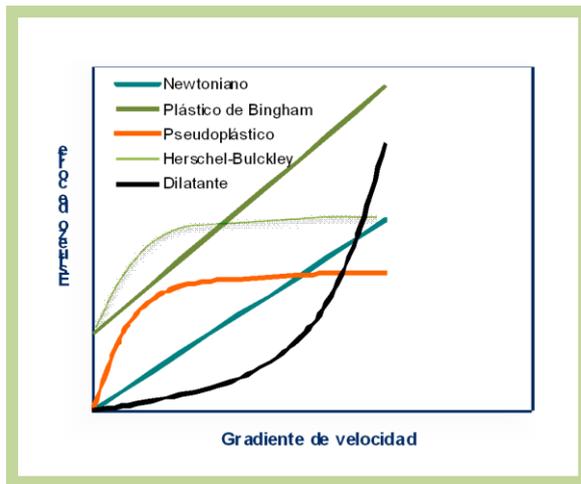


Figura 3: Esquema de comportamientos de flujo posibles para fluidos newtonianos y no newtonianos (Pseudoplástico, Dilatante, Herschel Bulkley y Plástico de Bingham).

En los fluidos pseudoplásticos al aumentar el gradiente de velocidad disminuye el incremento de esfuerzo observado para una variación en el gradiente de velocidad. Esto significa que la resistencia del líquido a fluir disminuye con el aumento del gradiente de velocidad aplicado.

El comportamiento opuesto al descrito anteriormente es el correspondiente al fluido dilatante, para el cual la resistencia a fluir se hace mayor con el aumento del gradiente de velocidad.

Existen otros dos comportamientos que pueden ser descritos en base a los anteriores. El correspondiente al plástico de Bingham muestra una dependencia lineal del esfuerzo de corte con el gradiente de velocidad, pero el flujo se inicia solo después de haber superado un determinado esfuerzo de corte, denominado umbral de fluencia y representado por σ_0 . Cuando los fluidos presentan umbral de fluencia seguido de una respuesta no lineal entre el esfuerzo de corte y el gradiente de velocidad se denomina comportamiento tipo Herschel-Bulkley.

Los modelos matemáticos planteados para describir los diferentes comportamientos de flujo que puede presentar un fluido se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Ecuaciones representativas de los distintos modelos que describen el comportamiento de flujo que puede presentar un líquido.

Modelo	Ecuación
Newtoniano	$\sigma = \eta \cdot \dot{\gamma}$
Ostwald de Waele o Ley de la potencia	$\sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n$
Plástico de Bingham	$\sigma = \sigma_0 + K \cdot \dot{\gamma}$
Herschel-Bulkley	$\sigma = \sigma_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n$

La ecuación de Ostwald de Waele o ley de la potencia cuyos parámetros K y n se denominan índice de consistencia e índice de comportamiento de flujo, respectivamente (Steffe, 1996) es adecuada para el ajuste de los resultados experimentales correspondientes a fluidos pseudoplásticos o dilatantes. En los fluidos pseudoplásticos el parámetro n toma valores entre 0 y menor a 1, mientras que en un fluido dilatante toma un valor mayor a 1.

Para fluidos no newtonianos surge el concepto de viscosidad aparente (η_{ap}). Este parámetro varía con la temperatura y es dependiente del gradiente de velocidad.

$$\eta_{ap} = f(\dot{\gamma}) = \sigma / \dot{\gamma}$$

El comportamiento de flujo de los fluidos no newtonianos además de depender del gradiente de velocidad puede depender del tiempo de aplicación de dicho gradiente. Se habla de fluidos tixotrópicos si la viscosidad desciende con el tiempo de aplicación del gradiente de velocidad, o reopéticos si la viscosidad aumenta.

Por ejemplo en la Figura 4 se muestra un fluido de tipo pseudoplástico sometido a un ciclo de ascenso, mantenimiento y descenso del gradiente de velocidad. A este fluido se lo denomina tixotrópico ya que a un gradiente de velocidad dado la viscosidad disminuye al aumentar el tiempo en que se

aplica ese gradiente. El área encerrada entre las curvas de ascenso y descenso se la denomina área de histéresis.

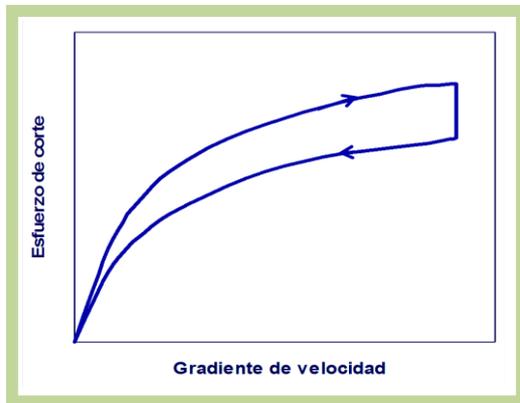


Figura 4: Comportamiento de un fluido pseudoplástico tixotrópico.

La viscosidad aparente, el área de histéresis, y los parámetros de los modelos que se utilizan para caracterizar los distintos tipos de fluidos están relacionados con las interacciones presentes en una matriz (Hassan *et al.*, 2003) por esta razón son de gran importancia a la hora de describir este tipo de sistemas.

1.8.2.- Viscosimetría oscilatoria de pequeña amplitud de deformación

La reometría oscilatoria de pequeña amplitud de deformación se utiliza para caracterizar la estructura de un gel imponiendo pequeñas deformaciones que no rompen la estructura de las muestras evaluadas. En este tipo de ensayos la muestra se coloca entre dos placas y una de ellas oscila a una frecuencia determinada. La perturbación sinusoidal aplicada causa un grado de cizallamiento en ella y la señal de respuesta que se obtiene es diferente en fase y amplitud. Se obtienen dos parámetros: el módulo de almacenamiento G' y el módulo imaginario o módulo de pérdida G'' . El módulo G' se relaciona con la cantidad de energía almacenada elásticamente en la estructura y por lo tanto se asocia al comportamiento

elástico. El módulo G'' es una medida de la pérdida de energía y está asociado al comportamiento viscoso (Pilosof, 2000).

La deformación que sufre el material entre ambas placas se representa con la siguiente ecuación:

$$\gamma = \gamma_0 \text{ sen } (\omega t)$$

donde γ_0 es la máxima deformación aplicada a la muestra, t es el tiempo y ω es la frecuencia de la oscilación.

Con una amplitud de deformación pequeña, de manera que el material se comporte en forma viscoelástica lineal, se obtiene la siguiente tensión de cizalla (o esfuerzo de corte) producida por la deformación de entrada:

$$\sigma = \sigma_0 \text{ sen } (\omega t + \delta)$$

donde σ_0 es la amplitud de tensión de cizalla y δ es el ángulo de desfase entre el esfuerzo aplicado y la respuesta del material.

La relación entre la amplitud de tensión y la amplitud de deformación se denomina módulo complejo (G^*):

$$G^* = \sigma_0 / \delta_0$$

y es la medida de la resistencia total del material a la deformación aplicada.

Para un material perfectamente elástico, la onda de deformación se encontrará en fase con el esfuerzo aplicado mientras que para un fluido viscoso ideal la respuesta a la deformación aplicada estará desfasada en 90° . La gran mayoría de los alimentos, incluidos los geles ácidos lácteos, son materiales viscoelásticos, es decir que tienen un comportamiento intermedio entre el correspondiente al sólido ideal y el del líquido ideal, por lo cual presentan ángulos de desfase entre 0 y 90° .

Los módulos G' y G'' se relacionan con el módulo complejo mediante las siguientes ecuaciones:

$$G' = G^* \cdot \cos \delta$$

$$G'' = G^* \cdot \text{sen } \delta$$

Si un material es puramente viscoso, $G' = 0$ y $G'' = G^*$. En cambio si es puramente elástico $G'' = 0$ y $G' = G^*$. En este sentido, si el ángulo de desfase

es un indicador de la presencia de propiedades elásticas o viscosas de un fluido, se puede establecer que si el valor de δ está comprendido entre 0° y 45° el fluido tiene un comportamiento más elástico que viscoso, o viceversa, cuando δ está comprendido entre 45° y 90° .

Objetivo

- ✓ Seleccionar lactobacilos aislados de kefir capaces de producir exopolisacáridos, caracterizar parcialmente los mismos y compararlos con el kefiran obtenido de gránulo.

Objetivos Específicos:

- ✓ Evaluar la capacidad de producir polisacárido de las cepas de kefir de la colección CIDCA y de los microorganismos aislados en el presente trabajo mediante la evolución de la viscosidad aparente y el comportamiento de flujo de las leches fermentadas.
- ✓ Seleccionar aquellos microorganismos capaces de producir geles ácidos viscosos y aislar y caracterizar estructuralmente los exopolisacáridos producidos.
- ✓ Comparar los polisacáridos seleccionados con el kefiran.

Resultados y discusión

1.- Selección de cepas productoras de polisacáridos.

La selección de cepas productoras de polisacáridos se realizó sobre los microorganismos aislados durante el desarrollo de este trabajo de tesis y sobre microorganismos aislados de kefir pertenecientes a la colección CIDCA capaces de crecer en leche. En total, se estudiaron 24 cepas de *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, 21 cepas de *Lactobacillus plantarum*, 7 cepas de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* (*Lb kefiranofaciens*) y 5 cepas de *Lactobacillus paracasei* (Tabla 2).

Tabla 2: Listado de microorganismos aislados de kefir de la colección CIDCA (Centro de Investigación en Desarrollo y Criotecnología de Alimentos (La Plata, Argentina)) estudiados.

Microorganismos	Nombre
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	CIDCA 8211, CIDCA 8212, CIDCA 8213, CIDCA 8224, CIDCA 8225, CIDCA 8226, CIDCA 8229, CIDCA 8231, CIDCA 8232, CIDCA 8233, CIDCA 8242, CIDCA 8243, CIDCA 8244, CIDCA 8245, CIDCA 8247, CIDCA 8248, CIDCA 8249, CIDCA 82212, CIDCA 82210, CIDCA 8221, CIDCA 8223, CIDCA 8241, CIDCA 8222, CIDCA 8214
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CIDCA 8312, CIDCA 8313, CIDCA 8316, CIDCA 8318, CIDCA 8321, CIDCA 8323, CIDCA 8324, CIDCA 8327, CIDCA 8329, CIDCA 8331, CIDCA 8333, CIDCA 8334, CIDCA 8336, CIDCA 8337, CIDCA 8338, CIDCA 8342, CIDCA 8346, CIDCA 8349, CIDCA 83112, CIDCA 83114, CIDCA 83210
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	CIDCA 83118, CIDCA 83119, CIDCA 83122 y CIDCA 83310, CIDCA 83212, CIDCA 83311, CIDCA 8351 y CIDCA 8371
<i>Lactobacillus paracasei</i>	CIDCA 8339, CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123, CIDCA 83124

Todos los microorganismos fueron inoculados en leche e incubados en sus respectivas condiciones de cultivo tal como se indica en Materiales y Métodos (ítem 6). Se pudo observar que todos fueron capaces de acidificar la leche, alcanzando pHs cercanos a 4 al final de la fermentación.

