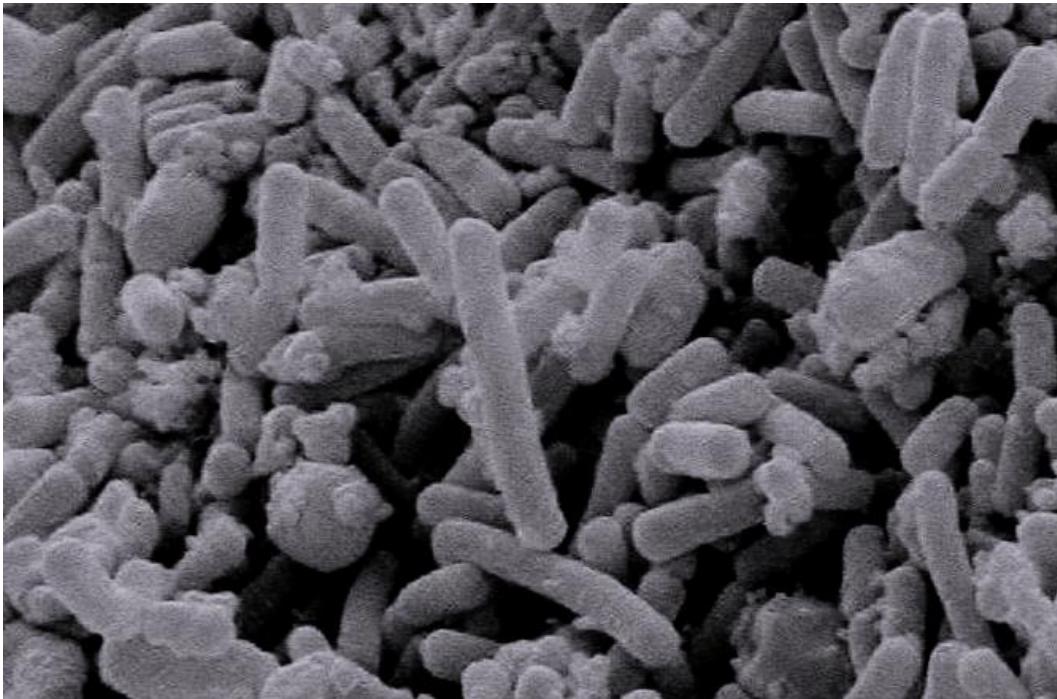


Introducción General y Objetivos



1.- Alimentos Funcionales

En las últimas dos décadas ha surgido el concepto de alimento funcional despertando la atención de la industria alimentaria, los consumidores, la comunidad científica y los profesionales de la salud. Este desarrollo está relacionado con los avances en ciencia y tecnología, el incremento en los costos de salud, el aumento de la expectativa de vida y la nueva tendencia en algunos sectores de la población a incorporar en la dieta alimentos capaces de mejorar el estado general del individuo.

Según el *International Life Science Institute (ILSI)*: “Un alimento puede considerarse funcional si se demuestra satisfactoriamente que ejerce un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutritivos intrínsecos, de modo tal que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas. Los alimentos funcionales deben seguir siendo alimentos, y deben demostrar sus efectos en las cantidades en que normalmente se consumen en la dieta. Además, no debe tratarse de comprimidos ni cápsulas, sino de alimentos que forman parte de un régimen normal” (Definición operativa *Functional Food Science in Europe*, 1999: UE-ILSI Europe).

Este mismo organismo determinó que, desde un punto de vista práctico, un alimento funcional puede ser:

- Un alimento natural en el que uno de sus componentes ha sido mejorado mediante condiciones especiales de cultivo.
- Un alimento al que se ha añadido un componente para que produzca beneficios (por ejemplo, bacterias probióticas seleccionadas, de probados efectos beneficiosos sobre la salud intestinal).

- Un alimento del cual se ha eliminado un componente para que produzca menos efectos adversos sobre la salud (por ejemplo, la disminución de ácidos grasos saturados).

- Un alimento en el que la naturaleza de uno o más de sus componentes ha sido modificada químicamente para mejorar la salud (por ejemplo, los hidrolizados proteicos adicionados en los preparados para lactantes para reducir el riesgo de alergenicidad).

- Un alimento en el que la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes ha sido aumentada para mejorar la asimilación de un componente beneficioso.

- O bien, cualquier combinación de las posibilidades anteriores.

1.1.- Probióticos y prebióticos como componentes de alimentos funcionales.

1.1.1.-Probióticos

Los probióticos son definidos como “Microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped” (FAO/WHO, 2001; Código Alimentario Argentino Resolución Conjunta 261/2011 y 22/2011, 2011). Todas las bacterias probióticas exógenas deben llegar intactas y viables al intestino grueso y así ayudar a mantener el balance de la flora intestinal (Manning, 2004). Los microorganismos comúnmente usados como probióticos para alimentación humana son lactobacilos (por ejemplo *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*) y bifidobacterias (*Bifidobacterium adolescentes*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*) (Gibson & Robertfroid, 1995).

