



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Polisacáridos de bacterias lácticas de
fermentos artesanales para el desarrollo
de alimentos funcionales.
Estudio del efecto prebiótico.**

Lic. María Fernanda Hamet
Directora: Dra. Analía G. Abraham



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

**“Polisacáridos de bacterias lácticas de
fermentos artesanales para el desarrollo de
alimentos funcionales. Estudio del efecto
prebiótico.”**

Lic Maria Fernanda Hamet

Directora: Dra. Analía G. Abraham

- 2012 -

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata se desarrolló en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos y en la cátedra de Microbiología General (Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata).



Los resultados del presente trabajo de tesis han sido publicados parcialmente en las siguientes instancias:

Revistas periódicas:

- Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterization. Londero A., Hamet M. F., De Antoni G. L., Garrote G. L., Abraham A. G. Journal of Dairy Research (2011).

Capítulos de libro:

- Abraham A.G., Medrano M., Mobili P., Hamet M. F., Serradell M., Romanin D. E., Diosma G., De Antoni G. L., Garrote G. Acción benéfica sobre la salud de bacterias ácido lácticas, levaduras y sus metabolitos. En: Aplicaciones prebióticas y tecnológicas de bacterias lácticas. De la Red iberoamericana NOVELPROBIO financiada por el programa CYTED. Ed: Andrea Gomez Zavaglia Editorial de la UNLP. ISBN: 978-84-96023-96-3.

Presentación oral:

- XII Congreso Argentino De Microbiología. VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología. Micología y Parasitología Clínica – SADEBAC. I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. Asociación Argentina de Microbiología. *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* de gránulos de kéfir argentinos. Aislamiento, identificación y caracterización reológica del producto fermentado. Hamet, M. F.; Londero, A.; Piermaria, J.; Garrote, G. L.; Abraham, A. G. Buenos Aires, 17 al 20 de octubre de 2010.

Trabajo completo:

- XIII Congreso CYTAL - AATA Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Caracterización fisicoquímica de leches fermentadas con lactobacilos aislados de kefir y su relación con la producción de polisacáridos. Hamet, M. F.; Piermaria, J. y Abraham, A. G. Buenos Aires - 19 Al 21 De Octubre de 2011.

Posters:

- XIII Congreso CYTAL - AATA Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Identificación polifásica de lactobacilos aislados de kefir. Hamet, M. F.; Medrano, M.; Vercammen, E.; Vandamme, P.; Abraham, A. G. Buenos Aires - 19 al 21 de octubre de 2011.
- XIII Congreso CYTAL - AATA Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Caracterización fisicoquímica de leches fermentadas con lactobacilos aislados de kefir y su relación con la producción de polisacáridos. Hamet, M. F.; Piermaria, J. Y Abraham, A. G. Buenos Aires - 19 al 21 de octubre de 2011.
- “LIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y LVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología”. (Organización: SAI). “Efecto prebiótico e inmunomodulatorio del kefir en un modelo murino”. Medrano, M.; Hamet, M. F.; Racedo, S. M.; Rolny, I. S.; Perez, P. F.; Abraham, A. G. Mar del Plata. 18 al 21 de Noviembre de 2009.
- III Simposio internacional de Bacterias lácticas. LI encuentro Red BAL Argentina. Influence of kefir on mice intestinal microbiota. Hamet, M. F.; Medrano M.; Garrote G. L.; Pérez P.; Abraham A. G. Tucumán. 15 al 17 de septiembre de 2009

- III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de lo Alimentos. “Estrategias de aislamiento y caracterización de *Lactobacillus kefiranofaciens*”. Hamet, M. F.; Londero, A.; Piermaria, J.; Garrote, G. y Abraham, A. Córdoba, Argentina 14, 15, 16 de Abril de 2009.
- XIII Jornadas Argentinas de Microbiología. “Análisis de la diversidad microbiana en gránulos de kefir mediante DGGE”. Asociación Argentina de Microbiología. Hamet M. F., Londero A., Rey F., De Antoni G. L., Garrote G. L. y Abraham A. G. Rosario, Argentina. Octubre de 2008.

Agradecimientos:

A mi directora de tesis, Analía Abraham, por haber confiado en mi, brindandome su tiempo, disposición y conocimientos en estos años.

Al CONICET, a la ANPCYT y al Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas por haber financiado mi trabajo.

A las autoridades del CIDCA por permitir que este trabajo se desarrollara en sus laboratorios.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata que me brindo la posibilidad de acceder a una excelente formación.

A la Dra. Graciela De Antoni, por haberme permitido formar parte del laboratorio de bacterias lácticas y especialmente por haber promovido mi espíritu de “extensionista” dentro del grupo kefir.

A Grace por su paciencia y dedicación para contestar todas mis consultas.

A Pablo Perez por su colaboración en los experimentos de FISH-citometría.

A Aldo Campana por su asistencia técnica en HPLC.

A Lucy por todo, especialmente por los postres de kefir.

A Angela por ser mi amiga y haberme acompañado en este camino.

A todo mis compañeros de microbiología por haberme brindado no solo su ayuda incondicional sino principalmente por haberme brindado su amistad.

A Sergio y a mis ex-compañeritos de box por los buenos momentos compartidos.

A Francisco por su ayuda incondicional en tareas varias, a Judith por su asistencia con las carátulas, el kefiran y tantas otras cosas, a Micaela por haberme ayudado a dar mis primeros pasos en el laboratorio, a Alejandra por haber compartido conmigo paso a paso este camino y a todos especialmente por su amistad y comprensión.

A mis amigos de la vida, especialmente a Silvia, Mariana y Valeria con las que compartí todos estos años. A mis amigos del grupo kefir por haberme hecho crecer como persona, especialmente a Vero. A mis compañeros becarios del CIDCA por haber hecho que mi estadía sea tan amena.

A mi familia por el amor que me brindan diariamente.

Índice General	I
Introducción General	1
1. Alimentos funcionales	1
1.1. Probióticos y prebióticos como componentes de alimentos funcionales	2
1.1.1. Probióticos	2
1.1.2. Prebióticos	3
2. El kefir: un ecosistema bacteriano complejo	5
2.1. El kefir como alimento funcional	6
2.2. Microorganismos presentes en el gránulo de kefir.	10
2.3. Componentes del gránulo de kefir: Biosíntesis	13
2.4. Kefiran	14
2.4.1. Propiedades tecnológicas del kefiran	15
2.4.2. Funcionalidad biológica del kefiran	16
Objetivos	19
Materiales y Métodos	21
1. Medios de cultivo	21
2. <i>Buffers</i> comunes a varias metodologías	22
3. Coloración de Gram	23
4. Gránulos de kéfir utilizados	24
5. Microorganismos de referencia. Condiciones de cultivo	24
6. Microorganismos de la colección CIDCA. Condiciones de cultivo.	25
7. Metodología para el aislamiento de microorganismos de gránulos de kefir	26
7.1. Disgregación de gránulos	26
7.2. Cultivo y selección de microorganismos	27
8. Reacción de la catalasa	27
9. Producción de gas a partir de glucosa (10 g/l)	28
10. Capacidad de fermentar la leche	28
11. Perfil de proteínas de célula entera por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE).	28
12. Obtención de ADN genómico de gránulos de gránulos de kefir.	32
13. Obtención de ADN genómico a partir de bacterias aisladas	33
14. Obtención de ADN a partir de contenido intestinal y materia fecal	36

15. Determinación de la concentración de ADN	36
16. Amplificación del ADNr 16S	36
17. Electroforesis en gel de acrilamida con gradiente desnaturizante (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE</i>)	40
18. Secuenciación	44
19. Tipificación por rep PCR (GTG) ₅ '	46
19.1. Amplificación de secuencias repetidas: rep PCR	46
19.2. Electroforesis en gel de agarosa	48
20. Secuenciación del gen de la fenilalanina sintasa	49
20.1. Amplificación del gen de la fenilalanina sintasa	49
20.2. Control de los amplicones	50
20.3. Purificación	51
20.4. Reacción de amplificación para la secuenciación	51
20.5. Purificación y Secuenciación	52
21. Caracterización reológica de las leches fermentadas	52
21.1. Obtención de leches fermentadas.	52
21.2. Obtención de geles lácteos acidificados con δ -gluconolactona.	53
21.3. Evaluación del comportamiento de flujo y determinación de viscosidad.	53
21.4. Evolución del espectro mecánico de los geles ácidos	54
22. Obtención y purificación de polisacáridos.	55
22.1. Extracción de exopolisacáridos de microorganismos aislados	55
22.2. Extracción de exopolisacáridos de gránulos de kefir	56
22.3. Cromatografía de capa fina	56
22.4. Cuantificación de proteínas: Método de Bradford	58
22.5. Cuantificación de azúcares totales: Método de antrona	58
23. Caracterización de exopolisacáridos.	59
23.1. Determinación de peso molecular	59
23.2. Composición de azúcares mediante cromatografía de intercambio aniónico	60
23.2.1. Hidrólisis para la determinación de azúcares	60
23.2.2. Cromatografía de intercambio aniónico	60
24. Efecto de polisacáridos sobre la microflora fecal de ratones.	61
24.1. Animales de laboratorio	61
24.2. Soluciones de polisacáridos	61
24.3. Tratamiento 1: Diseño del Experimento	61
24.3.1. Análisis de las muestras de contenido intestinal	62
24.4. Tratamiento 2: Diseño del Experimento	63
24.4.1. Análisis de las muestras de material fecal	64
24.4.1.1. Recuento de lactobacilos y bifidobacterias	64

24.4.1.2. Peso de los ratones	65
24.4.1.3. PCR-DGGE	65
24.4.1.4. Análisis mediante hibridación fluorescente <i>in situ</i> - Citometría de flujo	65
24.4.1.5. Microscopía laser confocal	68

Capítulo 1

Aislamiento e Identificación de Microorganismos de Gránulo de Kefir.

Introducción	69
1. Identificación de microorganismos en comunidades microbianas complejas.	69
1.1. Métodos para el estudio de comunidades microbianas: electroforesis dependientes de la secuencia.	69
1.1.1. Extracción del ADN	70
1.1.2. Amplificación	71
1.1.3. Electroforesis	72
1.1.4. Análisis de datos	73
2. Taxonomía	74
2.1. El género <i>Lactobacillus</i>	76
2.1.1. <i>Lb kefiranofaciens</i> : características generales y su importancia en el ecosistema del kefir.	80
Objetivos	83
Resultados y Discusión	84
1. Aplicación de métodos independientes de cultivo para estudiar la presencia de <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> en gránulos de kefir.	84
2. Aislamiento e identificación de <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> de gránulos de kefir.	95
2.1. Aislamiento	95
2.2. Identificación de los aislados obtenidos	99
2.2.1. Caracterización fenotípica: Coloración, morfología de colonia, producción de gas a partir de glucosa y capacidad para fermentar la leche.	99
2.2.2. Caracterización fenotípica: Perfil de proteínas totales por SDS-PAGE	105
2.2.3. Características genotípicas: Amplificación de secuencias repetitivas	109
2.2.4. Características genotípicas: Secuenciación del gen que codifica el tRNA de la fenilalanina sintasa (<i>pheS</i>)	113
2.2.5. Perfil obtenido por electroforesis en geles con gradiente desnaturizante químico (DGGE) de los microorganismos aislados de gránulo de kefir y secuenciación del ADNr 16S	115
Conclusiones	128

Capítulo 2:

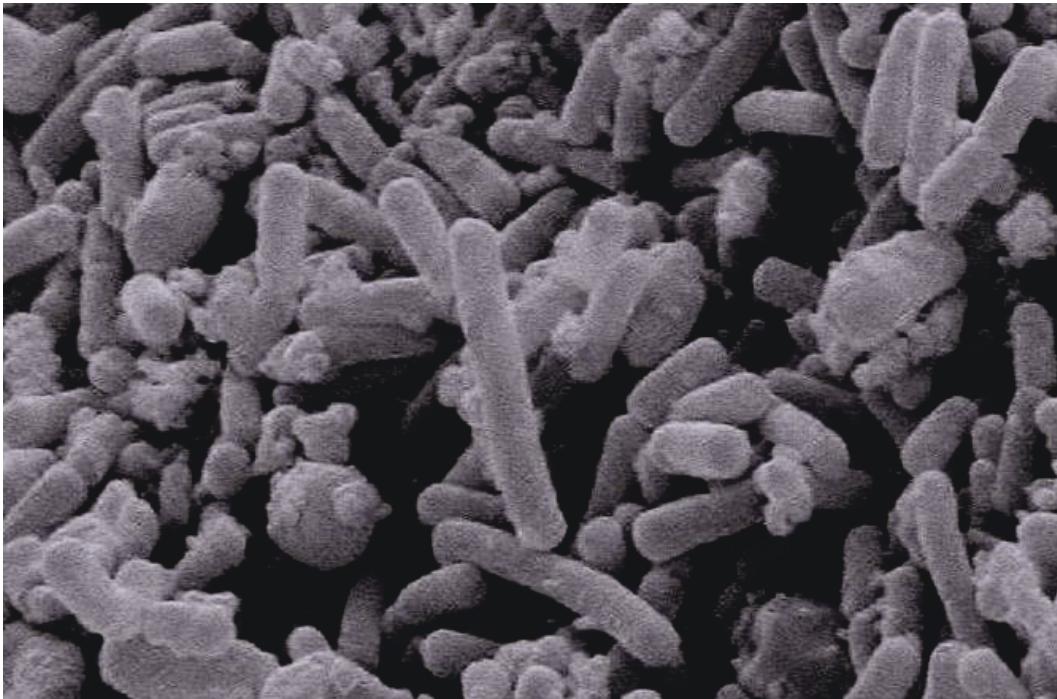
Selección de Lactobacilos Productores de Exopolisacáridos.

Introducción	131
1. Bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos en la industria de alimentos.	131
1.1. Características y clasificación de polisacáridos producidos por bacterias ácido lácticas.	131
1.2. Rol fisiológico de exopolisacáridos bacterianos	133
1.3. Producción de exopolisacáridos por bacterias ácido lácticas	134
1.3.1. Cuantificación de los exopolisacáridos producidos por bacterias lácticas.	135
1.4. Selección de bacterias productoras de exopolisacáridos.	136
1.5. Formación de geles lácteos ácidos.	137
1.6. Interacción exopolisacárido-proteína en geles lácteos	138
1.7. Propiedades de los exopolisacáridos en solución acuosa.	139
1.8. Evaluación de las características reológicas de geles lácteos.	140
1.8.1. Viscosimetría rotacional.	140
1.8.2. Viscosimetría oscilatoria de pequeña amplitud de deformación	145
Objetivos	148
Resultados y Discusión	149
1. Selección de cepas productoras de polisacáridos.	149
1.1. Efecto del pH de las leches fermentadas sobre la viscosidad aparente y el área de histéresis.	150
1.2. Comportamiento de flujo de leche acidificada con δ -gluconolactona y leches fermentadas con <i>Lb delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp <i>kefiranofaciens</i> .	151
1.3. Comportamiento de flujo de las leches fermentadas con los microorganismos aislados de kefir.	154
1.3.1. <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	154
1.3.2. <i>Lactobacillus plantarum</i>	156
1.3.3. <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> .	158
1.3.4. <i>Lactobacillus paracasei</i>	160
2. Caracterización de las leches fermentadas mediante reometría oscilatoria de pequeña amplitud de deformación.	165
3. Aislamiento y caracterización de polisacáridos.	171
3.1. Cuantificación de la producción de polisacáridos durante la fermentación de la leche.	171
3.2. Peso molecular de los polisacáridos.	175
3.3. Caracterización de los polisacáridos producidos por <i>Lactobacillus paracasei</i>	180

Conclusiones	183
Capítulo 3	
Efecto de Polisacáridos Bacterianos sobre el Balance de la Microflora Intestinal de Ratonés.	
Introducción	185
1. Composición de la microflora intestinal humana	185
1.2. Función de la microflora intestinal.	186
1.3. Componentes benéficos de la microbiota intestinal	188
1.4. El concepto de prebióticos.	189
1.4.1. Regulación de la microbiota intestinal por la dieta mediante el uso de prebióticos.	191
1.4.2.- Exopolisacáridos de bacterias lácticas como prebióticos	192
2. Metodologías para el estudio de la microbiota intestinal	193
2.1. Hibridación fluorescente <i>in situ</i> - Citometría de flujo	195
Objetivos	200
Resultados y Discusión	201
1.- Efecto de la administración oral de kefirán sobre la microbiota intestinal de ratones.	201
1.1. Optimización de las condiciones para el análisis mediante PCR-DGGE.	203
1.1.1.- Verificación de la especificidad de los oligonucleótidos empleados	203
1.1.2.- Selección de las condiciones de amplificación	206
1.1.3.- Selección de las condiciones de corrida para la Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante químico.	207
1.2. Análisis de la población de Eubacterias.	208
1.3. Estudio de las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos	215
2. Efecto de la administración oral de kefirán sobre la evolución de la microbiota fecal de ratones.	218
2.1. Evolución de poblaciones bacterianas en muestras de materia fecal	219
2.1.1. Análisis de la evolución de la población de Eubacterias.	219
2.1.2.- Evolución en los perfiles de bifidobacterias y lactobacilos	222
2.2. Cuantificación de poblaciones bacterianas mediante hibridación <i>in situ</i> fluorescente y citometría de flujo.	224
2.2.1. Puesta a punto del método. Especificidad de las sondas.	224
2.2.2. Cuantificación de poblaciones de lactobacilos y bifidobacterias mediante Hibridación <i>in situ</i> fluorescente y citometría de flujo.	225
3.-Efecto de la administración oral del polisacárido producido por <i>Lb paracasei</i> CIDCA 83124 sobre la evolución de la microbiota fecal de ratones.	232
3.1.- Evolución de poblaciones bacterianas en muestras de materia fecal.	232
3.1.1.- Evolución en los perfiles de bifidobacterias y lactobacilos	232

3.2.- Comparación del efecto del consumo de kefirán y del consumo del polisacárido producido por el <i>Lactobacillus paracasei</i> CIDCA 83124	234
3.2.1.-Peso de los ratones.	234
3.2.2.-. Recuento de microorganismos viables.	235
Conclusiones	238
<hr/>	
Conclusiones Generales	241
<hr/>	
Referencias Bibliográficas	247

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.

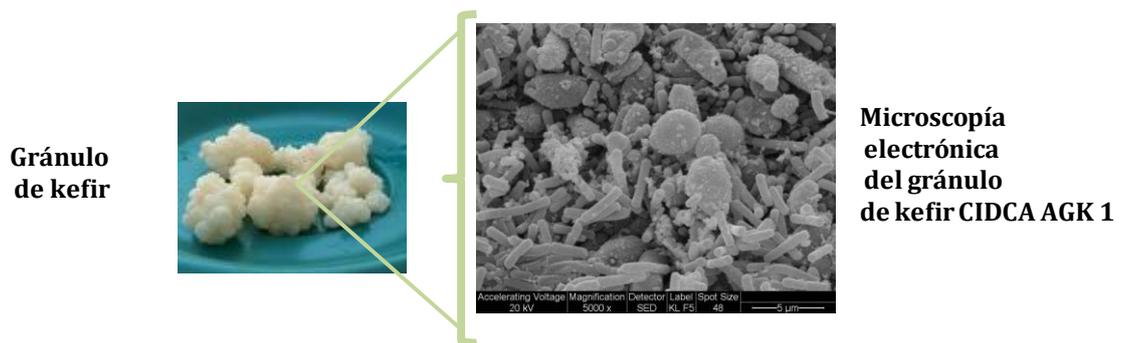


Figura 1: Aspecto macroscópico y micrografía electrónica de gránulo de kefir CIDCA AGK 1, gentileza de Carolina Iraporda.

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>	
<i>Candida friedricchii</i>	Angulo <i>et al.</i> 1993; Wyder 2001.
<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 gránulo 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.*,

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 anticolesterolémica; 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:

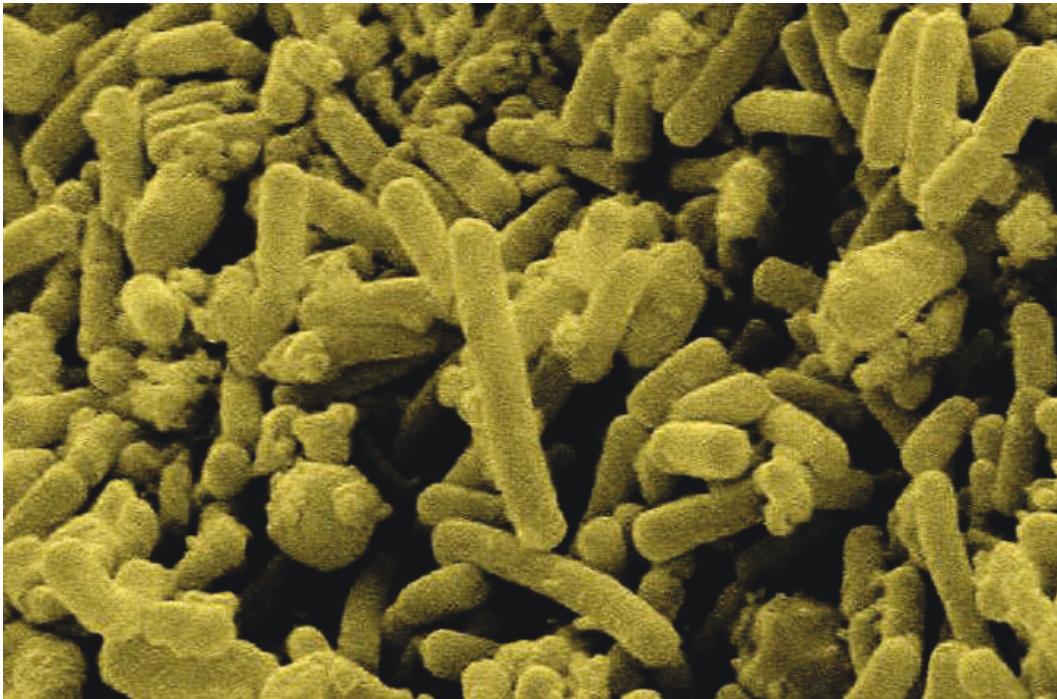
Objetivos Específicos:

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.

Materiales y Métodos



Materiales y Métodos

1.- Medios de cultivo

Leche: Se utilizó leche descremada estéril (UHT) (Sancor, Santa Fe, Argentina).

Caldo MRS (De Man, Rogosa & Sharpe, 1960): Se utilizó caldo MRS Difco (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) con la siguiente composición:

Peptona universal.....	10 g/l
Extracto de carne.....	5 g/l
Extracto de levadura.....	5 g/l
D(+)-glucosa.....	20 g/l
K ₂ HPO ₄	2 g/l
Tween 80.....	1 g/l
Citrato ácido de amonio.....	2 g/l
Acetato de sodio.....	5 g/l
MgSO ₄	0,1 g/l
MnSO ₄	0,05 g/l
pH final: 6,5	

Caldo MRS pH 5: Caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe, 1960) llevado a pH 5 con una solución diluida de HCl.

Agar MRS: (De Man, Rogosa y Sharpe, 1960): Caldo MRS adicionado con agar (Parafarm, Argentina) en concentración 15 g/L.

Agar MRS pH 5: Caldo MRS pH 5 adicionado con agar (Parafarm, Argentina) en concentración 18 g/L.

Caldo LB: composición:

Triptona.....10 g/l

Extracto de levadura.....5 g/l

NaCl.....5 g/l

H₂O.....c.s.p. 1 l

pH final: 7.0

Caldo 111: composición:

Triptona.....10 g/l

Extracto de levadura.....10 g/l

Lactosa.....10 g/l

H₂O..... c.s.p. 1 l

pH final: 6,5

2.- Buffers comunes a varias metodologías

Buffer PBS: composición:

KH₂PO₄ 0,144 g/l

NaCl.....9,0 g/l

Na₂HPO₄..... 0,795 g/l

H₂O.....c.s.p. 1 l

Buffer TAE 50x: composición:

Tris-base242 g/l
Acido Acético Glaciar.....0,0571 l
0,5 M EDTA (pH 8.0).....0,1 l
Agua milliQ.c. s. p. 1000 ml
Conservar a 4 °C.

Buffer TE: composición:

Tris-HCl (pH 8.0).....10 mM
EDTA (pH 8.0).....1 mM
pH final: 8.0
Conservar a 4 °C.

3.- Coloración de Gram

Soluciones de trabajo

Cristal violeta: 10 g/l en agua destilada.

Safranina (solución madre): 25 g/l de etanol etanol.

Safranina (solución de trabajo): solución madre diluida 1/10 en agua destilada.

Lugol: 10 g I₂ + 20 g KI en 1 litro de agua destilada.

Decolorante: etanol-acetona en relación 4:1.

Las soluciones deben ser filtradas antes de ser utilizadas.

Protocolo:

La coloración se llevo a cabo a partir de cultivos frescos de los microorganismos. Se procedió a fijar las muestras a la llama y posteriormente

se aplicaron las soluciones y se realizaron los sucesivos lavados siguiendo el esquema que se detalla a continuación:

Cristal violeta.....2 min
Lugol.....30 s
Lugol.....30 s
Lavar con agua
Decolorante.....10 s
Lavar con agua
Safranina.....2 min

4.- Gránulos de kéfir utilizados

Se utilizaron nueve gránulos de kefir de leche pertenecientes a la colección CIDCA denominados: CIDCA AGK1, CIDCA AGK2, CIDCA AGK3, CIDCA AGK5, CIDCA AGK6, CIDCA AGK7, CIDCA AGK8, CIDCA AGK10 y CIDCA AGK11.

Los gránulos de kefir fueron conservados a -20° C en leche estéril. Para los experimentos se utilizaron gránulos activos. Con este fin los gránulos fueron reactivados mediante sucesivos repiques en leche descremada estéril (UHT) (Sancor, Santa Fe, Argentina) utilizando una relación de 10 g de gránulo cada 100 ml de leche. Cada subcultivo fue incubado a 20 °C por 24 h y posteriormente separado mecánicamente, por filtración, del producto fermentado. Previo a cada subcultivo los gránulos fueron lavados con agua destilada.

5.- Microorganismos de referencia. Condiciones de cultivo

En la Tabla 1 se detallan los microorganismos pertenecientes a colecciones internacionales utilizados en este trabajo de tesis y sus respectivas condiciones de cultivo.

Las condiciones de anaerobiosis necesarias para el cultivo de algunos microorganismos se obtuvieron utilizando el kit comercial AnaeroPack-Anaero (Mitsubishi Gas Chemical CO, Inc. Tokyo, Japan).

Tabla 1: Microorganismos de referencia con sus respectivas condiciones de cultivo.

Microorganismo	Condiciones de Cultivo	Colección
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	Anaerobiosis, MRS pH5, 30°C, 7 días	^a JCM 6985
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	Anaerobiosis, MRS pH5, 30°C, 7 días	^b DSMZ 5016
<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>	Anaerobiosis, MRS pH5, 30°C, 7 días	^d LMG 15132
<i>Lb plantarum</i>	Aerobiosis, MRS, 30 °C, 24 horas	^b DSMZ 20174
<i>Lb parakefir</i>	Aerobiosis, MRS, 30 °C, 48 horas	^b DSMZ 8328
<i>Lb casei</i>	Aerobiosis, MRS, 30 °C, 48 horas	^b DSMZ 20011
<i>Lb acidophilus</i>	Aerobiosis, MRS, 37 °C, 48 horas	^c ATCC 314
<i>Lb brevis</i>	Aerobiosis, MRS, 30 °C, 48 horas	^c ATCC 8287
<i>Lb kefir</i>	Aerobiosis, MRS, 37 °C, 48 horas	^a JCM 5818

^a JCM: Japan Collection of Microorganisms (Reiken, Japón);

^b DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig Alemania);

^c ATCC: American Type Culture Collection (Manassas, Estados Unidos de América);

^d BCCM/LMG: Belgium Co-ordinated Collection of Micro-organism, Ghent, Bélgica).

6.- Microorganismos de la colección CIDCA. Condiciones de cultivo.

Se utilizaron microorganismos aislados de gránulos de kefir y de fermentos artesanales pertenecientes a la colección CIDCA. En la Tabla 2 se detallan dichos microorganismos y las condiciones de cultivo empleadas.

Tabla 2: Condiciones de cultivo utilizadas para microorganismos de la colección CIDCA (Centro de Investigación en Desarrollo y Criotecnología de Alimentos, La Plata, Argentina).

Especie	Nombre	Condiciones de cultivo
<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	Medio MRS / 30 °C / Aerobiosis / 24 horas
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CIDCA 332, CIDCA 333	Medio MRS / 37 °C / Aerobiosis / 8 horas
<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 8241, CIDCA 8214	Medio 111 / 30 °C / Aerobiosis / 24 horas

7.- Metodologías para el aislamiento de microorganismos a partir de gránulos de kefir.

7.1.- Disgregación de gránulos

Se realizaron aislamientos a partir de los 9 gránulos de kefir activos pertenecientes a la colección CIDCA mencionados en el inciso 4 de Materiales y Métodos.

Con el objetivo de facilitar la liberación de los microorganismos de la matriz de polisacáridos y proteínas en la cual se encuentran, se utilizaron tres procedimientos distintos. El **procedimiento 1** consistió en resuspender 1 g de

gránulo en 5 ml de agua destilada estéril e incubar la suspensión durante 60 minutos en un baño termostático a 40 °C. El **procedimiento 2** se basó en el mismo principio que el anterior pero, luego de la disolución del gránulo en agua, se procedió a homogeneizar mecánicamente (Ultraturrax) para lograr la desintegración completa de la estructura del gránulo. Finalmente, en el **procedimiento 3** se procedió a congelar 1 g de gránulo en nitrógeno líquido (- 196 °C), disgregarlo en mortero y disolverlo en 5 ml de agua destilada.

7.2.- Cultivo y selección de microorganismos

Se tomaron alícuotas de 100 µl de las suspensiones obtenidas mediante cada uno de los procedimientos descritos en el punto anterior y se adicionaron a tubos con 5 ml de medio de cultivo líquido selectivo (Caldo MRS pH 5.0). Seguidamente, los tubos fueron incubados a 30 °C durante 7 días en atmósfera anaerobia. Los cultivos resultantes se emplearon para hacer estrías en placas conteniendo medio de cultivo sólido selectivo (agar MRS pH 5.0) que fueron incubadas en las mismas condiciones que los tubos.

Luego de la incubación se escogieron de las placas colonias con distintas morfologías. Cada una de ellas fue repicada mediante estrías a otra placa con el mismo medio de cultivo y crecida en idénticas condiciones. Este procedimiento se repitió sucesivas veces hasta asegurar obtener colonias que provengan de un único microorganismo (método de aislamiento por estrías). La pureza de los cultivos fue constatada mediante la observación microscópica de las muestras. Los aislados bacterianos puros se almacenaron utilizando leche como crioprotector a -80 °C.

8.- Reacción de la catalasa

La prueba se realizó a partir cultivos líquidos frescos de los microorganismos. Para determinar la presencia de esta enzima en la célula se

agregó sobre un portaobjeto una gota de agua oxigenada y sobre ésta una gota del cultivo a ensayar. El ensayo se consideró positivo cuando se observó la formación de burbujas de oxígeno.

9.- Producción de gas a partir de glucosa (10 g/l).

Los microorganismos fueron inoculados en tubos conteniendo caldo MRS con campana de Durham. Los mismos, fueron incubados en las condiciones descritas en las Tablas 1 y 2 de Materiales y Métodos a menos que se indique lo contrario. La presencia de una burbuja retenida en la campana indicó la producción de gas a partir de la glucosa presente en el medio.

10.- Capacidad de fermentar la leche

Los microorganismos fueron sembrados en leche estéril en una relación de 0,1 ml de cultivo cada 10 ml de leche y se incubaron a 30 °C en atmósfera anaerobia durante 7 días. Pasado este periodo se determinó la capacidad de fermentar la leche mediante observación de formación de coágulo y medida del pH resultante.

11.- Perfil de proteínas de célula entera por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizantes (SDS-PAGE).

Soluciones de trabajo

Solución de acrilamida -bisacrilamida (N-N´metilen-bisacrilamida)

Acrilamida.....30,0 g
Bisacrilamida.....0,8 g
Agua bidestilada.....c.s.p 100 ml

Para preparar esta solución se procedió a disolver los sólidos en 70 ml de agua bidestilada, filtrarlos y luego completar el volumen de 100 ml con agua bidestilada. La solución se conservó en heladera en frasco color caramelo para preservarla de la luz. Para preparar la solución se utilizaron guantes y barbijo.