Como controles de geles ácidos obtenidos con cepas productoras y no productoras de polisacáridos se utilizaron las leches fermentadas con los microorganismos *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 332 y *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 333, aislados de fermentos artesanales que se diferencian en sus capacidades para producir EPS al fermentar la leche y *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* JCM 6985 proveniente de *Japan Collection of Microorganisms* (Reiken, Japan).

Lb delbrueckii subsp *bulgaricus* CIDCA 332 y *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* JCM 6985 son productores de polisacáridos de alto peso molecular cuando se desarrollan en leche y *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 333 no produce polisacáridos de alto peso molecular en las mismas condiciones (Piermaria J., tesis doctoral 2008). Además, se utilizaron geles lácteos formados por acidificación empleando δ -gluconolactona.

Las cepas productoras de EPS tienen la capacidad de modificar las propiedades físicas de las leches fermentadas (Hassan *et al.*, 1996). Estos cambios se ven reflejados en propiedades tales como las características de flujo y viscosidad aparente. Por esta razón se consideró como criterio de selección de microorganismos productores de EPS en leche que, aquellas leches fermentadas que presenten valores de viscosidad aparente mayores a la leche acidificada (geles lácteos formados por la acidificación de la leche con δ -gluconolactona) podrían estar relacionadas con la capacidad de producir exopolisacáridos que poseen las cepas utilizadas para la fermentación.

1.1.- Efecto del pH de las leches fermentadas sobre la viscosidad aparente y el área de histéresis.

El efecto de la acidez sobre las proteínas de la leche es central para la formación del gel lácteo. Durante la fermentación de la leche no siempre se alcanzó el mismo pH final sino que los valores oscilaron en un rango entre 3,6 y 4,5. Para analizar si el rango de pH final de las leches fermentadas en el

que se trabajó tiene un efecto sobre las características de flujo de los geles lácteos, se fermentó la leche con cada microorganismo hasta distintos valores de pH dentro del rango indicado anteriormente y se determinó la viscosidad aparente y el área de histéresis de los geles lácteos obtenidos. En la Figura 5 se presentan, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos con la leche fermentada con *Lb plantarum* CIDCA 8312 determinados en tres ensayos independientes.

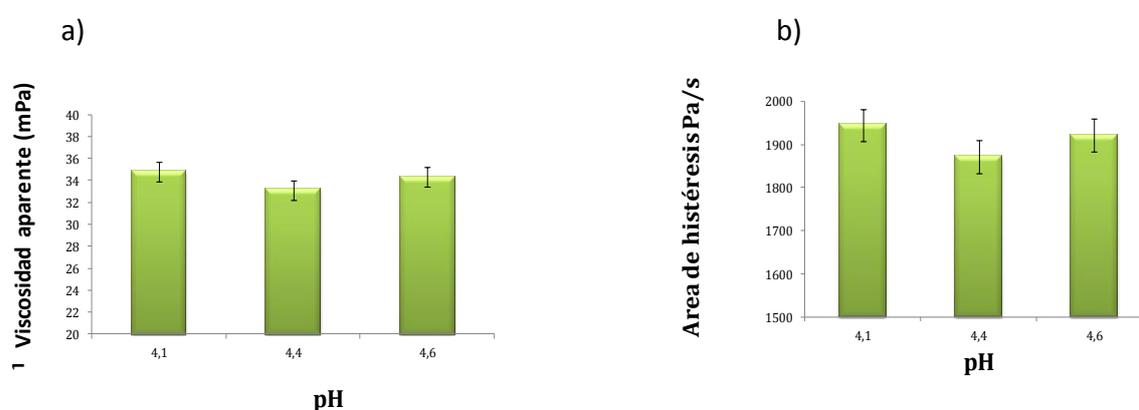


Figura 5: Viscosidad Aparente a 300 s⁻¹ (a), y área de histéresis (b) evaluadas a 25°C en función del pH final de la fermentación para la leche fermentada por *Lb plantarum* CIDCA 8312.

Mediante el análisis estadístico de los datos, se observó que no hay diferencias significativas entre los valores encontrados a los diferentes pHs ($p \leq 0,05$). El mismo comportamiento se halló para todas las cepas estudiadas. Por lo tanto podemos decir que la variación en el pH final de los distintos cultivos en el rango estudiado no tiene un efecto sobre los valores encontrados para los parámetros analizados.

1.2.- Comportamiento de flujo de leche acidificada con δ -gluconolactona y leches fermentadas con *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* y *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens*.

En una primera instancia se analizaron las curvas de flujo correspondientes a la leche control, a la leche acidificada con δ -gluconolactona, y a las leches fermentadas con *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* JCM 6985 (EPS+), *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 333 (EPS-) y *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 332 (EPS+) utilizados como referencia (Figura 6).

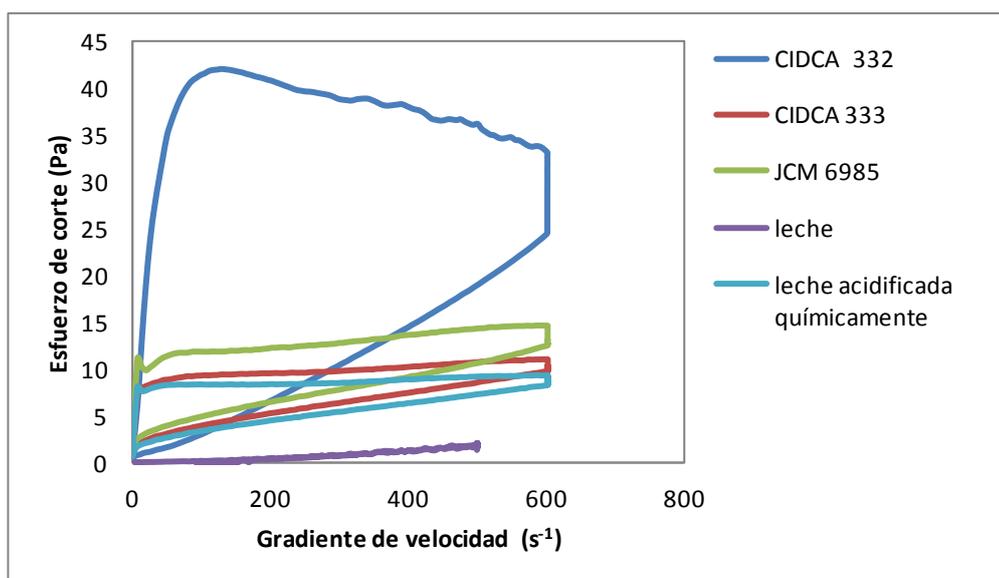


Figura 6: Curvas de flujo a 25°C de leche, leche acidificada y de leches fermentadas con *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 332, *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 333 y *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* JCM 6985.

Puede observarse que las leches fermentadas y la leche acidificada presentaron una curva de flujo que evidenció un comportamiento de tipo pseudoplástico y tixotrópico. La leche control, como era de esperar, presentó un comportamiento de tipo newtoniano.

Debe destacarse que la leche fermentada con la cepa *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 332 (EPS+) muestra valores superiores de esfuerzo de corte, para todos los gradientes de velocidad, que las demás muestras evaluadas.

El área de histéresis, comprendida entre las curvas de esfuerzo de corte correspondientes al ascenso y descenso de gradiente de velocidad de

deformación, es una medida del grado de ruptura estructural que se produce durante el ciclo de aplicación del esfuerzo de corte (Rimada & Abraham, 2006). Como se puede observar en la Figura 6 la leche fermentada con la cepa *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 332 (EPS+) muestra un área de histéresis superior a la del resto de las leches fermentadas y a la de la leche acidificada con δ -gluconolactona. Esta ruptura de la estructura nos permite inferir que existirían interacciones entre las macromoléculas constituyentes de éste gel ácido diferentes a la de los demás geles ácidos evaluados debido posiblemente a los polisacáridos producidos por este microorganismo.

A partir de los valores de esfuerzo de corte en función de γ' , se calculó la viscosidad aparente a 300 s^{-1} y se cuantificó el área de histéresis. Los valores de éstos parámetros encontrados para leche, leche acidificada con δ -gluconolactona y leches fermentadas con las cepas *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 332(EPS+), *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 333 (EPS-) y *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* JCM 6985 (EPS+) se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3: Viscosidad aparente a un gradiente de velocidad de 300 s^{-1} , pH y área de histéresis correspondientes a: leche, leche acidificada con δ -gluconolactona y leches fermentadas con *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 332, *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 333 y *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* JCM 6985 evaluadas a 25°C .

Muestras	pH promedio	Viscosidad Aparente a 300s^{-1} (mPa s)	Área de histéresis (Pa/s)
Leche control	6,5	$2,2 \pm 0,5$	---
Leche acidificada con δ -gluconolactona	4,5	$23,1 \pm 4,6^a$	$1441,4 \pm 132,7^a$
<i>Lb delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> CIDCA 333	4,6	$22,9 \pm 1,6^a$	$1476,5 \pm 137,8^c$
<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp <i>kefiranofaciens</i> JCM 6985	4	$40,7 \pm 2,5^c$	$2905 \pm 186,68^c$
<i>Lb delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> CIDCA 332	3,9	$160,1 \pm 42,4^b$	$18895 \pm 4617,4^b$

* los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$

El valor de viscosidad aparente para la leche control fue de 2,2 mPa.s a 25°C, esto es coincidente con los datos encontrados en bibliografía. Los valores de viscosidad aparente y área de histéresis correspondientes a leche acidificada y fermentada con la cepa *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 333, no productora de polisacáridos (EPS -), no mostraron diferencias significativas entre sí. En cuanto a las leches fermentadas con los microorganismos *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 332 (EPS +) y *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* JCM 6985 (EPS +), mostraron valores de viscosidad aparente y área de histéresis significativamente superiores a los anteriormente mencionados indicando que la producción de EPS por estas cepas contribuye a la viscosidad de la leche fermentada.

1.3.- Comportamiento de flujo de las leches fermentadas con los microorganismos aislados de kefir.