Los alimentos probióticos son productos que contienen a estos microorganismos como ingredientes en una matriz adecuada y en cantidad suficiente, de modo tal, que luego de la ingestión se obtienen los beneficios especificados (Schrezanmeir & de Vrese, 2001).

En Argentina en diciembre de 2011, se ha reglamentado el uso de probióticos como componente de los alimentos en el Código Alimentario Argentino (Resolución Conjunta 261/2011 y 22/2011, 2011). Esta reglamentación se propuso a razón de las tendencias mundiales y del aumento del número y tipo de alimentos y bebidas con agregado de probióticos disponibles para los consumidores y detalla una serie de requisitos mínimos para que una cepa pueda ser utilizada como ingrediente probiótico en alimentos. Estos requisitos se describen a continuación:

1. La cepa debe ser identificada (Género/especie/subespecie) por laboratorios reconocidos mediante tecnologías validadas.

2. Se debe realizar una caracterización “*in vitro*” e “*in vivo*” mediante ensayos de resistencia gástrica, a bilis y a lisozima de modo tal que se asegure la resistencia de la cepa a las barreras biológicas del organismo.

3. El(los) efecto(s) probiótico(s) adjudicado(s) a la cepa deben ser constatados mediante ensayos “*in vitro*” e “*in vivo*”. Estos deben ser debidamente documentados y respaldados con estudios efectuados por organismos nacionales y/o internacionalmente reconocidos.

4. Se debe demostrar la seguridad de la cepa probiótica (no debe ser riesgosa para la salud y no deberá presentar o promover la translocación bacteriana) en las concentraciones en que se encuentra en el alimento. Específicamente, se debe constatar que la/s cepas no son portadora de genes de resistencia a antibióticos, no presentan factores de virulencia responsable de actividad hemolítica y no producen toxinas.

1.1.2.- Prebióticos

Los prebióticos se definen como ingredientes alimentarios que afectan benéficamente al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon mejorando el estado de salud (Gibson & Robertfroid, 1995; Resolución

Conjunta 229/2011 y 731/2011; 2011) y pueden tener además un efecto favorable sobre la estabilidad de los probióticos (Oliveira *et al.*, 2011).

La reciente regulación sobre el uso de prebióticos como ingredientes de alimentos (Resolución Conjunta: 229/2011 y 731/2011 del Código Alimentario Argentino, 2011; FAO/WHO) determina que para ser considerado prebiótico un alimento debe cumplir con los siguientes requisitos mínimos:

1. El compuesto debe ser correctamente identificado (nombre químico, caracterización físico-química, descripción, fuente y origen, pureza y contaminantes).

2. Se debe constatar la resistencia a la acidez gástrica, a la hidrólisis por enzimas de mamíferos y a la absorción gastrointestinal. Además se debe comprobar la capacidad de los prebióticos de ser fermentados por la microflora intestinal y de estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de bacterias intestinales benéficas.

3. El(los) efecto(s) fisiológico(s) adjudicado(s) al prebiótico deben ser debidamente documentados y respaldados en estudios efectuados por organismos nacionales y/o internacionalmente reconocidos mediante ensayos “*in vitro*” e “*in vivo*” que los demuestren.

4. Se debe verificar que el compuesto prebiótico no resulte riesgoso para la salud.

Actualmente, la importancia de los prebióticos radica en varios aspectos dentro de los que se incluye la creciente convicción de que una flora intestinal equilibrada es fundamental para poseer un buen estado de salud, la demostración de que los prebióticos pueden alterar la composición de la microbiota hacia un equilibrio favorable constituyendo una alternativa a los probióticos y son relativamente baratos de fabricar (especialmente inulina y sus derivados, y galactooligosacáridos (GOS)).

2.- El Kefir: un ecosistema bacteriano complejo

El kefir es una leche fermentada ácida, viscosa y ligeramente carbonatada, muy popular en países del este europeo, que se prepara a partir de un fermento inmovilizado natural, el “gránulo de kefir” (Thompson *et al*, 1990; Angulo *et al*, 1993; Garrote *et al*, 2001).