Buffer de corrida (5X)

Glicina.....72,0 g
Tris base.....15,0 g
SDS.....5,0 g
H₂O bidestilada.....c.s.p. 1 l
Llevar a pH 8,3 con HCl .

Buffer gel separador (4X)

SDS.....0,6 g
Tris base.....27,2 g
TEMED 0,6 ml
H₂O bidestilada.....c.s.p. 150 ml
Llevar a pH 8,8 con HCl.

Buffer gel apilador (4X)

SDS.....0,4 g
Tris base.....6,0 g
TEMED.....0,4 ml
H₂O bidestilada.....c.s.p.100 ml
Llevar a pH 6,8 con HCl.

Buffer de muestra

Buffer apilador.....	4,0 ml
SDS.....	0,16 g
Glicerol	4.0 ml
β -mercaptoetanol.....	5 %
Azul de bromofenol.....	2 mg

Solución colorante y fijadora

Disolver 1,92 g de Coomassie R en 400 ml de metanol. Adicionar 160 ml de ácido acético y 400 ml de agua. Agitar bien y filtrar.

Solución Decolorante

Metanol o etanol.....	250 ml
Acido acético.....	100 ml
Agua destilada.....	650 ml

Protocolo

Para la obtención de los extractos celulares las bacterias fueron cultivadas en medio líquido hasta fase estacionaria en sus respectivas condiciones de cultivo (Tabla 3). Seguidamente fueron cosechadas por centrifugación (10.000 g, 10 min) y el *pellet* resultante fue lavado dos veces y resuspendido en cantidad suficiente de *buffer* PBS como para alcanzar DO₅₅₀: 20.

Se separaron alícuotas de 100 μ l de las soluciones bacterianas obtenidas y se les adicionó 6 μ l de solución de lisozima (Sigma Co., St.Louis, USA) en concentración 10 mg/ml. Luego fueron incubadas durante 3 horas a una temperatura de 37 °C. Finalizado el tiempo de incubación se agregaron 10 μ l de una solución de SDS (20 % p/v) a cada una y se las llevó a ebullición durante 2

minutos. Finalmente, cada solución fue adicionada de un volumen igual de *buffer* de muestra con β -mercaptoetanol y se las llevó a ebullición durante 2 minutos.

Los extractos celulares se analizaron por SDS-PAGE según el método de Laemmli (1970) en geles de 9 x 8 x 0,1 cm, disociantes y continuos. Se utilizó una concentración de 12,8 % p/v de acrilamida en el gel separador y 4 % p/v en el gel apilador. La preparación de las soluciones de acrilamida para cada uno de los geles se detalla en la Tabla 3. El equipo utilizado fue un sistema vertical Bio- Rad Mini Protean II (Bio Rad Lab, C.A.). La siembra se realizó con jeringa Hamilton, los volúmenes de siembra variaron entre 15 y 20 μ l. La corrida electroforética se llevó a cabo a 120 V.

Tabla 3: Volúmenes necesarios de cada reactivo para preparar un gel con separadores de 1mm de espesor.

Reactivos	Gel Separador 12,8 %	Gel Apilador 4 %
<i>Buffer</i> gel separador	1,25 ml	--
<i>Buffer</i> gel apilador	--	875 μ l
Agua destilada	3,25 ml	980 μ l
Glicerol	--	980 μ l
Acrilamida-bis 30,8%	4,25 ml	455 μ l
Persulfato de amonio 10%*	70 μ l	45 μ l

* agregar inmediatamente antes de cargar las placas

Para la tinción se introdujo el gel en la solución colorante y fijadora por un periodo de 2 horas con agitación. Pasado éste tiempo se colocaron en solución decolorante hasta observar las bandas nítidamente. Los geles se conservaron en agua destilada con una gota de ácido acético.

Para determinar el peso molecular de las proteínas presentes en las diferentes muestras se incluyó en una de las calles del gel un patrón de proteínas de peso molecular conocido. Se emplearon patrones de bajo peso

molecular (Sigma) conteniendo: fosforilasa b (94 kDa), albúmina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y lactalbúmina (14,4 kDa).

Los geles proteicos fueron escaneados y la imagen fue analizada. Los perfiles obtenidos fueron comparados estadísticamente utilizando el programa SYSTAT 12.

12.- Obtención de ADN genómico de bacterias presentes en gránulos de kefir.

Soluciones de trabajo

Buffer liticosa

Sorbitol.....0,9 M
Tris-HCl pH 8.....0,1 M
EDTA.....0,1 M

Buffer lisozima

Tris-HCl.....50 mM
EDTA.....5 mM
Sacarosa.....50 g/l
pH final: 8

Protocolo

Se colocó 1 g de gránulo de kefir seco en 20 ml de agua destilada estéril y la suspensión se mantuvo a 100 °C en un baño termostático. Las células fueron luego separadas por centrifugación (15 min a 15.000 g) en una centrifuga Sorvall RC-5B plus (Sorvall Products, L.P. Newtown, CT, USA) y resuspendidas en 10 ml de agua destilada estéril. Este paso de precipitación y disolución se

llevó a cabo dos veces. El *pellet* obtenido se resuspendió en 100 µl de *buffer* liticosa adicionado de 10 µl de liticosa 2,5 mg/ml (Sigma Chemical, St. Louis, USA) y se incubó a 37 °C por 1 hora en baño termostático. Luego, se agregaron 40 µl de *buffer* lisozima y 40 µl de lisozima 10 mg/ml (Sigma Chemical, St. Louis, USA) y se incubó durante 15 min a una temperatura de 20 °C. El proceso de extracción y purificación se llevó a cabo utilizando un kit comercial AccuPrep Genomic ADN Extraction kit (BIONEER, Korea) de acuerdo al protocolo del proveedor. El ADN obtenido fue almacenado hasta su uso a -20 °C en *eppendorf* libres de ADN.

13.- Obtención de ADN genómico a partir de bacterias aisladas.

Soluciones de trabajo

Buffer TES

Tris-base50 mM

EDTA.....1 mM

Sacarosa.....6,7 %

pH final: 8.0

Filtrado, esterilizado y conservado a temperatura ambiente.

Buffer STET

Tris-base50 mM

EDTA.....50 mM

Sacarosa.....8 %

Triton-X-1005 %

pH final: 8.0

Filtrado, esterilizado y conservado a temperatura ambiente.

Ribonucleasa A (ARNsa)

ARNsa200 mg
NaCl0,8766 g
Agua milliQ.....c. s. p. 100 ml
pH final: 5.0
Almacenado a -20 °C.

Buffer RS

NaCl..... 0,15 M
EDTA (pH 8.0).....0,1 M

Solución de lisozima/ mutanolisina

Lisozima 3 ng
Mutanolisina 5000 U ml⁻¹ (Sigma).....30 µl
Buffer TES.....62,5 µl
Proteinquinasa K12,5 µl

Protocolo

Los microorganismos fueron crecidos en medio líquido, en sus respectivas condiciones de cultivo, hasta fase estacionaria. Luego, se extrajo el ADN genómico utilizando un kit comercial (AccuPrep Genomic ADN Extraction kit, BIONEER, Korea) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El ADN obtenido fue almacenado hasta su utilización a -20 °C en *eppendorf* libres de ADN.

Cuando el ADN se obtuvo a partir de los microorganismos desarrollados en medio sólido las células fueron sembradas en placa y crecidas en sus respectivas condiciones de cultivo. Luego fueron recolectadas con ansa y la masa celular obtenida fue resuspendida en 1 ml de *buffer* RS. Esta solución fue

centrifugada a 4 °C durante 2 minutos a 8.000 g y el *pellet* se congeló a -20 °C por un periodo mínimo de 1 hora (tiempo máximo: 1 semana). Una vez descongelado el *pellet* se resuspendió en 1 ml de *buffer* TES, se centrifugó (2 min, 8.000 g, 4 °C) y se descartó el sobrenadante. Para la lisis se procedió a resuspender el *pellet* obtenido en 275 µl de *buffer* STET. Luego, se agregaron 105 µl de solución recién preparada de lisozima-mutanolisina y se incubó a 37 °C durante 60 min. Concluido dicho período de incubación se adicionaron 40 µl de SDS 20 % p/v en *buffer* TE termostatzado a 37 °C y se le agregaron perlas de vidrio. Se agitó en *vortex* dos veces durante 10 s. Finalmente, se realizaron dos incubaciones sucesivas de 10 min cada una, a 37 °C y 65 °C respectivamente. Una vez finalizada la lisis se procedió a purificar las muestras. Para ello se adicionó a cada muestra 100 µl de *buffer* TE y se transfirió el contenido a un tubo *ependorf phase-lock gel* (Heavy 2 ml-200, 5 prime GmbH, mat: 2900309). Se agregaron bajo campana 515 µl de fenol/cloroformo/isoamliialcohol (24:24:1), se agitó vigorosamente y se centrifugó (5 min, 10.000 g a temperatura ambiente). Cuando la fase superior no se observó completamente clara, se repitió la extracción agregando 500 µl de fenol/cloroformo/isoamliialcohol. La parte superior fue separada con micropipeta y transvasada a un tubo *ependorf*. Para precipitar el ADN purificado se agregó a cada tubo 70 µl de NaCl 5 M y 0,5 ml de isopropanol. Los tubos se colocaron en un baño de hielo durante 15 min, se agitaron hasta hacer visible el ADN en forma de nube blanquecina y se centrifugó 30 min, 11.000 g, 4 °C. Al *pellet* obtenido se le adicionaron 500 µl de etanol 70 % a 4 °C y se centrifugó durante 5 min a 11.000 g y temperatura ambiente. Los tubos se dejaron abiertos bajo una lámpara para el secado por evaporación del etanol. Posteriormente se adicionaron 100 µl de una dilución 1/10 de *buffer* TE y 5 µl de ARNasa 10 mg/ml y se incubó a 37 °C durante 10 min. El ADN obtenido se conservó a 4 °C.

14.- Obtención de ADN a partir de contenido intestinal y materia fecal

Quinientos miligramos (500 mg) de contenido intestinal/materia fecal fueron colocados en 1 ml de *buffer* PBS. A partir de dicha suspensión se procedió a la extracción del ADN genómico utilizando un kit comercial específico para este tipo de muestra (AccuPrep Stool ADN Extraction kit, BIONEER, Korea)). Para ello se siguieron las instrucciones descriptas por el proveedor. El ADN obtenido se almacenó en *ependorf* libres de ADN a - 20 °C hasta su uso.

15.- Determinación de la concentración de ADN

La concentración y calidad del ADN fue determinada por medida de la absorbancia a 260, 280 y 234 nm, usando un espectrofotómetro *Nanodrop* (Thermo Scientific Nano Drop 2000 spectrofotometer, USA).

Se determinaron las absorbancia de soluciones diluidas (1/10 a 1/100 a partir de la solución stock) asignando las mismas del siguiente modo: A_{234} a péptidos y aminoácidos aromáticos, A_{260} a ADN y ARN y A_{280} a proteínas y ARN. Se consideró puro al ADN si la relación $A_{260/280}$ presentó valores entre 1,8 y 2,2

Para calcular la concentración de la solución stock se utilizó la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] \text{ en } \mu\text{l ml}^{-1} = A_{260} \times 5.000$$

La solución de trabajo se preparó a una concentración de 50 ng μl^{-1} y se almacenó a -20 °C.

16.- Amplificación del ADNr 16S

Se amplificó la región V3 del gen que codifica para el ARNr 16S, utilizando los oligonucleótidos sintéticos 518R/341F-GC, BIF164F/BIF662-GC,

LAC1/LAC2-GC (Invitrogen, USA), cuyas secuencias nucleotídicas se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4: Secuencia nucleotídica y referencias de los oligonucleótidos 518R/341F-GC, BIF 164F/ BIF662-GC, LAC1/LAC2-GC.

Nombre	Secuencia	Tamaño	Referencia
518R/341F-GC	518R (5'ATTACCGCGGCTGCTGG- 3') 341F (5VCCTACGGGAGGCAGCAG- 3V) con 5' GC (5' CGCCCCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGG GGG- 3')	193 p b	Muyzer <i>et al., 1993</i>
BIF164F/BIF 662-GC	BIF164F (5'GGGTGGTAATGCCGGATG-3') BIF662(5VCCACCGTTACACCGGAA-3')con 5' GC (5'- CGCCCCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGG GG- 3')	523 p b	Satokari <i>et al., 2001</i>
LAC1/LAC2-GC	LAC1 (5'AGCAGTAGGGAATCTTCA- 3') LAC2 (5'ATTYCACCGCTACACATG- 3') con 5' GC (5'CGCCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGCCCGGGGGCACCG GGG- 3')	327 p b	Walter <i>et al., 2000</i>

Para la amplificación se procedió a preparar una mezcla inicial de reacción o *premix* que consta de los reactivos básicos necesarios para la amplificación. En la Tabla 5 se presentan, a modo de ejemplo, los reactivos necesarios para realizar la amplificación de una muestra con un volumen final de 50 µl. Los volúmenes varían según el número de muestras y el volumen final deseado. Tanto para la preparación del material como para la manipulación se utilizaron guantes con el objetivo de proteger a la muestra de enzimas que degradan el ADN o de la contaminación con material extraño.

Tabla 5: Mezcla de reacción (*premix*) necesaria para amplificar un volumen final de 50 microlitros.

Premix	Volumen (μl) para un total de 50 μl
Buffer Taq 10 x (Inbio -Highway, Tandil, Argentina)	5
MgCl ₂ (Inbio -Highway, Tandil, Argentina)	5
dNTP's (Inbio -Highway, Tandil, Argentina)	5
Oligonucleótidos sintéticos (Invitrogen, USA)	2,5 μ l de cada uno
Taq polimerasa (Inbio -Highway, Tandil, Argentina)	0,25
Agua miliQ	26,42

En el caso de la amplificación de ADN proveniente de materia fecal con los oligonucleótidos LAC1/LAC2-GC y BIF164F/BIF662-GC, se duplicó la concentración de enzima polimerasa utilizada.

La mezcla de reacción se mantuvo en baño de hielo para conservar la actividad de la enzima polimerasa. Luego se fraccionó en tubos *ependorf* y se adicionó a cada uno de ellos el ADN molde que se deseaba amplificar. La cantidad de ADN molde utilizado varió según el origen. Para la amplificación de ADN proveniente de microorganismos aislados se utilizó 1 μ l de ADN molde; para amplificar el ADN proveniente de gránulo de kefir y de materia fecal se utilizaron 3 μ l de ADN molde.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (MyCycler Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) programado previamente con las temperaturas adecuadas a cada par de oligonucleótido. Los programas utilizados para cada par de oligonucleótidos ensayados se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6: Condiciones impuestas al termociclador para la amplificación de la región V3 del ADNr 16S con los pares de oligonucleótidos sintéticos 518R-341F-GC; BIF164F/BIF662-GC; LAC1/LAC 2-GC.

Oligonucleótido sintético 518R/341F-GC			
Temperatura (°C)	Tiempo	N° de ciclos	Descripción
94	5 min	1	Desnaturalización inicial
94	30 s	30	Desnaturalización
60	60 s		<i>Annealing</i>
72	30 s		Extensión
72	5 min	1	Extensión final
Oligonucleótido sintético BIF164F/BIF662-GC			
Temperatura (°C)	Tiempo	N° de ciclos	Descripción
98	5 min	1	Desnaturalización inicial
94	45 s	40	Desnaturalización
52	50 s		<i>Annealing</i>
72	50 s		Extensión
72	7 min	1	Extensión final
Oligonucleótido sintético LAC1/LAC2-GC			
Temperatura (°C)	Tiempo	N° de ciclos	Descripción
94	2 min	1	Desnaturalización inicial
94	30 s	35	Desnaturalización
61	60 s		<i>Annealing</i>
68	60 s		Extensión
68	7 min	1	Extensión final

Los amplicones obtenidos se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

17.- Electroforesis en gel de acrilamida con gradiente desnaturalizante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)

Los amplicones evaluados mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (*denaturing gradient gel electrophoresis*: DGGE) fueron los obtenidos por amplificación de un ADN molde con oligonucleótidos ricos en GC.

Soluciones de trabajo

Solución de Acrilamida-Bisacrilamida 40%

Acrilamida.....38,93 g

Bisacrilamida.....1,07 g

Agua destilada.....c.s.p 100 ml

Filtrada a través de un filtro de 0,45 µm y conservada a 4 °C.

Buffer muestra

Azul de bromofenol 2%.....0,25 ml

Xileno cianol 2%0,25 ml

Glicerol 100%.....7,00 ml

Agua destilada.....2,50 ml

Solución de teñido

Sybr Gold (Invitrogen).....30 µl

Buffer TAE.....300 µl.

Preparada en el momento de ser utilizada y conservada al reparo de la luz.

Gel apilador

Acrilamida/Bisacrilamida 40%	5 ml
Temed.....	5 μ l
Persulfato de amonio 10%.....	5 μ l

Gel separador

El gel separador contiene 8% de acrilamida y se prepara a partir de una solución de acrilamida/bisacrilamida 40%. Para preparar la solución 80% de agente desnaturante (80%) se le agrega urea y formamida de acuerdo al protocolo que se detalla en la Tabla 7

Tabla 7: Composición de las soluciones 0 y 80 % desnaturizantes necesaria

Reactivos	Solución 0% desnaturizante	Solución 80% desnaturizante
Acrilamida-Bis 40%	20 ml	20 ml
Buffer TAE 50X	2 ml	2 ml
Urea	-	33,6 g
Formamida deionizada	-	32 ml
Agua destilada	c.s.p 100 ml	c.s.p 100 ml

A partir de estas soluciones se preparan los gradientes que se requieren para cada gel.

Protocolo:

Para el armado de los geles se utilizaron dos vidrios perfectamente limpios y secos, uno pequeño y uno grande. El vidrio grande se recubrió con una goma y se colocaron separadores en la parte interior del vidrio tratando de minimizar el espacio que los separa. Los separadores fueron previamente embebidos en grasa con el objetivo de disminuir efectos provocados por la corriente y que deforman el gel (*smile*). Luego, se colocó el vidrio pequeño

sobre el vidrio grande y ambos se ajustaron con seis broches. Se constató que el sistema no tenga pérdidas introduciendo agua en el mismo. Luego se vació y escurrió sobre papel de filtro.

En la Tabla 8 se presentan a modo de ejemplo, los volúmenes de las soluciones desnaturizantes 0 y 80 % necesarios para obtener soluciones desnaturizantes 40, 45, 60 y 65 %. Una vez combinadas las soluciones, e inmediatamente antes de comenzar a formar el gradiente, se les adicionó 4,4 µl de Temed y 44 µl de persulfato de amonio 10 % y se agitó. Luego se procedió a la formación de los geles en gradiente.

Tabla 8: Volúmenes de las soluciones desnaturizantes 0 y 80 % necesarios para obtener soluciones desnaturizantes 40, 45, 60 y 65 % de urea/formamida.

Concentración desnaturizante (%)	Solución desnaturizante* (ml)	0%	Solución desnaturizante* (ml)	80%
40	5,75		5,75	
60	2,87		8,63	
65	2,2		9,3	

*Volúmenes necesarios para la preparación de 11,5 ml de cada solución.

El gradiente desnaturizante se formó utilizando un sistema de vasos comunicantes y bomba de vacío. Los vasos comunicantes se colocaron sobre un agitador magnético y se introdujo un buzo magnético en el vaso más cercano al orificio de salida que contendrá la solución de mayor concentración de agente desnaturizante. Se verificó que la comunicación entre los vasos esté cerrada y se introdujeron ambas soluciones. Finalmente se colocó una manguera entre el orificio de salida de los vasos y el espacio entre el sistema de vidrios. Se procedió a encender la bomba de vacío, se abrió la comunicación entre vasos y comenzó a formarse el gel en gradiente. Se emplearon velocidades de formación del gel lo más lentas posible y las mismas fueron constante para los distintos geles de modo tal de lograr reproducibilidad.

Luego, se colocó el peine y se dejó polimerizar. En los casos en que los geles se contrajeron y quedaron espacios vacíos se completó el volumen con gel de apilamiento. Una vez polimerizados, se retiraron los peines y se procedió al montaje de los geles sobre los soportes. El equipo consta de dos soportes con una capacidad de cuatro geles por corrida. Cada uno soporta dos geles que se montan con broches plásticos. Una vez armados los soportes se procedió a liberar la zona de la base del gel quitando la goma contenedora de manera tal que la corriente pueda circular. El sistema se introdujo dentro de la cuba previamente cargada con *buffer* TAE y precalentada a 60 °C. Se encendió el sistema de recirculación de líquido del equipo y se procedió a la siembra de las muestras.

Previo a la siembra las muestras fueron combinadas con un volumen de *buffer* muestra (25 µl de muestra + 5 µl de *buffer* muestra) y luego sembradas con jeringa Hamilton.

El equipo se conectó a una fuente a 100 V de modo que la corriente que pase por cada gel sea de aproximadamente de 35 mA. Las corridas electroforéticas fueron de 16 horas a 60 °C.

Se utilizó un equipo DGGE-2401 C.B.S (C.B.S. Scientific Co., Del Mar, CA, USA) (Figure 1) con geles de 15 x 20 x 0,75 cm de tamaño (Figura 1).

Una vez finalizada la corrida electroforética, los geles fueron incubados en la solución de tñido (*Sybr Gold*, Invitrogen, USA) en oscuridad durante 30 minutos. Las bandas se observaron con luz UV en un transiluminador.

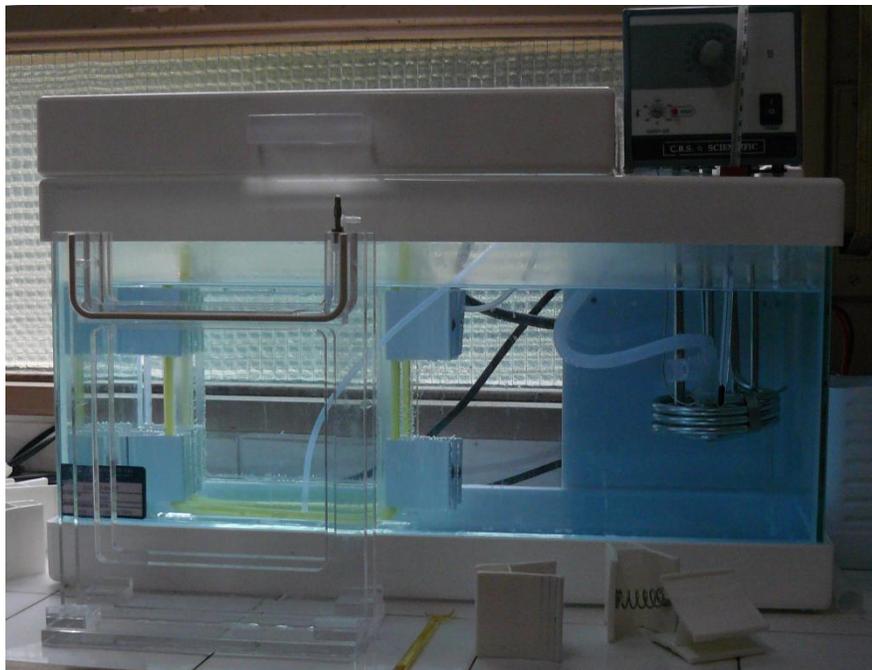


Figura 1: Cuba para electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (C.B.S. Scientific Co., Del Mar, CA, USA)

18.- Secuenciación

Soluciones de trabajo

TSS-2X

PEG 8000.....2 gr

MgCl₂ (1M)..... 0,7 ml

DSMO (dimetilsulfoxido)..... 1 ml

Medio LB estéril..... c.s.p. 10 ml

Filtrada a través de filtro de 0,22 µm. Conservada a -20 °C

Protocolo

Las bandas de interés observadas en los geles de DGGE se cortaron e introdujeron en *ependorf* estériles que contenían 50 µl de *buffer* TE. Para permitir que el ADN difunda del gel hacia el *buffer* los tubos se conservaron

durante toda la noche a 4 °C. Luego, se realizó una amplificación del ADNr 16S, utilizando éste ADN como molde y los oligonucleótidos sintéticos 518R/341F-GC.

Los productos de la amplificación fueron purificados utilizando un kit comercial (Invitrogen, USA).

Para determinar la pureza y estimar la concentración de los amplicones obtenidos, los mismos fueron analizados en un gel de agarosa 1% en el cual también se incluyó un patrón de PM de concentración conocida (Inbio-Highway, Argentina). Por comparación de la intensidad de las bandas obtenidas con las correspondientes al patrón de PM se estimó la concentración del ADN. Para verificar que los amplicones tuvieran el tamaño esperado se compararon en el gel las distancias recorridas por la muestra y el patrón.

Posteriormente se prepararon células competentes de *E coli* utilizando un método químico. Un inóculo inicial de *E coli* en medio LB se incubó a 37 °C durante toda la noche. Luego, 1 ml de este cultivo fue sembrado en 100 ml de medio LB y se cultivó a 37 °C, en agitador orbital (225 rpm) hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,45-0,55. Luego, el cultivo se colocó en hielo durante 15 min. Se centrifugó (3.000 rpm, 4 °C, 8 min), se descartó el sobrenadante cuidadosamente y el *pellet* fue resuspendido en 5 ml de medio LB más 5 ml de TSS-2X. La solución resultante se incubó en baño de hielo durante 15 a 30 min., se fraccionó en tubos *ependorf* estériles y se congeló empleando N₂ líquido. Las células competentes fueron almacenadas a -80 °C hasta su utilización.

Para el clonado se utilizó el kit pGEM-T y pGEM-T Easy Vector Systems (Promega Co., USA). La inserción del plásmido y el clonado se llevó a cabo según las instrucciones del proveedor. Las colonias seleccionadas fueron luego enviadas para su secuenciación a Macrogen (Seul, Korea) y las secuencias obtenidas fueron analizadas por comparación con la base de datos del GenBank. Se utilizó el software BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) y se

determinó la similitud de estas secuencias parciales del ADNr 16S con otras secuencias conocidas.

En algunos experimentos se envió a secuenciar directamente las bandas amplificadas y purificadas, sin previa clonación.

19.- Tipificación por rep PCR (GTG)5´

Soluciones de trabajo

Buffer Gitscheir 5X

(NH₄)₂SO₄(Merk).....1 M
Tris pH 8.0.....1 M
MgCl₂1 M
EDTA pH 8.8..... 0,5 M
β-mercaptoetanol.....14.4 M
Conservadas a 4 °C.

Marcadores de referencia

35 µl de PCR ruler (Bio-rad, #170-8206)
28 µl de 500 bp molecular ruler (Bio-rad, #170-8203)
75 µl de *buffer* de muestra
100 µl *buffer* TE

19.1.- Amplificación de secuencias repetidas: rep PCR

La amplificación se realizó utilizando los oligonucleótidos sintéticos (GTG)5´ (Tabla 9). Estos oligonucleótidos hibridan con secuencias de ADN repetidas (secuencias rep) que se encuentran distribuidas en el cromosoma.

Tabla 9: Secuencia nucleotídica del oligonucleótido sintético (GTG)₅'.

Oligonucleótido	Secuencia
(GTG) ₅	5'GTGGTGGTGGTGGTG-3'

La mezcla de reacción se preparó como se detalla en la Tabla 10

Tabla 10: Mezcla de reacción para la amplificación de secuencias repetidas intragénicas.

Reactivo	Cantidad por muestra (μl)
5x Gitschier <i>buffer</i>	5
Seroalbúmina bovina (BSA) (20mg/ml) (Roche)	0,2
Dimetilsulfóxido (DMSO) 100% (Fluka)	2,5
Agua MiliQ	13,65
dNTP's (25mM) (Pharmacia)	1,25
Oligonucleótido (GTG) ₅ ' 0,3 μg/μl	1
Taq ADN polimerasa (5 U μl ⁻¹ , Red Goldstar, Eurogentec)	0,4

En tubos *epENDORF* estériles se colocaron 24 μl de la mezcla de reacción y 1 μl de ADN molde (50 ng μl⁻¹) Se utilizó el ADN obtenido a partir de medio sólido ya que con este método se obtiene ADN de mejor calidad y en mayor concentración. El programa utilizado en el termociclador se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11: Condiciones fijadas al termociclador para el ensayo de rep PCR.

Temperatura (°C)	Tiempo	N° de ciclos	Descripción
95	7 min	1	Desnaturalización inicial
94	1 min	30	Desnaturalización
40	1 min		<i>Annealing</i>
65	8 min		Extensión
65	16 min	1	Extensión final

Los productos PCR que no se utilizaron inmediatamente fueron conservados a

- 20 °C.

19.2.- Electroforesis en gel de agarosa

Se prepararon geles con un porcentaje de 1,5 % p/v de agarosa en *buffer* TAE. Se utilizó un equipo de electroforesis con un soporte de 20 x 15 cm y peines de 20 posiciones de 1,5 mm de ancho cada una.

Para la preparación del gel se pesaron 2,25 g de agarosa en frasco de vidrio y se le adicionó 150 ml de *buffer* TAE (previamente preparado utilizando material volumétrico y empleando agua MilliQ). A la solución resultante se le determinó el peso y se calentó en microondas hasta disolución completa. Se pesó nuevamente y se corrigió al peso original adicionando agua MilliQ. Esta solución fue termostatzada a 55 °C en un baño y luego se volcó sobre el soporte de electroforesis cubriendo luego el mismo con papel de aluminio para evitar la evaporación. Una vez solidificado se procedió a la siembra de las muestras.

Para la preparación de las muestras se combinaron 25 μl de cada producto PCR con 5 μl de *buffer* de corrida (6x). De cada una de éstas soluciones se tomaron 7,2 μl y se sembraron en las diferentes posiciones del gel

La electroforesis se desarrolló a 4 °C, a un voltaje constante de 55 V durante 960 min. Una vez finalizada la corrida, los geles fueron teñidos por inmersión en solución de 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de bromuro de etidio en *buffer* TAE, durante 30 minutos. Luego, los mismos se colocaron durante 10 min en agua MilliQ y se tomó de ellos una imagen digital. Las calles fueron individualizadas y las imágenes resultantes fueron normalizadas utilizando el programa Corel Photo Paint 7.

Los resultados fueron analizados empleando el software Bionumerics v2.5 (Applied Maths, B) utilizando la base de datos LMG de la Universidad de Gent, Belgica (www.belspo.be/bccm).

20.- Secuenciación del gen de la fenilalanina sintasa

20.1.- Amplificación del gen de la fenilalanina sintasa

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes de la fenilalanina sintasa (*pheS*) se detallan en la Tabla 12 (Naser *et al.*, 2005):

Tabla 12: Oligonucleótidos utilizados para el ensayo de secuenciación del gen de la *pheS*.

Oligonucleótidos	Secuencia 5'-----> 3'
pheS 21 F	CAYCCNGCHCGYGAYATGC
pheS 22 R	CCWARVCCRAARGCAAARCC
pheS 23 R	GGRTGRACCATVCCNGCHCC

Una solución de ADN molde se llevo a $\text{DO}_{260} = 0,2$ con agua Milli-Q. El ADN utilizado en este ensayo fue obtenido a partir de bacterias crecidas en

medio sólido y su calidad fue previamente constatada según se detalla en el punto 15 de Materiales y Métodos.

En la Tabla 13 se detallan las cantidades de cada reactivo necesarias para la obtención de la mezcla de reacción que se utilizó en la reacción de amplificación.

Tabla 13: Mezcla de reacción utilizada para la amplificación del gen de la pheS.

Reactivo	Cantidad por muestra (µl)
PCR <i>buffer</i> 10X	2,5
Agua MQ	18
dNTP's (2mM)	2,5
oligonucleótido 1(50µM)	0,25
oligonucleótido 2(50µM)	0,25
Taq ADN polimerasa	0,5

En cada tubo *ependorf* estéril se agregaron 24 µl de la mezcla de reacción y 1 µl de ADN (0,2 ng µl⁻¹). La temperatura de *annealing* utilizada en la reacción de amplificación fue de 50 °C. En caso de amplificación negativa se ensayaron, además, las siguientes temperaturas de *annealing*: 42, 46, 55, 60, y 65 °C.

En caso de que los productos PCR no fueran utilizados inmediatamente, se conservaron a -20 °C.

20.2.- Control de los amplicones

Para constatar que los amplicones obtenidos tuviesen el tamaño esperado (460 bp) los mismos fueron separados en un gel de agarosa (1 p/v %) mediante electroforesis junto a un patrón de peso molecular de concentración y tamaño conocidos.