1.3.1.- *Lactococcus lactis* subsp *lactis*

Los geles ácidos obtenidos por fermentación de la leche con cepas de *Lc lactis* subsp *lactis* resultaron ser débiles, observándose sinéresis en la mayoría de ellos. Los valores de pH al final de la fermentación variaron entre 4,0 y 4,5.

En cuanto a la evaluación de las curvas de flujo, se observó que todas las leches fermentadas presentaron comportamiento de flujo no newtoniano, de tipo pseudoplástico. Los valores de viscosidad aparente encontrados para éste grupo de microorganismos varió entre 12,1 mPa s y 25,5 mPa s. El área de histéresis tomó valores en un rango entre 284,5 Pa/s y 1544 Pa/s. Ambos parámetros fueron inferiores al encontrado para la leche acidificada con δ -gluconolactona. Por lo tanto, podemos inferir que el comportamiento de flujo de las leches fermentadas con *Lc lactis* subsp. *lactis* es similar al obtenido por la desestabilización de las caseínas debido al pH indicando que la contribución de los microorganismos a las características de flujo del gel ácido es sólo debida a la acidificación de la leche (Tabla 4).

Tabla 4: Viscosidad aparente a 300 s⁻¹, pH y área de histéresis de leches fermentadas con cepas de *Lc lactis* subsp *lactis* y leche acidificada con δ -gluconolactona evaluadas a 25°C.

Muestras	pH promedio	Viscosidad Aparente a 300s ⁻¹ (mPa s)	Area de histéresis (Pa/s)
Leche acidificada con δ -gluconolactona	4,5	23,1 ± 4,6	1441,4 ± 132,7
CIDCA 8211	4,1	12,1±1,0	284,5±12,1
CIDCA 8212	4,6	16,1±1,1	380,6±13,1
CIDCA 8213	4,2	18,3±1,1	509,9±20,1
CIDCA 8224	4,1	20,8±1,2	626,3±41,2
CIDCA 8225	4,0	19,6±0,9	596,6±32,6
CIDCA 8226	3,9	18,1±1,1	522,9±29,4
CIDCA 8229	4,4	23,1±1,3	1219±99,9
CIDCA 8231	4,2	20,8±0,8	656,6±44,1
CIDCA 8232	4,3	18,4±1,1	547,6±33,9
CIDCA 8233	4,0	20,4±1,4	578,2±45,9
CIDCA 8242	4,3	20,3±2,1	707,3±51,1
CIDCA 8243	4,3	15,9±1,1	460,5±22,5
CIDCA 8244	4,0	23,8±1,1	633,7±49,8
CIDCA 8245	4,3	15,5±1,9	398,3±33,5
CIDCA 8247	4,1	18,8±1,5	304,9±29,2
CIDCA 8248	4,0	25,5±1,2	1544±110,1
CIDCA 82212	4,5	16,8±2,1	424,5±29,2
CIDCA 82210	4,3	17,7±1,1	521,9±44,8
CIDCA 8221	4,2	16,1±1,6	374±22,1
CIDCA 8223	4,2	21,1±2,3	660,6±55,2
CIDCA 8241	4,3	21,1±2,6	595,9±44,9
CIDCA 8222	4,4	17,8±1,9	511,0±67,2

1.3.2.- *Lactobacillus plantarum*

Las leches fermentadas con 21 cepas de *Lb plantarum* presentaron el aspecto de geles ácidos firmes y valores de pH, al final de la fermentación, que variaron entre 4,2 y 4,5.

Las curvas de flujo de las leches fermentadas por éste grupo de microorganismos mostraron comportamiento pseudoplástico.

La viscosidad aparente tomó valores que variaron entre 25,4 mPa s y 35,3 mPa s. En cuanto al el área de histéresis los valores se encontraron en un rango entre 1387 Pa/s y 1937,3 Pa/s (Tabla 5). Las leches fermentadas por las cepas de *Lb plantarum*, presentaron valores de ambos parámetros cercanos al hallado al evaluar la leche acidificada con δ -gluconolactona, no observándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) mediante análisis estadístico indicando que las leches fermentadas por *Lb plantarun* solo presentan la textura característica dada por la desestabilización de las caseínas debido a la acidificación de la leche.

Tabla 5: Viscosidad aparente a 300 s⁻¹, pH y área de histéresis de leches fermentadas con cepas de *Lb plantarum* y leche acidificada con δ -gluconolactona evaluadas a 25°C.

Muestras	pH promedio	Viscosidad Aparente a 300s ⁻¹ (mPa s)	Área de histéresis (Pa/s)
Leche acidificada con δ -gluconolactona	4,5	23,1 ± 4,6 ^a	1441,4 ± 132,7 ^a
CIDCA 8312	4,8	34,1 ± 0,9 ^a	1922,7 ± 37,8 ^a
CIDCA 8313	4,4	31,1 ± 1,5 ^a	1686,7 ± 67,42 ^a
CIDCA 8316	4,4	29,4 ± 6,6 ^a	1550,7 ± 382,40 ^a
CIDCA 8318	4,2	35,3 ± 4,7 ^a	1937,3 ± 367,3 ^a
CIDCA 8323	4,3	31,9 ± 3,7 ^a	1840,0 ± 206,5 ^a
CIDCA 8324	4,3	26,3 ± 8,2 ^a	1412,3 ± 411,2 ^a
CIDCA 8327	4,2	31,1 ± 5,1 ^a	1676,7 ± 409,2 ^a
CIDCA 8329	4,4	28,4 ± 3,7 ^a	1467,3 ± 239,9 ^a
CIDCA 8331	4,3	30,5 ± 2,8 ^a	1628,3 ± 201,2 ^a
CIDCA 8333	4,5	27,9 ± 0,6 ^a	1548,3 ± 63,1 ^a
CIDCA 8334	4,9	30,5 ± 4,7 ^a	1615 ± 305,8 ^a
CIDCA 8336	4,2	33,3 ± 0,5 ^a	1759 ± 18,4 ^a
CIDCA 8337	4,3	30,6 ± 4,1 ^a	1667,7 ± 272,7 ^a
CIDCA 8338	4,8	31,6 ± 4,9 ^a	1707,7 ± 292,1 ^a
CIDCA 8342	4,6	29,9 ± 6,2 ^a	1575,7 ± 447,1 ^a
CIDCA 8346	4,2	25,4 ± 4,4 ^a	1387 ± 142,8 ^a
CIDCA 8349	4,5	29,7 ± 0,4 ^a	1570,3 ± 35,50 ^a
CIDCA 83112	4,3	31,9 ± 6,0 ^a	1669,7 ± 253,8 ^a
CIDCA 83114	4,2	29,3 ± 4,7 ^a	1575,7 ± 243,0 ^a
CIDCA 83210	4,9	28,1 ± 1,6 ^a	1495,67 ± 82,5 ^a

* los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes con p ≤ 0,05

1.3.3.- *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*

El pH al final de la fermentación de la leche por éstos microorganismos osciló en un rango entre 3,7 y 4,2. Las leches fermentadas por las cepas de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* presentaron, desde el punto de vista macroscópico, diferentes tipos de geles ácidos. Los geles ácidos obtenidos por fermentación de la leche con las cepas CIDCA 83118, CIDCA 83119, CIDCA 83122 y CIDCA 83310 fueron más firmes y de mayor consistencia que los geles obtenidos por fermentación de la leche con las cepas de las especies *Lb plantarum* y *Lc lactis* subsp *lactis*. Por el contrario, las leches fermentadas con las cepas CIDCA 83212, CIDCA 83311, CIDCA 8351 y CIDCA 8371 formaron geles débiles. Además se observó que la leche fermentada con la cepa de referencia *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* JCM 6985 presentó una consistencia más viscosa que la observada para las leches fermentadas con cepas de la misma especie aisladas a partir de los gránulos del CIDCA.

Las curvas de flujo mostraron una dependencia del esfuerzo de corte con el gradiente de velocidad característica del comportamiento de flujo pseudoplástico.

En la Tabla 6 se muestran los valores de viscosidad aparente ($300s^{-1}$) y área de histéresis encontrados para los geles ácidos producidos por las cepas de *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* aisladas de kefir.

Tabla 6: Viscosidad aparente a 300 s⁻¹, pH y área de histéresis evaluadas a 25°C de leches fermentadas con cepas de *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* y la leche acidificada con δ -gluconolactona.

Muestras	pH promedio	Viscosidad Aparente a 300s ⁻¹ (mPa s)	Área de histéresis (Pa/s)
Leche acidificada con δ -gluconolactona	4,5	23,1 \pm 4,6 ^a	1441,4 \pm 132,7 ^a
<i>Lb kefiranofaciens</i> JCM 6985	4,0	40,7 \pm 2,5 ^c	2905,0 \pm 186,7 ^c
CIDCA 83118	3,9	34,7 \pm 1,5 ^b	1654,5 \pm 43,1 ^a
CIDCA 83119	3,8	29,5 \pm 6,5 ^b	1453,5 \pm 325,9 ^a
CIDCA 83122	3,7	35,9 \pm 10,1 ^b	1861,0 \pm 613,8 ^b
CIDCA 83211	4,1	18,5 \pm 2,2 ^a	836,3 \pm 76,2 ^a
CIDCA 83212	4,1	20,4 \pm 1,2 ^a	902,7 \pm 58,7 ^a
CIDCA 83310	3,8	28,1 \pm 2,2 ^a	1402,5 \pm 67,2 ^a
CIDCA 83311	3,9	17,8 \pm 1,0 ^a	745,2 \pm 35,6 ^a
CIDCA 8351	4,2	22,3 \pm 0,9 ^a	1020,7 \pm 68,3 ^a
CIDCA 8371	4,1	14,1 \pm 0,1 ^a	619,6 \pm 19,3 ^a

* los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$

La viscosidad aparente de las leches fermentadas con los aislados de *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* tomó valores entre 14,1 y 36,0 mPa s. En las leches fermentadas con las cepas CIDCA 83118, CIDCA 83119 y CIDCA 83122 este parámetro resultó ser significativamente superior al de la leche acidificada. El área de histéresis varió entre 619,6 y 1861,0 Pa/s. Solo para la cepa CIDCA 83122 se halló un valor significativamente superior al encontrado para la leche acidificada con δ -gluconolactona.

Las leches fermentadas con las cepas CIDCA 83211, CIDCA 83212, CIDCA 83311, CIDCA 8351 y CIDCA 8371 presentaron valores, para ambos parámetros, inferiores a los observados para la leche acidificada. Estos resultados indicarían que dentro de los aislados de *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* se encuentran cepas que difieren, al menos, en su capacidad

de producir sustancias que modifican la viscosidad de las leches fermentadas. Sin embargo ninguna de las leches fermentadas con los *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* aislados en este trabajo presentó las mismas características viscosas que las cepas de colección.