Para la elaboración del kefir se introduce una cierta cantidad de gránulos de kefir en leche (Koroleva, 1982; Halle' *et al*. 1994; Tamime *et al*. 1999) y se deja fermentar hasta alcanzar un pH de aproximadamente 4. De esta forma se obtiene la leche fermentada denominada kefir. El origen de la leche y del gránulo, la proporción gránulos/leche y las condiciones de fermentación (tiempos y temperaturas) afectan tanto las propiedades organolépticas (*flavor*, acides y consistencia) como el perfil microbiológico del producto final (Garrote *et al*. 1998; Londero *et al*., 2012). Por ejemplo, si la relación gránulo leche es 1 % se obtiene un producto más viscoso que si la proporción es superior a 10 %, alterándose además la composición microbiológica (Garrote *et al*, 1998)

El gránulo de kefir es una estructura gelatinosa e irregular compuesta por un polisacárido, proteínas y agua. Asociado a esta estructura, conformando un ecosistema complejo, se encuentran levaduras, bacterias ácido lácticas y ácido acéticas (Farnworth, 2005; Lopitz-Otsoa *et al*, 2006). En este ecosistema los microorganismos se brindan beneficios recíprocos. Así, las levaduras se autolisan liberando aminos ácidos y factores de crecimiento como rivo flavina y ácido fólico que permiten el crecimiento de lactobacilos que tienen dificultad para utilizar los aminoácidos y caseínas de la leche; por otro lado la β -galactosidasa bacteriana hidroliza la lactosa favoreciendo el crecimiento de levaduras que no la pueden asimilar (Jacquet & Thevenot, 1961). Por su parte, las bacterias ácido acéticas interactúan con los demás microorganismos oxidando el ácido láctico y utilizando el etanol

producido por levaduras y bacterias heterofermentativas, para la biosíntesis de ácido acético (Rosi & Rossi, 1978).

En la Figura 1 se muestra una fotografía de varios gránulos de kefir donde se puede observar la variación en el tamaño y una micrografía obtenida por microscopía electrónica mostrando la presencia de bacterias y levaduras en el gránulo.

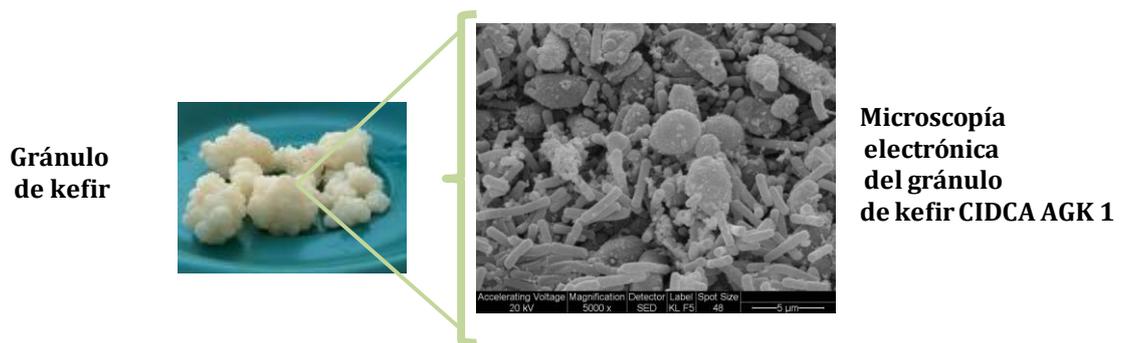


Figura 1: Aspecto macroscópico y micrografía electrónica de gránulo de kefir CIDCA AGK 1, gentileza de Carolina Iraporda.

El interés en la caracterización del gránulo de kefir y el aislamiento de los microorganismos que lo componen se basa en la larga lista de efectos benéficos para la salud que han sido reportados como consecuencia del consumo de ésta leche fermentada. Estos beneficios son adjudicados tanto a los microorganismos que lo componen como a los componentes bioactivos que se producen durante la fermentación (Otes & Cagindi, 2003, Farnworth, 2005)

2.1.- El kefir como alimento funcional

Los efectos benéficos del kefir son muy conocidos, especialmente en países de Europa del Este (Halle' *et al.*, 1994). Allí, la longevidad de los habitantes de dicha región se asocia al consumo de kefir y suele ser utilizado empíricamente para el tratamiento de enfermedades

gastrointestinales, desordenes metabólicos, aterosclerosis y alergias (Lopizt-Otsoa *et al.*, 2006). Además, numerosos estudios documentan la acción benéfica para la salud del kefir. Estas propiedades se atribuyen a la presencia de una microbiota compleja así como a sus productos metabólicos. Dentro de estos productos se pueden mencionar: ácidos orgánicos, vitaminas (fundamentalmente del grupo B), proteínas de superficie de algunos microorganismos que se liberan al medio (capa S), y un exopolisacárido (kefiran).