20.3.- Purificación

Los amplicones se colocaron sobre un sistema constituido por una membrana de ultrafiltración (kit NucleoFast 96 PCR) unida a una bomba de vacío (Tecan, Suiza). Como resultado los contaminantes (oligonucleótidos sintéticos, dNTPs y sales) fueron expulsados y los amplicones purificados permanecieron en la membrana. Luego, los mismos fueron resuspendidos en distintos volúmenes de agua MilliQ de manera de obtener iguales concentraciones en todas las muestras.

20.4.- Reacción de amplificación para la secuenciación

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen pheS se describen en la Tabla 14.

Tabla 14 : Oligonucleótidos utilizados para el ensayo de secuenciación de la pheS.

Oligonucleótidos	Secuencia 5'-----> 3'
pheS 21 F	CAYCCNGCHCGYGAYATGC
pheS 23 R	GGRTGRACCATVCCNGCHCC

Las cantidades de cada reactivo necesarias para formular la mezcla de reacción que se utilizó en la reacción de amplificación se detallan en la Tabla 15.

Tabla 15 : Mezcla de reacción para la reacción de amplificación del gen de la pheS .

Reactivo	Cantidad por muestra
BugDye v3.1 (OPL-0,48)1/14	0,286 µl
5X Buffer de secuenciación(OPL-0,49)	1,857 µl
Agua MiliQ	1,857µl
Oligonucleótido sintético (4µM)	3 µl

Para la amplificación se combinaron 7 µl de la mezcla de reacción y 3 µl de ADN molde en cada tubo *ependorf* estéril y las mezclas se llevaron a un

termociclador. Los ciclos de calentamiento y enfriamiento se detallan en la Tabla 16.

Tabla 16: Condiciones impuestas al termociclador para amplificar el gen de la pheS.

Temperatura (°C)	Tiempo	N° de ciclos	Descripción
96	15 sec	30	Desnaturalización
35	1sec		<i>Annealing</i>
60	4 min		Extensión
4	7 min		Extensión final

Los productos PCR que no se utilizaron inmediatamente fueron conservados a -20 °C.

20.5.- Purificación y Secuenciación

Para purificar los productos de la amplificación del ADN se utilizó el kit BigDye Xterminator. En este caso las impurezas (sales, dNTPs, etc) quedaron retenidas en la fracción insoluble mientras que los productos de amplificación marcados permanecieron en el sobrenadante.

Luego de la purificación, los productos fueron colocados en una placa de 96 pocillos (3100 Genetic Analyzer Plate Septa) y secuenciados.

Los resultados obtenidos fueron analizados usando el programa Applied Biosystems Sequencing Analysis Software versión 5.1

21.- Caracterización reológica de las leches fermentadas

21.1.- Obtención de leches fermentadas.

A partir de 50 µl de los cultivos conservados a -80 °C de cada uno de los microorganismos a utilizar se hicieron repiques en 5 ml de leche descremada

estéril y se cultivaron en sus respectivas condiciones de crecimiento. La pureza de los cultivos obtenidos se verificó mediante la evaluación de la morfología microscópica utilizando la tinción de Gram. Se realizaron dos repiques sucesivos previo a la ejecución de cada ensayo en las condiciones descriptas.

Para la evaluación reológica los microorganismos se inocularon en leche parcialmente descremada esterilizada por tratamiento de ultra alta temperatura (UAT) al 1% v/v y se incubaron durante los tiempos y temperaturas indicados anteriormente (Tablas 1 y 2). Los cultivos destinados a la evaluación se realizaron en frascos de boca ancha, estériles, conteniendo 100 ml de leche para permitir la toma de muestra sin romper la estructura del gel ácido. Previo a la evaluación reológica, las leches fermentadas fueron almacenadas por un período de 24 horas a 4 °C. Asimismo se determinó el pH final de la fermentación utilizando un peachímetro asociado a un microelectrodo combinado de vidrio/calomel (Cole-Parmer).

21.2.- Obtención de geles lácteos acidificados con δ -gluconolactona.

A 10 ml de leche se le adicionó 0,1 g de δ -gluconolactona (ICN Biomedicals Inc., Ohio 44202, USA). Se agitó en un agitador magnético durante 1 minuto y luego se incubó a 37 °C por 3 horas. El pH de los geles obtenidos luego de la incubación se encontró en un rango entre 4,3 y 4,5. Los geles se mantuvieron a 4 °C hasta su análisis.

21.3.- Evaluación del comportamiento de flujo y determinación de viscosidad.

Para la evaluación del comportamiento de flujo y la evaluación de viscosidad se utilizó un reómetro Haake Rheostress 600 (Alemania), en su modo de viscosímetro rotacional empleando la geometría plato-plato rugosos. El ensayo se llevó a cabo a 25 °C (Termohaake DC50) y la secuencia de rotación

empleada fue: ascenso del gradiente de velocidad de 0 a 500 s⁻¹ en 2 minutos, mantenimiento del gradiente de velocidad en 500 s⁻¹ durante 1 minuto y descenso del gradiente de velocidad de 500 a 0 s⁻¹ en 2 minutos. Se registró el esfuerzo de corte en función del gradiente de velocidad de deformación y se determinó la viscosidad aparente (η_{ap}) a un gradiente de velocidad de 300 s⁻¹.

21.4.- Evaluación del espectro mecánico de los geles ácidos

Las leches fermentadas fueron evaluadas mediante ensayos oscilatorios de pequeña amplitud de deformación. Las medidas fueron efectuadas en un reómetro de esfuerzo controlado RheoStress 600 (Termo Haake, Karlsruhe, Germany) utilizando la geometría plato-plato rugosos de 35 mm de diámetro como sistema sensor, con una separación de 1 mm entre platos.

La temperatura de las se mantuvo a 25°C utilizando un baño anexo al equipo (DC50, Haake).

En un primer ensayo, se determinó el rango de viscoelasticidad lineal. Para ello se realizó un barrido de esfuerzo de 0,01 a 20 Pa a una frecuencia fija de 1Hz. A partir de los mismos se seleccionó un esfuerzo dentro de dicho rango para realizar los barridos de frecuencia y así obtener los espectros mecánicos de las muestras.

Se determinaron los módulos elástico (G') y viscoso (G''), la tangente del ángulo de deformación ($\text{tg } \delta$) y el módulo complejo (G^*) como funciones de la frecuencia (0,1–10Hz) y se escogieron los valores de esos parámetros a la frecuencia de 1Hz para efectuar las comparaciones correspondientes.

22.- Obtención y purificación de polisacáridos.

22.1.- Extracción de exopolisacáridos a partir de cultivos de microorganismos aislados.

Los microorganismos activos fueron inoculados en leche parcialmente descremada estéril y se incubaron en sus respectivas condiciones de cultivo. Una vez finalizados los tiempos de fermentación se evaluó el pH y se procedió a la extracción de polisacáridos utilizando el método de precipitación con alcohol en frío y diálisis descrito por Rimada & Abraham (2001).

Inicialmente, las leches fermentadas fueron calentadas en baño a ebullición con el objetivo de inactivar enzimas que puedan degradar los EPS y modificar la estructura de las proteínas de la leche de modo de facilitar su posterior separación. A continuación se centrifugaron a temperatura ambiente durante 15 minutos a 10.000 g utilizando una centrifuga Avanti J25 (Beckman Coulter Inc., USA). Al sobrenadante se le adicionó dos veces su volumen de etanol frío (-20 °C) y la solución resultante se llevo a -20 °C durante 24 horas.

Los polisacáridos, que en estas condiciones precipitan, fueron separados por centrifugación (4 °C, 20 min, 10.000 g) y luego resuspendidos en agua caliente.

Para obtener una muestra con bajos contenidos de proteínas y sin lactosa se procedió a repetir el proceso de precipitación y disolución y luego se dializó con membrana con valor de corte de 1.000 Da (Spectra/Por, Spectrum laboratorios, USA). La diálisis se realizó en vasos de precipitado de 4 litros contra agua bidestilada en agitación continua a 4 °C. El periodo de diálisis fue de 48 horas y se realizó un cambio de agua a las 24 horas.

De las soluciones obtenidas se separó una alícuota para determinar el contenido de azúcares totales (método de antrona) y constatar la ausencia de carbohidratos de bajo peso molecular (TLC) y proteínas (método de Bradford).

Finalmente, las soluciones fueron liofilizadas y almacenadas en recipientes herméticos a temperatura ambiente.

22.2.- Extracción de exopolisacáridos de gránulos de kefir

Se realizó la extracción de polisacáridos del gránulo de kefir CIDCA AGK1 utilizando el método de precipitación con alcohol en frío descrito por Rimada & Abraham (2001).

Los gránulos lavados, escurridos y pesados fueron disueltos en agua destilada en una proporción de 10 % p/v y se calentaron a 100 °C durante un periodo de 30 minutos. Luego se centrifugaron a temperatura ambiente por 15 minutos a 10.000 g utilizando una centrifuga Avanti J25 (Beckman Coulter Inc., USA). El sobrenadante se separó y se le adicionó dos veces su volumen de etanol frío (-20 °C). Esta solución se mantuvo a -20 °C por 24 horas. El polisacárido precipitado fue separado por centrifugación (4 °C, 20 min, 10.000 g) y resuspendido en agua caliente. Se repitió el proceso de precipitación y disolución y finalmente se dializó con membranas con valor de corte de 1.000 Da (Spectra/Por, Spectrum laboratorios, USA). De las soluciones obtenidas se separó una alícuota para determinar el contenido de azúcares totales (método de antrona) y constatar la ausencia de carbohidratos de bajo peso molecular (TLC) y proteínas (método de Bradford). Finalmente las soluciones fueron liofilizadas y almacenadas a temperatura ambiente.

22.3.- Cromatografía en capa fina

Soluciones de trabajo

Solvente de corrida

n-propanol.....70 ml

Ácido acético.....20 ml

Agua10 ml

Solución de revelado

Ácido p-amino benzoico.....7 g/l

Ácido o-fosfórico.....30 g/l

Metanol.....c.s.p. 1 l

Protocolo

Como medida de la pureza de las muestras se verificó la ausencia de lactosa mediante cromatografía en capa fina (TLC). Como referencia se utilizó lactosa Sigma (St Louis MO 63178 USA) al 0,5 % p/v en una solución de etanol:agua 50:50.

Se utilizaron placas de Silica gel G (Merck D-64271, Alemania) que fueron cortadas teniendo en cuenta que cada muestra debe sembrarse separada una distancia de 1 cm de la siguiente y del borde inferior. Las placas fueron previamente activadas en estufa a 100 °C durante 1 min y la siembra se realizó con jeringa Hamilton. El volumen de siembra fue de 3 µl. Una vez concluida la siembra, la placa fue introducida en una cuba previamente saturada con solvente de corrida. Se permitió el avance de fase la móvil hasta una distancia de 2 cm de la parte superior de las placas.

Finalizada la corrida, se retiró la placa de la cuba, se secó utilizando aire caliente y se procedió al revelado. Para ello, se bañó la placa con solución de revelado, se secó por evaporación y se llevó a estufa a 100 °C durante 5 min para visualizar los hidratos de carbono. Las placas fueron escaneadas para el análisis (Zweig & Sherma, 1978).

22.4.- Cuantificación de proteínas: Método de Bradford

Soluciones de trabajo

Reactivo de Bradford

Coomassie Brilliant Blue G-250.....100 mg

Ácido fosfórico 85%100 ml

Etanol 95%50 ml

NaOH 1M.....50 ml

Agua destilada..... c.s.p. 1 l

Protocolo

Como medida del grado de pureza de las muestras se procedió a cuantificar el contenido de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello, se colocó en un tubo de hemólisis 50 µl de solución a analizar y 1 ml de reactivo de Bradford. La mezcla de reacción se agitó por inversión y se midió la absorbancia de la muestra a 590 nm en un espectrofotómetro (Metrolab). Las muestras se procesaron simultáneamente con una curva de calibración que se preparó a partir de seroalbumina bovina en concentraciones entre 50 y 300 µg/ml.

22.5.- Cuantificación de azúcares totales: Método de antrona

Soluciones de trabajo

Reactivo de antrona

antrona (9,10 dihidro-9-oxoantraceno, Mallinckrodt)0,5 gr

H₂SO₄ 66% (v/v) c.s.p. 1 l

Para la disolución del ácido sulfúrico (H_2SO_4) en agua se trabajó en un baño de hielo debido a que se trata de una reacción exotérmica. Para facilitar la disolución de el 9,10 dihidro-9-oxoantraceno el mismo se agregó a una temperatura aproximada de 70 °C. El reactivo se conservó entre 0 y 4 °C por no más de 30 días.

Protocolo

La cuantificación de azúcares totales se realizó utilizando el método de antrona (Southgate, 1976). La evaluación de las muestras se realizó simultáneamente con la de una curva de calibración. Esta última se preparó empleando soluciones de glucosa en el rango de 25-500 $\mu\text{g/ml}$.

En tubos de vidrio con tapa se agregaron 0,2 ml de las soluciones a ensayar y 2 ml de reactivo de antrona. Luego, las muestras fueron llevadas a un baño de agua a 100 °C por 15 minutos y luego colocadas en un baño de agua a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos. Finalmente se realizó la medida de la absorbancia a 620 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro. Los resultados de absorbancia correspondientes a las muestras se interpolaron con los resultados correspondientes a la recta de calibración.

23.- Caracterización de exopolisacáridos.

23.1.- Determinación de peso molecular

Los polisacáridos disueltos en agua fueron filtrados utilizando filtros de 0,45 μm de diámetro de poro (Millipore, San pablo, Brasil) e introducidos en viales para la determinación de peso molecular mediante cromatografía líquida de alta resolución utilizando una columna de exclusión molecular OH-PAK SB 805 HQ (Shoedex, Japón). El equipo consta de un aspirador automático para la toma de muestra modelo 717 (Waters, Milford), un controlador modelo 600

(Waters, Milford) y un refractómetro diferencial modelo 410 (Waters, Milford). La elución de las muestras se llevó a cabo a temperatura ambiente utilizando como eluyente NaNO_3 0,1 M a flujo constante (0,95 ml/min, presión: 120:130 psi). El volumen de muestra inyectado fue de 50 μl . Como patrones de peso molecular se utilizaron dextranos en el rango de 97.000 a 3.800.000 Da (ALO-2770, Phenomenex, Torrence, CA).

23.2.- Composición de azúcares mediante cromatografía de intercambio aniónico

23.2.1.- Hidrólisis para la determinación de azúcares

Muestras de los polisacáridos liofilizados (entre 0,4 y 1,2 mg) fueron disueltas en 200 μl de agua Milli-Q e hidrolizada en ácido trifluoroacético 0,2, 2,0 y 4 N durante 3 horas a 100 °C. Luego, las mismas se llevaron a sequedad en rotavapor, con sucesivos agregados de agua para eliminar el ácido. Finalmente las muestras se secaron en SpeedVac (ThermoSavant, USA). Cada una de las muestras fue redisuelta en 100 μl de agua destilada.

23.2.2.- Cromatografía de intercambio aniónico

Para el análisis de la composición de azúcares mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución se utilizó una columna Carbopac PA-10 (4 x 250 mm) con pre-columna PA-10 (Dionex) y un detector de pulsos amperométricos (HPAEC-PAD) en un equipo Dionex DX-300.

Se utilizaron como patrones D-glucosamina, D-galactosamina, L-fucosa, D-manosa, D-galactosa, L-arabinosa, D-fructosa (Sigma) y D-glucosa (Merk) secados previamente en desecador al vacío durante 48 hs. Los patrones fueron pesados para preparar soluciones a partir de las cuales se realizaron las diluciones necesarias para el análisis. Las soluciones se mantuvieron congeladas hasta su utilización a -20 °C. La cuantificación de los azúcares

neutros se realizó utilizando 2-deoxi-glucosa (Sigma) como estándar interno, relacionando el área correspondiente a 2-deoxi-glucosa con el área de pico obtenida para cada azúcar. Este azúcar se utiliza por similitud estructural con la glucosa y por ser un azúcar no natural.

Los solventes de corrida utilizados fueron NaOH 200 mM y agua. Se empleó en la corrida un programa isocrático con un flujo de 1 ml/min y una concentración de NaOH de 16 mM. Los resultados son promedios de dos corridas realizadas para cada muestra.

24.- Efecto de polisacáridos sobre la microbiota fecal de ratones.

24.1.- Animales de laboratorio

Se utilizaron hembras de ratones Balb/C de seis semanas de edad, libres de patógenos específicos, obtenidos del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP. Los animales se mantuvieron en jaulas plásticas, con temperatura y ciclo día/noche controlados; y fueron alimentados con una dieta balanceada convencional.

24.2.- Soluciones de polisacáridos

Los polisacáridos se resuspendieron en agua mineral (Villa del Sur, Argentina) en concentración 300 mg/l y se administraron a los ratones como agua de bebida para su consumo *ad libitum*. Las soluciones fueron reemplazadas todos los días.

24.3.- Tratamiento 1: Diseño del Experimento

Para determinar el efecto de la administración oral de polisacárido sobre la microbiota intestinal, se realizaron experimentos *in vivo*. La ingesta diaria de solución de polisacárido fue de 2,5 a 3,4 ml / ratón/ día, lo que equivale a una dosis de 0,75 -1 mg polisacárido / ratón/ día.

Los ratones fueron divididos en 3 grupos de 5 ratones:

Grupo control: recibieron una dieta balanceada durante 7 días.

Grupo k/2d: recibieron una dieta balanceada y se incluyó la incorporación de polisacárido (300 mg/l) en el agua de bebida durante 2 días.

Grupo k/7d: recibieron una dieta balanceada y se incluyó la incorporación de polisacárido (300 mg/l) en el agua de bebida durante 7 días.

Las soluciones de polisacárido fueron administradas de manera que todos los animales de diferentes grupos experimentales fuesen sacrificados en el mismo día. El contenido intestinal fue extraído, resuspendido en PBS y congelado a -80 °C hasta su análisis (Figura 2). Se realizaron tres experimentos independientes.

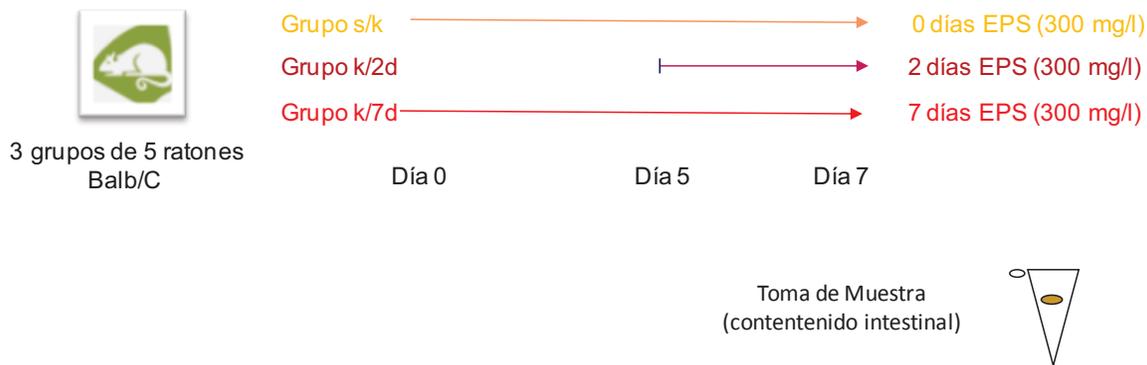


Figura 2: Esquema del diseño experimental.

24.3.1.- Análisis de las muestras de contenido intestinal

Las muestras de contenido intestinal fueron analizadas por PCR-DGGE. Para ello, el ADN de la materia fecal fue extraído como se detalló en el ítem 14 de Materiales y Métodos y utilizado como molde para amplificar la región V3

del gen que codifica para el ARNr 16S. Los oligonucleótidos sintéticos utilizados en la amplificación fueron 518R/341F-GC, BIF164F/BIF662-GC y LAC1/LAC2-GC. Las mezclas de reacción y temperaturas de amplificación empleadas para cada par de oligonucleótidos se describen en el ítem 16. **Amplificación del ADNr 16S** de Materiales y Métodos. Los amplicones obtenidos fueron sembrados en un gel de poliacrilamida con gradiente desnaturizante de urea formamida (ítem 17 de Materiales y Métodos).

En la selección de las condiciones de corrida para la Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturizante se utilizaron los gradientes 30/60, 40/60, 45/65 y 45/70. Para el análisis de los resultados se utilizó el programa Systat 12.

24.4.- Tratamiento 2: Diseño del Experimento

Con el objetivo de realizar un seguimiento a lo largo del tiempo de la microbiota fecal de los ratones se realizó un ensayo en el cual los mismos fueron individualizados dentro de cada grupo. La ingesta diaria de solución de polisacárido fue de 2,5 a 3,4 ml / ratón/ día, lo que equivale a una dosis de 0,75 -1 mg polisacárido / ratón/ día.

Los ratones fueron divididos en tres grupos (Figura 3).

Grupo control: (ratones 1 a 6) recibieron una dieta balanceada durante 21 días.

Grupo k/21d: (ratones 7 a 12) recibieron una dieta balanceada y se incorporó kefir en el agua de bebida en una concentración de 300 mg/l.

Grupo 83124/21d: (ratones 13 a 18) recibieron una dieta base suplementada con el polisacárido aislado de la cepa CIDCA 83124 en una concentración de 300 mg/l durante 21 días.

Los polisacáridos (kefir an de gránulo o proveniente de la cepa CIDCA 83124) fueron suministrado *ad libitum* en al agua de bebida en una concentración de 300 mg/l durante 21 días.

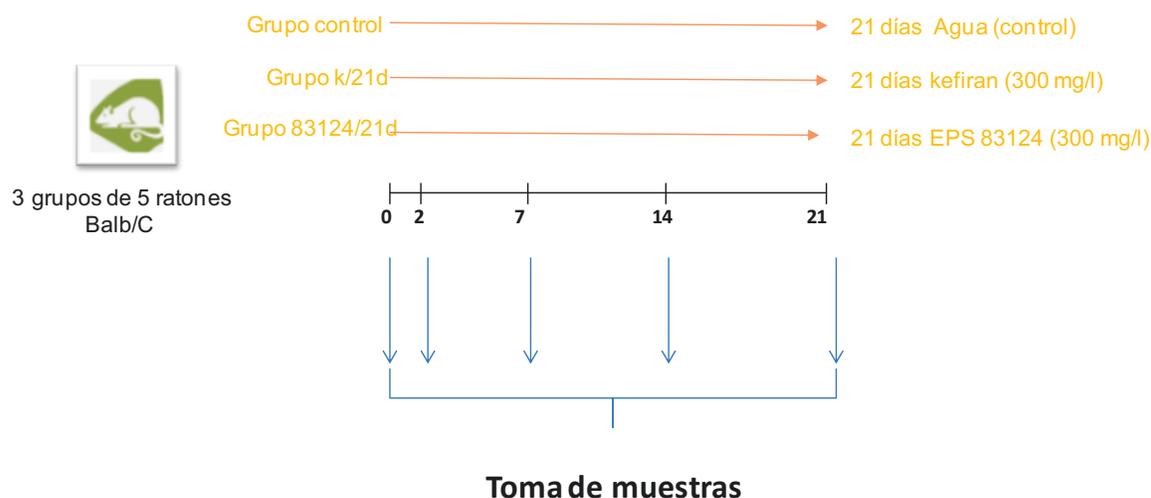


Figura 3: Esquema del diseño experimental.

Las muestras de materia fecal fueron tomadas los días 0, 2, 7, 14 y 21 y procesadas en el momento de la toma de muestra o bien conservadas a -80 °C hasta su análisis.

24.4.1.- Análisis de las muestras de material fecal

24.4.1.1.-Recuento de lactobacilos y bifidobacterias

A las muestras de materia fecal tomadas de todos los ratones los días 0 y 21 se le realizó recuento de microorganismos viables dirigido a las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos.

Para ellos se tomaron 5 *pellets* de materia fecal, se pesaron y se introdujeron dentro de un tubo estéril con 1 ml de de PBS/Cys 0,05 %. Luego, se disgregaron en esterilidad y finalmente, se procedió a realizar el recuento de microorganismos viables. Se empleó MRS/Cys 0,05 % como medio de cultivo y solución fisiológica (NaCl 0,85 %) como diluyente. Las condiciones de

crecimiento fueron 37 °C, 48 hs y anaerobiosis. El resultado se expresó como ufc/ml.

24.4.1.2.- Peso de los ratones

Se evaluó el efecto de las distintas dietas sobre el peso de los ratones. Para esto cada ratón fue pesado los días 0, 2, 7, 14 y 21 del tratamiento. Para analizar los resultados se calcularon las diferencias entre el peso inicial (Pi) y final (Pf) para cada ratón y luego se promediaron los valores obtenidos para los ratones pertenecientes a cada grupo.

24.4.1.3.- PCR-DGGE

Las muestras de materia fecal tomadas a cada ratón los días 0, 2, 7, 14 y 21 del tratamiento fueron analizadas por PCR-DGGE. La extracción del ADN, amplificación y el ensayo de DGGE fueron llevados a cabo empleando la misma metodología descrita para el tratamiento 1 (ítem 24.3.1 de Materiales y Métodos).

24.4.1.4.- Análisis mediante hibridación fluorescente *in situ*- Citometría de flujo

Soluciones de trabajo

Solución de hibridación

NaCl.....	5,26 g
Tris base.....	0,24 g
SDS.....	0,01 g
Formamida	30 ml
Agua bidestilada c.s.p.	100 ml

Solución de lavado

NaCl.....	0,57 g
Tris-HCl pH8.....	0,36 g
EDTA pH8.....	0,03 g
SDS.....	0,015 g
Agua bidestilada c.s.p.....	150 ml

Protocolo

Las poblaciones celulares se evaluaron mediante la marcación con sondas fluorescentes específicas (Invitrogen) para los siguientes grupos poblacionales: Eubacterias (Eub 338), NONEubacteria (NON 338), Bifidobacterias (Bif 164) y Lactobacilos (Lab 158). La sonda Eub 338 se usó como control positivo. La sonda NON 338, se utilizó como control negativo.

En la Tabla 17 se detallan los marcadores específicos utilizados para cada grupo de bacterias.

Tabla 17: Sondas utilizadas para la hibridación fluorescente *in situ* y secuencia a la cual se unen.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Marcador fluorescente
Eub 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	FITC
NON 338	ACATCCTACGGGAGGC	FITC
Lab 158	GGTATTAGCAYCTGTTTCCA	AlexaFluor 532
Bif164	CATCCGGCATTACCACCC	AlexaFluor 647

El proceso de fijación y marcación de las muestras de materia fecal se llevo a cabo mediante el protocolo descrito por Snart *et al.*, 2006 como se detalla a continuación:

1) La materia fecal fue recolectada, pesada e introducida en tubos *eppendorf*, luego fue homogeneizada mecánicamente con palillos de madera y diluida 1/10 en PBS.

2) Se tomaron 300 μl de la suspensión resultante y se le agregaron 900 μl de paraformaldehído 4 % (p/v).

3) Las muestras obtenidas se almacenaron a 4 °C durante toda la noche. Pasado este periodo de tiempo se centrifugaron (7.600 g, 5 min, 4 °C) y el *pellet* resultante se resuspendió en 1 ml de PBS y se centrifugo nuevamente (7.600 g, 5 min, 4 °C). Finalmente, el *pellet* fue resuspendido en 400 μl de PBS y se le agregó 400 μl de etanol frío. Se prepararon 6 tubos de cada muestra. Las muestras fijadas se almacenaron a -80 °C en tubos hasta su análisis.

4) Para cada análisis se hizo un pool con 3 tubos de los anteriormente fijados, para ello cada tubo se centrifugó (14.600 g, 5 min) y los *pellets* bacterianos resultantes fueron reunidos en un solo tubo y resuspendidos en 1 ml de PBS.

5) Las células bacterianas fueron cosechadas por centrifugación (14.600 g, 5 min) y resuspendidas en 1 ml de *buffer* Tris-EDTA.

6) Después de ser lavadas con este *buffer* los *pellets* fueron resuspendidos en *buffer* Tris-EDTA con 1 mg of lisozima por ml y se mantuvieron durante 10 min a temperatura ambiente.

7) Seguidamente, las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas en 1 ml de solución de hibridación.

8) Alícuotas de 50 μl fueron usadas para unirse a cada sonda. La concentración final de cada sonda fue de 4 ng/ μl . Las mezclas de hibridación fueron mantenidas a 35 °C durante toda la noche en tubos para microcentrifuga y al abrigo de la luz.

9) Luego de la hibridación se agregó 150 µl de solución de hibridación a cada tubo y las células bacterianas fueron cosechadas por centrifugación (14.600 g, 5 min).

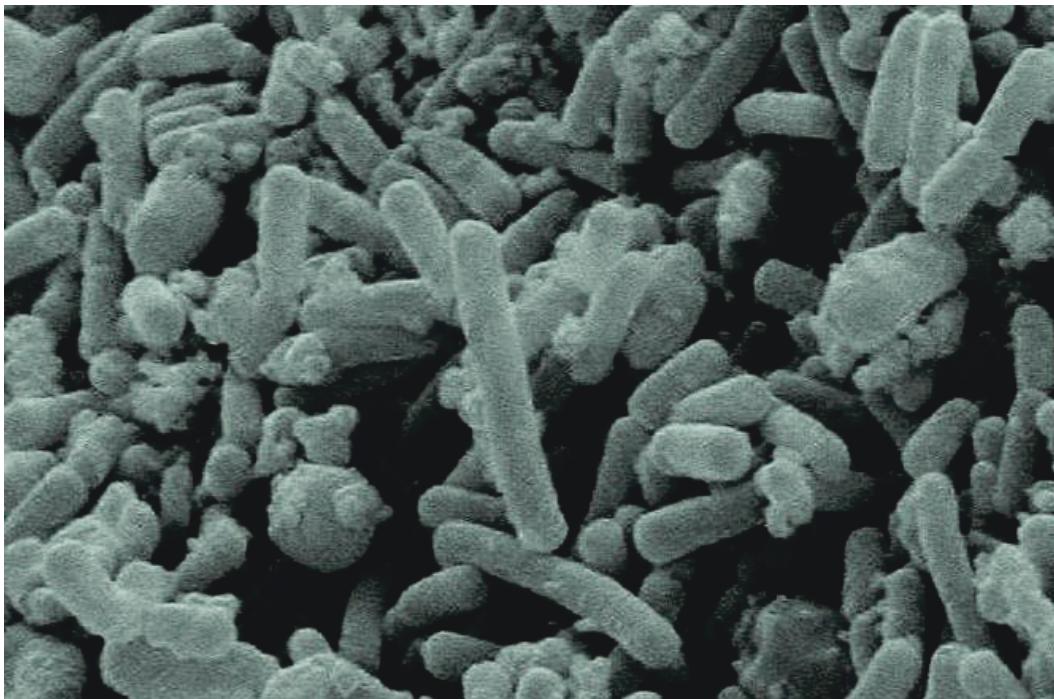
10) Seguidamente, las células fueron resuspendidas en 200 µl de solución de lavado, incubadas a 37 °C durante 20 min y centrifugadas (14.600 g, 5 min). Luego de esta centrifugación las células fueron resuspendidas en 100 µl de PBS y se les adicionó 500 µl de PBS previamente filtrado para la posterior adquisición de datos en el citómetro.

Se determinó el *forward* (FSC) y *side scatter* (SSC) en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson Biosciencias, San Jose, USA) utilizando el programa Cell Quest Pro para la adquisición de los datos (50000 eventos). Se estableció el *gate* o región correspondiente para cada tipo celular. El análisis de datos fue realizado con los programas Cell Quest Pro (Becton Dickinson) y WinMDI (versión 2.9; Joseph Trotter).

24.4.1.5.- Microscopía laser confocal

Las muestras de materia fecal marcadas con sondas fluorescentes siguiendo el mismo protocolo que se describe en el punto anterior fueron analizadas en un microscopio laser confocal. Para ello, una gota de la muestra marcada con sonda fluorescente fue depositada entre un portaobjeto y un cubreobjeto y conservada en oscuridad hasta el momento de la observación. La observación se llevó a cabo en un microscopio confocal LEICA TCS SP5 con láseres de Argón y HeNe. Las microfotografía obtenidas fueron evaluadas mediante el programa LAS AF Lite.

Capítulo 1: Aislamiento e Identificación de microorganismos de gránulo de kefir



Introducción

1.- Identificación de microorganismos en comunidades microbianas complejas.