1.3.4.- *Lactobacillus paracasei*

Las leches fermentadas con las cepas de *Lb paracasei* mostraron el aspecto de geles ácidos muy consistentes, viscosos y filantes, características no observadas en las leches fermentadas por las especies anteriormente analizadas. La evaluación de las curvas de flujo mostró que todas se comportaron como fluidos pseudoplásticos.

La Tabla 7 muestra los valores de viscosidad aparente y área de histéresis para las leches fermentadas con estas cepas. Los valores encontrados variaron en un rango entre 45,9 y 90,8 mPa s para la viscosidad aparente y entre 3263,5 y 9181,5 Pa/s para el área de histéresis. Ambos parámetros resultaron ser significativamente superiores a los encontrados para la leche acidificada con δ -gluconolactona en todas las muestras evaluadas.

Tabla 7: Viscosidad aparente a 300 s⁻¹, pH y área de histéresis evaluadas a 25°C de leches fermentadas con cepas de *Lb paracasei* y leche acidificada con δ gluconolactona.

Muestras	pH promedio	Viscosidad Aparente a 300s ⁻¹ (mPa s)	Área de histéresis (Pa/s)
Leche acidificada con δ gluconolactona.	4,5	23,1 ± 4,6 ^a	1441,4 ± 132,7 ^a
CIDCA 8339	4,0	45,8 ± 15,9 ^b	3718,5 ± 1358 ^b
CIDCA 83120	3,6	51,9 ± 1,9 ^b	3263,5 ± 88,4 ^b
CIDCA 83121	3,8	59,4 ± 1,8 ^b	4202 ± 56,6 ^b
CIDCA 83123	3,7	90,8 ± 0,9 ^b	9181,5 ± 21,9 ^b
CIDCA 83124	3,7	50,1 ± 12,1 ^b	4167,5 ± 946,8 ^b

* los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$

A fin de comparar las características de flujo de las leches fermentadas por *Lc lactis* subsp *lactis* CIDCA, *Lb plantarum*, *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* y *Lb paracasei* se seleccionó un microorganismo como representante de cada grupo. Las cepas elegidas fueron aquellas cuyas leches fermentadas presentaron el mayor valor para los parámetros estudiados (viscosidad aparente y área de histéresis) dentro de cada especie a saber: *Lc lactis* subsp *lactis* CIDCA 8248, *Lb plantarum* CIDCA 8318, *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* CIDCA 83122 y *Lb paracasei* CIDCA 83123. En la Figura 7 se presentan, a modo de ejemplo, las curvas de flujo obtenidas a partir de las leches fermentadas por las cepas seleccionadas.

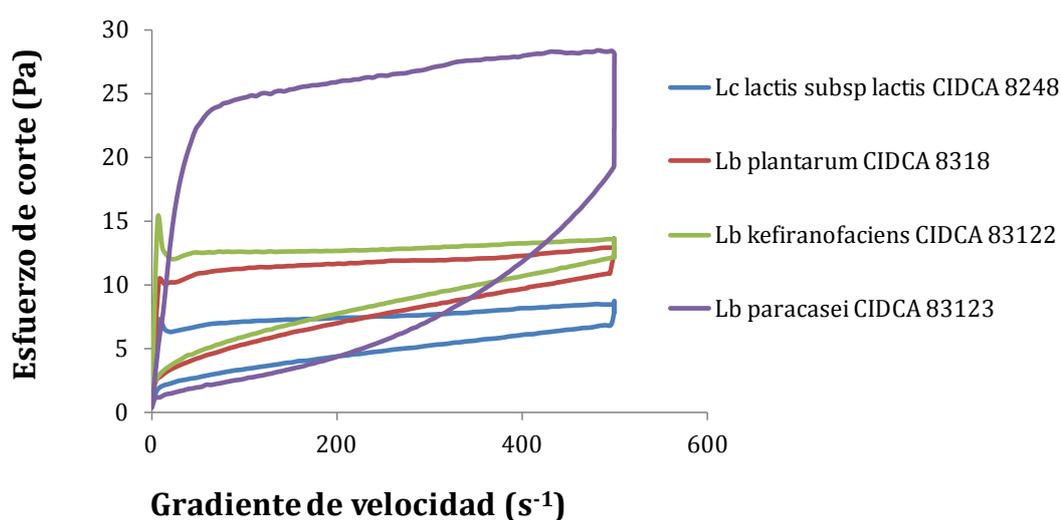


Figura 7: Curvas de flujo de las leches fermentadas con los microorganismos *Lc lactis* subsp. *lactis* CIDCA 8248, *Lb plantarum* CIDCA 8318, *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* CIDCA 83122 y *Lb paracasei* CIDCA 83123 evaluadas a 25°C.

Los valores de viscosidad aparente y área de histéresis obtenidos de las curvas de flujo anteriormente descritas junto con los datos correspondientes a la leche acidificada con δ -gluconolactona y a la leche fermentada con *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* JCM 6985 se presentan en la Figura 8.

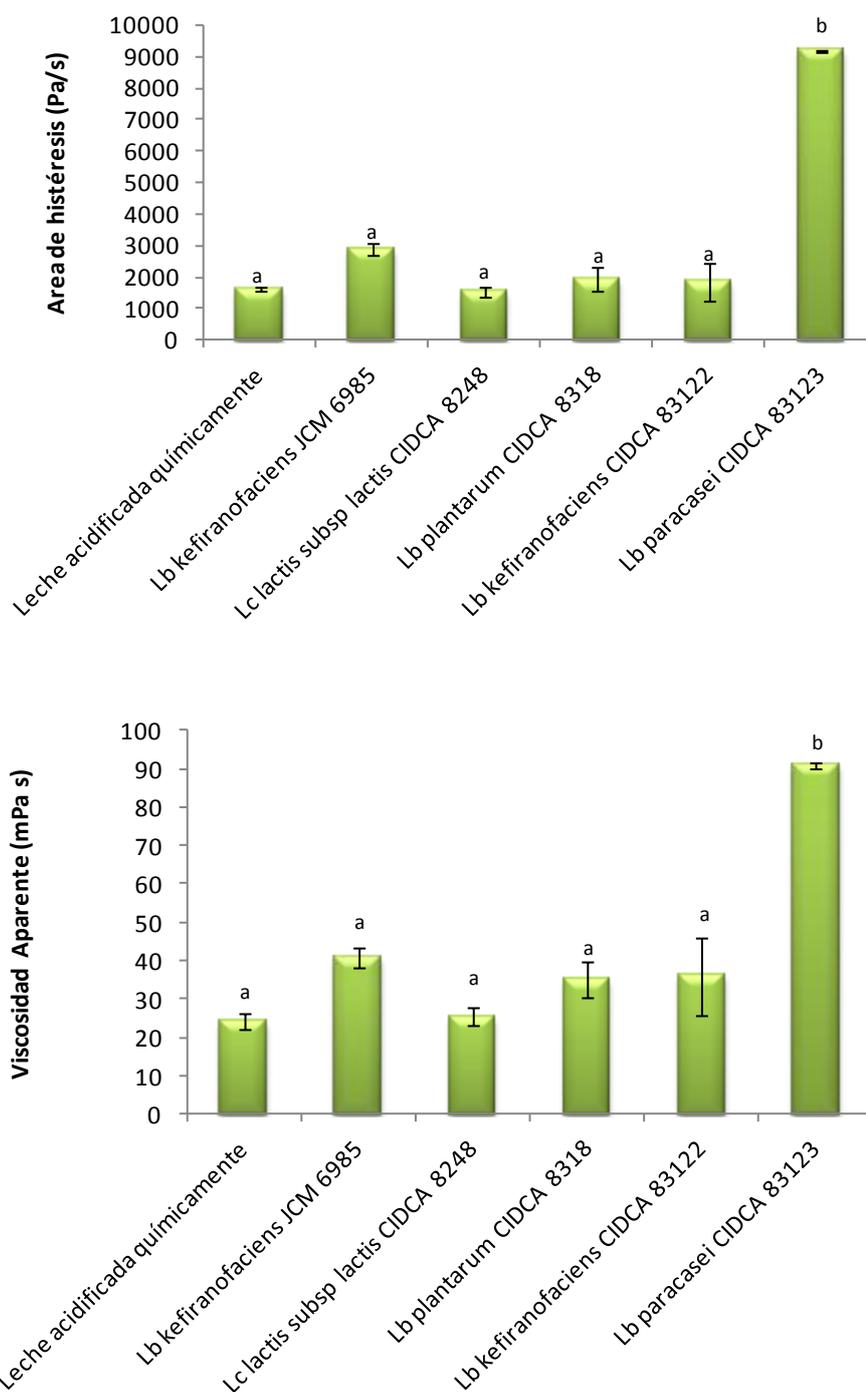


Figura 8: Viscosidad aparente (mPa.s) (a) evaluada a 300 s^{-1} y Área de histéresis (Pa/s) (b) de la leche acidificada con δ -gluconolactona y las leches fermentadas con *Lc lactis* subsp *lactis* CIDCA 8248, *Lb plantarum* 8318, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* 83122, *Lb paracasei* 83123, *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 332 y *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* JCM 6985.

* los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$

Los valores de viscosidad aparente y área de histéresis obtenidos a partir de las curvas de flujo de la leche fermentada con la cepa *Lb paracasei*

CIDCA 83123 fueron diferentes significativamente de los correspondientes a las demás leches fermentadas. Si ampliamos este análisis a las leches fermentadas con todos los microorganismos incluidos en este estudio surge que sólo las leches fermentadas con las cepas de *Lb paracasei* presentan comportamientos de flujo diferentes al observado para la leche acidificada con δ -gluconolactona ($p \leq 0,05$). Para completar la caracterización del comportamiento de flujo de las leches fermentadas por éste grupo de microorganismos, las curvas de flujo fueron ajustadas utilizando el modelo de Ostwald de Waele o ley de la potencia. La ecuación correspondiente a dicho modelo es:

$$\sigma = K \cdot \gamma^n$$

donde al parámetro K se lo denomina índice de consistencia y n representa el índice de comportamiento de flujo (Steffe, 1996).

En la Tabla 8 se observan los valores encontrados de ambos parámetros para las leches fermentadas con los *Lb paracasei* (CIDCA 3839, CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123 y CIDCA 83124), *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* (CIDCA 332 (EPS+) y CIDCA 333 (EPS -)), *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985 (EPS+) y la leche acidificada con δ -gluconolactona. Como se puede observar los valores de K de la leche fermentada con *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 333 (EPS-) posee un valor inferior a los encontrados para las leches fermentadas con los microorganismos del grupo *Lb paracasei* y las cepas EPS+: *Lb delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 332 (EPS+) y *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985 (EPS+).