Una de las propiedades benéficas que se le atribuye es la actividad antimicrobiana y se la relaciona principalmente a la producción de ácidos orgánicos y péptidos (bacteriocinas) por parte de las bacterias en el ecosistema del kefir. Garrote *et al.* 2001 mostraron que el kefir, obtenido de diferentes gránulos, alcanza pH entre 3,5 y 4.0 (las concentraciones de ácido láctico varían entre 1.30-2.30 g/100 ml y las de ácido acético entre 0.13-0.29 g/100ml) e inhibe el crecimiento *Escherichia coli*. Gulmez & Guven (2003) compararon la seguridad microbiológica de yogurt y kefir utilizando como indicador tres cepas que comúnmente se encuentran como contaminante en alimentos, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica* y concluyeron que una combinación de microorganismos iniciadores de yogurt y kefir pueden mejorar la seguridad del producto final. Silva *et al.* (2009) mostraron la actividad antimicrobiana de kefir contra *Candida albicans*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* and *Shigella sonnei*. Kakisu *et al.* (2007) estudiaron el efecto del kefir contra cepas toxigénicas de *B cereus*. En este trabajo se contaminó artificialmente, con esporos de la cepa toxigénica, leche fermentada con gránulos de kefir y comprobaron que se inhibe la germinación de los esporos y el crecimiento de las células vegetativas. Gollowczyc *et al.* (2008) demostraron que los sobrenadantes de 11 cepas de *Lb plantarum*, aisladas de gránulos de kefir, producen una fuerte inhibición del crecimiento de *S enterica* serovar. Thipymurium y *E coli* y que

alguno de ellos también inhibe el crecimiento de *S gallinarum*, *S enterica* y *Sh. sonnei*. En cuanto a la producción de bacteriocinas por cepas aisladas de kefir, se encontró una cepa de *Lactococcus* que produce una bacteriocina, a la que se denomina lacticin 3147, que tiene efecto inhibitorio contra muchos patógenos de alimentos y microorganismos esporulados (Ryan *et al.*, 1996; Dobson *et al.*, 2011). *Lb plantarum* ST8K aislado de kefir produce otra bacteriocina de 3,5 kDa (bacST8KF) que es activa contra *Lb casei*, *Lb salivarius*, *Lb curvatus* y *Listeria innocua* (Powell *et al.*, 2007).

Otra propiedad que está documentada para algunos microorganismos aislados de kefir y se suele tener en cuenta a la hora de seleccionar microorganismos probióticos es su capacidad para adherirse a la mucosa gastrointestinal y colonizarla (Ouwehand *et al.* 1999). La habilidad de adherirse a células epiteliales *in vitro* es común en cepas de Lactobacilos y es dependiente de la cepa. *Lb plantarum* y *Lb kefir* aislados de gránulos de kéfir son capaces de adherirse a células Caco-2 con diferentes porcentaje de asociación (0,97 a 10% de adherencia). Esta capacidad no se relaciona con la hidrofobicidad, ya que tanto cepas de *Lb kefir* altamente hidrofóbicas (Golowczyc *et al.*, 2007) como cepas de *Lb plantarum* altamente hidrófilicas (Golowczyc *et al.*, 2008), poseen la capacidad de adherirse a células en cultivo Caco-2 (0,97 a 5,30% de adhesión). Santos *et al.*, (2003) describieron también la capacidad de lactobacilos aislados de kefir de asociarse a células de enterocitos. Hugo *et al.* (2008) estudiaron *in vitro* el efecto de lactobacilos aislados de kefir sobre la actividad biológica de *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) y encontraron que uno de los lactobacilos ensayados, *Lb plantarum* CIDCA 83114, viable o no, impide el desprendimiento de células en cultivo (Hep-2) inducido por los factores de virulencia de *E. coli*. Ellos concluyeron que estos lactobacilos podrían antagonizar los mecanismos de virulencia de ECEH, ya sea por la modificación del microambiente o interfiriendo con las cascadas de señalización activadas por el patógeno. Zacconi *et al.* (2003)

estudiaron la exclusión competitiva de *Campylobacter jejuni* provocada por el kefir en pollos mediante estudios de colonización de la microbiota colónica y encontraron que el kefir, fresco o congelado, podría tener aplicaciones interesantes en el control de la difusión de microorganismos patógenos en hemorragias de aves de corral. Marquina *et al.*, (2002) demostraron, en ratones que ingirieron kefir durante 7 meses, que el número de bacterias lácticas aumentó significativamente en intestino delgado y grueso y el número de *Clostridium* sp. disminuyó en 2 unidades logarítmicas en comparación con los grupos controles.