El estudio de la composición de poblaciones microbianas complejas se puede realizar mediante el uso de técnicas dependientes de cultivo o independientes de cultivo. La comparación entre el porcentaje de bacterias cultivables y el total de células en diferentes hábitats muestra comúnmente enormes discrepancias. Una de las razones de estas diferencias puede ser la interdependencia de los microorganismos entre sí y la falta de conocimiento sobre las verdaderas condiciones de cultivo de los mismos en sus hábitats naturales (Muyzer & Smalla, 1998). El uso de técnicas independientes del cultivo y el desarrollo de métodos de biología molecular otorgó ventajas en éste aspecto, aumentando el estado de conocimiento sobre las comunidades microbianas complejas.

1.1.- Métodos para el estudio de comunidades microbianas: electroforesis dependientes de la secuencia.

Las técnicas electroforesis dependientes de la secuencia (EDS) se basan en la separación electroforética de fragmentos de ADN amplificados por PCR (amplicones). Estos amplicones poseen secuencias específicas de igual longitud y son separados en una matriz de poliacrilamida que contiene un gradiente desnaturante de urea y formamida (electroforesis en gel con gradiente desnaturante químico (DGGE)) o bien un gradiente de temperatura (electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) y electroforesis en gel con gradiente temporal de temperatura (TTGE)) (Muyzer, 1999; Huys *et al.*, 2008). En la TGGE, el gradiente de temperatura se crea a lo largo de la longitud del gel, mientras que en TTGE el gradiente de temperatura es temporal se forma gradualmente durante el funcionamiento

de la electroforesis (Huys *et al.*, 2008). Estas técnicas se utilizan para comparar la diversidad de comunidades microbianas, monitorear la dinámica poblacional, detectar microorganismos no cultivables y hacer análisis de mutaciones.

Dichas metodologías han sido utilizadas en diversas comunidades microbianas, obteniéndose resultados positivos en cuanto a la identificación de los microorganismos que lo componen (Felske *et al.*, 1998; Ercolini *et al.*, 2001; Miyamoto *et al.*, 2010). También han sido aplicadas al estudio de la microflora presente en gránulos de kefir (Ninane *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Jianzhong *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009; Da Cruz Pedrozo Miguel *et al.*, 2010; Londero *et al.*, 2012), aumentando así la información acerca de la composición microbiana de estos ecosistemas.

Para obtener los perfiles de las comunidades bacterianas se deben llevar a cabo los siguientes pasos: extracción del ADN total de la comunidad presente en la muestra; amplificación por PCR de las secuencias específicas utilizando oligonucleótidos; separación electroforética de los amplicones usando DGGE, TGGE o TTGE; y procesamiento y análisis de la huella digital.

1.1.1.- Extracción del ADN

El método utilizado para la extracción del ADN debe ser eficiente, reproducible y de alto rendimiento. Esto es indispensable para obtener una muestra representativa de la comunidad microbiana en estudio. El paso crucial en la extracción del ADN es la lisis celular. Existen diversos métodos que incluyen rupturas mecánicas o bien lisis enzimáticas. Evaluar este paso de la extracción es fundamental debido a que no todos los miembros de las comunidades microbianas poseen la misma sensibilidad a las condiciones de lisis. Los criterios usualmente utilizados para evaluar la eficacia de los procedimientos de extracción del ADN incluyen verificación electroforética de la integridad del ADN y determinación del rendimiento.

1.1.2.- Amplificación

Luego del paso de extracción y purificación del ADN se procede a la amplificación. La selección de los oligonucleótidos que serán utilizados en la reacción de amplificación de la polimerasa (PCR) es el punto más importante. El uso de oligonucleótidos universales permite el análisis de cualquier tipo de comunidad microbiana aunque en poblaciones con una alta diversidad, solo generarán bandas visibles en los perfiles obtenidos por las técnicas de electroforesis dependientes de la secuencia, aquellas que se encuentren en mayor proporción en la comunidad. Para centrarse en una subpoblación específica dentro de la comunidad total, se utilizan oligonucleótidos específicos para determinados grupos poblacionales (Huys *et al.*, 2008).

Tradicionalmente se utilizan los genes que codifican para el rARN 16S como molécula *target* para la construcción de oligonucleótidos universales y específicos. Esta preferencia proviene del hecho de que los genes de la subunidad ribosomal menor (SSU) del rARN están compuestos por una estructura tipo mosaico donde se alternan regiones no variables, relativamente conservadas, con regiones altamente variables (regiones V). En las técnicas de electroforesis dependientes de la secuencia que analizan la huella genética de las poblaciones se utilizan oligonucleótidos que se unen a regiones conservadas de las secuencias de los genes con el objetivo de cubrir hasta tres regiones hipervariables. Los oligonucleótidos utilizados para este tipo de técnicas poseen además una secuencia rica en GC unida al extremo 5' denominada GC *clamp* que tienen el objetivo de prevenir la desnaturalización completa de los amplicones generados. Esto es necesario para obtener un punto de fusión estable de los fragmentos durante la electroforesis (Huys *et al.*, 2008).

1.1.3.- Electroforesis

Las técnicas de electroforesis dependientes de la secuencia se basan en el principio de que la movilidad electroforética de los amplicones doble cadena, en la matriz del gel con gradiente desnaturalizante ascendente (químico o de temperatura), va disminuyendo, y a una determinada concentración de agente desnaturalizante o bien a una temperatura dada, se produce la fusión parcial de la doble hebra (T_m) (Figura 1). La desnaturalización física de los fragmentos de ADN doble cadena está influenciada básicamente por dos factores, la secuencia nucleotídica y el contenido de G+C. A los dominios con altos contenidos en G+C se los denomina dominios de fusión e interfieren con la estructura helicoidal de la molécula de ADN produciendo una migración mayor en el gel. Los amplicones que presentan diferencias en sus secuencias nucleotídicas exhiben discrepancias en su comportamiento de fusión y, por lo tanto, migran hasta una posición diferente a lo largo del gradiente lineal del gel. Esto produce como consecuencia diferentes perfiles de bandas que representan la diversidad de las secuencias presentes en la mezcla de amplicones (Huys *et al.*, 2008).

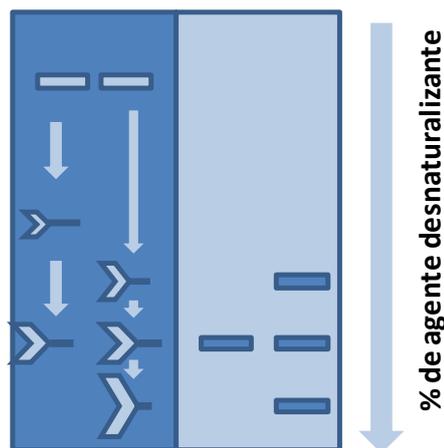


Figura 1: Esquema del proceso de separación de amplicones de ADN por electroforesis en gradiente desnaturalizante químico.

1.1.4.- Análisis de datos

El análisis de los perfiles obtenidos por éstas técnicas puede ser realizado visualmente o numéricamente. La interpretación visual de los perfiles solo se puede llevar a cabo cuando se comparan perfiles de baja complejidad. En aquellas muestras donde el número de bandas de los perfiles aumenta o bien cuando se deben comparar un alto número de perfiles, se utilizan métodos numéricos. Con este objetivo se procede a digitalizar las imágenes de los geles y procesarlos con distintos software. Algunos de los más utilizados son: GelCompar y BioNumerics (Applied Maths; <http://www.applied-maths.com/>), Quantity One y Molecular Analyst (Bio-Rad Laboratories), GeneTools (Syngene; <http://www.syngene.com/>), y Photo-Capt (Vilber Lourmat; <http://www.vilber.com/>). Estos programas permiten realizar el análisis numérico de los patrones de bandas y suelen incluir herramientas estadísticas para la interpretación de los datos.

Luego de este primer paso de análisis estadísticos, basado en diversidad y coeficientes de similitud, se procede a identificar y monitorear los miembros específicos de las comunidades bacterianas. La identificación de las bandas presentes en los perfiles electroforéticos pueden ser obtenidas mediante el análisis de las posiciones relativas de las bandas, comparándolas con las posiciones de patrones de identidad conocida, o bien mediante la secuenciación de las bandas (Huyst *et al.*, 2008).

Idealmente, la posición de cada banda en el perfil de una muestra es representativa de una especie. Sin embargo, en la práctica, el efecto observado en ciertas taxa cuando se utilizan oligonucleótidos para los genes del rARN 16S, puede llevar a una sobreestimación del número de especies predominantes en las muestras analizadas debido a la presencia de operones múltiples.

Los resultados obtenidos por comparación de la posición de las bandas pueden o deben ser verificados mediante secuenciación, permitiendo así determinar la filiación filogenética de cepas desconocidas.

Se procede a extraer los fragmentos de amplificación de la matriz del gel de poliacrilamida. Luego, dichos fragmentos se reamplifican y analizan por técnicas de electroforesis dependientes de la secuencia para verificar que se esté trabajando con los fragmentos de ADN correctos. Como consecuencia, estos fragmentos obtenidos por PCR pueden ser directamente secuenciados sin necesidad de clonación previa o clonados previo a la secuenciación. Finalmente, las secuencias obtenidas son comparadas con secuencias almacenadas en las bases de datos públicas (por ejemplo: EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)) para su identificación.

2.- Taxonomía

La taxonomía o la sistemática es el estudio científico de la diversidad de organismos con el objetivo último de caracterizarlos y disponerlos de una manera ordenada (Schleifer & Ludwig, 1994). Clasificación, identificación y nomenclatura son tres subdisciplinas separadas pero relacionadas en taxonomía. La clasificación es el proceso de agrupar los organismos en grupos taxonómicos (taxa) en base a sus semejanzas o relaciones. La nomenclatura es la asignación de nombres a los grupos taxonómicos según reglas internacionales. Finalmente, la identificación es el proceso de determinar si un nuevo aislado pertenece a una de las taxa establecidas y nombradas (Staley & Krieg, 1989).

Las taxas en el sistema de clasificación están organizadas de manera jerárquica. Actualmente, se reconocen dos dominios procarióticos: Archaea y Bacterias. A su vez, estos dominios se dividen en reinos; siendo los niveles subsiguientes phylum, clase, orden, familia, género y especie. Estos niveles taxonómicos se diferencian mediante sufijos.

Debido a que los microorganismos poseen una estructura muy simple y pocos caracteres informativos comparados con organismos superiores, el progreso en la taxonomía bacteriana ha sido dependiente de los avances que

se dan dentro de la tecnología. Por esta razón, la taxonomía bacteriana moderna emplea principalmente datos moleculares.

Los métodos de análisis comúnmente utilizados para la identificación de microorganismos poseen diferente poder de resolución, por lo tanto la investigación completa de la identidad de un microorganismo se podría realizar solamente a través de la comparación de resultados de un gran número de técnicas: éste es el acercamiento polifásico a la sistemática bacteriana, es decir cuanto más datos se utilizan para la comparación, es más completa y exacta la identificación (Colwell, 1970; Vandamme *et al.*, 1996). Vandamme *et al.* (1996) señalan que para la identificación de microorganismos se deben tener en cuenta en forma integral los resultados obtenidos por distintas metodologías que incluyan tanto el estudio de características fenotípicas como genotípicas. La taxonomía polifásica logra consensuar caracteres fenotípicos tales como morfología, nutrición, movilidad, características tintoriales, formación de esporos, marcadores quimiotaxonómicos, perfil de proteínas totales, enzimas, etc.; filogenéticos, basados en el gen del rARN 16S y genotípicos como el % G+C, hibridación ADN-ADN, técnicas basadas en perfiles que marcan diferencias entre especies (*fingerprinting*), etc.

En las últimas décadas el acercamiento a la filogenética ha revolucionado la sistemática bacteriana. La filogenética se basa en encontrar la relaciones existente entre los organismos mediante la comparación de las secuencias moleculares, principalmente a través de los genes que codifican al rARN 16S (Woese, 1987). Para esto se asumen que: (i) los genes que codifican para el rARN son altamente conservados debido al rol fundamental que cumplen los ribosomas en la biosíntesis de proteínas (función que fue desarrollada en los primeros tiempos de la evolución del organismo); (ii) estos genes no están implicados en fenómenos de transferencia genética horizontal y (iii) el porcentaje de similitud entre las secuencias de diversos individuos es representativa de la variación de sus genomas. Si bien estas

aseveraciones no son completamente ciertas; gracias al análisis de los genes del rARN 16S se ha logrado un avance importante en la taxonomía bacteriana y los resultados obtenidos han sido confirmados mediante el análisis de varias moléculas, por ejemplo: proteínas como RecA (Lloyd & Sharp, 1993; Eisen, 1995) y factores de elongación.

Alternativamente se utilizan otros marcadores como pueden ser los genes que codifican para la subunidad α de la ARN polimerasa (*rpoA*) y la subunidad α del t-ARN de la fenilalanina sintasa bacteriana (Naser *et al.*, 2007).

Se ha encontrado una relación empírica, no-lineal entre los datos de similitud del ADN total y el porcentaje de identidad de las secuencias de los genes que codifican para el rARN 16S (Keswani & Withman, 2001; Rosselló-Mora & Amann, 2001). Según Gevers *et al.* (2005) se podría afirmar que si dos organismos poseen una similitud inferior al 97% en la secuencia del gen que codifica para el rARN 16S tienen una relación a nivel genético baja y por lo tanto pertenecen a diferentes especies. Asimismo, si dos organismos poseen semejanzas superiores al 97 % los organismos son considerados como muy relacionados a nivel genético y solamente datos de hibridación ADN-ADN y/o análisis de otras secuencias son decisivos para la identificación a nivel de especie. Se debe tener en cuenta que la identificación mediante el análisis de secuencias obtenidas por amplificación de secuencias específicas y comparación con base de datos suele ser más rápida, reproducible y menos costosa que la hibridación ADN-ADN (Gevers *et al.*, 2005).

2.1.- El género *Lactobacillus*

Las especies del género *Lactobacillus* son una de las taxa más importantes implicadas en microbiología de alimentos y nutrición humana. Esto se debe al papel que tienen en la producción y preservación de alimentos y también a las características probióticas exhibidas por algunas

cepas. Estos rasgos son de importancia cada vez mayor y reciben la atención de los consumidores, industriales y comunidad científica.

Las bacterias ácido lácticas son un grupo filogenéticamente muy diverso. Estas bacterias constituyen un grupo heterogéneo formado por cocos o bacilos no esporulados, son Gram positivas, catalasa negativas, con bajo contenido de G+C (menor a 54%), carentes de citocromos, exigentes nutricionalmente, ácido-tolerantes y productoras de ácido láctico como producto final mayoritario de la fermentación de carbohidratos.

La mayor discrepancia en la taxonomía del género *Lactobacillus* es la baja correlación existente entre las propiedades metabólicas y la filogenética. La subdivisión histórica del género *Lactobacillus* basada en el tipo de fermentación ha sido revisada y se ha subrayado el hecho de que a términos como homofermentativo y heterofermentativo y ambos términos acompañados de obligado y/o facultativo se le han asignado significados diversos según los autores, lo cual puede llevar a error.

Actualmente se acepta la definición descrita por Hammes & Vogel (1995) donde se define como homofermentativos obligados a aquellos lactobacilos capaces de fermentar las hexosas a ácido láctico por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) mientras que las pentosas y el gluconato no son fermentadas debido a la carencia de fosfocetolasa; heterofermentativo facultativos a aquellos lactobacilos que degradan las hexosas por vía EMP y son capaces de degradar las pentosas y a menudo el gluconato debido a que poseen las enzimas aldolasa y fosfocetolasa y finalmente se describe a los heterofermentativos obligados como aquellos que degradan las hexosas por la vía del fosfogluconato produciendo lactato, etanol o ácido acético y dióxido de carbono como productos y fermentan las pentosas por esta misma vía metabólica (Felis & Dellaglio, 2007).

Según la *Taxonomic Outline of the Prokaryotes* (Release 5.0, Garrity *et al.*, 2004), el género *Lactobacillus* pertenece al *phylum Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Lactobacillaceae* y se agrupan dentro

de la misma familia a los géneros relacionados *Paralactobacillus* y *Pediococcus*.

El primer análisis filogenético de lactobacilos fue realizado en 1991 por Collins *et al.* con las especies conocidas hasta ese momento. De éste análisis surgieron subdivisiones y el género *Lactobacillus* fue dividido en 3 grupos. En los últimos años se han descrito una gran cantidad de nuevas especies y se ha realizado un nuevo examen filogenético del género. Como consecuencia, éstos grupos se han subdividido en grupos más pequeños. Esta estrategia fue adoptado de Hammes & Hertel (2003), y Dellaglio & Felis (2005), y se resumen en la Tabla 1.

Grupos	Hammes y Hertel(2003)	Dellaglio y Felis (2005)	Felis y Dellaglio (2007)
<i>Lb coryniformis</i> (cor)	-	-	<i>Lb bifermentans</i> , <i>Lb coryniformis</i> , <i>Lb rennini</i> , not robustly associated with <i>L. composti</i>
<i>L. plantarum</i> (plan)	<i>L. alimentarius</i> , <i>L. arizonensis</i> , <i>L. collinoides</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. kimchii</i> , <i>L. malefermentans</i> , <i>L. indensis</i> , <i>L. paralimentarius</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. versmoldensis</i>	<i>L. arizonensis</i> , <i>L. collinoides</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> (<i>L. plantarum</i> group-a) associated with <i>L. alimentarius</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. kimchii</i> , <i>L. mindensis</i> , <i>L. paralimentarius</i> , <i>L.versmoldensis</i> (<i>L. plantarum</i> group-b) the affiliation of <i>L. collinoides</i> was poorly supported	<i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. pentosus</i>
<i>L. perolens</i> (per)	-	-	<i>L. perolens</i> , <i>L. harbinensis</i> , <i>L. paracollinoides</i>
<i>L. brevis</i> (bre)	-	<i>L. acidifarinae</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. hammesii</i> , <i>L. spicheri</i> , <i>L. zymae</i>	<i>L. brevis</i> , <i>L. hammesii</i> , <i>L. parabrevis</i>
<i>Pediococcus dextrinicus</i> (Pdex)			<i>P. dextrinicus</i> , <i>L. concavus</i> , <i>L. oligofermentans</i> (the latter sometimes poorly supported)
<i>Pediococcus</i>		1 single cluster (not including <i>P. dextrinicus</i>)	2 clusters, not associated: the first comprises <i>P. cellicola</i> , <i>P. damnosus</i> <i>P. parvulus</i> , <i>P. inopinatus</i> , while the second includes <i>P. acidilactici</i> , <i>P. clausenii</i> , <i>P. pentosaceus</i> and <i>P. stilesii</i>
Couples (couple)			<i>L. rossiae</i> - <i>L. siliginis</i> (1) <i>L. vaccinostercus</i> - <i>L. suebicus</i> (2) <i>L. manihotivorans</i> - <i>L. collinoides</i> (3)
Single species (ss)	<i>L. bifermentans</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. coryniformis</i> and <i>L. perolens</i>	<i>L. algidus</i> , <i>L. kunkeei</i> , <i>L. malefermentans</i> , <i>L. paracollinoides</i> , <i>L. perolens</i> , <i>Paralactobacillus selangorensis</i>	<i>L. kunkeei</i> , <i>L. malefermentans</i> , <i>L. pantheris</i> , <i>L. sharpeae</i> , <i>Paralactobacillus selangorensis</i>

No obstante estas clasificaciones, la taxonomía bacteriana está en permanente evolución debido a la aparición de nuevas especies generando la constante evaluación de géneros, cambio de nombre de las especies y la aparición de nuevos agrupamientos (Felis & Dellaglio, 2007).

2.1.1.- *Lb kefirifaciens*: características generales y su importancia en el ecosistema del kefir.

En el gránulo de kefir los microorganismos se encuentran en una íntima asociación con los componentes de la matriz (proteínas y

polisacáridos), siendo el polisacárido (kefiran) indispensable para mantener su integridad (Mukai *et al.*, 1990; Yokoi *et al.*, 1990).

Lactobacillus kefiranofaciens está compuesta por dos subespecies, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* y *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*. La importancia de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* radica en que es el responsable de la producción de kefiran (Fujisawa *et al.*, 1988, Vancanneyt *et al.*, 2004)

Lb kefiranofaciens subsp *kefiranofaciens* es un bacilo Gram positivo, no móvil, no formador de esporos, de un tamaño que varía entre 0,5-1,2 a 3,0-20 μm , puede encontrarse solo, de a pares y ocasionalmente en cadenas cortas. No crece a 15 °C. Es anaerobio facultativo y produce ácido DL-láctico homofermentativamente. No produce gas a partir de glucosa o gluconato. No produce catalasa. Acidifica la leche. Algunas cepas producen grandes cantidades de polisacárido. No produce la desaminación de la arginina. La hidrólisis de esculina es negativa. Produce ácido a partir de sacarosa pero no de amigdalina, arbutina, celobiosa, β -gentobiosa, inulina, salicina, trehalosa o D-turanose. La producción de ácido a partir de N-acetilglucosamina, maltosa, melibiosa y D-rafinosa es dependiente de la cepa. El contenido de G+C del ADN es de 37,3-38,2 mol % (HPLC) o 34,3-38,6 mol % (Tm) (Vancanneyt *et al.*, 2004).

Hasta el momento este microorganismo ha sido aislado de gránulos de kefir de distinto origen; la cepa tipo JCM 6985T = ATCC 43761T = LMG 19149T fue aislada de gránulos de kefir comerciales en Japón (Fujisawa *et al.*, 1988); las cepas IL1, HLI y MLI fueron aislados de tres gránulos provenientes de Taiwan (Chen *et al.*, 2008); ZW3 de gránulos originarios del Tibet (Wang *et al.*, 2008), R-12937=EXT2.139, R-14240=EXT2.143, R-14242=EXT2.145, R-14243=EXT2.146, R-14244=EXT2.147, R-14245=EXT2.148 y R-14703=EXT2.187 fueron aislados de gránulos procedentes del Cáucaso (Vancanneyt *et al.*, 2004), KF-75 fue aislada de gránulos proveniente de Japón (Mitsue *et al.*, 1998), CYC 10055, CYC 10056,

CYC 10057 y CYC 10058 fueron aislados de gránulos provenientes de distintas regiones de Francia, Italia, Portugal, Rusia, Turquía y España (Santos *et al.*, 2003). Además, *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* fue detectado en gránulos de kefir provenientes de Bélgica (Ninane *et al.*, 2007), Taiwan (Chen *et al.*, 2008), Tibet (Zhou *et al.*, 2009) y Turquía (Kesmen & Kacmaz 2011) utilizando métodos independiente del cultivo (PCR-DGGE). No encontrándose en gránulos provenientes de distintos estados de Brasil y Estados Unidos (Da Cruz Pedrozo Miguel *et al.*, 2010) utilizando la misma metodología.

En virtud de lo expuesto, en una primera etapa se centraron los estudios en determinar la presencia de este microorganismo en gránulos de kefir de la colección CIDCA (Argentina), para posteriormente proceder a su aislamiento y identificación.

Objetivo General

- ✓ Aislar *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* de gránulos de kefir de la colección CIDCA.

Objetivos Específicos:

- ✓ Evaluar la presencia de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* en gránulos de kefir mediante métodos independientes de cultivo.
- ✓ Realizar un aislamiento dirigido a la búsqueda de este microorganismo y efectuar la identificación taxonómica de los aislados obtenidos.

Resultados y Discusión

1.- Aplicación de métodos independientes de cultivo para estudiar la presencia de *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* en gránulos de kefir.

Lb kefiranofaciens subsp. *kefiranofaciens* tiene un rol vital dentro del ecosistema del gránulo de kefir debido a que el exopolisacárido (EPS) que produce forma parte de la matriz y es un componente esencial para el aumento de la biomasa. Por lo tanto es esperable la presencia de éste microorganismo dentro de los gránulos de kefir activos de la colección CIDCA.

Con la finalidad de constatar la existencia de *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* dentro de los gránulos se utilizó una técnica independiente de cultivo comúnmente empleada para el estudio de comunidades microbianas complejas. La metodología utilizada fue la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante químico (DGGE) que consiste en la amplificación del ADN con oligonucleótidos específicos, separación electroforética en gel con gradiente desnaturizante químico y secuenciación de los fragmentos de ADN presentes en cada perfil.

Se extrajo el ADN de 9 gránulos (CIDCA AGK 1, CIDCA AGK 2, CIDCA AGK 3, CIDCA AGK 4, CIDCA AGK 5, CIDCA AGK 6, CIDCA AGK 7, CIDCA AGK 8, CIDCA AGK 10 y CIDCA AGK 11), se amplificó el ADN de cada uno de ellos con oligonucleótidos específicos para Eubacterias (518R y 341F-GC) que codifican para la región V3 del ARNr 16S y los amplicones resultantes se separaron mediante DGGE. Los perfiles electroforéticos obtenidos a partir de la amplificación del ADN de los 9 gránulos en estudio se muestran en la Figura 2.

Se pueden observar diferentes perfiles para los distintos gránulos. Dependiendo del gránulo, el número de bandas presentes en cada perfil

varió entre 7 y 18; siendo el perfil del gránulo CIDCA AGK 2 el que presentó menor número de bandas y el del gránulo CIDCA AGK 8 el que presentó mayor número de bandas. Las bandas señaladas como I, II, y III se encontraron presentes en todos los perfiles. Los gránulos CIDCA AGK 1, CIDCA AGK 3, CIDCA AGK 10 y AGK 11 resultaron muy similares entre sí; lo mismo se observó entre los gránulos CIDCA AGK 2 y CIDCA AGK 5. Los perfiles de los gránulos CIDCA AGK 10, CIDCA AGK 7 y CIDCA AGK 8 presentaron bandas en la zona del gradiente de menor concentración de urea formamida que no se repitieron en los demás perfiles. El número de bandas de los perfiles no es indicativo de la cantidad de especies que están presente en cada comunidad debida a que una especie puede presentar más de una banda en su perfil electroforético (Rosado *et al.*, 1998; Cocolin *et al.*, 2001; Salles *et al.*, 2001) pero el análisis de los perfiles electroforéticos permite comparar las diferentes comunidades.

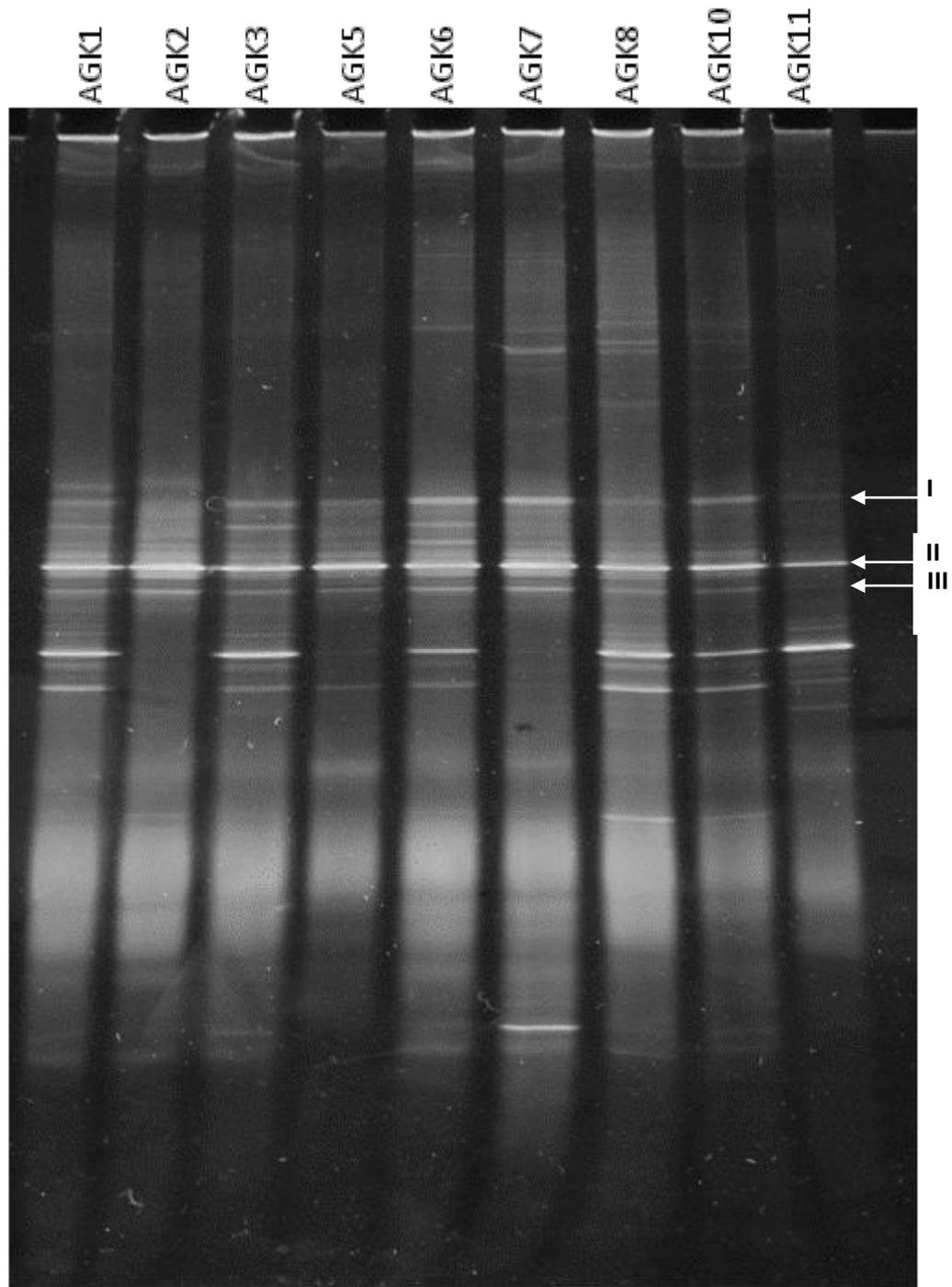


Figura 2: Perfiles electroforéticos obtenidos por DGGE de amplicones del gen que codifica para la región V3 del ARNr 16S obtenidos a partir de ADN aislado de los gránulos de kefir CIDCA AGK 1, CIDCA AGK 2, CIDCA AGK 3, CIDCA AGK 5, CIDCA AGK 6, CIDCA AGK 7, CIDCA AGK 8, CIDCA AGK 10 y CIDCA AGK 11 de la colección CIDCA. En la electroforesis se utilizó un gradiente de urea/formamida 40-60 % y corridas electroforéticas de 16 horas a 100V. Los gels fueron teñidos con Sybr Gold.

Para analizar la similitud existente entre los perfiles electroforéticos obtenidos por DGGE de los distintos gránulos se utilizó el coeficiente de Jaccard y se realizó un análisis de cluster mediante el método de agrupamiento de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA) el programa utilizado fue Systat 12 (Figura 3).

Del análisis del cluster puede decirse que entre todos los perfiles existe un 58,3 % de similitud. El gránulo CIDCA AGK 8 resultó el más disímil ya que no agrupó con ninguno de los otros gránulos. Los perfiles del resto de los gránulos se unieron en dos grandes grupos. En uno de ellos agruparon los gránulos CIDCA AGK 7, CIDCA AGK 6, CIDCA AGK 5 y CIDCA AGK 2, mientras que en el otro agruparon los gránulos CIDCA AGK 10, CIDCA AGK 1, CIDCA AGK 3 y CIDCA AGK 11.

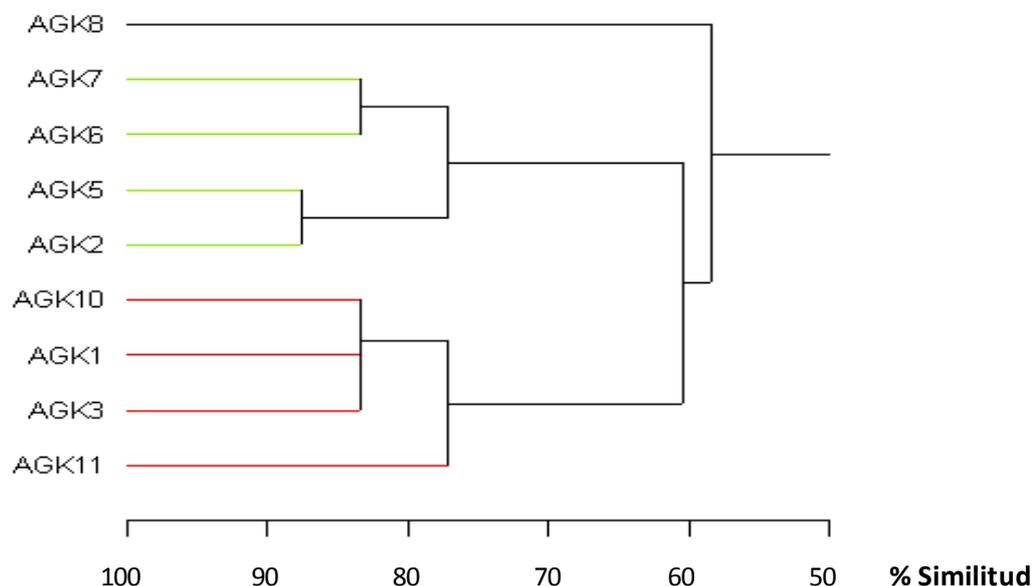


Figura 3: Dendrograma obtenido luego del análisis estadístico (UPGMA) de los perfiles electroforéticos obtenidos mediante DGGE de los gránulos de kefir CIDCA AGK 1, CIDCA AGK 2, CIDCA AGK 3, CIDCA AGK 5, CIDCA AGK 6, CIDCA AGK 7, CIDCA AGK 8, CIDCA AGK 10 y CIDCA AGK 11.