Los parámetros n y K fueron utilizado para evaluar la leche fermentada obtenida con fermentos para yogurt con distinta capacidad para producir EPS, es así que Hassan *et al.* (2003) utilizando yogures con *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* y *St thermophilus* cuya capacidad de producir EPS fue modificada encontraron que las leches fermentadas con las cepas

mutantes (EPS-) presentaron un índice de consistencia inferior al obtenido cuando se usaron las mismas cepas salvajes (EPS+).

En cuanto al valor del índice de comportamiento de flujo (n), resultó ser menor que 1, evidenciando comportamiento pseudoplástico tal como se esperaba.

Tabla 8: Valores de los parámetros n (índice de comportamiento de flujo) y K (índice de consistencia) obtenidos a partir de la ecuación de Ostwald de Waele para las leches fermentadas con los microorganismos de los grupos *Lb paracasei* (CIDCA 3839, CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123 y CIDCA 83124), *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* (CIDCA 332 (EPS+) y CIDCA 333 (EPS -)), *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985 (EPS+) y la leche acidificada con δ -gluconolactona.

Muestras	Índice de Consistencia=K (Pa s ⁿ)	Índice de Comportamiento de Flujo=n
Leche acidificada	2,4±1,2	0,11± 0,08
<i>Lb paracasei</i> CIDCA 8339	9,8±3,1	0,06±0,01
<i>Lb paracasei</i> CIDCA 83120	5,1±0,3	0,19±0,02
<i>Lb paracasei</i> CIDCA 83121	4,9±0,6	0,23±0,03
<i>Lb paracasei</i> CIDCA 83123	17,6±0,9	0,07±0,01
<i>Lb paracasei</i> CIDCA 83124	6,8±1,8	0,14±0,01
<i>Lb delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> CIDCA 332	61,5±0,3	0,08±0,01
<i>Lb delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> CIDCA 333	3,3±0,5	0,16±0,01
<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> JCM 6985	8,2±0,8	0,08±0,01

Se sabe que los EPS producidos por las bacterias al fermentar la leche afectan las propiedades fisicoquímicas del producto. Estos cambios están influenciados por las características propias del EPS, por los cambios que se producen en la agregación de las proteínas y por las interacciones entre los constituyentes de la leche, los EPS y la superficies de las paredes bacterianas (Marshall & Rawson, 1999). De acuerdo a los resultados presentados anteriormente se observan leches fermentadas con viscosidades superiores (mayor viscosidad aparente) y mayor área de histéresis cuando se utilizan los microorganismos pertenecientes a la especie *Lb paracasei* para la fermentación de la leche. Estos resultados indicarían una interacción distinta entre las macromoléculas constituyentes de dichos geles lácteos, lo cual podría estar vinculado a la contribución de polisacáridos producidos por estos microorganismos (Hassan *et al.*, 2003; Rimada & Abraham, 2006).

2.- Caracterización de las leches fermentadas mediante reometría oscilatoria de pequeña amplitud de deformación.

Las leches fermentadas con los microorganismos de las especies *Lb kefiranofaciens* y *Lb paracasei* se analizaron mediante reometría oscilatoria de baja amplitud de deformación. Esta selección se basó en que, según bibliografía, *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* es responsable de la producción del EPS kefiran (Kooiman, 1968), y las cepas de *Lb paracasei* resultaron ser las que produjeron geles lácteos ácidos con mayor viscosidad aparente. Esta técnica consiste en la aplicación de pequeñas amplitudes de deformación de manera tal de no romper la estructura de las muestras evaluadas y permite analizar el comportamiento viscoelástico de dichos geles. El módulo elástico o de almacenamiento (G') y el módulo viscoso o de pérdida (G'') son parámetros que caracterizan a este tipo de materiales (Steffe, 1996).

Para analizar el carácter viscoelástico de las muestras es necesario establecer inicialmente las deformaciones o esfuerzos para los cuales el

material no sufre ruptura, que se denomina rango de viscoelasticidad lineal. En este rango los parámetros G' y G'' no varían con el esfuerzo aplicado. Para ello se efectuaron barridos de esfuerzo de las leches fermentadas con los microorganismos en estudio. En la Figura 9 se presenta, a modo de ejemplo, el barrido de esfuerzo correspondiente a la leche fermentada con la cepa *Lb paracasei* CIDCA 8339. Se observó que, para esfuerzos menores a 1 Pa los módulos elástico y viscoso fueron independientes del esfuerzo aplicado razón por la cual se trabajó en esa zona para realizar los barridos de frecuencia. Estos resultados fueron equivalentes para todos los geles ácidos evaluados.

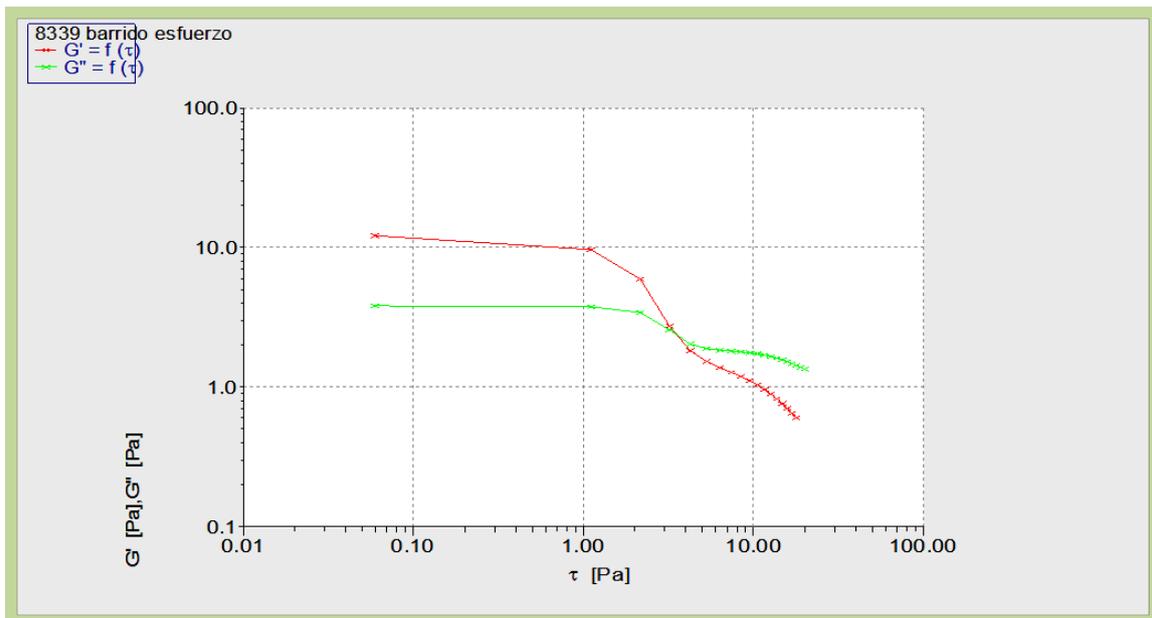


Figura 9: Barrido de esfuerzo de la leche fermentada con la cepa *Lb paracasei* CIDCA 8339 a 25°C.

Las leches fermentadas con las cepas pertenecientes a la especie *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* y las leches fermentadas con las cepas de *Lb paracasei*, CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83124 y CIDCA 8339 presentaron espectros mecánicos similares. En todos ellos el módulo elástico (G') resultó mayor al módulo viscoso (G'') en todo el rango de

frecuencia estudiado mostrando ambos módulos baja dependencia con la frecuencia. Estos espectros mecánicos definen un comportamiento característico de gel (Ross-Murphy, 1995). Esta conducta se diferencia de la encontrada para la leche fermentada con *Lb paracasei* CIDCA 83123.

En la Figura 10 se grafican, a modo de ejemplo, los módulos elástico y viscoso en función de la frecuencia de oscilación para las leches fermentadas con las cepas *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* CIDCA 83118 y *Lb paracasei* CIDCA 83120 y CIDCA 83123 a un esfuerzo definido (1Pa) dentro del rango de viscoelasticidad lineal. A este tipo de gráfica se la denomina espectro mecánico.

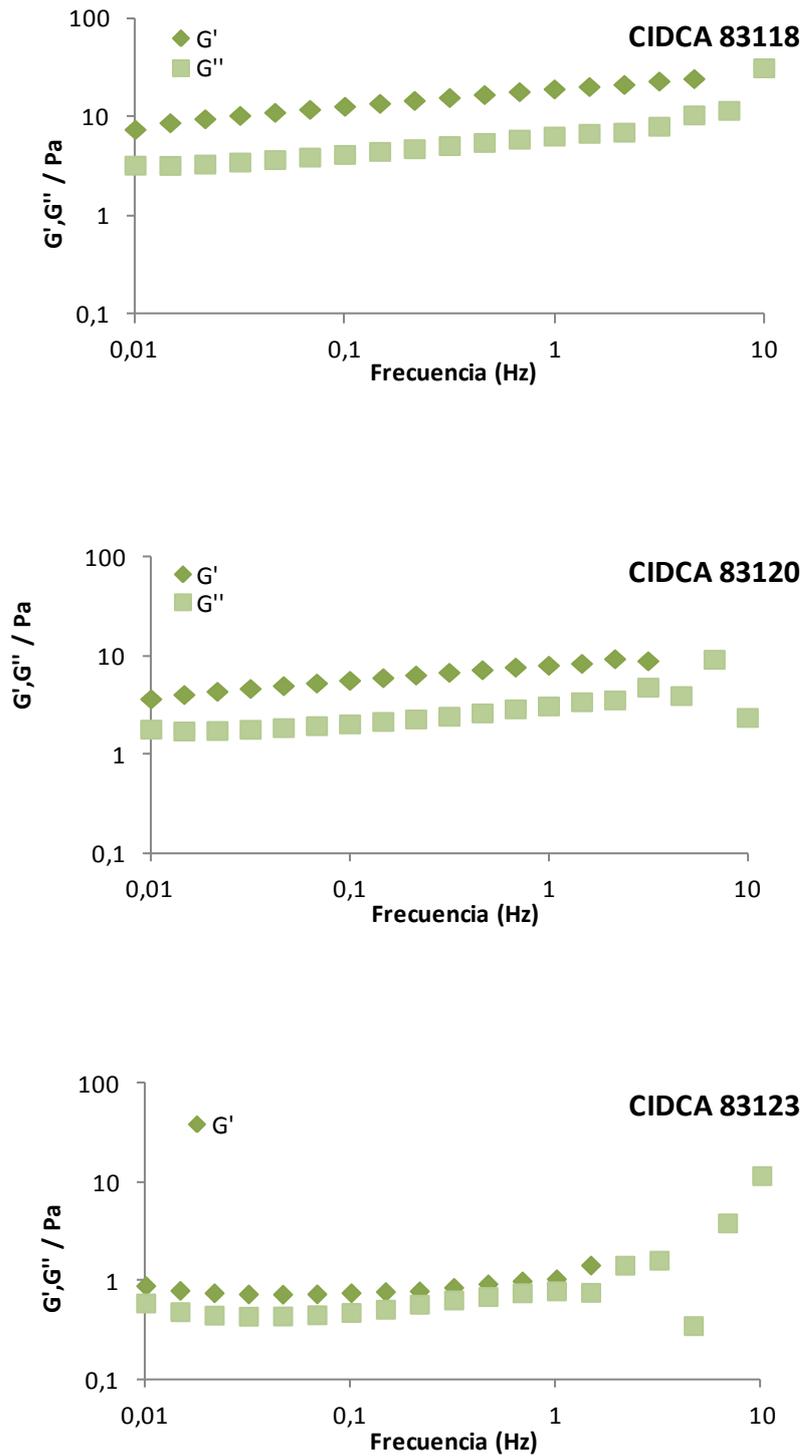


Figura 10: Espectro mecánico (módulos elástico y viscoso en función de la frecuencia) correspondiente a leche fermentada con la cepa de *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* CIDCA 83118, y *Lb paracasei* CIDCA 83120 y CIDCA 83123 efectuado a un esfuerzo fijo de 0,5 Pa y 25°C.