La actividad antitumoral también ha sido relacionada al kefir. Shiomi *et al.* (1982) fueron los primeros en documentar el efecto antitumoral de un polisacárido aislado de kefir soluble en agua. Este polisacárido, administrado a ratones en forma oral o intraperitonealmente, es capaz de inhibir el crecimiento de carcinoma de Erlich o sarcoma 180 comparado con ratones que no recibieron el polisacárido (Shiomi *et al.* 1982; Murofushi *et al.* 1983). Liu *et al.* (2002) encontraron una disminución significativa en el crecimiento de tumores en ratones por los productos de fermentación de kefir. Estudios de microscopía revelaron que los procesos de apoptosis de las células tumorales pueden haber sido los responsables de la reducción del crecimiento. Al mismo tiempo observaron un incremento significativo en los niveles de IgA en el intestino delgado, proponiendo que este incremento podría originarse por una estimulación del sistema inmune a nivel de las placas de Peyer. Estos autores concluyeron que los microorganismos o el polisacárido producido por ellos podrían ser responsables del efecto observado. De Moreno de LeBlanc *et al.* (2007) también estudiaron el efecto antitumoral del kefir y de una fracción libre de células del kefir en un modelo de ratones con tumores mamarios y destacaron el efecto de los componentes no microbianos.

También se ha documentado actividad moduladora sobre el sistema inmune. Este efecto se ha atribuido tanto al kefir (Lee *et al.*, 2007; Thoreux & Schmucker, 2001) como al polisacárido kefiran (Furukawa *et al.*, 1992; Vinderola *et al.*, 2006; Medrano *et al.*, 2011). Thoreux & Schmucker, (2001) mostraron un aumento de inmunoglobulina IgA específica en ratones tratados con kefir frente al desafío con toxina colérica comparado con ratones control y un aumento significativo en los niveles séricos de IgG no específica. Ellos concluyeron que el kefir, estaría ejerciendo un efecto adyuvante en el sistema inmune de mucosas, y lo relacionaron con los componentes de pared bacteriana. Lee *et al.* (2007) demostraron la actividad antiinflamatoria y antialérgica del kefir en un modelo murino de asma.

La mejora en la digestibilidad y absorción de la lactosa se basaron en el bajo contenido de lactosa residual que posee el kefir y en la presencia de actividad β -galactosidasa (De Vrese *et al.*, 1992). Hertzler & Clancy (2003) han demostrado que la actividad β -galactosidasa en el kefir es 60% mayor que en el yogurt.

Otros beneficios que han sido documentados para esta leche fermentada son la acción preventiva en el tratamiento de gastritis, diarreas, males intestinales y problemas de digestión (Koroleva, 1988) y la actividad cicatrizante en lesiones de la piel en ratas Wistar (Rodrigues *et al.*, 2005b).

2.2.- Microorganismos presentes en el gránulo de kefir

El gránulo de kefir es una comunidad simbiótica (Margulis, 1996), siendo este hecho lo que dificulta su estudio (Farnwoth, 2005). Algunas bacterias y levaduras de gránulo de kefir, al ser aisladas en cultivos puros, no crecen en leche o disminuyen su actividad bioquímica lo cual complica aún más el estudio de la población microbiana del gránulo de kefir (Koroleva, 1991)

En el año 2001, la *Food and Agriculture Organization* (FAO) definió al kefir desde el punto de vista microbiológico (Norma del Codex para leches fermentadas standards 243-2003 http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.jsp) y destacó que “los microorganismos que lo componen son *Lactobacillus kefir*; especies de los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Acetobacter* y levaduras fermentadoras y no fermentadoras de lactosa creciendo en una íntima relación”. No obstante, estudios realizados utilizando diversas metodologías de aislamientos e identificación describen además, la presencia de otros microorganismos que se detallan en la Tabla 1 (Farnworth, 2005 ; Lopitz-Otsoa *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009).

Del análisis de la Tabla 1 se puede destacar que distintos autores informan la presencia de diferentes microorganismos como constituyentes del gránulo. Lo que demuestra que aún existe controversia en cuanto a la composición microbiológica de los mismos.

Diferentes autores indican que no existe una única combinación de microorganismos que conforman el gránulo, sino que la microbiota que presentan depende del origen, condiciones de cultivo, procesos de elaboración y condiciones de almacenamiento (Otogalli *et al.*, 1973; Molska *et al.*, 1983; Zourari & Anifantakis, 1988; Lin & Kuo, 1999; Farnworth, 2005).

Tabla 1: Microorganismos encontrados en kefir y en gránulos de kefir. Tabla adaptada de Garrote *et al.*, 2010.

