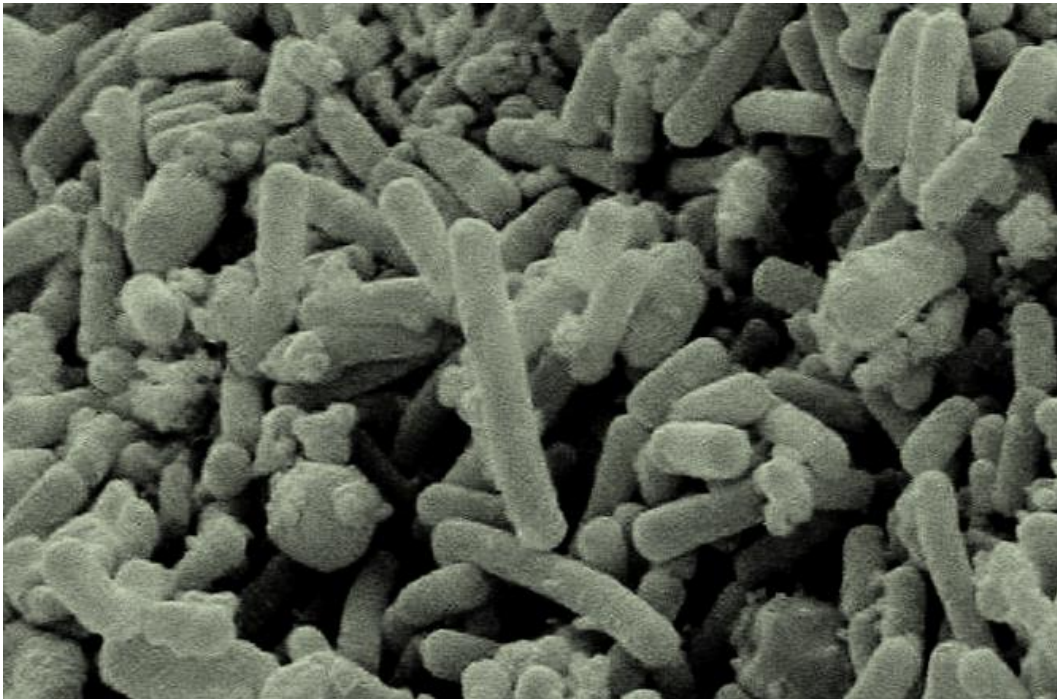


## Conclusiones Generales



## Conclusiones Generales

Las bacterias ácido lácticas representan una fuente de polisacáridos natural que se pueden utilizar en diversos productos fermentados. El kefiran es el polisacárido presente en los gránulos de kefir y es producido por microorganismos con status GRAS (generalmente reconocidos como seguros). Algunas propiedades del kefiran hacen que su estudio resulte muy interesante ya que presenta propiedades tanto tecnológicas como promotoras de la salud. Por ello el objetivo de esta tesis fue aislar e identificar los microorganismos responsables de la producción de kefiran a partir de gránulos de kefir y evaluar su efecto prebiótico para su posible aplicación en alimentos funcionales.

En una primera etapa se analizó la microbiota de los gránulos de kefir a fin de comprobar la presencia de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* al cual se le atribuye la síntesis de kefiran. El estudio de la microbiota de gránulos de kefir con métodos independientes de cultivo (PCR-DGGE) permitió completar el conocimiento del ecosistema microbiano presente en gránulos. Mediante métodos independientes de cultivo (PCR-DGGE-Secuenciación) se determinó que las poblaciones bacterianas presentes en los distintos gránulos de la colección CIDCA no es idéntica entre sí y se constató la presencia de *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* en los gránulos de kefir AGK 1, AGK 2, AGK 3, AGK 5, AGK 6, AGK 7, AGK 8, AGK 10 y AGK 11.

A partir de los gránulos se realizaron aislamientos y se obtuvieron 22 nuevos microorganismos que se identificaron utilizando métodos basados en características fenotípicas y genotípicas.