En la Tabla 9 se presentan los valores de dichos módulos a la frecuencia de 1Hz junto al correspondiente valor de la tangente del ángulo de desfase ($\tan\delta = G''/G'$).

Los valores de tangente de δ ($\tan \delta$) se encontraron en un rango entre 0,3 y 0,5 para todas las leches fermentadas evaluadas, excepto para la leche fermentada por *Lb paracasei* CIDCA 83123, cuyo valor de $\tan \delta$ es significativamente superior ($0,81 \pm 0,07$), por lo tanto, podemos decir que esta leche fermentada posee un menor carácter elástico. Además, todos los valores de G' resultaron superiores entre dos y tres veces al correspondiente valor de G'' , excepto para la leche fermentada por *Lb paracasei* CIDCA 83123. En esta última los valores de G' y G'' no difirieron mucho entre sí y resultaron inferiores a los observados para las demás leches fermentadas evaluadas.

Tabla 9: Modulo elástico (G'), módulo viscoso (G''), y tangente del ángulo de desfasaje ($\tan \delta$) medidos a 1 Hz, de las leches fermentadas por cepas de *Lb paracasei* y *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*.

Especie	Cepa	f [Hz]	G' [Pa]	G'' [Pa]	$\tan(\delta)$
Leche acidificada		1	13	5,7	0,4
<i>Lb paracasei</i>	CIDCA 83120	1	8,60±0,63	3,24±0,11	0,38±0,01
	CIDCA 83121	1	16,54±0,37	5,21±0,54	0,32±0,04
	CIDCA 83123	1	0,86±0,27	0,68±0,16	0,81±0,07
	CIDCA 83124	1	5,36±5,08	2,13±1,4	0,49±0,20
	CIDCA 8339	1	16,49±0,40	5,224±0,61	0,317±0,12
<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	CIDCA 8352	1	8,304	2,974	0,358
	CIDCA 8371	1	3,09±0,96	1,23±0,19	0,40±0,06
	CIDCA 83118	1	19,17	6,384	0,333
	CIDCA 83119	1	14,6±3,5	4,85±0,74	0,33±0,03
	CIDCA 83122	1	14,23±1,24	5,16±1,12	0,36±0,05
	CIDCA 83211	1	15,16	4,70	0,31
	CIDCA 83212	1	9,66±0,10	2,96±0,03	0,31±0,01
	CIDCA 83310	1	12,49±3,85	4,51±1,18	0,36±0,02
CIDCA 83311	1	14,64±6,48	4,41±1,98	0,30±0,01	

Si relacionamos estos parámetros con los encontrados por viscosimetría rotacional podemos decir que las leches fermentadas con las cepas de *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* y *Lb paracasei* generan geles ácidos similares pero con viscosidades diferentes. La viscosidad aparente de las leches fermentadas por las cepas de *Lb paracasei* es mayor a la encontrada para las leches fermentadas por las cepas de *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* (Tabla 6 y Tabla 7). Además, la leche fermentada por la *Lb paracasei* CIDCA 83123 mostró un gel menos elástico pero más viscosas que el resto de las leches evaluadas.

Esto demuestra que las leches fermentadas con microorganismos que fueron capaces de incrementar la viscosidad presentan propiedades reológicas dinámicas que son dependientes de cada cepa y de las características de los polisacáridos que producen. Otros autores también observaron este comportamiento. Folkenberg *et al.*, (2006) encontraron que las leches fermentadas con cepas iniciadoras del yogurt productoras de EPS resultaban más viscosas y que poseen mayor módulo elástico. Hassan *et al.* (2003) describieron geles generados por bacterias productoras de EPS que presentaron valores de $\tan \delta$ menores que los correspondientes a geles lácteos formados por bacterias no productoras de EPS. Rohm & Kovac (1994) encontraron mayores valores de $\tan \delta$ en el caso de geles lácteos altamente viscosas.

3.- Aislamiento y caracterización de polisacáridos.

Dentro de los parámetros que afectan las características de textura de los geles lácteos se encuentran la cantidad de polisacárido producido por los microorganismos durante la fermentación y las características fisicoquímicas de los mismos. Por esta razón se cuantificó la concentración de EPS producido por cada microorganismo durante la fermentación de la leche y posteriormente se procedió a su caracterización.

3.1.- Cuantificación de la producción de polisacáridos durante la fermentación de la leche.

A fin de relacionar las características reológicas observadas con la cantidad de EPS producido por cada cepa, durante su desarrollo en leche, se procedió a su cuantificación. La metodología empleada, previamente descrita en Materiales y Métodos ítem 22.1, utiliza dos precipitaciones con alcohol frío y diálisis (Rimada & Abraham, 2003). En ésta técnica, las etapas de precipitación con etanol permiten eliminar proteínas y la diálisis separa la lactosa que, de lo contrario, interferiría en la reacción química usada para la cuantificación de los EPS.

En los extractos obtenidos se determinó la presencia de proteínas utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976) y se verificó la ausencia de monosacáridos y disacáridos mediante cromatografía en capa fina (TLC). La cuantificación de los polisacáridos se llevó a cabo utilizando el método de antrona (Southgate, 1976).

Las soluciones de polisacáridos obtenidas presentaron una concentración de proteínas 10 veces menor que de polisacárido, hecho que no interfiere en la determinación de hidratos de carbono por el método de antrona. Además se demostró ausencia de mono y disacáridos que sí interferirían, en caso de estar presentes, con la determinación.

La cantidad de polisacárido expresada en miligramos de polisacárido por litro de leche fermentada se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10: Cantidad de polisacárido (expresada en mg/l) obtenida a partir de leche fermentada con distintos microorganismos.

Microorganismo	Muestras	Concentración (mg/L)
<i>Lc lactis</i> subsp <i>lactis</i>	CIDCA 8212	167,5
	CIDCA 8224	209,5
	CIDCA8225	189,5
	CIDCA 8226	167,2
	CIDCA 8244	139,3
<i>Lb plantarum</i>	CIDCA 8318	180,7
	CIDCA 8324	145,35
	CIDCA 8342	166,1
<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp <i>kefiranofaciens</i>	JCM 6985	110,1
	CIDCA 8351	111,9
	CIDCA 8371	85,12
	CIDCA 83118	202,4
	CIDCA 83119	301,9
	CIDCA 83122	198,2
	CIDCA 83211	112,9
	CIDCA 83212	125,9
	CIDCA 83310	178,9
	CIDCA 83311	183,2
<i>Lb paracasei</i>	CIDCA 8339	145,2
	CIDCA 83120	198,9
	CIDCA 83121	234,9
	CIDCA 83123	159,4
	CIDCA 83124	209,3

Se puede observar que los microorganismos estudiados producen cantidades de EPS que varían entre 85,1 y 301,9 mg/l. Este rango de valores se encuentra dentro de los esperados, ya que la producción de HePS por BAL

es normalmente muy baja y los valores se hallan entre 25 y 600 mg/l (Ruas-Madiedo *et al.*, 2008).

Si relacionamos la viscosidad de las leches fermentadas por éstos microorganismos con la cantidad de EPS producidos, podemos ver que no existe una relación directa entre ambos parámetros. Por ejemplo cepas donde se observó alta producción de EPS, como CIDCA 83119, presenta baja viscosidad aparente en su leche fermentada y cepas con baja producción de EPS, como CIDCA 83123, producen valores de viscosidad aparente altos en sus leches fermentadas. Además, cepas que producen igual concentración de polisacárido generan leches fermentadas con viscosidades diferentes (por ejemplo: CIDCA 83123 y CIDCA 8342). Estos resultados se resumen en la Figura 11. Otros factores que podrían influir en la viscosidad de las leches fermentadas son la composición de monosacáridos, cargas, tipos de uniones, peso molecular, radio de giro y ramificaciones del EPS que definen las interacciones entre sí y con las proteínas de la leche.

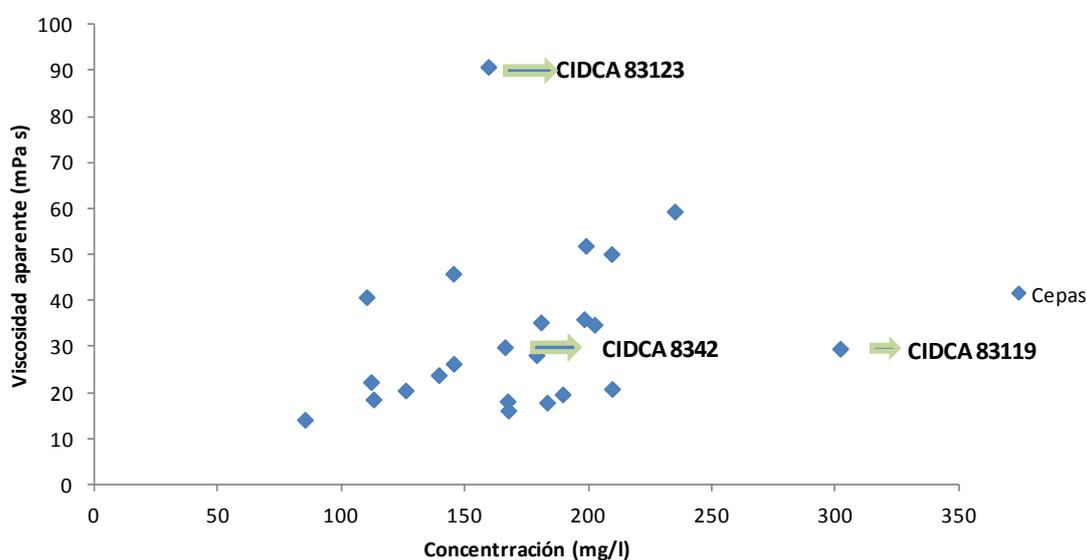


Figura 11: Viscosidad aparente medida a 300 s⁻¹ de leches fermentadas en función de la concentración de polisacárido.