Especies	Referencias
<i>Lactobacillus kefir</i>	Kandler & Kunath, 1983; Marshall <i>et al.</i> 1984; Angulo <i>et al.</i> 1993; Pintado <i>et al.</i> 1996; Takizawa <i>et al.</i> 1998; Garrote <i>et al.</i> 2001.
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	Fujisawa <i>et al.</i> 1988; Toba <i>et al.</i> 1991; Mukai <i>et al.</i> 1992; Takizawa <i>et al.</i> 1998.
<i>Lactobacillus kefirgranum</i>	Takizawa <i>et al.</i> 1994, 1998.
<i>Lactobacillus parakefir</i>	Takizawa <i>et al.</i> 1994; Garrote <i>et al.</i> 2001.
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Serot <i>et al.</i> 1990; Garrote <i>et al.</i> 2001; Hertzler & Clancy 2003.
<i>Lactobacillus brevis</i>	Ottogalli <i>et al.</i> 1973; Rosi & Rossi, 1978; Marshall <i>et al.</i> 1984; Angulo <i>et al.</i> 1993.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Ottogalli <i>et al.</i> 1973; Angulo <i>et al.</i> 1993; Marshall 1993.
<i>Lactobacillus viridescens</i>	
<i>Lactobacillus gasseri</i>	
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Molska <i>et al.</i> 1983; Angulo <i>et al.</i> 1993.
<i>Lactobacillus casei</i>	
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Kuo & Lin, 1999.
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	Ottogalli <i>et al.</i> 1973; Angulo <i>et al.</i> 1993; Marshall 1993; Pintado <i>et al.</i> 1996; Garrote <i>et al.</i> 2001.
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Rosi & Rossi, 1978; Angulo <i>et al.</i> 1993; Marshall 1993; Kuo & Lin, 1999; Garrote <i>et al.</i> 2001.
<i>Acetobacter aceti</i>	Rosi & Rossi, 1978; Angulo <i>et al.</i> 1993.
<i>Candida kefir</i>	Zourari & Anifantakis, 1988; Engel <i>et al.</i> 1986; Angulo <i>et al.</i> 1993; Marshall 1993; Wyder 2001.
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Engel <i>et al.</i> 1986; Angulo <i>et al.</i> 1993; Wyder 2001.
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Rohm <i>et al.</i> 1992; Kuo & Lin, 1999; Wyder 2001; Garrote <i>et al.</i> 2001.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Rosi & Rossi 1978; Rohm <i>et al.</i> 1992; Angulo <i>et al.</i> 1993; Marshall 1993; Wyder 2001; Garrote <i>et al.</i> 2001.
<i>Saccharomyces delbrueckii</i>	Rosi & Rossi 1978; Engel <i>et al.</i> 1986; Pintado <i>et al.</i> 1996.
<i>Saccharomyces unisporus</i>	Engel <i>et al.</i> 1986; Angulo <i>et al.</i> 1993; Wyder 2001.
<i>Torulaspota. delbrueckii</i>	Angulo <i>et al.</i> 1993; Wyder 2001.
<i>Candida friedricchii</i>	
<i>Pichia fermentum</i>	Rohm <i>et al.</i> 1992; Angulo <i>et al.</i> 1993; Kuo & Lin, 1999; Wyder 2001.
<i>Torulopsis holmii</i>	
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i> ,	
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	Wyder 2001.
<i>Yarrownia lipolytica</i>	

2.3.-Componentes del gránulo de kefir: Biosíntesis.

El gránulo de kefir contiene aproximadamente 83 % de agua, 4 ± 5 % de proteínas y 9 ± 10 % de un polisacárido denominado kefiran (Abraham & De Antoni, 1999). Durante la fermentación de la leche con gránulos de kefir se produce un incremento de biomasa de gránulo. Esto se debe a que las poblaciones presentes en el gránulo, interaccionando de manera simbiótica (Vedamuthu, 1982, Witthuhn *et al.*, 2005), sintetizan las proteínas y el polisacárido que componen la matriz (Garrote *et al.*, 2010). El gránulo es capaz de incrementar su biomasa cuando utiliza como sustrato suero de leche, sin embargo la formación del mismo se ve afectada por las condiciones de fermentación. El aumento de la temperatura de fermentación produce alteraciones en el aspecto y composición microbiológica de los gránulos así como también se detecta una disolución parcial de los mismos a una temperatura de fermentación superior a 37 °C (Rimada & Abraham 2001; Londero *et al.*, 2012).

El conocimiento sobre las proteínas presentes en el granulo así como también el rol de los microorganismos en la síntesis de los componentes de la matriz es limitada. Bassette y Acosta (1988) reportaron que las proteínas podrían venir del medio de crecimiento, o sea la leche, sin embargo estudios posteriores (Abraham & de Antoni; 1999) demostraron que la proteína es producida por la microbiota de kefir ya que el perfil proteico de los gránulos se mantiene aún después de sucesivos subcultivos en leche de soja.

El exopolisacárido producido por los microorganismos presentes en gránulos de kéfir se denomina kefiran (Kooiman, 1968). La responsabilidad sobre la producción de dicho polisacárido fue adjudicada inicialmente a *Lb brevis* (La Rivière *et al.*, 1967), “*atypical Streptobacterium*” (Rosi & Rossi 1978) y finalmente a *Lb kefiranofaciens* sp. Nov (WT-2B, ATCC 43761) (Fujisawa *et al.*, 1988). Recientemente se encontró que las especies *Lb kefiranofaciens* (Fujisawa *et al.*, 1988) y *Lb kefirgranum* (Takizawa *et al.*,

1994), ambos lactobacilos homofermentativos aislados de gránulos de kefir, son idénticos filogenéticamente (100% de similitud en sus secuencias de DNAr 16S) y fueron reclasificados en dos subespecies de *Lb kefiranofaciens*, subespecie *kefiranofaciens* y subespecie *kefirgranum* (Vancanneyt *et al.*, 2004) siendo la subespecie *kefiranofaciens* la considerada responsable de la producción del kefiran (Fujisawa *et al.*, 1988; Michelli *et al.*, 1999).