Los perfiles electroforéticos obtenidos por DGGE de los gránulos se contrastaron con los de cepas de referencia comúnmente descritas en éste ecosistema bacteriano y se compararon las posiciones relativas al frente de corrida de las bandas obtenidas. Para ello, el ADN de cepas de referencia fue amplificado y separado mediante la metodología ya descrita en Materiales y Métodos (ítem 12). Las cepas de referencia utilizadas fueron *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985; *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* LMG 15132; *Lb casei* DSMZ 20011; *Lb kefir* JCM 5818, *Lb parakefir* DSMZ 10551; *Lb plantarum* DSMZ 20174 y *Lb delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 332.

Los perfiles obtenidos del ADN de las cepas de referencia amplificados con los oligonucleótidos sintéticos específicos para Eucariotas (Figura 4) muestran que los microorganismos *Lb casei*, *Lb plantarum*, *Lb kefir* y *Lb parakefir* poseen patrones electroforéticos cuyas posiciones relativas al frente de corrida son muy disímiles entre sí, por lo tanto, son fácilmente diferenciables. *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* y *Lb delbrueckii* subsp. *bulgaricus* presentaron bandas en las mismas posiciones relativas al frente de corrida, pero diferentes a los otros microorganismos estudiados. Por esta razón estos tres microorganismos no pueden ser distinguidas por su movilidad electroforética.

En la Figura 4 también puede observarse que los amplicones muestran más de una banda en su perfil electroforético; esto puede deberse a varias razones dentro de las que podemos nombrar la presencia de múltiples copias del gen ribosomal analizado (Cocolin *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2008), la amplificación incompleta del gen de interés (Rosado *et al.*, 1998) o bien la formación de heteroduplex que se forman entre secuencias muy similares y se desnaturalizan en las regiones de menor contenido de agente desnaturalizante observándose bandas en la parte superior del gradiente (Fernandez *et al.*, 1993; Ferris & Ward, 1997; Rosado *et al.*, 1998).

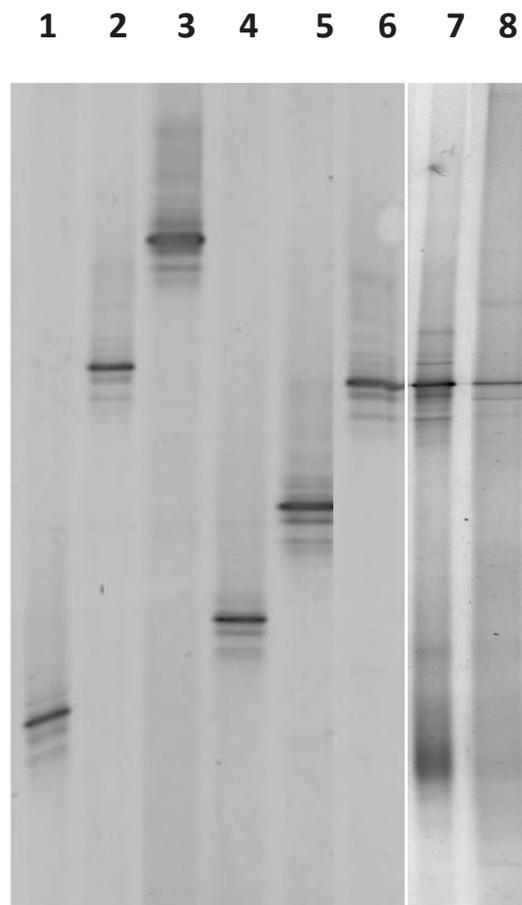


Figura 4: Perfiles electroforéticos obtenidos por DGGE de amplicones del gen que codifica para la región V3 del ARNr 16S de cepas de referencia. En éste gel se utilizó un gradiente de urea/formamida 40-60 % y corridas electroforéticas de 16 horas a 100 V. Los geles fueron teñidos con Sybr Gold. 1: *Lb casei* DSMZ 20011; 2: *Lb delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 332; 3: *Lb plantarum* DSMZ 20174; 4: *Lb parakefir* DSMZ 10551; 5: *Lb kefir* JCM 5818; 6: *Lb kefiranofaciens subsp. kefiranofaciens* DSMZ 5016.; 7: *Lb kefiranofaciens subsp. kefiranofaciens* JCM 6985; 8: *Lb kefiranofaciens subsp. kefirgranum* LMG 15132.

Comparando los perfiles electroforéticos obtenidos para gránulos y cepas de referencia se pudo observar que en los perfiles de los gránulos estudiados se encuentran bandas que presentan posiciones relativas idénticas a las presentes en los perfiles de *Lb kefir*, *Lb parakefir* y de ambas subespecies de *Lb kefiranofaciens* y/o *Lb delbrueckii subsp. bulgaricus*. Por lo tanto estos microorganismos estarían presentes en éstos gránulos de kefir.

En la Figura 5 se presenta a modo de ejemplo los perfiles obtenidos a partir del ADN del gránulo AGK 10 (Calle 1) y un patrón formado por las cepas *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *Lb kefir* y *Lb parakefir* (Calle 2).

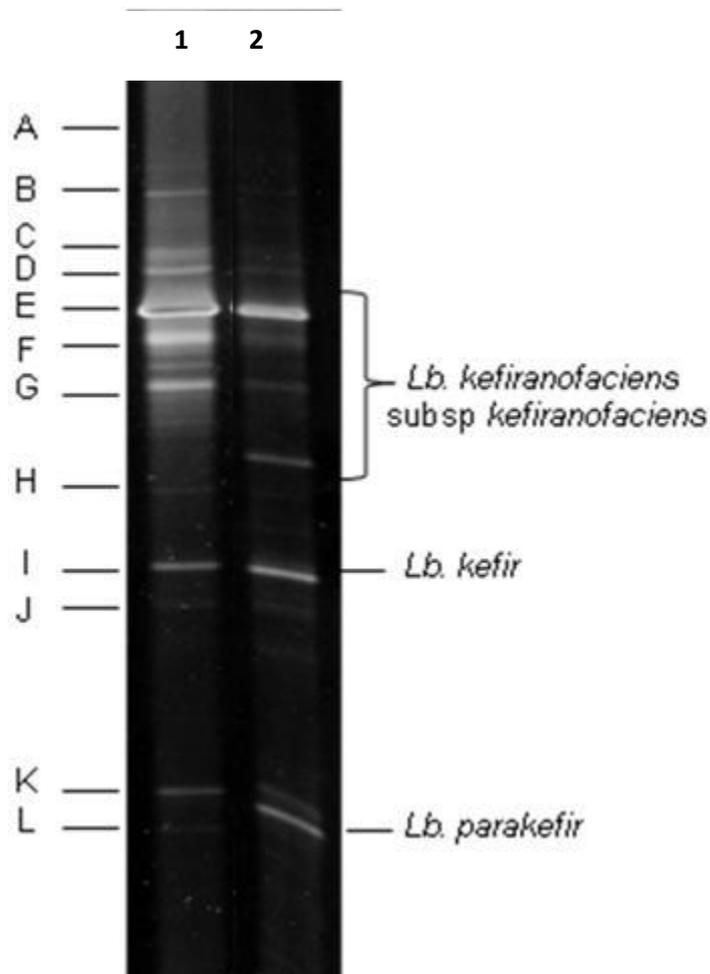


Figura 5: Perfiles electroforéticos obtenidos por DGGE de amplicones del gen que codifica para la región V3 del ARNr 16S de 1: Gránulo AGK 10; 2: Patrón formado por *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985, *Lb kefir* JCM 5818 y *Lb parakefir* DSMZ 10551. Se utilizó un gradiente desnaturalizante de urea/formamida 40-60 % y corridas electroforéticas de 16 horas a 100 V. Los geles fueron teñidos con *Sybr Gold*.

Debido a la complejidad de la muestra, la comparación de las posiciones relativas de las bandas no fue suficiente para la identificación de

los microorganismos y resultó necesario un análisis mediante secuenciación y contrastación con base de datos.

A fin de identificar a qué correspondía cada banda se separó el ADN de los geles de poliacrilamida, se purificó y se amplificó con los oligonucleótidos sintéticos 341F y 518R. Se procedió a la clonación y posterior secuenciación. En algunos experimentos los productos de amplificación fueron directamente secuenciados y comparados con secuencias similares en la base de datos del GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Tabla 2). Las bandas que fueron objeto de la secuenciación se observan en la Figura 5. De acuerdo a éste análisis se encontró que las bandas A a G alinearon con ambas subespecies de *Lb kefiranofaciens* (subsp. *kefirgranum* y subsp. *kefiranofaciens*). La banda H fue identificada como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* o subsp. *cremoris*. Las bandas I y J alinearon con *Lactobacillus kefir*, *Lb buchneri*, *Lb otakiensis* y *Lb sunkii*. La banda K se correspondió con *Lb parakefir* y la banda L alineó con *Lactobacillus sp* sin diferenciar especies (Tabla 2).

Como se puede observar las bandas I y J mostraron altos porcentajes de homología con varias subespecies de lactobacilos. Se relacionaron las bandas I y J solamente con *Lb kefir* ya que *Lb buchneri*, *Lb otakiensis* y *Lb sunkii* no han sido encontrados con anterioridad en gránulo de kefir y provienen de otros hábitats.

Tabla 2: Porcentaje de similitud entre las secuencias parciales del ADNr 16S encontradas para las bandas A a L y las presentes en la base de datos de NCBI.

Banda	Microorganismos más cercanos (closest relative)	Número de acceso	Similitud %
A	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>	AB372208.1	99
	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	FJ915793.1	99
B	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>	AB372208.1	100
	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	FJ915793.1	100
C	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>	AB372208.1	100
	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	FJ915793.1	100
D	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>	AB372208.1	98
	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	FJ915793.1	98
E	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>	AB372208.1	100
	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	FJ915793.1	100
F	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>	AB372208.1	98
	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	FJ915793.1	98
G	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>	AB372208.1	100
	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	FJ915793.1	100
H	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	HM004215.1	100
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	GU344727.1	100
I	<i>Lactobacillus kefiri</i>	AB429371.1	100
	<i>Lactobacillus buchneri</i>	GQ421851.1	100
	<i>Lactobacillus sunkii</i>	AB366385.1	100
	<i>Lactobacillus otakiensis</i>	AB366392.1	100
J	<i>Lactobacillus kefiri</i>	AB429371.1	100
	<i>Lactobacillus buchneri</i>	AB425940.1	100
	<i>Lactobacillus sunkii</i>	AB366385.1	100
	<i>Lactobacillus otakiensis</i>	AB366392.1	100
K	<i>Lactobacillus parakefiri</i>	AB447485.1	97
L	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>	AB372208.1	98
	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	FJ915793.1	98
	<i>Lactobacillus crispatus</i>	AY339180.1	98
	<i>Lactobacillus jensenii</i>	AY262343.1	98
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	GU454853.1	98
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	GU560037.1	98

El estudio de las comunidades bacterianas mediante DGGE permite inferir que hay un porcentaje de la comunidad microbiana que está presente en todos los gránulos pero ninguna de las poblaciones es idéntica entre sí. Está documentado que éstas variaciones pueden deberse a factores tales como el origen y almacenamiento de los gránulos o bien a las condiciones de elaboración del kefir (Witthuhn *et al.*, 2005; Fontán *et al.*, 2006; Latorre-García *et al.*, 2007). Resultados similares, utilizando la misma metodología, se encuentran entre gránulos provenientes de distintos estados de Brazil, Canadá y E.E.U.U. (da Cruz Pedrozo Miguel *et al.*, 2010), en gránulos de kefir procedentes del Tíbet (Jianzhong *et al.*, 2009) y en gránulos originarios de Taiwán (Chen *et al.*, 2008). De esta manera la heterogeneidad de gránulos de distinto origen, que fue documentada con metodologías que se basan en el aislamiento de microorganismos, se confirma mediante técnicas independientes del cultivo (técnicas dependientes de la secuencia) (Ottagalli *et al.*, 1973; Garrote *et al.*, 2001; Farnworth *et al.*, 2005; Bosch *et al.*, 2006).

En cuanto a la identificación de las bandas presentes en los perfiles de los gránulos se pudo constatar que las bandas cuyas posiciones relativas resultaron idénticas a las presentadas por *Lb kefir* JCM 5818 y *Lb parakefir* DSMZ 10551 fueron identificadas como tales mediante secuenciación y contrastación con base de datos pública. Asimismo, las bandas presentes en los gránulos que presentaron posiciones relativas similares *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* y/o *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* y/o *Lb delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fueron identificadas como *Lb kefiranofaciens* sin diferenciar subespecie por secuenciación. Al examinar las secuencias publicadas en las base de datos (GenBank), la secuencia completa del ADNr 16S es idéntica para ambas subespecies de *Lb kefiranofaciens* (número de acceso AJ57525 y AJ575261) (Ninane *et al.*, 2007). Por lo tanto este método sería inapropiado para diferenciar a estos

microorganismos a nivel subespecie (Vancanneyt *et al.*, 2004; Ninane *et al.*, 2007).

Resultados previos indican que la comunidad bacteriana de los gránulos de kefir CIDCA AGK 1, CIDCA AGK 2, CIDCA AGK 3 y CIDCA AGK 4, estudiada mediante métodos dependientes del cultivo, está constituida por los microorganismos *Lb plantarum*, *Lb kefir*, *Lb parakefir*; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y subsp. *diacetylactis*, *Acetobacter* y *Leuconostoc mesenteroide* (Garrote *et al.*, 2001). Los microorganismos hallados por éste método son dependientes del proceso de aislamiento, de la selectividad de los medios y condiciones de cultivo utilizados para el enriquecimiento. Tales variables pueden favorecer el crecimiento de microorganismos que se encuentren en baja proporción en la comunidad bacteriana (Heuer & Smalla, 1997; Miambi *et al.*, 2003).

Por otra lado, en éste trabajo, mediante métodos independientes de cultivo se encontró en los gránulos de kefir: *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* y/o *kefirgranum*; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y/o subsp. *cremoris*; *Lactobacillus kefir*, *Lb parakefir* y otros *Lactobacillus sp* sin diferenciar especies. Este método nos permite confirmar la presencia de microorganismos de difícil crecimiento o bien no cultivables en condiciones de laboratorio. Además algunos microorganismos encontrados por métodos dependientes del cultivo no están representados en los patrones electroforéticos de los gránulos hallados mediante esta metodología. A modo de ejemplo, se puede destacar que *Lb plantarum* no fue detectado en los perfiles PCR-DGGE de ninguno de los gránulos, sin embargo; fue aislado previo enriquecimiento de los gránulos CIDCA AGK 1, CIDCA AGK 2, CIDCA AGK 3 y CIDCA AGK 4 (Garrote *et al.*, 2001). Esto podría estar relacionado con una baja proporción de éste microorganismo dentro del gránulo. Está descrito que especies que representan menos del 1% del total de una comunidad bacteriana pueden no ser visibles en los respectivos perfiles DGGE (Muyzer *et al.*, 1993; Heuer & Smalla, 1997). Sin embargo, esta no es la

única razón que justifica el hecho de que un microorganismo no esté representado en una comunidad microbiana al ser estudiada por esta metodología. Así, bajos rendimientos en la extracción del ADN debido a problemas en la lisis, amplificaciones diferenciales de genomas con bajo contenido de G-C, accesibilidad diferencial a los genes de interés dentro del genoma, interferencia de secuencias adyacentes y afinidad selectiva de los oligonucleótidos sintéticos por la secuencia blanco (Farrelly *et al.*, 1995; Suzuki & Giovannoni, 1996; Hansen *et al.*, 1998; Kanagawa, 2003) son otros factores que pueden influir en los resultados obtenidos por esta metodología. Por lo tanto, los métodos dependientes e independientes de cultivo resultaron complementarios a la hora de describir a la comunidad microbiana de los gránulos de kefir analizados.

Teniendo en cuenta resultados anteriores obtenidos por métodos dependientes de cultivo y los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se puede decir que en los gránulos de kefir de la colección CIDCA están presentes los microorganismos *Lb plantarum*, *Lb kefir*, *Lb parakefir*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y subsp. *diacetylactis*, *Acetobacter*, *Leuconostoc mesenteroide* y *Lb kefirnofaciens*.

2.- Aislamiento e identificación de *Lb kefirnofaciens* subsp. *kefirnofaciens* de gránulos de kefir.

2.1.- Aislamiento.

Habiendo confirmado la presencia de *Lb kefirnofaciens* en todos los gránulos de kefir de la colección CIDCA se planteó una estrategia dirigida a su aislamiento. Para ello se tuvieron en cuenta tanto las características de crecimiento como la complejidad de la estructura del gránulo.

Se observó que durante la purificación del kefir a partir de los gránulos se encontraban habitualmente bacilos íntimamente ligados al polisacárido. Estos bacilos mostraban una morfología microscópica coincidente con la de *Lb kefirnofaciens* subsp. *kefirnofaciens* y

permanecían asociados al polisacárido durante las sucesivas etapas de purificación. De tales observaciones se concluyó que la matriz producida por estos microorganismos constituye al mismo tiempo, una de las principales barreras para la liberación de los mismos hacia el medio utilizado para su aislamiento. Por lo tanto, para aumentar las probabilidades de aislar el microorganismo, se escogieron metodologías dirigidas a lograr la mayor disgregación o ruptura posible de la matriz del gránulo combinado con condiciones de cultivo que favorezcan el crecimiento de éste microorganismo frente al resto de los microorganismos presentes en el gránulo.

Las estrategias utilizadas para el aislamiento de *Lb kefiranofaciens* se esquematizan en la Figura 6. Los métodos 1 y 2 esquematizados se basaron principalmente en la propiedad del kefiran de ser soluble en agua caliente. La temperatura del agua utilizada, 40 °C, fue la más elevada posible para favorecer la solubilidad del polisacárido manteniendo la viabilidad de los microorganismos. El método 3 tuvo como objetivo una alternativa para la interrupción del gránulo. Dado que el gránulo tiene una textura gomosa no es factible triturarlo; por ésta razón para lograr mayor friabilidad se sumergió en nitrógeno líquido. Esto facilitó la ruptura posterior en mortero posibilitando la obtención de partículas de menor tamaño.

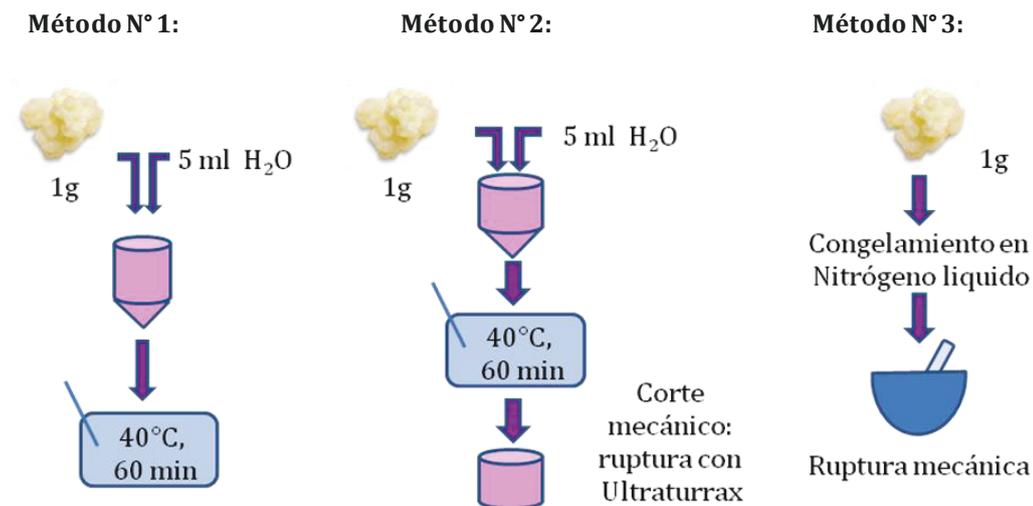


Figura 6: Estrategias para el aislamiento de *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* a partir de gránulo de kefir.

Para el crecimiento se utilizaron medios de cultivo y condiciones de incubación selectivos para el desarrollo de *Lb kefiranofaciens* (caldo y agar MRS pH 5, y 10 días de incubación a 30 °C en atmosfera anaerobia). A las suspensiones obtenidas se les realizaron aislamientos directos por estrías en agar (agar MRS pH 5) y se realizó un previo enriquecimiento en medio líquido (caldo MRS pH 5) en las condiciones de crecimiento descritas antes de realizar el aislamiento por agotamiento en agar.

Las colonias encontradas se diferenciaron por características macroscópicas tales como color, tamaño, relieve, textura y bordes. En la Figura 7 se observan 4 de las morfologías de colonias encontradas. Dichas morfologías se repitieron en las colonias obtenidas a partir de los distintos gránulos y con las distintas estrategias de aislamiento.

Placas obtenidas luego de 10 días en MRS agar pH 5:



Tipos de colonias obtenidas:



Colonia opaca, de bordes lisos, tamaño grande. No presenta filancia.



Colonia opaca, de bordes rugosos, tamaño grande. No presenta filancia.



Colonia blanca, de bordes irregulares, tamaño grande. No presenta filancia.



Colonia brillante, de bordes lisos, tamaño pequeño. Presenta filancia.

Figura 7: Aspecto de las estrías (crecimiento en agar MRS pH 5, 10 días de incubación a 30 °C en atmósfera anaerobia) y microfotografías ampliadas mostrando las morfologías de colonia encontradas.

De las estrías obtenidas a partir de las suspensiones provenientes de cada gránulo se seleccionaron todas las colonias con distintas morfologías y se procedió a hacer sucesivos repiques hasta obtener cultivos puros de los microorganismos. La pureza de los microorganismos se constató por morfología de colonia y morfología microscópica utilizando tinción de Gram. Como resultado se obtuvo un total de 22 microorganismos aislados que fueron conservados a -80 °C hasta su caracterización. En la Tabla 3 se detallan los aislados obtenidos y los gránulos de los cuales provienen.

Tabla 3: Microorganismos aislados a partir de gránulos de kefir de la colección CIDCA.

Gránulos de kefir	Aislado
CIDCA AGK 1	CIDCA 83118, CIDCA 83119, CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83122, CIDCA 83123, CIDCA 83124, CIDCA 83125
CIDCA AGK 2	CIDCA 83211, CIDCA 83212
CIDCA AGK 3	CIDCA 8339, CIDCA 83310, CIDCA 83311
CIDCA AGK 5	CIDCA 8352
CIDCA AGK6	CIDCA 8361
CIDCA AGK7	CIDCA 8371
CIDCA AGK8	CIDCA 8381, CIDCA 8385
CIDCA AGK10	CIDCA 83101, CIDCA 83102, CIDCA 83103
CIDCA AGK 11	CIDCA 830111

2.2.- Identificación de los aislados obtenidos

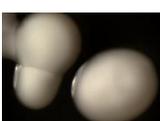
2.2.1.- Caracterización fenotípica: Coloración, morfología de colonia, producción de gas a partir de glucosa y capacidad para fermentar la leche.

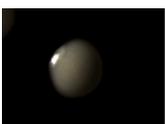
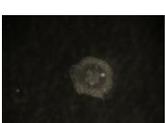
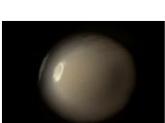
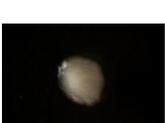
Los aislados fueron caracterizados en cuanto a su morfología microscópica comportamiento frente a la tinción de Gram y morfología de colonia. Asimismo, se les determinó la presencia de la enzima catalasa, capacidad de formar gas a partir de glucosa y la capacidad de crecimiento en leche. Todas las bacterias aisladas resultaron ser bacilos Gram positivos, catalasa negativa, no móvil y no formadoras de esporos, por lo tanto, se puede decir que se encuentran dentro del género *Lactobacillus* (Dellaglio & Felis, 2005).

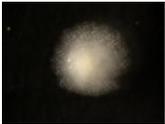
Para determinar la morfología de las colonias los microorganismos fueron crecidos en agar MRS pH 5 durante 7 días de incubación a 30 °C en

atmosfera anaerobia. En la Tabla 4 se muestra la descripción de las colonias con sus respectivas imágenes. Asimismo, se incluye la colonia perteneciente a *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* utilizada como referencia.

Tabla 4: Características de las colonias de los 22 aislados crecidos en agar MRS pH 5 durante 7 días de incubación a 30 °C en atmosfera anaerobia.

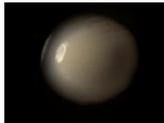
Aislados	Color	Borde	Tamaño	Filancia	Brillo	Imágen
<i>Lb kefirano faciens</i> subsp. <i>kefirano faciens</i> JCM 6985	crema	liso	pequeño	+	si	
CIDCA 83118	crema	rugoso	pequeño	+	si	
CIDCA 83119	crema	rugoso	pequeño	+	si	
CIDCA 83120	blanca	liso	grande	+++	si	
CIDCA 83121	blanca	liso	grande	+++	si	
CIDCA 83122	crema	rugoso	pequeño	+	si	
CIDCA 83123	blanca	liso	grande	+++	si	
CIDCA 83124	blanca	liso	grande	+++	si	

CIDCA 83125	blanca	liso	grande	-	si	
CIDCA 83211	crema	rugoso	pequeño	-	no	
CIDCA 83212	crema	rugoso	pequeño	-	no	
CIDCA 8339	blanca	liso	grande	+	si	
CIDCA 83310	crema	rugoso	pequeño	-	no	
CIDCA 83311	crema	rugosa	pequeño	-	no	
CIDCA 8352	crema	rugoso	pequeño	+	si	
CIDCA 8361	crema	rugoso	pequeño	-	no	
CIDCA 8371	crema	rugoso	pequeño	-	no	
CIDCA 8381	blanqueci no	liso	grande	-	si	
CIDCA 8385	blanqueci no	rugoso	grande	-	no	
CIDCA 83101	blanqueci no	liso	grande	-	si	

CIDCA 83102	blanqueci no	rugoso	grande	-	no	
CIDCA 83103	crema	rugoso	pequeño	-	no	
CIDCA 830111	crema	rugoso	grande	-	no	

En base a la similitud entre las morfologías de colonia encontradas se diferenciaron 5 grupos (Tabla 5). En el grupo I se incluye a los lactobacilos CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123, CIDCA 83124 y CIDCA 8339 que presentan colonias blancas, con brillo, bordes lisos, tamaño grande y filancia; el Grupo II está constituido por los microorganismos CIDCA 83101, CIDCA 8381, y CIDCA 83125, cuyas colonias son blanquecinas, con brillo, de bordes lisos, grandes y no presentan filancia. El grupo III está formado por los aislados CIDCA 83102, CIDCA 830111 y CIDCA 8385, de colonias blanquecinas, sin brillo, de bordes rugosos, tamaño grande y sin filancia. El grupo IV esta constituido por los microorganismos CIDCA 83122, CIDCA 83119, CIDCA 83118 que tienen la característica de presentar polimorfismo en sus colonias. Ambos tipos de colonias son pequeñas, de color crema y bordes rugosos, la diferencia entre ambas es que unas presentan brillo y mayor filancia que el otro tipo de colonia. El Grupo V incluye a los microorganismos CIDCA 8352, CIDCA 8361, CIDCA 8371, CIDCA 83212, CIDCA 83211, CIDCA 83310, CIDCA 83311, CIDCA 83103 cuyas colonias son de color crema, sin brillo, de bordes rugosos, tamaño pequeño y no presentan filancia.

Tabla 5: Agrupamiento de los aislados según la morfología de sus colonias .

GRUPOS	AISLADOS	DESCRIPCION	TIPO DE MORFOLOGÍA
I	CIDCA 83120 CIDCA 83121 CIDCA 83123 CIDCA 83124 CIDCA 8339	Colonias blancas, con brillo, de bordes lisos, tamaño grande. Presentan filancia.	
II	CIDCA 83101 CIDCA 8381 CIDCA 83125	Colonias blanquesinas, con brillo, de bordes lisos, tamaño grande. No presentan filancia	
III	CIDCA 83102 CIDCA 8385 CIDCA 830111	Colonias blanquesinas, sin brillo, de bordes rugosos, tamaño grande. No presentan filancia.	
IV	CIDCA 83122 CIDCA 83119 CIDCA 83118	Presentan polimorfismo(1 y 2). 1: colonias color crema, de bordes rugosos, tamaño pequeño. 2: colonias color crema, de bordes rugosos, tamaño pequeño. Presentan brillo y filancia moderada.	
V	CIDCA 8352 CIDCA 8361 CIDCA 8371 CIDCA 83212 CIDCA 83211 CIDCA 83310 CIDCA 83311 CIDCA 83103	Colonias color crema, sin brillo, de bordes rugosos, tamaño pequeño. No presentan filancia	

De todos los aislados se analizó la habilidad de fermentar la leche y la capacidad de producir gas a partir de glucosa, que nos permite separar a los microorganismos en homofermentativos y heterofermentativos obligados. En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos para los microorganismos aislados indicando el grupo al que pertenecen según la morfología de las colonias. Se incluyó en esta Tabla la cepa de referencia *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985 que tiene la capacidad de fermentar la leche y no produce gas a partir de glucosa.

Los microorganismos de los grupos I, IV y V no producen gas a partir de glucosa y fermentan la leche; mientras que los microorganismos que pertenecen a los grupos II y III producen gas a partir de glucosa y no fermenta la leche. Estas características resultaron ser idénticas para los microorganismos dentro de cada grupo; excepto el aislado CIDCA 8361 perteneciente al grupo V que no fermenta la leche a diferencia de los demás microorganismos de ese grupo.

Tabla 6: Capacidad para crecer en leche y producir gas a partir de glucosa de *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985 y 22 microorganismos aislados de gránulo de kefir.

GRUPOS DE MORFOLOGÍA DE COLONIA	AISLADOS	CRECIMIENTO EN LECHE	GAS A PARTIR DE GLUCOSA
	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	+	-
I	83120	+	-
I	83121	+	-
I	83123	+	-
I	83124	+	-
I	8339	+	-
II	83125	-	+
II	8381	-	+
II	83101	-	+
III	8385	-	+
III	83102	-	+
III	830111	-	+
IV	83118	+	-
IV	83119	+	-
IV	83122	+	-
V	83211	+	-
V	83212	+	-
V	83310	+	-
V	8352	+	-
V	8361	-	-
V	8371	+	-
V	83103	+	-
V	83311	+	-

2.2.2.- Caracterización fenotípica: Perfil de proteínas por SDS-PAGE

Continuando con la identificación de los aislados se realizó un análisis de las proteínas de célula entera. La electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) es ampliamente utilizado para identificar una

gran cantidad de especies estrechamente vinculadas (Ohya *et al.*, 1988; Vauterin *et al.*, 1993; Kersters *et al.*, 1994; Gómez-Zavaglia *et al.*, 1999). Además, numerosos estudios han revelado una buena correlación entre los resultados obtenidos por este método y la hibridación ADN-ADN (Costas, 1992; Vandamme *et al.*, 1996); siendo ésta última una técnica de gran importancia en identificación bacteriana.

Inicialmente se procedió a analizar los perfiles electroforéticos obtenidos mediante SDS-PAGE de cepas de referencia comúnmente descritas en éste ecosistema bacteriano y sus perfiles fueron comparados entre sí. Los microorganismos de referencia ensayados fueron *Lb casei* DSMZ 20011, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* LMG 15132, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* DSMZ 5016, *Lb plantarum* DSMZ 20174, *Lb acidophilus* DSMZ 20079, *Lb brevis* JCM 1059, *Lb kefir* JCM 5818, *Lb paracasei* LMG 40006 y *Lb parakefir* JCM 8573.