3.2.- Peso molecular de los polisacáridos.

Una de las características fisicoquímicas estudiadas fue la distribución de peso molecular (PM) de los polisacáridos obtenidos a partir de las leches fermentadas por las distintas cepas. Se utilizó cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con una columna de exclusión molecular que permite separar moléculas por tamaño en el rango de 10^4 - 10^6 Da.

Para analizar los cromatogramas obtenidos se realizó previamente una curva de calibración con dextranos de peso molecular conocido. Los dextranos utilizados tienen valores de PM en el rango 97.000-3.800.000 Da. Los datos experimentales de tiempo de retención y PM fueron luego ajustados a una recta con una progresión lineal (Figura 12).

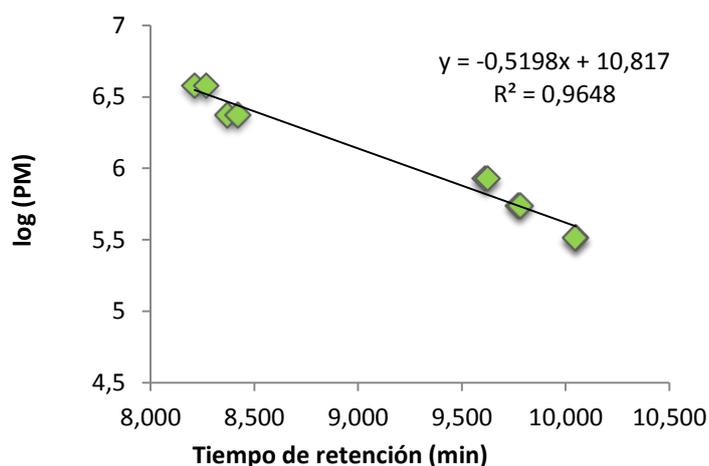


Figura 12: Valores experimentales y recta de regresión correspondiente a los logaritmos de los pesos moleculares de los patrones de dextranos en función del tiempo de retención, medidos por HPLC de permeación en gel.

Las soluciones de polisacáridos obtenidas a partir de las leches fermentadas con *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *Lb paracasei* y *Lb plantarum* presentaron cromatogramas que muestran entre 1 y 3 picos a diferentes tiempos de retención. Esto indicaría la presencia de polisacáridos

de diferente grado de polimerización y en consecuencia diferente peso molecular.

En la Figura 13 se observa el cromatograma obtenido para los polisacáridos aislados de las leches fermentadas con los microorganismos *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* CIDCA 83118 (a) y *Lb paracasei* CIDCA 83123 (b).

El EPS producido por *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* presentó un cromatograma donde se observan dos picos a tiempos de retención mayores que los obtenidos para el dextrano de menor peso molecular indicando que esta cepa produciría oligosacáridos pequeños, cuyo peso molecular es inferior a 10^4 Da.

El cromatograma obtenido a partir de la solución de EPS proveniente de leche fermentada con *Lb paracasei* CIDCA 83123 mostró 3 distribuciones de pesos moleculares. Como puede observarse, el polisacárido de mayor peso molecular eluyó de la columna en menor tiempo que el correspondiente al patrón de dextrano de mayor peso molecular utilizado; esto indicaría que posee un peso molecular superior a $4 \cdot 10^6$ Da. Además de ese pico se observan otros dos a tiempos de retención mayores que el dextrano de menor PM.

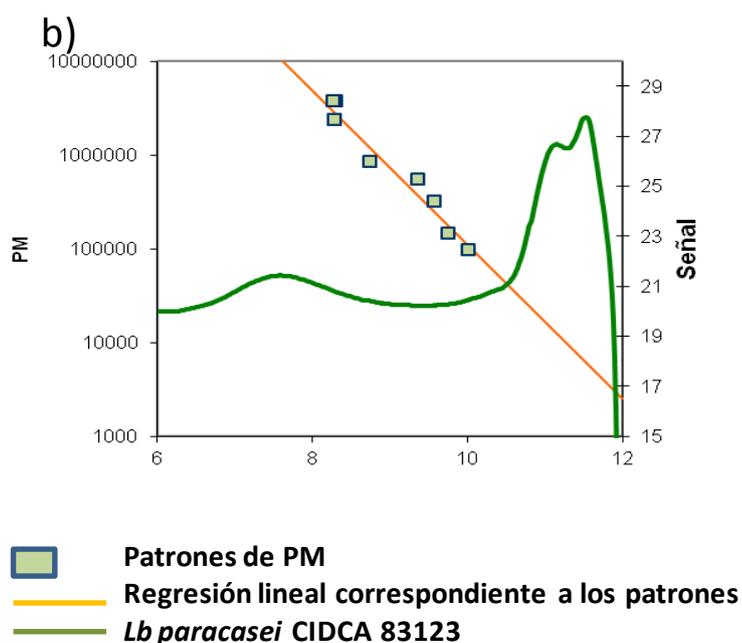
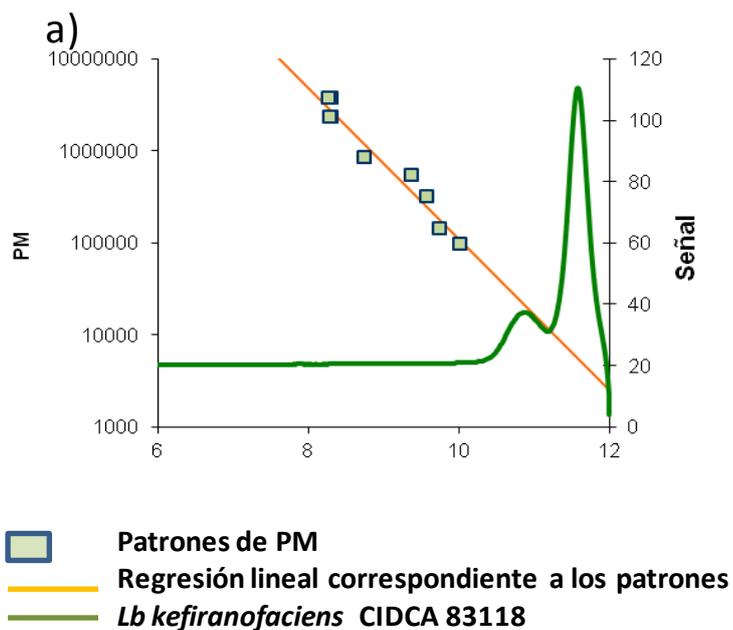


Figura 13: Cromatogramas obtenidos para soluciones de polisacáridos aislados de *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* CIDCA 83118 (a) y *Lb paracasei* CIDCA 83123 (b). Señal (en unidades arbitrarias) y peso molecular de los dextranos (Da) en función del tiempo de retención en la columna (minutos).

A partir de los cromatogramas se calcularon las cantidades relativas (porcentual) de cada fracción con distinto PM (Tabla 11). Para facilitar el

análisis se distribuyeron los pesos moleculares en los siguientes rangos: menor a 10^4 Da, entre 10^4 y 10^5 Da, entre 10^5 y 10^6 Da y mayor a 10^6 Da.

Los polisacáridos producidos por la mayoría de las cepas de *Lb plantarum* mostraron valores de PM entre 10^4 y 10^5 Da, excepto las cepas CIDCA 83112, CIDCA 8336 y CIDCA 8337 que presentaron mayor proporción de oligosacáridos de menor peso molecular.

Los polisacáridos producidos por las cepas de *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* mostraron un peso molecular inferior a 10^4 Da, excepto los polisacáridos producidos por las cepas CIDCA 83211, CIDCA 8371, CIDCA 83122 y CIDCA 83119 que además presentan una fracción con peso molecular entre 10^4 y 10^5 Da.

Los polisacáridos provenientes de las cepas de *Lb paracasei* presentaron como componente mayoritario fracciones de peso molecular entre 10^4 Da y 10^5 Da. Estas cepas presentaron además fracciones de polisacárido de mayor peso molecular. La cepa 8339 presentó una fracción de polisacárido cuyo peso molecular fue de $1,38 \cdot 10^5$ Da. Las cepas CIDCA 83123 y CIDCA 83124 mostraron fracciones en el rango entre 10^5 y 10^6 Da y mayor a 10^6 Da y las cepas CIDCA 83120 y CIDCA 83121 mostraron polisacáridos de peso molecular mayor a 10^6 Da.

Tabla 11: Distribución porcentual de los pesos moleculares de los polisacáridos aislados de las leches fermentadas *Lb plantarum*, *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* y *Lb paracasei*.

Cepas	Distribución Porcentual de Peso Molecular			
	< 10 ⁴ Da	10 ⁴ -10 ⁵ Da	10 ⁵ -10 ⁶ Da	>10 ⁶ Da
<i>Lb plantarum</i> CIDCA 8311	--	100	--	--
<i>Lb plantarum</i> CIDCA 8312	--	100	--	--
<i>Lb plantarum</i> CIDCA 8313	--	100	--	--
<i>Lb plantarum</i> CIDCA 8316	--	100	--	--
<i>Lb plantarum</i> CIDCA 8318	--	99,8	0,2	--
<i>Lb plantarum</i> CIDCA 83114	--	100	--	--
<i>Lb plantarum</i> CIDCA 8323	--	100	--	--
<i>Lb plantarum</i> CIDCA 8324	--	98,8	1,2	--
<i>Lb plantarum</i> CIDCA 8327	--	100	--	--
<i>Lb plantarum</i> CIDCA 83112	96,8	3,3	--	--
<i>Lb plantarum</i> CIDCA 8336	91,5	8,6	--	--
<i>Lb plantarum</i> CIDCA 8337	91,7	8,3	--	--
<i>Lb plantarum</i> CIDCA 8342	--	99,1	0,9	--
<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp <i>kefiranofaciens</i> ICM 6985		74,7	0,3	25,0
<i>Lb kefiranofaciens</i> CIDCA 83118	100	--	--	--
<i>Lb kefiranofaciens</i> CIDCA 83119	78,2	21,8	--	--
<i>Lb kefiranofaciens</i> CIDCA 83122	78,3	21,7	--	--
<i>Lb kefiranofaciens</i> CIDCA 8352	100	--	--	--
<i>Lb kefiranofaciens</i> CIDCA 8371	79,7	20,4	--	--
<i>Lb kefiranofaciens</i> CIDCA 83310	100	--	--	--
<i>Lb kefiranofaciens</i> CIDCA 83311	100	--	--	--
<i>Lb kefiranofaciens</i> CIDCA 83212	97,7	2,3	--	--
<i>Lb kefiranofaciens</i> CIDCA 83211	77,5	22,56	--	--
<i>Lb paracasei</i> CIDCA 8339	--	81,6	18,4	--
<i>Lb paracasei</i> CIDCA 83120	--	90,3	--	9,7
<i>Lb paracasei</i> CIDCA 83121	--	76,7	--	23,3
<i>Lb paracasei</i> CIDCA 83123	--	62,9	5,7	31,5
<i>Lb paracasei</i> CIDCA 83124	--	76,3	21,9	1,8

Analizando las distribuciones de PM de los polisacáridos producidos por distintos microorganismos y las viscosidades de las leches fermentadas se observó que sólo las cepas que son capaces de producir polisacárido de alto PM son las que le confieren a las leches fermentadas mayor viscosidad aparente.