2.4.-Kefiran.

El kefiran es un glucogalactano ramificado, soluble en agua, que contiene aproximadamente la misma cantidad de residuos de D-glucosa y D-galactosa (Figura 2). La enzima β ,D (1-6) glucanasa, es capaz de fragmentarlo generando unidades de pentasacáridos y glucosas (La Rivière *et al.*, 1967). La unidad repetitiva del kefiran está compuesta por hexa o heptasacáridos ramificados formados por un pentasacárido lineal y uno o dos residuos de azúcares unidos aleatoriamente al pentasacárido (Kooiman, 1968; Micheli *et al.*, 1999). Otros autores mediante estudios de hidrólisis/metilación demostraron que el kefiran presenta una estructura más compleja que la que se describe anteriormente, indicando la coexistencia de moléculas con microheterogeneidades en su estructura (Mukai *et al.*, 1988).

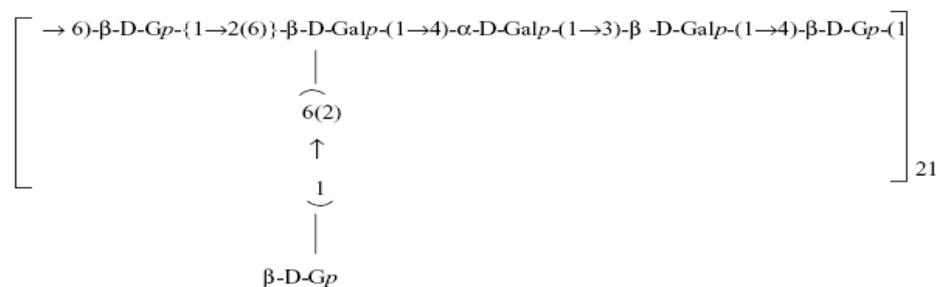


Figura 2: Estructura propuesta para el kefiran en el año 1968 por P. Kooiman. (Carbohydrate Research, 7: 200-211).

Se han estudiado algunos polisacáridos aislados de cepas provenientes de gránulos de kefir con el objetivo de determinar la similitud con el kefiran. Mediante ensayos de ^{13}C -NMR y análisis de metilación se encontró que el *Lactobacillus sp.* KPB-167B produce un polisacárido cuya estructura es similar al kefiran (Yokoi *et al.*, 1991). El polímero procedente de *Lb kefiranofaciens* ZW3 fue estudiado mediante espectroscopía FT-IR resultando ser un glucogalactano que posee grupo carboxilo, hidroxilo y amida en su estructura. Maeda *et al.* (2004a) estudiaron el polisacárido producido por *L. kefiranofaciens* WT-2BT crecido en medio líquido a base de hidrolizado de arroz y encontraron que el polisacárido producido posee un peso molecular del orden de 7.6×10^5 g/mol y está compuesto por glucosa y galactosa en una relación molar 1.00:1.05.

Algunas propiedades del kefiran hacen que su estudio resulte muy interesante. Se puede destacar que tiene la ventaja de ser producido por microorganismos con status GRAS (generalmente reconocidos como seguros), otorgándole valor agregado a los productos en los que se utilice como aditivo.

2.4.1.- Propiedades tecnológicas del kefiran

El kefiran posee propiedades fisicoquímicas y funcionales que permitirían su aplicación como aditivo alimentario (Rimada & Abraham 2006). Se puede destacar que al ser utilizado como aditivo en leches fermentadas produce el aumento de la viscosidad aparente (caracterizada por viscosimetría rotacional), y de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') (realizado por reometría oscilatoria de pequeña amplitud de deformación) de los geles lácteos ácidos (Rimada & Abraham, 2006).

También forman geles en solución acuosa conteniendo etanol (Pintado *et al.*, 1996). La fuerza de los geles preparados con 3% de kefiran

en 8 % de etanol son equivalentes a las obtenidas en los geles formados con 3% de gelatina (Mukai *et al.*, 1991).