Los perfiles obtenidos para las cepas de referencia (Figura 8) resultaron ser disímiles entre sí. Se puede observar que se logra la diferenciación de microorganismos que se encuentran inclusive en los mismos grupos filogenéticos según Felis & Dellaglio (2007). Por ejemplo, se obtienen perfiles distintos para ambas subespecies de *Lb kefiranofaciens* y *Lb acidophilus*, logrando así diferenciar a estos microorganismos que se encuentran en el grupo *Lb delbrueckii*. Por otro lado, se logra diferenciar a los microorganismos *Lb kefir* y *Lb parakefir* pertenecientes al grupo *Lb buchneri*.

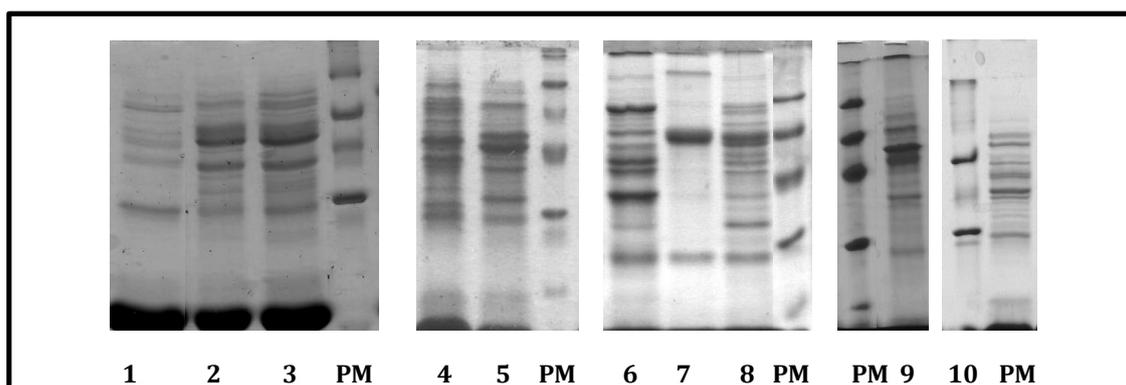


Figura 8: Perfil de proteínas de cepas de lactobacilos de referencia obtenido mediante SDS-PAGE en gel continuo 12,5% de acrilamida /bis acrilamida. Calles: 1: *Lb casei* DSMZ 20011; 2: *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985; 3: *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* DSMZ 5016 ; 4: *Lb plantarum* DSMZ 20174; 5: *Lb acidophilus* DSMZ 20079; 6: *Lb brevis* JCM 1059; 7: *Lb kefir* JCM 5818; 8: *Lb parakefir* JCM 8573; 9: *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* LMG 15132, 10: *Lb paracasei* LMG 40006.

Los perfiles proteicos obtenidos mediante SDS-PAGE de cada uno de los microorganismos aislados se muestran en la Figura 9.

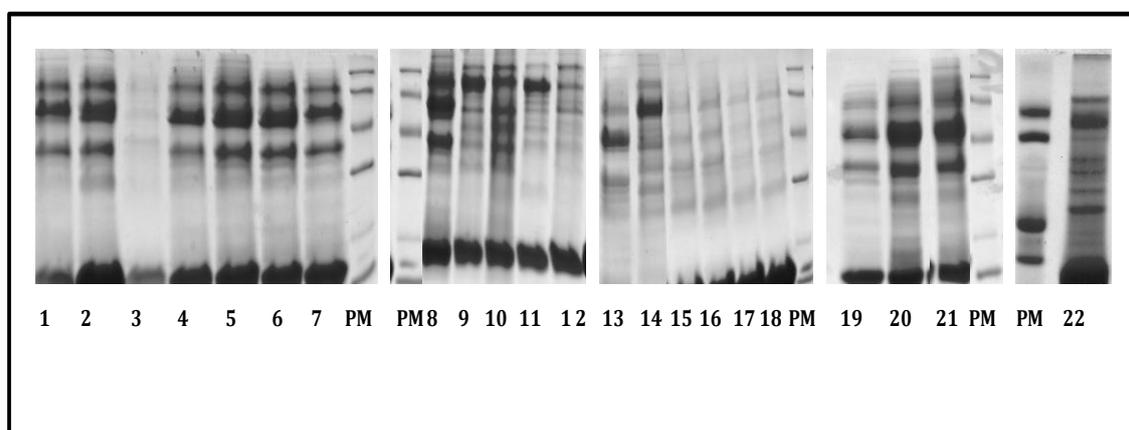


Figura 9: Perfil de proteínas de célula entera de los microorganismos aislados mediante SDS-PAGE en gel continuo 12,5% de acrilamida /bis acrilamida 1:CIDCA 83211, 2:CIDCA 83212, 3:CIDCA 8339, 4:CIDCA 83310, 5:CIDCA 83311, 6:CIDCA 8352, 7:CIDCA 8361, 8:CIDCA 8371, 9: CIDCA 8381, 10:CIDCA 8385, 11:CIDCA 83101, 12:CIDCA 83102, 13:CIDCA 83103, 14:CIDCA 830111, 15:83120, 16:CIDCA 83121, 17:CIDCA 83123, 18:CIDCA 83124, CIDCA 8318, 20:CIDCA 8319, 21:CIDCA 83122, 22:CIDCA 83125.

La similitud existente entre las cepas de referencias y los microorganismos en estudio fue evaluada utilizando el coeficiente de Jaccard y se realizó un análisis de cluster mediante el método de agrupamiento de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA). El dendrograma resultante se presenta en la Figura 10.

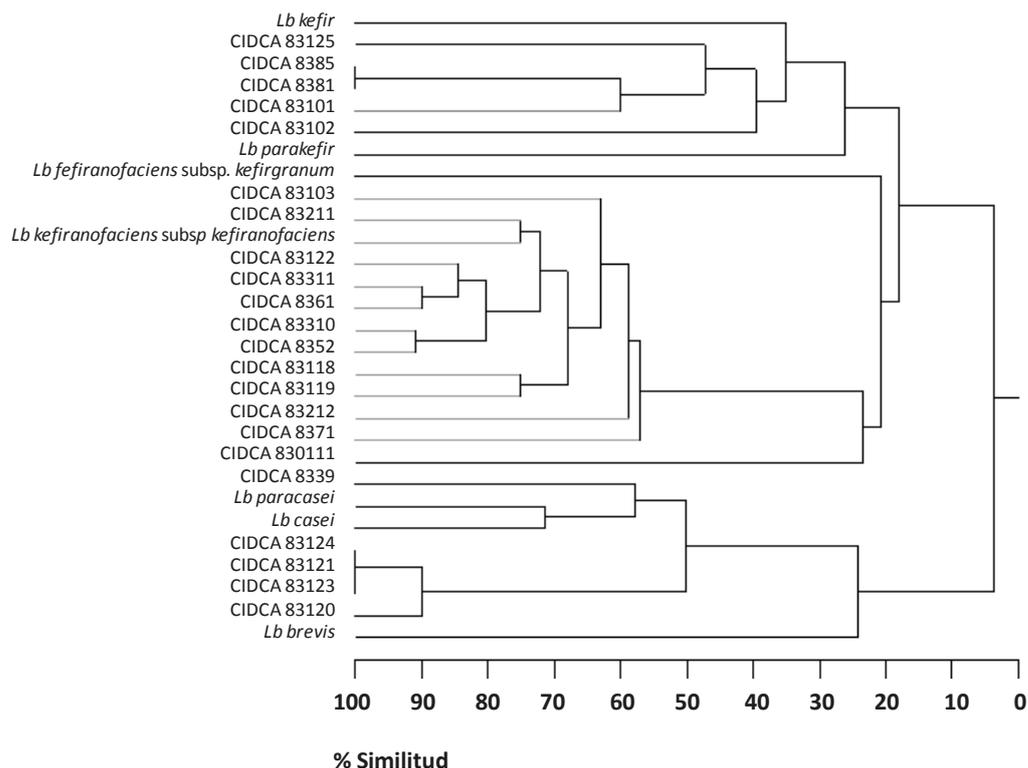


Figura 10: Dendrograma obtenidos por análisis estadístico (Coeficiente de Jaccard-agrupamiento de ligamento promedio no ponderado (UPGMA)) de los perfiles SDS-PAGE de los microorganismos aislados de kefir y los utilizados como referencia. *Lb brevis* JCM 1059, *Lb kefir* JCM 5818, *Lb parakefir* JCM 8573, CIDCA 83102, CIDCA 83101, CIDCA 8381, CIDCA 8385, CIDCA 83125 y CIDCA 830111; *Lb paracasei* LMG 40006; *Lb casei* DSMZ 20011, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* LMG 15132, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* DSMZ 5016, *Lb plantarum* DSMZ 20174, *Lb acidophilus* DSMZ 20079, y los aislados CIDCA 8371, CIDCA 83212, CIDCA 83211, CIDCA 8361, CIDCA 83311, CIDCA 83122, CIDCA 83310, CIDCA 8352, CIDCA 83118, CIDCA 83119, CIDCA 83103, CIDCA 83120, CIDCA 83123, CIDCA 83121, CIDCA 83124, CIDCA 8339.

De este análisis surge que los microorganismos agrupan formando 2 clusters bien definidos. Uno de ellos está constituido por *Lb casei*, *Lb paracasei* y los aislados CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123, CIDCA 83124 y CIDCA 8339 y con menor porcentaje de similitud se une a los anteriores *Lb brevis*. El otro cluster se subdivide en dos grupos, uno formado por *Lb kefir*, *Lb parakefir*, CIDCA 8381, CIDCA 8385, CIDCA 83125, CIDCA 83101, CIDCA 83102 y el otro que agrupa a *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* LMG 15132 y los aislados CIDCA 83118, CIDCA 83119, CIDCA 83122, CIDCA 83211, CIDCA 83212, CIDCA 8352, CIDCA 8361, CIDCA 8371, CIDCA 83311, CIDCA 8310, CIDCA 83103, CIDCA 830111.

2.2.3.- Características genotípicas: Amplificación de secuencias repetitivas.

La amplificación por PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP) es un tipo de PCR que emplea oligonucleóticos diseñados para hibridar con secuencias de ADN repetidas distribuidas en el cromosoma y amplifica las regiones que las separan. Por lo tanto, el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones del ADN. Como resultado se obtienen múltiples amplicones de distintos tamaños que luego son separados por electroforesis en gel de agarosa. Los perfiles electroforéticos obtenidos son característicos para cada cepa bacteriana y son utilizados para su identificación. Esta técnica es ampliamente utilizada para diferenciar una gran cantidad de lactobacilos asociados a alimentos a nivel especie y subespecie, cuando el número de bandas presentes en los perfiles electroforéticos varía entre 10 y 20 (Gevers *et al.*, 2001).

En este trabajo se amplificó el ADN de los 22 aislados utilizando los oligonucleóticos sintéticos (GTG)₅' y los amplicones obtenidos se corrieron en geles de agarosa 1,5 % p/v. Las imágenes resultantes fueron procesadas utilizando el programa Bionumerics v5.1 y como referencia, para la comparación e identificación de los perfiles, se utilizó la base de datos del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Gent (LM-UGent).

En la Figura 11 podemos observar los perfiles electroforéticos y el dendrograma construido a partir de los resultados obtenidos. El análisis estadístico se realizó utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

Del análisis de cluster puede decirse que los aislados forman dos grandes grupos que presentan una muy baja homología (0,5 %). Uno de los grupos posee un bajo número de bandas en los perfiles y otro un elevado número de bandas. El cluster que presenta los aislados con un bajo número de bandas incluye a las cepas de referencia *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* y *Lb kefir*. El cluster que agrupa a los aislados con mayor número de bandas incluye a las cepas de referencia *Lb paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb paracasei* subsp. *tolerans* y *Lb parakefir*.

Puede observarse que los aislados CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 presentan una homología del 96 % entre sí y de 40,9 % con cepas de *Lb paracasei* subsp. *paracasei* LMG 13087 y LMG 7955 y *Lb paracasei* subsp. *tolerans* LMG 919. El aislado CIDCA 8339 se asemeja a *Lb paracasei* de la base de datos de LMU-Gent mostrando un porcentaje de similitud de 65,8 %.

Los aislados CIDCA 83125 y CIDCA 83101 tienen una homología de 60,4% con el microorganismo *Lb parakefir* LMG 15133.

En cuanto a los aislados CIDCA 8352, CIDCA 83310, CIDCA 83118, CIDCA 8371, CIDCA 83211, CIDCA 83212, CIDCA 8361 agrupan con *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* LMG 15132 y *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* LMG 19149 mostrando una similitud de 62,4 %.

Los aislados CIDCA 83211, CIDCA 83212, CIDCA 83119, CIDCA 83102, CIDCA 83122, CIDCA 830111, CIDCA 8381 y CIDCA 8385 presentaron bajo número de bandas fueron.

Los aislados CIDCA 83119, CIDCA 83102, CIDCA 83122, CIDCA 830111, CIDCA 8385, CIDCA 8381, CIDCA 83311 y las cepas de *Lb kefir* LMG 11454, LMG 11496, LMG 9480 y LMG 11453 de la colección LM-UGent forman un subgrupo con una homología de 69,5 %. Dentro de este último subgrupo se encuentran seis de los siete aislados con bajo número de bandas en sus perfiles electroforéticos.

En el análisis no se incluye el perfil del aislado CIDCA 83103 ya que no se logró amplificar el ADN en las condiciones ensayadas.

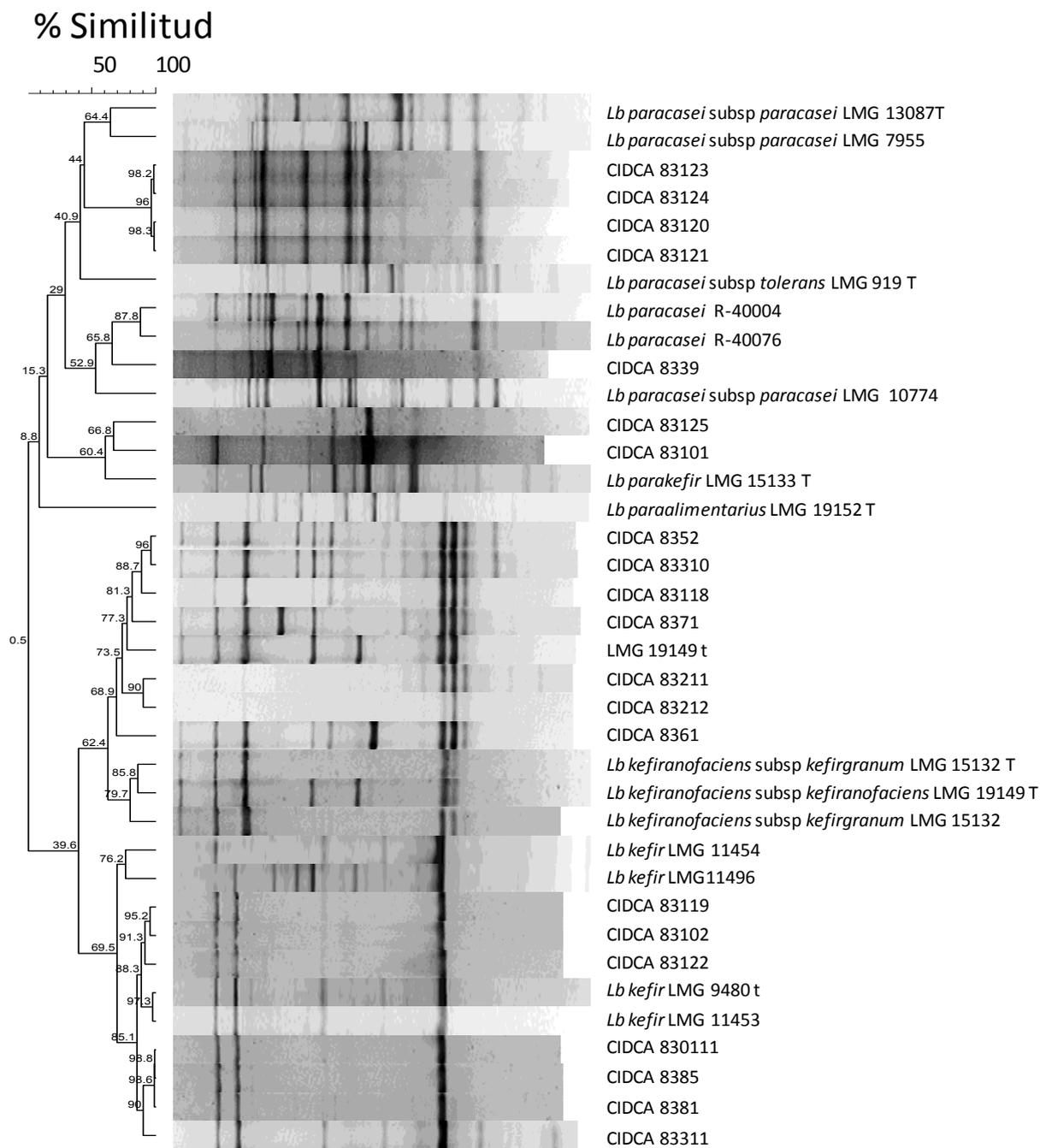


Figura 11: Dendrograma obtenido por análisis estadístico (correlación de Pearson) de los perfiles de rep-PCR (GTG)5' de los lactobacilos aislados en comparación con las cepas de referencia de la base de datos LM-Ugent.

Es de destacar que los grupos de similitud encontrados por esta metodología son iguales a los encontrados por perfil de proteínas totales (SDS-PAGE) para la mayoría de los microorganismos. Sin embargo, los

aislados CIDCA 83119, CIDCA 83122 y CIDCA 83311 no mostraron resultados coincidentes analizado por ambas metodologías. Según esta técnica dichos microorganismos presentan homología con el microorganismo *Lb kefir* mientras que su perfil de proteínas totales indica una similitud, con altos porcentajes de homología, con *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*.

2.2.4. Características genotípicas: Secuenciación del gen que codifica el tARN de la fenilalanina sintasa (pheS).

La secuenciación de los genes de la subunidad α del tARN de la fenilalanina sintasa (pheS) y de la subunidad α de la ARN polimerasa (rpoA) es usada para identificación como una alternativa a la secuenciación del ARNr 16S y tiene un poder discriminatorio muy alto para especies del género *Lactobacillus* (Naser *et al.*, 2007).

En este trabajo se secuenció el gen que codifica para el tARN de la pheS con el método dideoxi de Sanger. Para ello, se amplificó el ADN de los aislados con los oligonucleóticos conservados 21F/22R y 21F/23R. Los amplicones obtenidos (400-450 kpb) fueron purificados por técnicas de ultrafiltración y la calidad y cantidad del ADN se verificó utilizando electroforesis en geles de agarosa al 2%, los datos obtenidos se ensamblaron para obtener una secuencia consenso.

Los resultados encontrados para los aislados fueron comparados con las cepas de referencia de la base de datos LM-UGent y el porcentaje de similitud fue calculado usando el coeficiente de Pairwise.

Los aislados analizados por esta metodología fueron aquellos que presentaron discrepancias en los métodos anteriormente descritos. No se muestran resultados para los aislados CIDCA 83211, CIDCA 83102 y CIDCA 830111 debido a que no fue posible amplificar su ADN con la combinación de primers 21/22, 21/23 y temperaturas de *annealing* utilizadas.

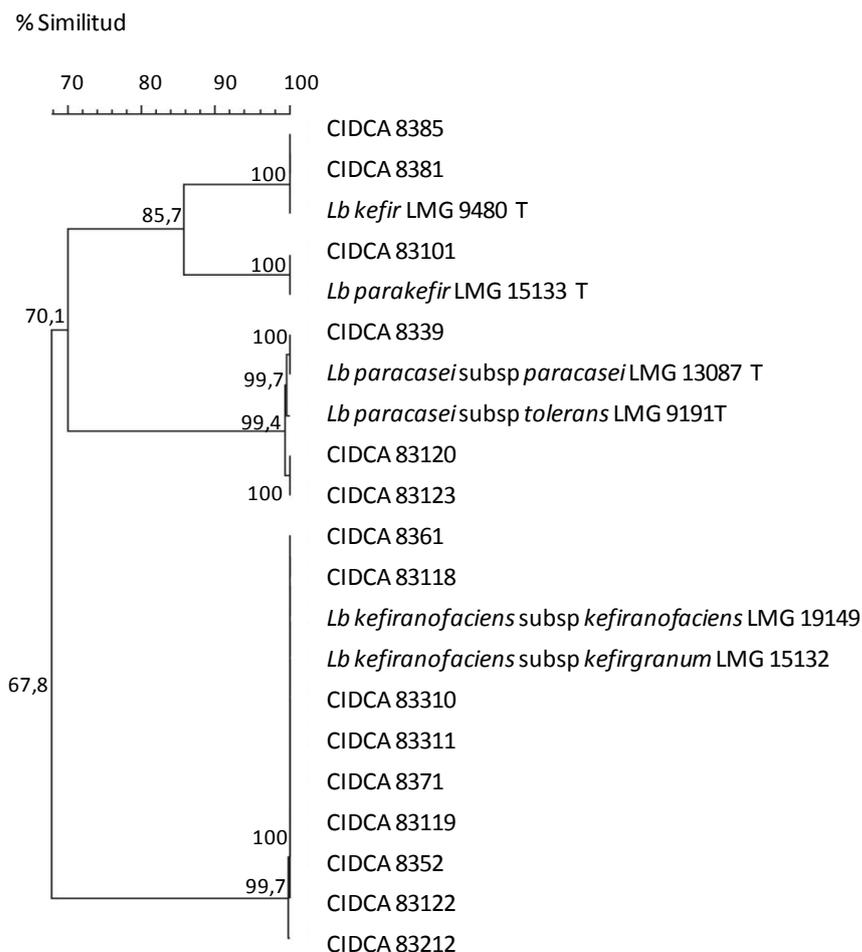


Figura 12: Dendrograma obtenido a partir de los datos de secuenciación de gen de la pheS de los lactobacilos aislados en comparación con los resultados de cepas de referencia de la base de datos de LM- UGent.

Los resultados del análisis numérico se muestran en la Figura 12. Se puede observar que la secuenciación de éste gen diferencia muy bien a las especies *Lb kefiranofaciens*, *Lb kefir*, *Lb parakefir* y *Lb paracasei* en estudio. Los aislados se agrupan con las cepas de referencia en 3 cluster. Uno de ellos está constituido por los aislados CIDCA 83212, CIDCA 83122, CIDCA 8352, 83119, CIDCA 8371, CIDCA 83311, CIDCA 83310, CIDCA 8361, y CIDCA 83118 y presenta una similitud de 100% con las cepas de referencia *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* y *Lb kefirnofaciens* subsp. *kefirgranum*. El segundo grupo se divide en dos subgrupos. En uno de ellos se encuentran

los aislados CIDCA 8339, CIDCA 83120 y CIDCA 83123 mostrando porcentajes de similitud cercanos al 100 % con *Lb paracasei* subsp. *paracasei* y *Lb paracasei* subsp. *tolerans*. El segundo subgrupo se subdivide, mostrando por un lado al aislado CIDCA 83101 que posee una homología del 100 % con *Lb parakefir* y por otro lado los aislados CIDCA 8381 y CIDCA 8385 que presentaron una semejanza del 100% con *Lb kefir*.

La secuenciación del gen de la pheS de los aislados CIDCA 83118, CIDCA 8352, CIDCA 83212, CIDCA 83310, CIDCA 8361, CIDCA 8371, CIDCA 83101, CIDCA 8339, CIDCA 83120, CIDCA 83123, CIDCA 8381 y CIDCA 8385 confirmó los resultados obtenidos por (GTG)₅' y perfil de proteínas totales. Los aislados CIDCA 83119, CIDCA 83122, CIDCA 83311 presentaron resultados que no se correspondieron con los obtenidos por rep PCR (GTG)₅' pero sí a los obtenidos por SDS-PAGE.

2.2.5. Perfil obtenido por electroforesis en geles con gradiente desnaturizante químico (DGGE) de los microorganismos aislados de gránulo de kefir y secuenciación del ADNr 16S.

Se realizaron perfiles DGGE de los 22 microorganismos aislados. Para ello su ADN fue amplificado utilizando los oligonucleótidos sintéticos 518R y 341F-GC y los amplicones se analizaron por electroforesis utilizando un gradiente desnaturizante de urea/formamida 40-60% (Figura 13). Las posiciones relativas de las bandas se contrastaron con las encontradas para las cepas de referencia *Lb casei* DSMZ 20011, *Lb parakefir* DSMZ 10551, *Lb kefir* JCM 5818, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* LMG 15132, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985 y *Lb plantarum* DSMZ 20174 (Figura 4).

En la Figura 13 se observan, a modo de ejemplo, los perfiles electroforéticos encontrados para algunos de los aislados y la cepa de referencia *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985.

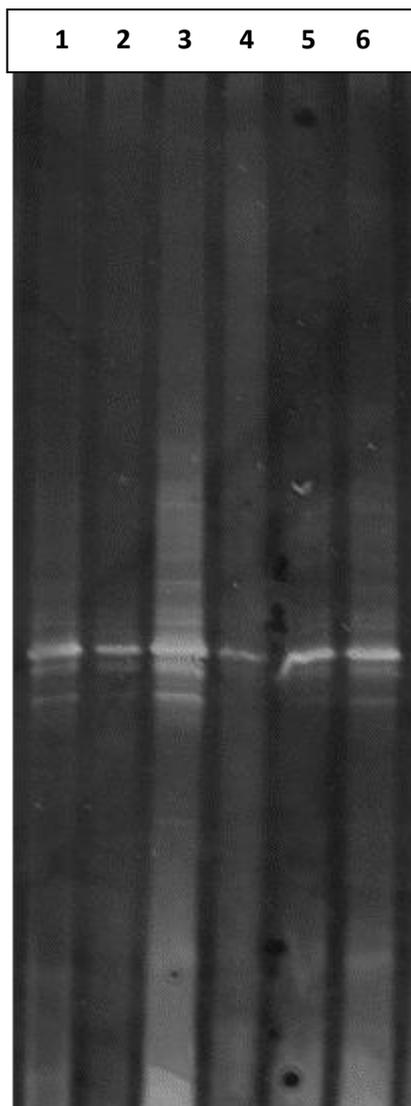


Figura 13: Perfiles electroforéticos obtenidos por DGGE de amplicones de la región V3 del ARNr 16S de las cepas de referencia JCM 6985 y algunos de los microorganismos aislados en este trabajo. Los oligonucleótidos sintéticos utilizados para amplificar dicha secuencia fueron 518R y 341F-GC. En éste gel se utilizó un gradiente de urea/formamida 40-60 % y corridas electroforéticas de 16 horas a 100 V. Los gels fueron teñidos con Sybr Gold. Calles: 1: *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985; 2: CIDCA 83118; 3: CIDCA 83119; 4: CIDCA 83122; 5: CIDCA 83212; 6: CIDCA 83212; 7: CIDCA 83310.

Los aislados CIDCA 83103, CIDCA 83122, CIDCA 83119, CIDCA 83118, CIDCA 83212, CIDCA 83310, CIDCA 83311, CIDCA 8371, CIDCA 8352, y CIDCA 8361 poseen perfiles idénticos entre sí y con las cepas *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985 y *Lb kefiranofaciens* subsp.

kefirgranum LMG 15132; los microorganismos aislados CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83113, CIDCA 83124 y CIDCA 8339 mostraron equivalencia en sus perfiles y con la cepa de referencia *Lb casei* DSMZ 20011. Para dilucidar la identidad de éstos microorganismos las bandas mayoritarias de cada uno de los aislados y las cepas de referencia *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985 obtenidas en el punto anterior fueron cortadas, amplificadas con oligonucleótidos 518R y 341F, purificadas y secuenciadas. Las secuencias obtenidas fueron contrastadas en el GenBank utilizando el algoritmo BLAST. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Porcentaje de similitud entre las secuencias parciales del ADNr 16S encontradas para las bandas mayoritarias de los aislados y las presentes en la base de datos de NCBI. NA: Número de Acceso al GenBank.

Aislado	Resultado
<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> CIDCA 83118	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (NA:HM218529.1)/ <i>kefirgranum</i> (NA: AB372208.1) 100%
CIDCA 83119	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (NA: FJ915793.1) / <i>kefirgranum</i> (NA: AB372208.1)100%
CIDCA 83120	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (NA: FJ915793.1) / <i>kefirgranum</i> (NA: HM218539.1)98%
CIDCA 83121	<i>Lb casei</i> (NA: AB494735.1)/ <i>paracasei</i> (NA: AB494720.1)/ <i>rhamnosus</i> (NA: GU560042.1)95%
CIDCA 83122	<i>Lb casei</i> (NA: AB494735.1)/ <i>paracasei</i> (NA: AB494720.1)/ <i>rhamnosus</i> (NA: GU560042.1) 95%
CIDCA 83123	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (NA: FJ915793.1) / <i>kefirgranum</i> (NA: AB372208.1)100%
CIDCA 83124	<i>Lb casei</i> (NA: AB494735.1)/ <i>paracasei</i> (NA: AB494720.1)/ <i>rhamnosus</i> (NA: GU560042.1) 97%
CIDCA 83125	<i>Lb casei</i> (NA: GU560041.1)/ <i>paracasei</i> (NA: AB494720.1)/ <i>rhamnosus</i> (NA: GU560042.1) 99%
CIDCA 83212	<i>Lb parakefir</i> (NA: AB447485.1) 100%
CIDCA 8339	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (NA: FJ915793.1) / <i>kefirgranum</i> (NA: AB372208.1)97%
CIDCA 83310	<i>Lb casei</i> (NA: AB494735.1), <i>paracasei</i> (NA: AB494720.1), <i>rhamnosus</i> (NA: GU560042.1) 100%
CIDCA 83311	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (NA: FJ915793.1) / <i>kefirgranum</i> (NA: AB372208.1)100%
CIDCA 8352	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (NA: FJ915793.1) / <i>kefirgranum</i> (NA: AB372208.1)99%
CIDCA 8361	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (NA: FJ915793.1) / <i>kefirgranum</i> (NA: AB372208.1) 97%
CIDCA 8371	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (NA: FJ915793.1) / <i>kefirgranum</i> (NA: AB372208.1) 97%
CIDCA 8381	<i>Lb buchneri</i> (NA: AB425940.1)/ <i>sunki</i> (NA: AB366385.1)/ <i>kefir</i> (NA: AB372208.1) 100%
CIDCA 8385	<i>Lb buchneri</i> (NA: AB425940.1)/ <i>sunki</i> (NA: AB366385.1)/ <i>kefir</i> (NA: AB429371.1) 100%
CIDCA 83101	<i>Lb buchneri</i> (NA: AB425940.1)/ <i>sunki</i> (NA: AB366385.1)/ <i>kefir</i> (NA: AB429371.1)/ <i>otakiensis</i> (NA: AB366392.1) 100%
CIDCA 83102	<i>Lb buchneri</i> (NA: AB425940.1)/ <i>sunki</i> (NA: AB366385.1)/ <i>kefir</i> (NA: AB429371.1)/ <i>otakiensis</i> (NA: AB366392.1) 96%
CIDCA 83103	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (NA: FJ915793.1) / <i>kefirgranum</i> (NA: AB372208.1)100%
CIDCA 830111	<i>Lb buchneri</i> (NA: AB425940.1)/ <i>sunki</i> (NA: AB366385.1)/ <i>kefir</i> (NA: AB429371.1)/ <i>otakiensis</i> (NA: AB366392.1) 98%

Las secuencias parciales del gen que codifica para el ARNr 16S encontradas para los microorganismos CIDCA 83103, CIDCA 83122, CIDCA 83119, CIDCA 83118, CIDCA 83212, CIDCA 83310, CIDCA 83311, CIDCA 8352, CIDCA 8371 y CIDCA 8361 presentaron una homología que varió entre 97 y 100% con las secuencias depositadas en el GenBank de ambas

subespecies de *Lb kefiranofaciens*. Asimismo, los aislados CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123, CIDCA 83124 y CIDCA 8339 presentaron similitud con las secuencias de *Lb casei*, *Lb paracasei* y *Lb rhamnosus* en porcentajes que variaron entre 95 y 100%. Finalmente, las secuencias encontradas para los aislados CIDCA 83101, CIDCA 8381, CIDCA 8385, CIDCA 83102 y CIDCA 830111 mostraron homología entre 95 y 100% con cepas de *Lb buchneri*, *Lb sunki*, *Lb kefir* y *Lb otakiensis* (Tabla 7).