De los datos mostrados hasta el momento podemos resaltar que del total de los microorganismos de kefir estudiados, las 5 cepas de *Lb paracasei* aislados en éste trabajo de tesis son las que presentan los mayores valores de viscosidad aparente y área de histéresis. Esto está en concordancia con el hecho de que producen polisacáridos de alto PM, siendo la cepa *Lb paracasei* CIDCA 83123 la que produce mayores valores para los parámetros estudiados.

3.3.- Caracterización de los polisacáridos producidos por *Lactobacillus paracasei*

Los polisacáridos aislados de las leches fermentadas por los microorganismos *Lb paracasei* CIDCA 83121, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 fueron caracterizados en cuanto a sus azúcares constituyentes y los resultados obtenidos se compararon con el polisacárido extraído de gránulo de kefir (kefiran).

Los perfiles cromatográficos de los polisacáridos hidrolizados analizados por HPAEC-PAD se presentan en la Figura 14. Como se puede observar el kefiran está formado por glucosa y galactosa, coincidiendo con los resultados publicados en bibliografía (Mukai *et al.*, 1988; Micheli *et al.*, 1999). La composición de azúcares de los polisacáridos producidos por las cepas de *Lb paracasei* resultó diferente de la composición del kefiran ya que no sólo se detectó la presencia de glucosa y galactosa, sino que también se detectó glucosamina y galactosamina. Estos aminoazúcares podrían estar presentes en los polisacáridos producidos por estos microorganismos o bien provenir de sus azúcares N-acetilados que sufrieron una desacetilación

durante el proceso de hidrólisis que se realiza para el análisis de los azúcares constituyentes de un polisacárido.

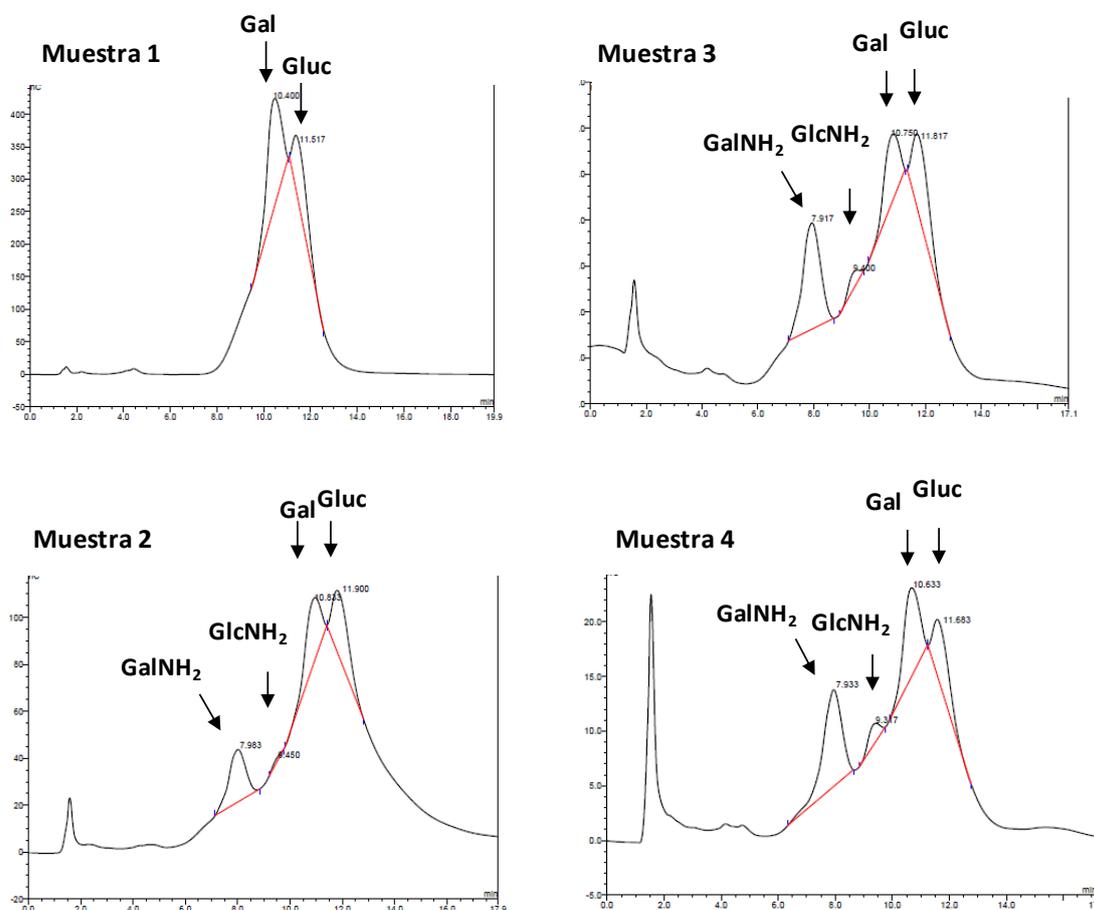


Figura 14: Perfiles cromatográficos obtenidos por cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico utilizando un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) en un equipo Dionex DX-300 de las muestras hidrolizadas de los polisacáridos. Muestra 1: kefiran; Muestra 2: polisacárido extraído de *Lb paracasei* CIDCA 83121, Muestra 3: polisacárido extraído de *Lb paracasei* CIDCA 83123; Muestra 4: polisacárido extraído de *Lb paracasei* CIDCA 83124.

Los porcentajes de los azúcares constituyentes de cada polisacáridos se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Composición porcentual de monosacáridos correspondiente al polisacárido kefiran (1), proveniente de gránulo de kefir, y a los aislado a partir de leche fermentada con (2) *Lb. paracasei* CIDCA 83121, (3) *Lb. paracasei* CIDCA 83123, (4) *Lb. paracasei* CIDCA 83124 .

Monosacáridos	1-Kefiran (%)	2-CIDCA 83121 (%)	3-CIDCA 83123 (%)	3-CIDCA 83124 (%)
Galactosa	50.37	33.13	22.98	31.84
Glucosa	49.62	35.21	29.42	21.02
Galactosamina	-	30.63	43.72	42.04
Glucosamina	-	1.02	3.98	5.09

El kefiran está constituido por glucosa y galactosa en relación aproximadamente 1:1. Los demás EPS presentaron cantidades mayores de glucosa, galactosa y galactosamina y baja proporción de glucosamina. Por lo tanto teniendo en cuenta la composición de azúcares se observó que ninguna de las cepas estudiadas produce un EPS equivalente al kefiran. Esto podría deberse a que en el desarrollo conjunto estos EPS se modifiquen por acción de otros microorganismos de gránulo para dar kefiran o bien que el microorganismo capaz de producirlo aún no haya sido aislado de los gránulos de kefir de la colección CIDCA.

Conclusiones

- Se encontró que de 57 microorganismos estudiados (24 cepas de *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, 21 cepas de *Lactobacillus plantarum*, 7 cepas de *Lactobacillus kefiranofaciens* y 5 cepas de *Lactobacillus paracasei*) solo 5 (*Lactobacillus paracasei*) son capaces de producir leches fermentadas muy viscosas.
- La variación en el pH final de los distintos cultivos en el rango estudiado no afectó la viscosidad aparente o comportamiento de flujo de las leches fermentadas.
- La viscosidad aparente de las leches fermentadas con los aislados de *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* tomó valores entre 14,1 y 36,0 mPa s. En las leches fermentadas con las cepas CIDCA 83118, CIDCA 83119 y CIDCA 83122 este parámetro resultó ser significativamente superior al de la leche acidificada. Los mayores valores de viscosidad aparente fueron aquellos de las leches fermentadas por *Lb paracasei*
- El modelo de Ostwald de Waale ajustó adecuadamente a las curvas de flujo de las leches fermentadas. Los valores del índice de consistencia (K) mantuvieron una relación directa con la viscosidad aparente de las leches fermentadas siendo mayor en aquellas fermentadas con microorganismos productores de polisacárido de alto peso molecular.
- La caracterización de las leches fermentadas mediante reometría oscilatoria de baja amplitud de deformación permitió demostrar

que la mayoría de las leches fermentadas mostraron un comportamiento tipo gel excepto para la leche fermentada por *Lb paracasei* CIDCA 83123. En esta última los valores de G' y G'' no difirieron mucho entre sí y resultaron inferiores a los observados para las demás leches fermentadas evaluadas.

- Los microorganismos estudiados producen cantidades de EPS que varían entre 85,1 y 301,9 mg/l
- No se observó una relación directa entre la viscosidad aparente de las leches fermentadas por las cepas estudiadas y la cantidad de polisacárido producida por ellas.
- Analizando las distribuciones de PM de los polisacáridos producidos por distintos microorganismos y las viscosidades de las leches fermentadas se observó que sólo las cepas que son capaces de producir polisacárido de alto PM son las que le confieren a las leches fermentadas mayor viscosidad aparente.
- Este es el primer trabajo en donde se aíslan *Lactobacillus paracasei* de gránulos de kefir productores de EPS y caracterizan sus polisacáridos
- Los polisacáridos producidos por las cepas de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83121, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 están formados por glucosa, galactosa, glucosamina y galactosamina en distintas proporciones.
- Los polisacáridos producidos por las cepas de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83121, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 y el kefirán, proveniente de gránulo de kefir son diferentes en cuanto a su peso molecular y azúcares constituyentes.