La identificación de los aislados mediante la evaluación de la producción de gas a partir de glucosa, perfil de proteínas de célula entera, rep PCR (GTG)5'

y la secuenciación del gen de la pheS permitió identificar a los 22 lactobacilos de los cuales 11 resultaron ser *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, 5 *Lactobacillus paracasei* y 7 *Lactobacillus kefir*. Se puede destacar que las especies *Lb kefiranofaciens* y *Lb paracasei* no habían sido aisladas con anterioridad de estos gránulos. De esta forma utilizando las metodologías de aislamiento que incluyeron la solubilización del gránulo en agua templada y el uso de medios selectivos se logró aislar *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* de los gránulos de kefir de la colección CIDCA.

Con la finalidad de evaluar si los aislados identificados como *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* producían polisacárido, se analizó la viscosidad de las leches fermentadas por los mismos. Este estudio se extendió a todos los microorganismos aislados de kefir capaces de crecer y acidificar la leche. Se encontró que de 57 microorganismos estudiados (24 cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 21 cepas de *Lb plantarum*, 7 cepas de *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* y 5 cepas de *Lb paracasei*) solo 5 pertenecientes a la especie *Lactobacillus paracasei* (CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123, CIDCA 83124, CIDCA 8339) fueron capaces de producir leches fermentadas muy viscosas. Es de destacar que estos microorganismos fueron aislados en éste trabajo de tesis y que hasta el momento no se habían detectado microorganismos de la especie *Lactobacillus paracasei* productores de polisacárido en el gránulo de kefir.

De las cepas de *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* solo 3 (*Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* CIDCA 83118, CIDCA 83119 y CIDCA 83122) fermentaron la leche dando geles ácidos con viscosidad superior a la de la leche acidificada artificialmente y a la de las otras cepas de esta especie estudiadas. La producción de EPS por estos microorganismos oscilo entre 85,1 y 301,9 mg/l. y 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. Estas 3 cepas produjeron polisacárido en el orden de 180 mg/L. 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 presentaron una fracción con peso molecular entre  $10^4$  y  $10^5$  Da. Se puede concluir que las cepas que produjeron leches fermentadas con mayor viscosidad aparente no fueron las que produjeron mayor cantidad de polisacárido ni tampoco fueron todas las que produjeron un polisacárido conteniendo una fracción de alto peso molecular. Los polisacáridos producidos por las cepas de *Lb kefiranofaciens* aisladas en este trabajo no resultaron ser del mismo grado de polimerización que el de la cepa de referencia que fue la única de esta especie en presentar una fracción de peso molecular superior a  $10^6$  Da.

Solo los polisacáridos provenientes de las cepas de *Lactobacillus paracasei* fueron capaces de producir polisacáridos de alto peso molecular (mayor a  $10^6$  Da). Esto está en concordancia con lo observado en cuanto al aporte de textura que produjeron estos microorganismos al fermentar la leche. De las 5 cepas de *Lactobacillus paracasei* la que otorgó mayor viscosidad fue la cepa CIDCA 83123. Al analizar el espectro mecánico de los geles lácteos se observó que todas las leches fermentadas con estos microorganismos presentaron valores de  $G'$  superiores entre dos y tres veces al correspondiente valor de  $G''$ , indicando un comportamiento tipo gel, excepto para la leche fermentada por *Lactobacillus parakefir* 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 indicando que las características fisicoquímicas de los EPS producidos serían diferentes.

Se logró definir la composición de azúcares de los EPS aislados de 3 cepas de *Lactobacillus paracasei* (CIDCA 83121, CIDCA 83123 y CIDCA 83124), y se observaron diferencias con respecto al kefiran aislado de gránulos de kefir. Los EPS aislados de cepas están constituidos por glucosa, galactosa, glucosamina y galactosamina, en distintas proporciones, difiriendo de la composición del kefiran donde no se encuentran aminoazúcares en su unidad repetitiva.

Si bien en este trabajo se logró aislar a *Lactobacillus kefiranofaciens*, estas cepas no produjeron EPS en la medida esperada. Sin embargo, se pudieron aislar cepas de *Lactobacillus paracasei* productores de un EPS que aportan a las leches fermentadas características reológicas interesantes.