Los resultados aplicando distintas metodologías, con la finalidad de identificar los 22 microorganismos aislados, se analizaron de manera conjunta. Para facilitar el análisis se agruparon los aislados de acuerdo a los grupos definidos inicialmente por morfología de colonia y producción de gas a partir de glucosa.

Grupo I

La Tabla 8 muestra los resultados obtenidos al utilizar diferentes metodologías para identificar los microorganismos CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123, CIDCA 83124 y CIDCA 8339 pertenecientes al grupo I de morfología de colonia. Estos microorganismos son Gram positivos, catalasa negativa, tienen la capacidad de crecer en leche y no producen gas a partir de glucosa.

De acuerdo al análisis de los perfiles de proteínas estos aislados agrupan con los microorganismos del grupo *Lb casei* (Felis & Dellaglio, 2007).

Los perfiles electroforéticos obtenidos por DGGE de los microorganismos del grupo I muestran que los fragmentos de ADN de la región V3 del ARNr 16S es idéntica entre ellos y con *Lb casei* DSMZ 20011 (ATCC 393). Esto podría relacionar a los aislados con este microorganismo de referencia. Sin embargo se sabe que para el grupo *Lb casei* (*Lb casei*, *Lb paracasei* y *Lb rhamnosus*) la movilidad electroforética de dicho fragmento es idéntica (Walter *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2008). Además, los resultados de

la secuenciación (ARNr 16S) mostraron altos porcentajes de similitud con las 3 especies del grupo *casei* (*Lactobacilos casei*, *paracasei* y *rhamnosus*). Por lo tanto, esta metodología solo nos permite afirmar que los microorganismos del grupo I se encuentran dentro del grupo *Lb casei*.

En cuanto a los perfiles encontrados por rep-PCR (GTG)_{5'} los aislados CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123, CIDCA 83124 mostraron una alta homología entre sí (96%) y una homología menor (40%) con *Lb paracasei* subsp. *paracasei* presente en la base de datos de LMU-Gent. En cuanto al microorganismo CIDCA 8339 se debe destacar que se encuentra en un cluster diferente a los microorganismos anteriormente mencionados con un porcentaje de similitud de 29%. Este microorganismo presenta una homología de 65,8% con *Lb paracasei*.

Como resultado de la secuenciación del gen que codifica para la pheS, los microorganismos CIDCA 83120, CIDCA 83123 y CIDCA 8339 mostraron homologías cercanas al 100 % con ambas subespecies de *Lb paracasei*. Naser *et al* (2007) señala que esta metodología puede ser utilizada para separar este grupo a nivel especie.

Tabla 8: Crecimiento en leche, producción de gas a partir de glucosa e identificación de los aislados CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123, CIDCA 83124 Y CIDCA 8339 pertenecientes al **grupo I** de morfología de colonia mediante perfil de proteínas totales por SDS-PAGE, rep PCR (GTG)5' y secuenciación de los genes que codifican para el ARNr 16S y pheS.

Aislado	Crecimiento en leche	Gas de glucosa	SDS-PAGE	Secuenciación ARNr 16S	rep PCR (GTG) 5'	pheS
83120	+	-	<i>Lb casei/paracasei</i>	<i>Lb casei/paracasei/rhamnosus</i> 95%	<i>Lb paracasei</i>	<i>Lb paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 99.5% / <i>L paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> 99,2%
83121	+	-	<i>Lb casei/paracasei</i>	<i>Lb casei/paracasei/rhamnosus</i> 95%	<i>Lb paracasei</i>	nd
83123	+	-	<i>Lb casei/paracasei</i>	<i>Lb casei/paracasei/rhamnosus</i> 97%	<i>Lb paracasei</i>	<i>Lb paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 99.5% / <i>L paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> 99,2%
83124	+	-	<i>Lb casei/paracasei</i>	<i>Lb casei/paracasei/rhamnosus</i> 99%	<i>Lb paracasei</i>	nd
8339	+	-	<i>Lb casei/paracasei</i>	<i>Lb casei, paracasei, rhamnosus</i> 100%	<i>Lb paracasei</i>	<i>Lb paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 100%

Los resultados obtenidos mediante SDS-PAGE, secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S y rep PCR (GTG 5') nos permitieron determinar que estos microorganismos pertenecen al grupo *Lb casei*, no obstante, no se pudo determinar de manera inequívoca si los aislados son *Lb casei* o *Lb paracasei*. Estas dos especies están íntimamente relacionadas y aún existe controversia sobre la clasificación taxonómica de los integrantes de este grupo. Sin embargo, Naser *et al* (2007), mostró que la secuenciación del gen que codifica para la pheS es una metodología que presenta un alto poder discriminatorio entre los microorganismos de este grupo. Por lo tanto,

y en base a los resultados obtenidos por esta metodología los aislados fueron identificados como *Lb paracasei*.

Grupos II y III

El grupo II de morfología de colonia está constituido por los microorganismos CIDCA 83101, CIDCA 8381 y 83125 y el grupo III está formado por CIDCA 8385, CIDCA 83102 y CIDCA 830111. Ambos grupos resultaron diferentes en su morfología de colonia pero similares en los demás resultados obtenidos; debido a esto fueron analizados conjuntamente.

Estos microorganismos son Gram positivos, catalasa negativos, producen gas a partir de glucosa y no tienen la capacidad para crecer en leche.

Los perfiles de proteínas de los aislados, analizado mediante SDS-PAGE, mostraron el porcentaje de similitud más elevado con la cepa de referencia *Lb kefir*. Excepto el perfil proteico del aislado CIDCA 830111 que presento mayor similitud con la cepa *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* de referencia.

Los resultados de secuenciación del ARNr 16S mostraron que los microorganismos CIDCA 8385, CIDCA 83102, CIDCA 830111, CIDCA 83101 y CIDCA 8381 tienen altos porcentajes de similitud con *Lb kefir* y el aislado CIDCA 83125 tiene una similitud del 100% con *Lb parakefir*.

Los resultados de rep-PCR(GTG)₅' mostraron que los microorganismos CIDCA 8385, CIDCA 83102, CIDCA 830111 y CIDCA 8381 agruparon con varias cepas de *Lb kefir* presente en la base de datos de LMU-Gent. En cuanto a los microorganismos CIDCA 83125 y CIDCA 83101 agruparon con *Lb parakefir* de la misma base de datos.

Los resultados de la secuenciación del gen que codifica para la pheS mostró una similitud de 100% entre el aislado CIDCA 83101 y *Lb parakefir*

y el mismo porcentaje de similitud entre los microorganismos CIDCA 8381 y CIDCA 8385 y *Lb kefir* (Tabla 9).

Tabla 9: Crecimiento en leche, producción de gas a partir de glucosa e identificación de los aislados CIDCA 83125, CIDCA 8381, CIDCA 83101, CIDCA 8385, CIDCA 83102, CIDCA 83011 pertenecientes al grupo **Grupo II y III** de morfología de colonia mediante perfil de proteínas por SDS-PAGE, rep PCR (GTG)5' y secuenciación de los genes que codifican para el ARNr 16S y pheS .

Aislado	Crecimiento en leche	Gas de glucosa	SDS-PAGE	Secuenciación ARNr 16S	rep PCR (GTG) 5'	pheS
83125	-	+	<i>Lb kefir</i>	<i>Lb parakefir</i> 100%	<i>Lb parakefir</i>	nd
8381	-	+	<i>Lb kefir</i>	<i>Lb buchneri/sunkii</i> / <i>kefir</i> 100%	<i>Lb kefir</i>	<i>Lb kefir</i> 100%
83101	-	+	<i>Lb kefir</i>	<i>Lb buchneri/sunki/kefir/otakiensis</i> 100%	<i>Lb parakefir</i>	<i>Lb parakefir</i> 100%
8385	-	+	<i>Lb kefir</i>	<i>Lb buchneri/sunkii</i> / <i>kefir</i> 100%	<i>Lb kefir</i>	<i>Lb kefir</i> 100%
83102	-	+	<i>Lb kefir</i>	<i>Lb buchneri/sunkii</i> / <i>kefir/ otakiensis</i> 96 %	<i>Lb kefir</i>	nd
830111	-	+	<i>Lb kefir</i> <i>kefir</i> <i>anofaciens</i> subsp <i>kefir</i> <i>anofaciens</i>	<i>Lb buchneri/sunkii</i> / <i>kefir/ otakiensis</i> 98%	<i>Lb kefir</i>	nd

En trabajos previos ya se había aislado cepas de *Lactobacillus kefir* y de *Lactobacillus parakefir* a partir de gránulos de kefir. La identificación de estos microorganismos se llevó a cabo teniendo en cuenta la fermentación de azúcares, crecimiento a 15 y 45 °C, la producción de gas de glucosa y su perfil de proteínas de célula entera (Garrote *et al.*, 2001), espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (Bosch *et al.*, 2006) y análisis de perfiles de enzimas de restricción de amplicones del ADNr 16 S y *Random*

Amplified Polymorphic ADN (RAPD-PCR) (Delfederico *et al.*, 2005). Esta última metodología permitió discriminar a *Lb kefir* inclusive a nivel de cepas utilizó análisis mediante para diferenciar microorganismos de *Lb kefir* (Delfederico *et al.*, 2005).

Sin embargo, no se han encontrado datos de la aplicación de las metodologías usadas en este trabajo para la diferenciación entre *Lb kefir* y *Lb parakefir*.

Para la identificación de *Lb kefir* y *Lb parakefir* mediante pruebas bioquímicas y FTIR fue necesario discriminar previamente a los microorganismos en homofermentativos y heterofermentativos. Cabe señalar que por los métodos planteados en el presente trabajo de tesis no fue necesario discriminar previamente a los microorganismos por su capacidad de producir gas de glucosa para poder agruparlos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por los distintos métodos los aislados CIDCA 8381, CIDCA 8385 y CIDCA 83102 fueron identificados como *Lb kefir* con todas las metodologías empleadas, por lo tanto fueron identificados como tales. Los aislados CIDCA 83101 y CIDCA 83125 mostraron resultados diferentes según la metodología utilizada por lo tanto fueron definidos como miembros del grupo *Lb buchneri*. El aislado CIDCA 830111 fue identificado como *Lactobacillus kefir*, descartándose los resultados obtenidos por SDS-PAGE debido a que produce gas a partir de glucosa.

Grupos IV y V

Los microorganismos constituyentes de estos grupos son: CIDCA 83118, CIDCA 83119, CIDCA 83122, CIDCA 83211, CIDCA 83212, CIDCA 83310, CIDCA 83311, CIDCA 8352, CIDCA 8361, CIDCA 8371, CIDCA 83103. Todos son bacilos Gram positivos, no productores de gas a partir de glucosa y con capacidad de crecer en leche, excepto el aislado CIDCA 8361 (Tabla 10).

La secuenciación de la región V3 del ARNr 16S de este grupo de microorganismos resulta en porcentajes de similitud superiores al 97 % con *Lb kefiranofaciens* sin diferenciar subespecies. Varios autores concuerdan en que ambas subespecies poseen una semejanza en la secuencia del ADNr 16S del 100% (Vancanneyt *et al.*, 2004; Ninane *et al.*, 2007). Por lo tanto esta metodología nos permite diferenciar a este grupo de microorganismos de otras especies pero no es posible diferenciar las subespecies a las que pertenecen. Los mismos resultados se encuentran mediante el estudio de la secuencia de la porción α de la pheS.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de los perfiles encontrados por rep-PCR (GTG)_{5'} no permitieron diferenciar ambas subsp de *Lb kefiranofaciens*. Los aislados CIDCA 83119, CIDCA 83311 y CIDCA 83122 mostraron un bajo número de bandas en sus perfiles con esta metodología, por tal razón los resultados obtenidos para estos microorganismos fueron descartados en el análisis.

El análisis numérico de los perfiles de proteínas totales mostró que estos aislados presentaron los mayores porcentajes de homología con *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* (superiores al 90 %) y porcentajes menores con *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* (inferiores al 80%). Vancanneyt *et al.* (2004), también utilizó esta metodología para diferenciar ambas subespecies de *Lb kefiranofaciens* obteniendo resultados positivos.

Tabla 10: Crecimiento en leche, producción de gas a partir de glucosa e identificación de los aislados CIDCA 83118, CIDCA 83119, CIDCA 83122, CIDCA 83211, CIDCA 83212, CIDCA 83310, CIDCA 83311, CIDCA 8352, CIDCA 8361, CIDCA 8371, CIDCA 83103 pertenecientes a los grupos **Grupo IV y V** de morfología de colonia mediante perfil de proteínas por SDS-PAGE, rep PCR (GTG)5' y secuenciación de los genes que codifican para el ARNr 16S y pheS.

Aislado	Crecimiento en leche	Gas de glucosa	SDS-PAGE	Secuenciación ARNr 16S	rep PCR (GTG) 5'	pheS
83118	+	-	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp.	<i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100%	<i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i>	<i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100%
83119	+	-	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp.	<i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> 98%	-	<i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100%
83122	+	-	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp.	<i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100%	-	<i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/Kefirgranum</i> 100%
83212	+	-	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp.	<i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> 97%	<i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i>	<i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens</i> 100%
83310	+	-	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp.	<i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100%	<i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i>	<i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100%
83211	+	-	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp.	--	<i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i>	nd
83311	+	-	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp.	<i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100%	--	<i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/Kefirgranum</i> 100%

8352	+	-	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens/kefirgranum</i> 99%	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens/kefirgranum</i>	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100%
8361	-	-	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens/kefirgranum</i> 97%	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens/kefirgranum</i>	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100%
8371	+	-	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens/kefirgranum</i> 97%	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens/kefirgranum</i>	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100%
83103	-	-	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100%	nd	nd

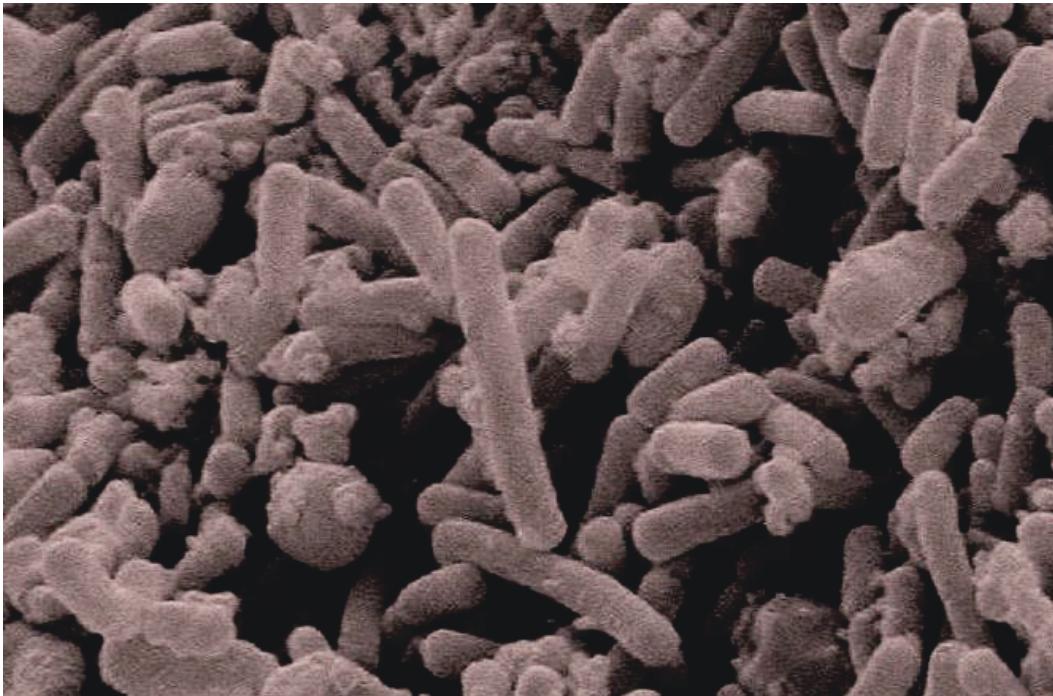
Por lo tanto los resultados de la diferenciación genotípica mediante rep PCR (GTG)^{5'}, secuenciación de la región V3 del ARNr 16S y secuenciación de la porción α de la pheS de este grupo de microorganismos nos permite decir que los 11 aislados corresponden a la especie *Lb kefiranofaciens* y la diferenciación fenotípica, mediante el perfil de proteínas, nos permite diferenciarlos a nivel subespecie, resultando que todos los microorganismos aislados pertenecen a la subespecie *kefiranofaciens*.

Conclusiones

- La composición microbiológica, analizada mediante metodologías independientes de cultivo, de los 9 gránulos de kefir de la colección CIDCA resultó diferente.
- El estudio de las comunidades bacterianas mediante DGGE permite inferir que hay un porcentaje de la comunidad microbiana que está presente en todos los gránulos pero ninguna de las poblaciones es idéntica entre sí.
- La clonación y secuenciación de las bandas presentes en el gel permitió determinar la presencia de *Lb kefiranofaciens* (subsp. *kefirgranum* y subsp. *kefiranofaciens*), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* o subsp. *cremoris*, *Lactobacillus kefir*, *Lb parakefir* existiendo otros *Lactobacillus sp* sin diferenciar especie en los gránulos de kefir estudiados.
- Algunos microorganismos encontrados por métodos dependientes del cultivo no están representados en los perfiles DGGE de los gránulos.
- Las bandas cuyas secuencias presentaron alta homología con *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* y/o *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp *kefirgranum* se detectaron en todos los gránulos estudiados.

- Teniendo en cuenta resultados anteriores obtenidos por métodos dependientes de cultivo y los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se puede decir que en los gránulos de kefir de la colección CIDCA están presentes los microorganismos *Lb plantarum*, *Lb kefir*, *Lb parakefir*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y subsp. *diacetylactis*, *Acetobacter*, *Leuconostoc mesenteroide* y *Lb kefiranofaciens*.
- Este método permitió confirmar la presencia de microorganismos de difícil crecimiento o bien no cultivables en condiciones de laboratorio.
- Aplicando las metodologías de aislamiento que incluyen la solubilización del gránulo en agua templada y el uso de medios selectivos se obtuvieron 22 lactobacilos Gram +, catalasa – que se pudieron agrupar de acuerdo a la morfología de colonia en 5 grupos.
- La identificación de los aislados mediante la evaluación de la producción de gas a partir de glucosa, perfil de proteínas de célula entera glucosa, rep PCR(GTG)5' y la secuenciación del gen de la pheS permitió identificar a los 22 lactobacilos.
- De los 22 microorganismos aislados en este trabajo de tesis 11 resultaron ser *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens*, 5 *Lactobacillus paracasei*, 4 *Lactobacillus kefir* y 2 resultaron pertenecientes al grupo *Lactobacillus buchneri*.
- Las metodologías utilizadas en este trabajo resultaron satisfactorias para el aislamiento de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* de gránulos de kefir de la colección CIDCA

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 representan 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.

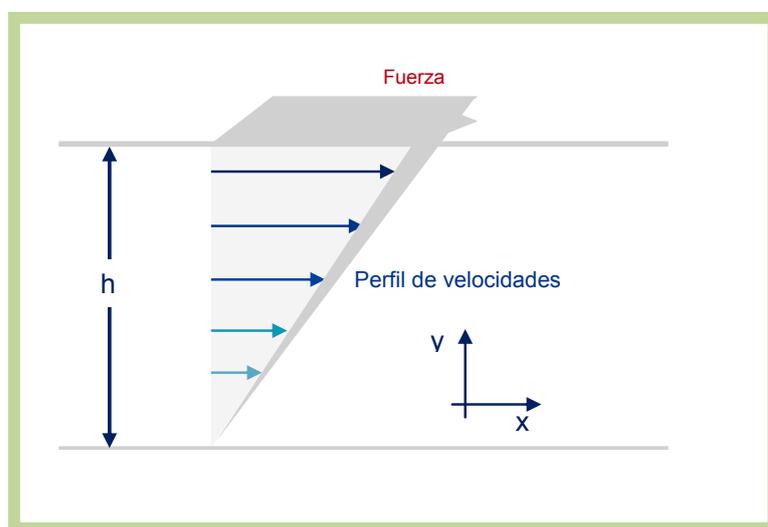


Figura 1: Representación de movimiento de un fluido entre una placa fija y una móvil en los viscosímetros rotacionales.

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.

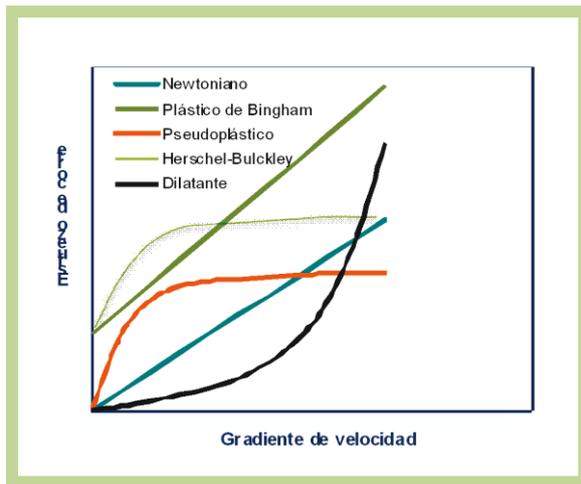


Figura 3: Esquema de comportamientos de flujo posibles para fluidos newtonianos y no newtonianos (Pseudoplástico, Dilatante, Herschel Bulkley y Plástico de Bingham).

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.

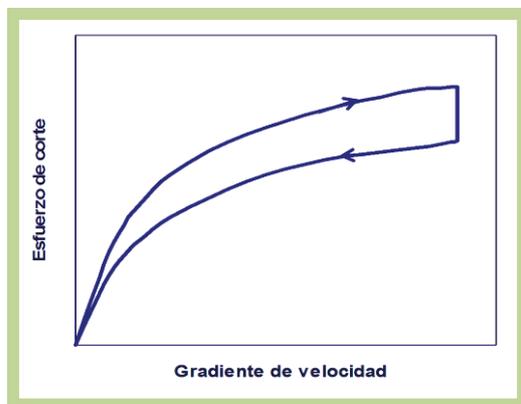


Figura 4: Comportamiento de un fluido pseudoplástico tixotrópico.

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.

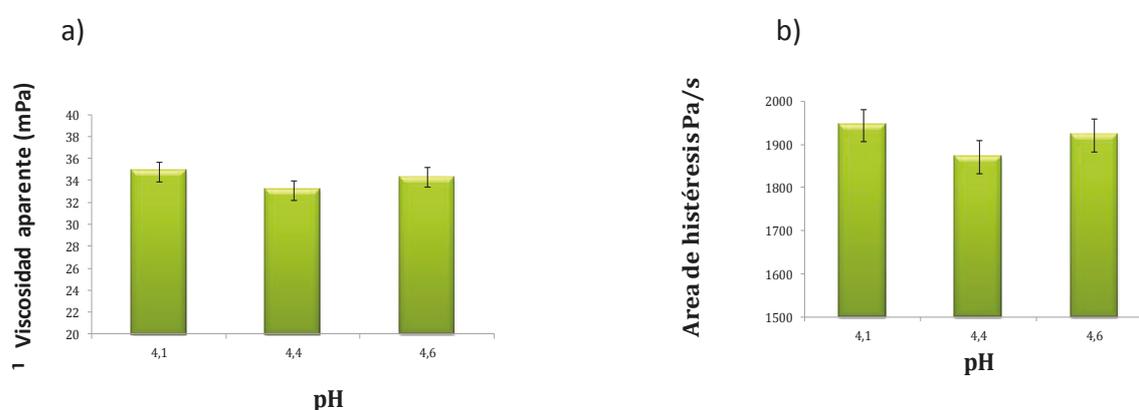


Figura 5: Viscosidad Aparente a 300 s^{-1} (a), y área de histéresis (b) evaluadas a 25°C en función del pH final de la fermentación para la leche fermentada por *Lb plantarum* CIDCA 8312.

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).

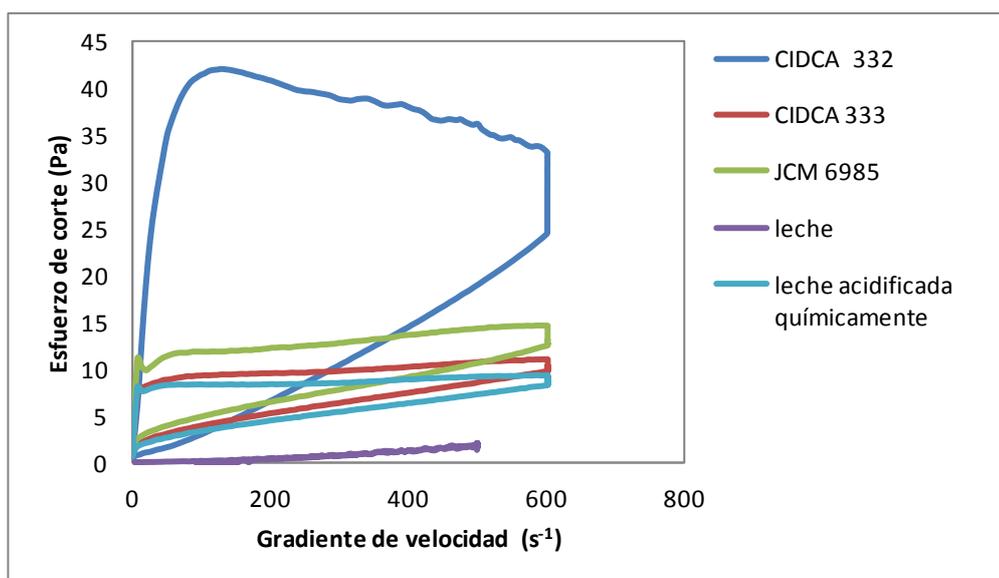


Figura 6: Curvas de flujo a 25°C de leche, leche acidificada y de leches fermentadas con *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 332, *Lb delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 333 y *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* JCM 6985.

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 \pm 4,6	1441,4 \pm 132,7
CIDCA 8211	4,1	12,1 \pm 1,0	284,5 \pm 12,1
CIDCA 8212	4,6	16,1 \pm 1,1	380,6 \pm 13,1
CIDCA 8213	4,2	18,3 \pm 1,1	509,9 \pm 20,1
CIDCA 8224	4,1	20,8 \pm 1,2	626,3 \pm 41,2
CIDCA 8225	4,0	19,6 \pm 0,9	596,6 \pm 32,6
CIDCA 8226	3,9	18,1 \pm 1,1	522,9 \pm 29,4
CIDCA 8229	4,4	23,1 \pm 1,3	1219 \pm 99,9
CIDCA 8231	4,2	20,8 \pm 0,8	656,6 \pm 44,1
CIDCA 8232	4,3	18,4 \pm 1,1	547,6 \pm 33,9
CIDCA 8233	4,0	20,4 \pm 1,4	578,2 \pm 45,9
CIDCA 8242	4,3	20,3 \pm 2,1	707,3 \pm 51,1
CIDCA 8243	4,3	15,9 \pm 1,1	460,5 \pm 22,5
CIDCA 8244	4,0	23,8 \pm 1,1	633,7 \pm 49,8
CIDCA 8245	4,3	15,5 \pm 1,9	398,3 \pm 33,5
CIDCA 8247	4,1	18,8 \pm 1,5	304,9 \pm 29,2
CIDCA 8248	4,0	25,5 \pm 1,2	1544 \pm 110,1
CIDCA 82212	4,5	16,8 \pm 2,1	424,5 \pm 29,2
CIDCA 82210	4,3	17,7 \pm 1,1	521,9 \pm 44,8
CIDCA 8221	4,2	16,1 \pm 1,6	374 \pm 22,1
CIDCA 8223	4,2	21,1 \pm 2,3	660,6 \pm 55,2
CIDCA 8241	4,3	21,1 \pm 2,6	595,9 \pm 44,9
CIDCA 8222	4,4	17,8 \pm 1,9	511,0 \pm 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.

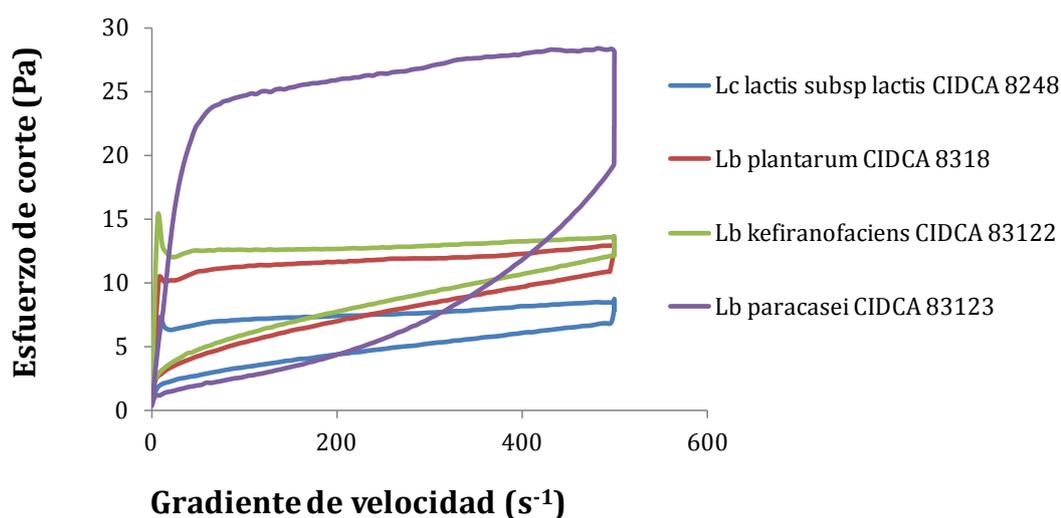


Figura 7: Curvas de flujo de las leches fermentadas con los microorganismos *Lc lactis* subsp. *lactis* CIDCA 8248, *Lb plantarum* CIDCA 8318, *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* CIDCA 83122 y *Lb paracasei* CIDCA 83123 evaluadas a 25°C.

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.