Cuando las soluciones de kefiran son congeladas, se produce el alineamiento de las moléculas formando un gel. Los geles formados resultan translúcidos con una alta capacidad de retención de agua ($90,43 \pm 1.51\%$) y suficientemente cohesivos como para soportar su propio peso. Los espectros mecánicos de las muestras congeladas muestran que los módulos elástico (G') es mayor que el módulo viscoso (G'') y ambos módulos resultan independientes de la frecuencia, evidenciando un comportamiento tipo gel. El comportamiento de los geles de kefiran a 37 °C determina su habilidad para fundirse a la temperatura de la boca; esta propiedad resulta relevante para su aplicación en alimentos (Piermaria *et al.*, 2008).

Finalmente, este polisacárido es capaz de producir películas comestibles extremadamente finas, transparentes, flexibles y homogéneas. (Piermaria *et al.*, 2009). Las películas de kefiran observadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) mostraron superficies lisas y estructuras compactas y homogéneas. Además son resistentes a la humedad pero son frágiles y rígidas. La incorporación de glicerol como plastificante disminuye la resistencia a la tracción y aumenta la elongación (Piermaria *et al.*, 2009). Por lo tanto, el agregado de glicerol en concentraciones superiores a 25 g de glicerol cada 100 g de kefiran resulta en películas con buenas características mecánicas y baja permeabilidad al vapor de agua (Piermaria *et al.*, 2009; 2011).

2.4.2.- Funcionalidad biológica del kefiran

Como consecuencia de la estructura que presenta, el kefiran puede llegar intacto al intestino delgado, donde podría ejercer efectos biológicos.

Se ha documentado mediante estudios en ratas hipertensas alimentadas con dietas de alto contenido lipídico que el kefiran posee

actividad anticolesterolemica; observándose que aquellas que recibieron kefiran disminuyeron significativamente la presión sanguínea y los niveles de colesterol-LDL, colesterol total y triglicéridos en relación a aquellas que no lo recibieron (Maeda *et al.*, 2004a). Al utilizar un modelo de ratas constipadas inducido por una dieta baja en fibras se observó que la administración de kefiran mejora los niveles de humedad y peso de las heces (Maeda *et al.*, 2004b).

La actividad inmunomoduladora fue estudiada en modelos murinos *in vivo* y se demostró que la administración oral del kefiran induce una respuesta a nivel de la mucosa intestinal, incrementando la producción de IgA y modificando los patrones de citoquinas liberados a la circulación sanguínea (Vinderola *et al.*, 2006; Kwon *et al.*, 2008; Medrano *et al.*, 2011).

Estudios sobre la acción antitumoral del kefiran mostraron una disminución del crecimiento de tumores en ratones tratados oral o intaperitonealmente con este polisacárido (Shiomi *et al.*, 1982). Murofushi *et al.* (1983) demostraron que la ingesta de kefiran en altas dosis antes del establecimiento del carcinoma producía la remisión de tumores inducidos en ratones en tratados con kefiran. Murofushi *et al.*, (1986) concluyeron que el kefiran es capaz de inducir una respuesta inmune mediada por células.

Otro efecto benéfico que ha sido documentado para el kefiran es la capacidad para antagonizar factores de virulencia de *Bacillus cereus*. Medrano *et al.* (2008) demostraron que el kefiran es capaz de antagonizar los mecanismos de virulencia de *Bacillus cereus* en un modelo *in vitro*. Los estudios realizados en enterocitos humanos en cultivo (línea celular Caco-2) demostraron que la presencia de kefiran (800 mg/l) fue capaz de disminuir los efectos citopáticos provocados por factores extracelulares presentes en los sobrenadantes de cultivo de *B. cereus* B10502 así como también el daño celular causado por las células vegetativas (Medrano *et al.*, 2009). En este estudio, el kefiran fue capaz de disminuir la asociación bacteriana a

enterocitos, evitando alteraciones morfológicas, antagonizando la inducción de eventos de muerte celular y previniendo el desprendimiento celular. La capacidad del kefirán de interactuar tanto con la superficie de bacterias como de enterocitos podría ser la responsable del efecto protector observado.

Rodríguez *et al.* (2005a y b) probaron la actividad antimicrobiana *in vitro* del kefirán contra varias especies de bacterias y observaron que *Streptococcus pyogenes* fue el microorganismo más sensible a kefirán, seguido por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus salivarius*. Otros ensayos mostraron que la administración tópica de kefirán (granos secos) a ratas Wistar, con lesiones de piel inducidas e infectadas con *S aureus*, poseen un efecto protector sobre el tejido conectivo.

Objetivo General:

Aislar e identificar los microorganismos responsables de la producción de kefirán a partir de gránulos de kefir y evaluar su efecto prebiótico para su posible aplicación en alimentos funcionales.

Para cumplir con el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

Objetivos Específicos:

A. Aislar *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* de los gránulos de kefir de la colección CIDCA.

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

C. Estudiar *in vivo* el efecto del kefirán y/o de EPS de microorganismos aislados de kefir sobre la microbiota intestinal para su potencial aplicación como prebiótico.