Finalmente para estudiar el efecto del kefiran sobre la microbiota intestinal se utilizó como modelo animal ratones Balb C. Asimismo se estudio el de EPS de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83124 aislados de kefir para su potencial aplicación como prebiótico. En una primera etapa se logró poner a punto la metodología de PCR-DGGE y FISH-citometría de flujo para el análisis de las poblaciones de Eubacterias, lactobacilos y bifidobacterias presentes en materia fecal. El análisis de los perfiles electroforéticos de materia fecal de ratones que fueron alimentados con las mismas dietas, nos permitió constatar la variabilidad propia de la microflora intestinal de cada ratón. Sin embargo, estudios en la evolución de la microbiota fecal de ratones debido a la ingesta del kefiran confirmaron que, a pesar de la variabilidad propia de la microbiota de cada ratón, el kefiran produce cambios que se evidencian mediante el análisis de los perfiles DGGE.

Por otro lado, contrastando los resultados obtenidos para los distintos grupos, se pudo observar en los perfiles de los ratones de los grupos suplementados con kefiran un mayor número de bandas que en los perfiles obtenidos para los ratones que no fueron suplementados cuando se estudio la

población de Eubacterias. Mediante secuenciación se determinó que una de las bandas que se encuentra sólo en los ratones que consumieron kefiran pertenece a microorganismos del género *Bifidobacterium*. Asimismo, se observó, mediante PCR-DGGE específicas para especie, un aumento del número de bandas correspondientes al género *Bifidobacterium* en la microflora intestinal de ratones tratados con kefiran, no observándose variaciones dentro del grupo *Lactobacillus*. Estos resultados cuando se analizó microbiota fecal o contenido intestinal de colon fueron equivalentes. La cuantificación, mediante FISH-citometría, permitió comprobar que los ratones del grupo control no mostraron variaciones en los porcentajes de bifidobacterias entre el inicio y el final del ensayo mientras que los ratones pertenecientes al grupo que ingirió kefiran duplicaron o triplicaron la cantidad de bifidobacterias en materia fecal entre el día 0 y 21 de ensayo. Estos resultados también fueron confirmados por recuento en placa de microorganismos. Por lo tanto, se puede decir que hay una influencia sobre la microbiota intestinal de ratones inducida por la suplementación de la dieta con kefiran y que esta influencia implica el aumento de la población de bifidobacterias.

En cuanto al polisacárido producido por la cepa *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83124 no demostró ser efectivo en la modificación de las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos confirmando que el polisacárido producido por este microorganismo es diferente al kefiran. Estos resultados también demuestran que el efecto modulador de la microbiota es específico para cada molécula ya que el EPS de estos microorganismos tiene un PM similar al kefiran pero es diferente su composición de azúcares quedando aun por indagar otras características estructurales.

De los dos polisacáridos estudiados se podría considerar al kefiran como prebiótico ya que se evidenció un efecto modulador positivo sobre la población de bifidobacterias pero este efecto no es suficiente para considerarlo como tal

ya que para completar la definición de prebiótico esta modulación debe asociarse a un efecto promotor en la salud. Estudios previos con este polisacárido han demostrado que la ingesta oral de kefiran en ratones Balb C produce un aumento de las células productoras de IgA en lámina propia como también de macrófagos en esta localización (Medrano *et al* 2011). Se evidenció también un aumento en el número de células productoras de mucus en intestino delgado de ratones que ingirieron kefiran. Estos resultados se pueden asociar a la presencia del kefiran en intestino y a su interacción con las células epiteliales que desencadenaría dicha respuesta (Medrano *et al* 2011) pero no se puede descartar el que el efecto se deba al aumento en la población de bifidobacterias demostrado en este trabajo.

Estos resultados son prometedores y demuestran la potencialidad de un polisacárido producido por microorganismos del kefir contenidos en el gránulo de actuar como un prebiótico, ya sea como componente de la leche fermentada o por su aplicación como aditivo funcional.