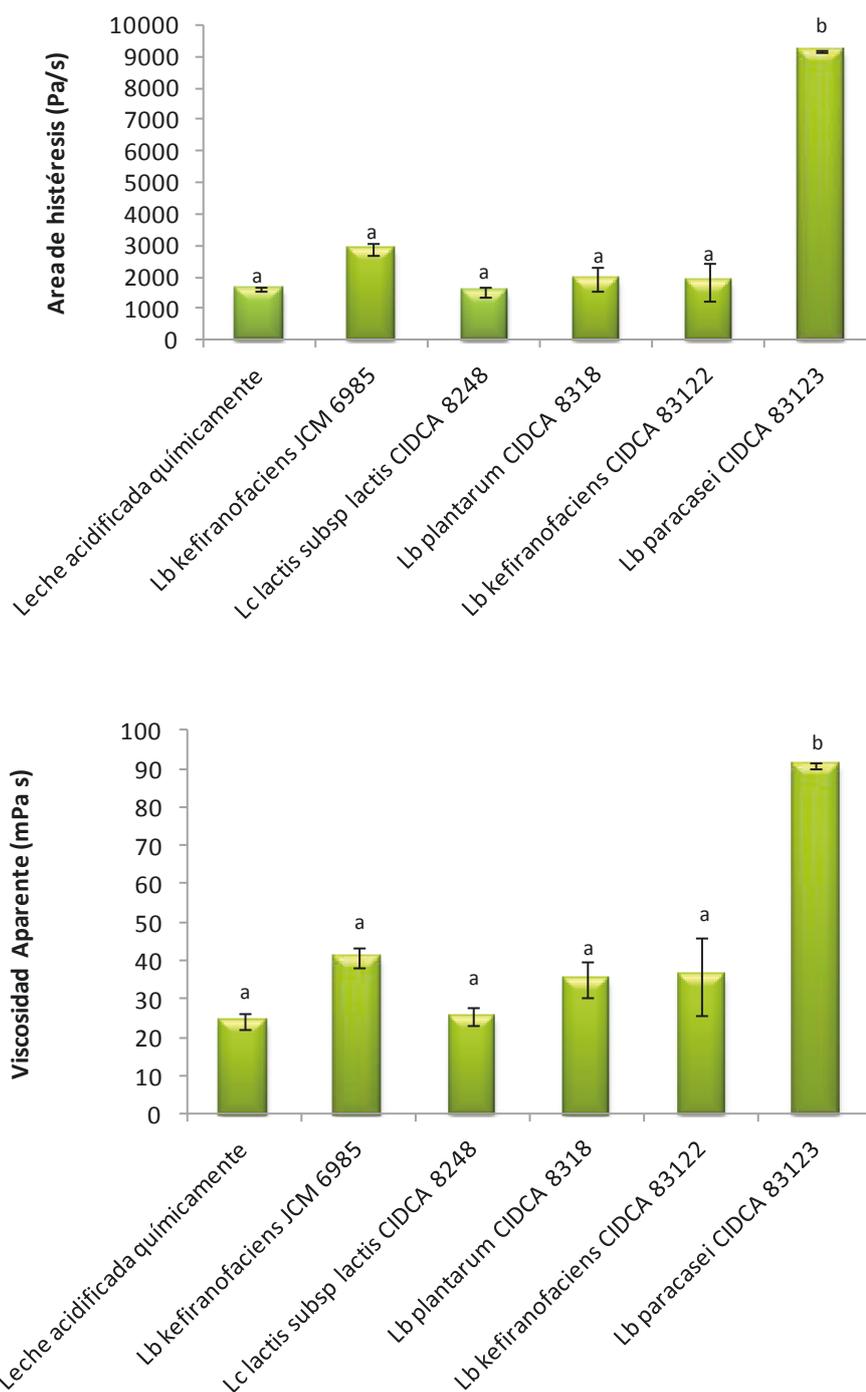


Figura 8: Viscosidad aparente (mPa.s) (a) evaluada a 300 s^{-1} y Área de histéresis (Pa/s) (b) de la leche acidificada con δ -gluconolactona y las leches fermentadas con *Lc lactis* subsp *lactis* CIDCA 8248, *Lb plantarum* 8318, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* 83122, *Lb paracasei* 83123,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

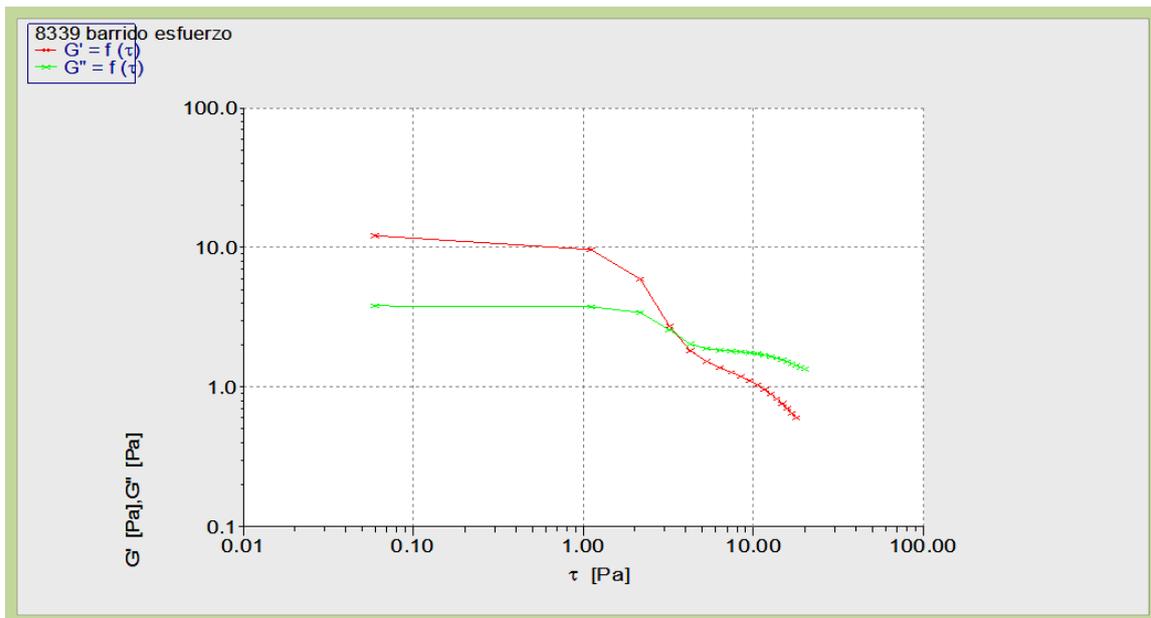


Figura 9: Barrido de esfuerzo de la leche fermentada con la cepa *Lb paracasei* CIDCA 8339 a 25°C.

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.

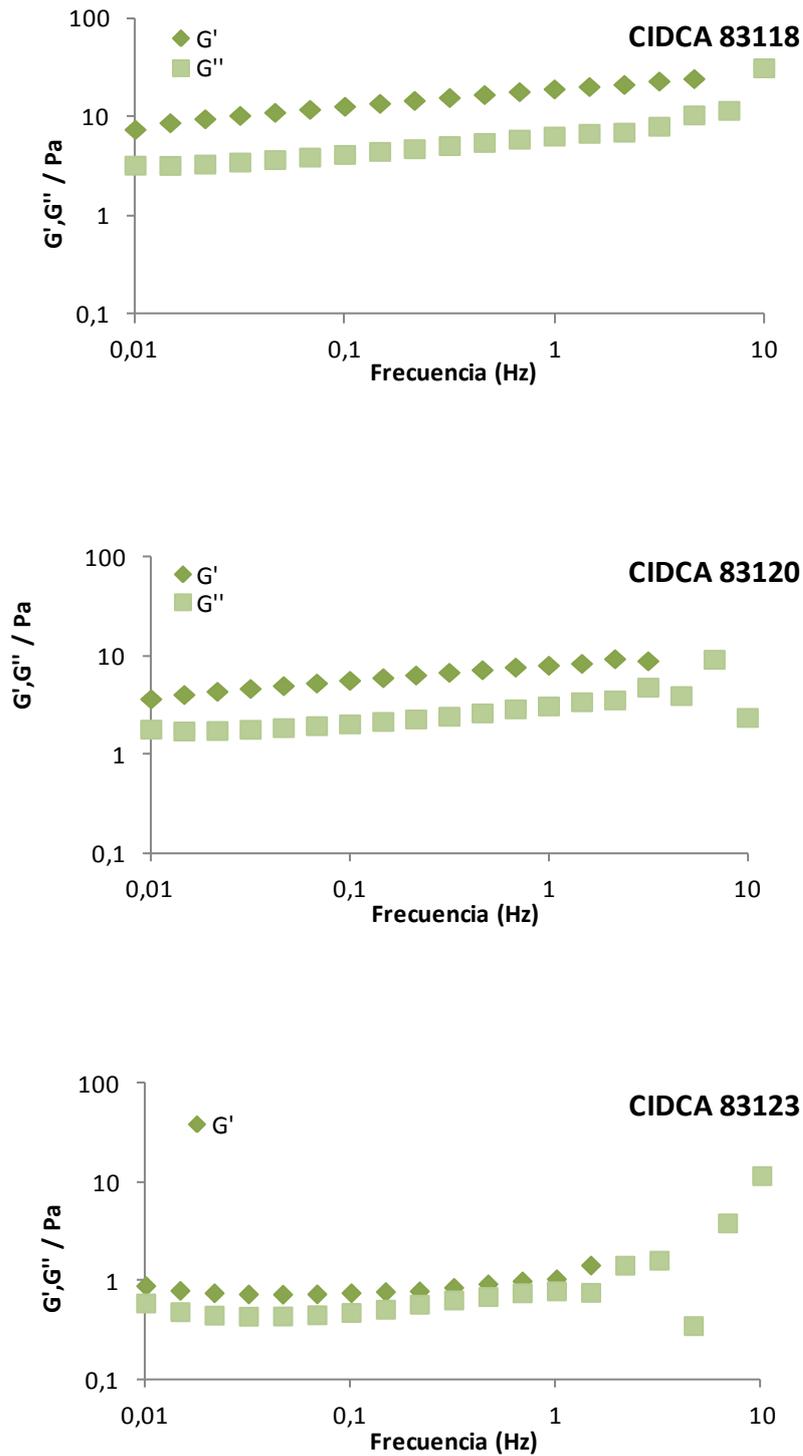


Figura 10: Espectro mecánico (módulos elástico y viscoso en función de la frecuencia) correspondiente a leche fermentada con la cepa de *Lb kefirifaciens* subsp. *kefirifaciens* CIDCA 83118, y *Lb paracasei* CIDCA 83120 y CIDCA 83123 efectuado a un esfuerzo fijo de 0,5 Pa y 25°C.

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 encontradas 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.

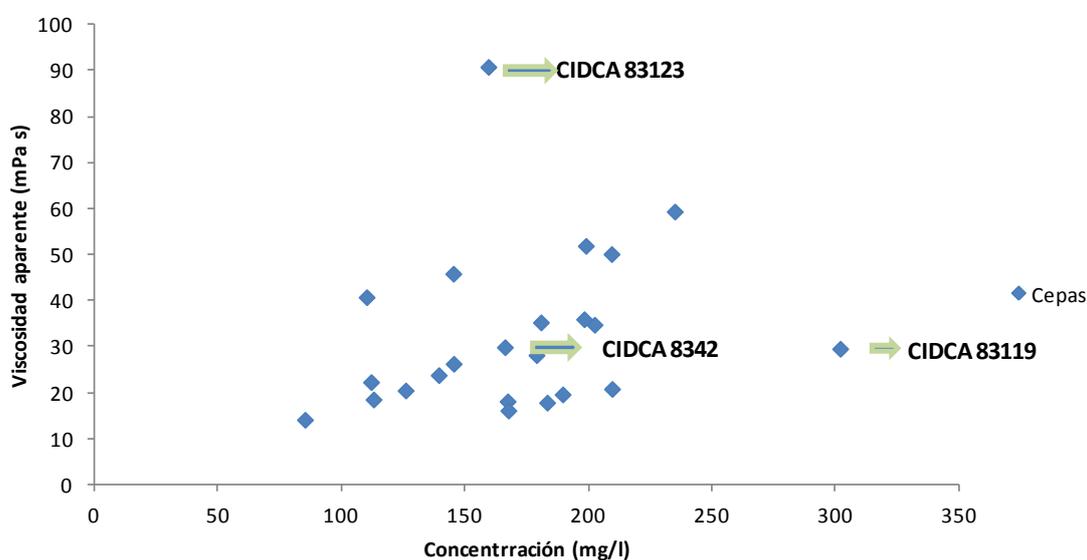


Figura 11: Viscosidad aparente medida a 300 s⁻¹ de leches fermentadas en función de la concentración de polisacárido.

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).

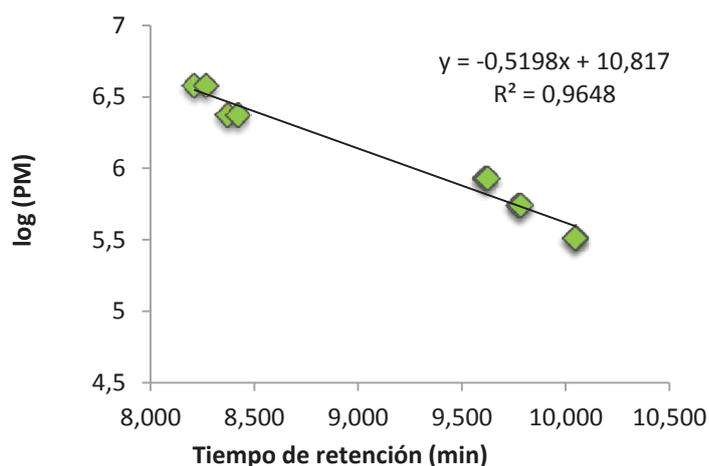


Figura 12: Valores experimentales y recta de regresión correspondiente a los logaritmos de los pesos moleculares de los patrones de dextranos en función del tiempo de retención, medidos por HPLC de permeación en gel.

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.

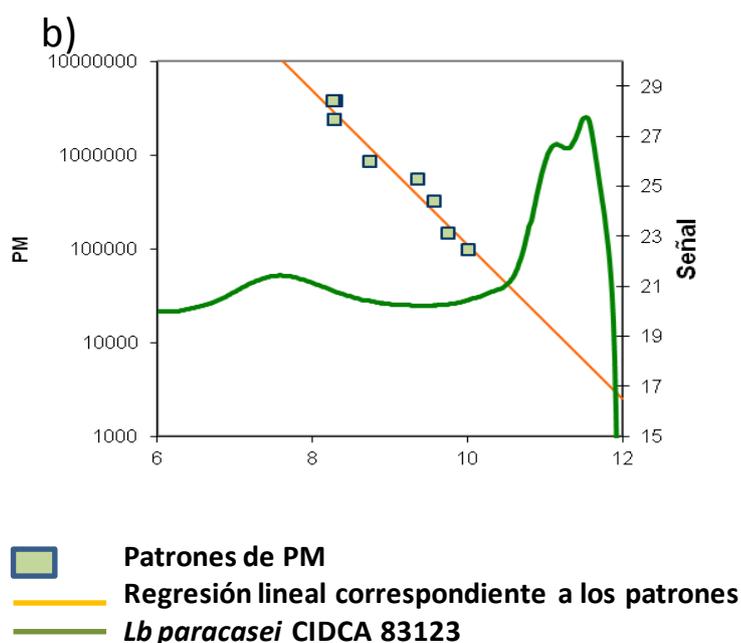
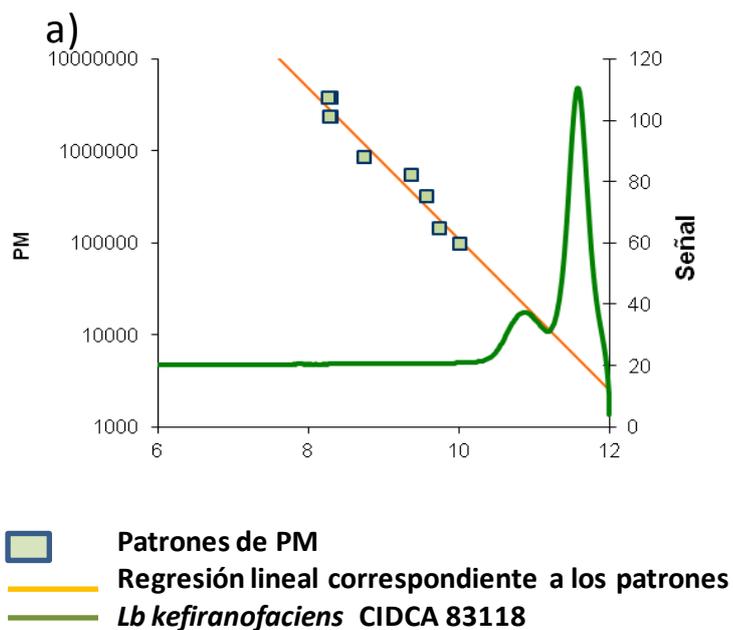


Figura 13: Cromatogramas obtenidos para soluciones de polisacáridos aislados de *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* CIDCA 83118 (a) y *Lb paracasei* CIDCA 83123 (b). Señal (en unidades arbitrarias) y peso molecular de los dextranos (Da) en función del tiempo de retención en la columna (minutos).

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.

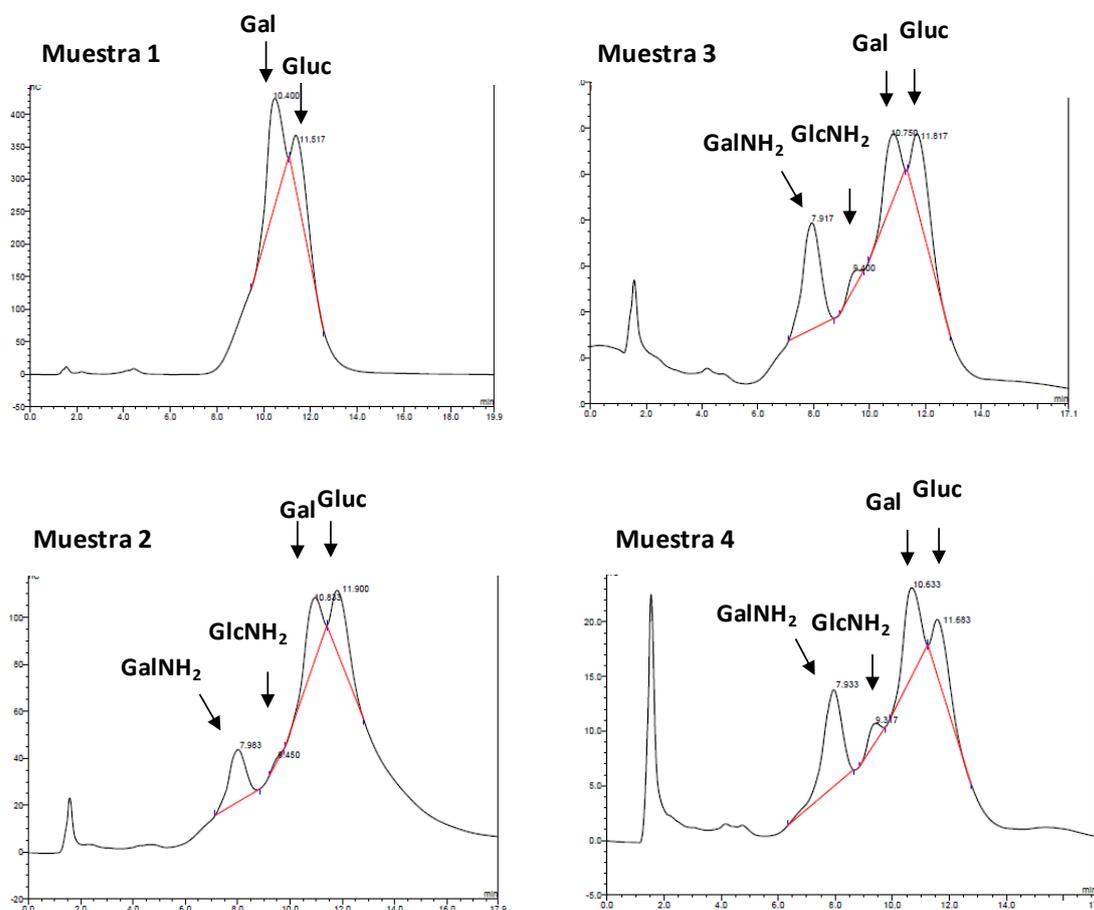


Figura 14: Perfiles cromatográficos obtenidos por cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico utilizando un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) en un equipo Dionex DX-300 de las muestras hidrolizadas de los polisacáridos. Muestra 1: kefiran; Muestra 2: polisacárido extraído de *Lb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

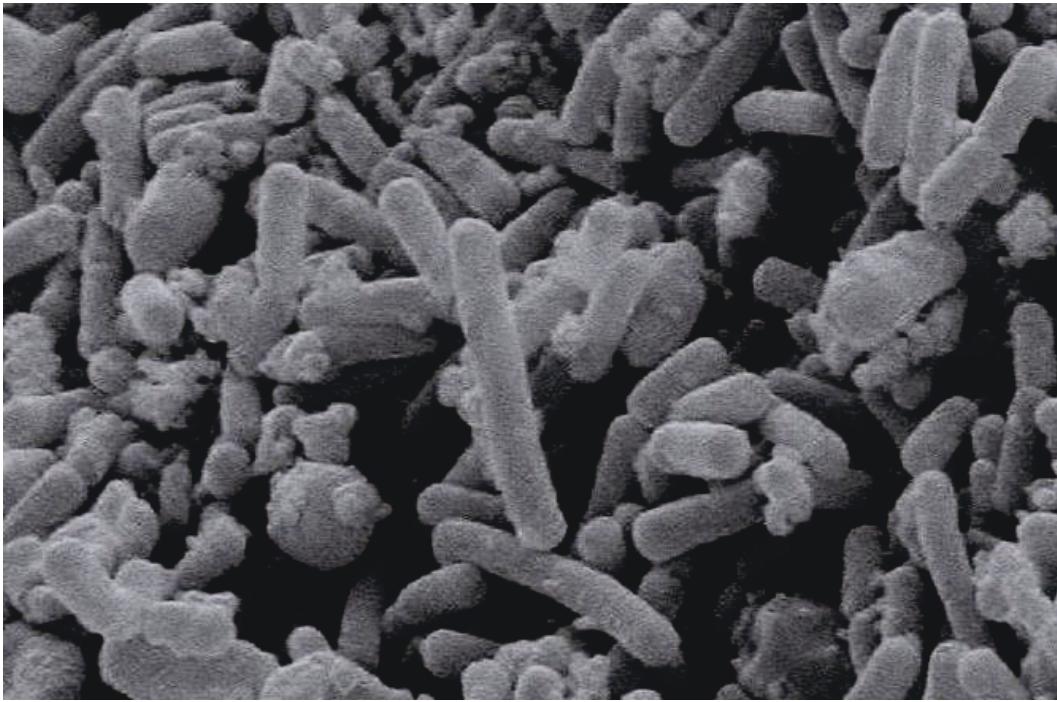
Conclusiones

- 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.

Capítulo 3: Efecto de polisacáridos bacterianos sobre el balance de la microbiota intestinal de ratones.



Introducción

1.- Composición de la microbiota intestinal humana

El tracto gastrointestinal humano (Figura 1) está formado por una serie de órganos que se encuentran colonizados en distinta medida por una colección compleja de microorganismos, a ésta se la denomina microbiota y es específica para cada individuo.

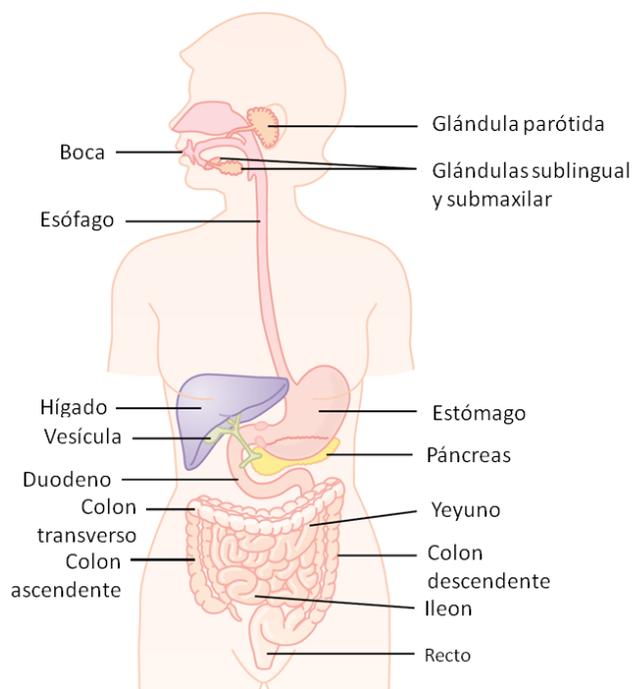


Figura 1: Esquema del tracto gastrointestinal humano.

La cantidad y composición de las bacterias varían mucho a lo largo del tracto gastrointestinal humano. El estómago y el intestino delgado contienen un bajo número de especies bacterianas adheridas al epitelio y algunas otras en tránsito (un máximo de 10^4 microorganismos por mililitro de contenido gástrico o intestinal (Tannock, 1995). La escases de bacterias en el tracto

superior se debe a la composición del medio luminal (ácido, bilis y secreción pancreática) y a la actividad propulsiva motora que impide la colonización estable de bacterias en el lumen. En contraste, el intestino grueso es el ecosistema microbiano más intensamente poblado, alberga cientos de especies (Guarner & Malagelada, 2003) con un contenido total de entre 10^{11} y 10^{12} bacterias por gramo (Simon & Gorbach, 1984).

La variabilidad y diversidad de este ecosistema bacteriano dificulta su estudio. Los géneros típicamente encontrados en la microbiota intestinal humana son *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* y *Clostridium* (Green *et al* 2006), además hay resultados que indican que las bacterias anaerobias superan en número a las aeróbicas en un factor de entre 100-1000. Los géneros, *Bacteroides*, *Eubacterias*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, y *Ruminococcus* son predominantes en el ser humano, y *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Proteus*, etc, son géneros subdominantes (Salminen *et al*, 1998). A su vez, cada individuo posee varios cientos de especies que pertenecen a estos géneros, con una combinación particular de especies predominantes específica para cada individuo.

1.2.- Función de la microbiota intestinal.

El intestino actúa como interface entre la alimentación y todas las demás funciones del organismo.

El desarrollo de la microbiota intestinal proporciona las bases para el mantenimiento de la barrera intestinal, que impide que las bacterias patógenas invadan el tracto gastrointestinal, pasen a la sangre que por él circula, y por ende se distribuyan por el organismo. El equilibrio de la microbiota intestinal, junto con el sistema inmunitario del propio intestino es fundamental para que

las bacterias residentes cumplan una función protectora, en especial contra la proliferación de agentes patógenos (ILCI).

Además, cumple funciones metabólicas fermentando algunos sustratos provenientes de la dieta (hidratos de carbono, proteínas) que no fueron digeridos en el intestino delgado, y se encuentran disponibles para la fermentación por la microbiota colónica o provenientes de fuentes endógenas tales como mucinas (glicoproteína mayoritaria componente de la mucosa que recubre la pared del tracto gastrointestinal) (Rowland *et al.*, 1985). Los carbohidratos exógenos complejos que pueden servir como sustrato fermentables por los microorganismos intestinales se detallan en la Tabla 1 (Tannock, 1995)

Tabla 1: Carbohidratos complejos presentes en el colón humano (Tannock, 1995).

Fuente	Tipo de hidrato de carbono
Material estructural de plantas	Celulosa Laminarina Xilanos Arabinogalactanos Pectinas
Aditivos alimenticios	Goma Guar Goma arábica Alginatos
Vegetales, harinas	Amilosa Amilopectinas
Células	Mucopolisacáridos
Mucus	Mucinas

En un adulto típico, aproximadamente 80 g del total de alimentos consumidos por día se encuentra disponible para ser fermentado por la microbiota intestinal. Los dos tipos de fermentación que se llevan a cabo en el intestino son sacarolítica y proteolítica. Se considera que una microbiota equilibrada debe contener un mayor número de microorganismos sacarolíticos dentro de los que encontramos a bifidobacterias y lactobacilos. Como productos finales de la fermentación sacarolítica se obtienen ácidos grasos de

cadena corta. Estos cumplen una importante función en los colonocitos ya que contribuyen a regular el metabolismo de lípidos y azúcares y disminuyen levemente el pH intestinal lo que contribuye a la exclusión de patógenos (Ruas-Madiedo *et al.*, 2007). La fermentación proteolítica genera además componentes fenólicos, aminos, amonio, que resultan tóxicos para el individuo (Scantlebury *et al.*, 2004). Otras funciones metabólicas son las de síntesis de vitaminas (Hill, 1997) y absorción de iones como calcio, hierro y magnesio (Roberfroid *et al.*, 1995).

Finalmente, la microbiota colónica influye sobre las características de las heces, tales como el peso, la consistencia, la frecuencia y el tiempo de tránsito intestinal total, propiedades que son quizá los marcadores más fiables de la función colónica en general (ILCI).

1.3.- Componentes benéficos de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal influye en el estado fisiológico, bioquímico e inmunológico de los animales, incluidos los humanos. Por lo tanto, modificaciones en la actividad bacteriana intestinal podría promover el estado general de salud en humanos o bien ser usado para la profilaxis o tratamiento de enfermedades específicas (Snart *et al.*, 2006).

En el intestino, ciertas bacterias están asociadas a la formación de toxinas y resultan patogénicas cuando son dominantes, o bien están relacionadas a la formación de moléculas carcinogénicas. Estas especies potencialmente dañinas están asociadas a grupos tales como clostridios y bacteroides. Otra parte de la población bacteriana intestinal es considerada microbiota potencialmente promotoras de la salud. Este concepto se basa en que no contienen agentes patógenos conocidos, no producen toxinas, producen defensinas, sintetizan vitaminas y son bacterias fermentadoras de hidratos de carbono cuyos productos finales mayoritarios de la fermentación son ácidos

grasos de cadena corta (AGCC) (especialmente, acetato, propionato y butirato los cuales pueden ser metabolizados para proveer de energía al huésped). Estos microorganismos pueden también inhibir a patógenos a través de múltiples mecanismos por ejemplo compitiendo con los patógenos por sitios receptores en la pared del intestino o bien por los nutrientes. Además, la pared celular de los microorganismos potencialmente benéficos está desprovista de mediadores inflamatorios (Especialmente Gram positivas), (Cummings *et al.*, 2004, Roberfroid *et al.*, 2010). Dentro de esta población encontramos principalmente a bifidobacterias y lactobacilos.

Los efectos de los lactobacilos en la salud humana incluyen la capacidad de mejorar la digestión de la lactosa en individuos intolerantes a la lactosa, reducir la constipación y la diarrea infantil, ayudar en infecciones resistentes como salmonelosis, prevenir la diarrea del viajero, y ayudar en el síndrome de colon irritable (Salminen *et al.*, 1998). En cuanto a las bifidobacterias, tienen la capacidad de estimular el sistema inmune, producir vitamina B, inhibir el crecimiento de patógenos, reducir el nivel de amonio y colesterol en sangre, y ayudar a restablecer la flora intestinal luego de un tratamiento con antibióticos (Gibson & Roberfroid, 1995).

1.4.- El concepto de prebiótico

Yazawa *et al* (1978) y Mitsuoka *et al* (1987) fueron los primeros en demostrar que algunos polisacáridos no digeribles (especialmente fructo-oligosacáridos) eran capaces de ser fermentados por bifidobacterias y producían el aumento del volumen de las heces humanas luego de ser ingeridos. Estas observaciones fueron estudiadas y confirmadas por Gibson & Roberfroid (1995) quienes introdujeron el concepto de prebiótico. Éste fue evolucionando y en el año 2008, la *International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics* (ISAPP) presentó la siguiente definición: “Un

prebiótico es un componente alimenticio que puede ser fermentado selectivamente, resultando en cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal y produce beneficios en la salud”. Quedando claro que dichos cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal implican una inducción en los efectos fisiológicos benéficos no solo en el colon sino también en todo el organismo y/o una reducción del riesgo de contraer enfermedades intestinales y sistémicas. Estos posibles efectos fueron detallados por Roberfroid *et al.* (2010) e incluyen:

- Mejora y/o estabilización de composición la microbiota intestinal.
- Mejora en las funciones intestinales (consistencia, regularidad y volumen de las heces).
- Aumento en la absorción de minerales y mejora en la salud ósea (contenido de Calcio en huesos, densidad mineral ósea).
- Modulación de la producción de péptidos gastrointestinales, energía metabólica y saciedad.
- Iniciación (luego del nacimiento) y regulación/modulación de las funciones inmunológicas.
- Mejora en las funciones de la barrera intestinal, reducción de metabolitos tóxicos.
- Reducción del riesgo de infecciones intestinales.

Además podrían:

- Reducir el riesgo de obesidad, diabetes tipo 2, síndromes metabólicos, etc.
- Reducir el riesgo en inflamaciones intestinales.
- Reducir el riesgo de contraer cáncer de colon.

1.4.1.-Regulación de la microbiota intestinal por la dieta mediante el uso de prebióticos.

Uno de los factores fundamentales a la hora de controlar la microbiota intestinal es la dieta, por lo tanto, es posible modular su composición a través de los alimentos. Como se mencionó anteriormente, bifidobacterias y lactobacilos son consideradas flora benéfica debido al papel que desempeñan en la microbiota intestinal. Por ésta razón estos grupos de microorganismos suelen ser objeto de intervenciones en la dieta con el objetivo final de mejorar la salud como consecuencia de su proliferación a expensas de bacterias patógenas tales como Bacteroides, clostridia, eubacteria, enterobacteria, enterococci, etc. (Macfarlane *et al.*, 2006).

Esta modulación se puede llevar a cabo mediante la suplementación de la dieta con prebióticos. Tanto oligosacáridos como polisacáridos, pueden ser considerados como candidatos a prebióticos si su estructura química no permite que se absorban en la parte superior del tracto gastrointestinal ni ser hidrolizados por enzimas gástricas, pancreáticas o entéricas humanas. Dentro de los carbohidratos no digeribles podemos encontrar varios compuestos tales como almidones resistentes, polisacáridos de la pared celular de plantas (hemicelulosa), pectinas, gomas y oligosacáridos no digeribles (fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, oligosacáridos de soja, glucooligosacáridos). De éstos solo algunos como Inulina, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOSs) y la lactulosa presente en la leche materna, han sido estudiados en lo referente a sus propiedades prebióticas y se ha demostrado su efecto estimulando el desarrollo de microorganismos benéficos como lactobacilos y bifidobacterias (Gibson *et al.*, 1995; Roberfroid *et al.*, 1998; Kruse *et al.*, 1999; Tuohy *et al.* 2001 a y b; Langlands *et al.*, 2004; Van de Wiele *et al.*, 2004; Macfarlane *et al.*, 2006; Haarman & Knol, 2005; Kolida & Gibson, 2007). La mayor parte de los trabajos están dirigidos a estudiar el efecto

prebiótico de la inulina de distintos grados de polimerización (Roberfroid *et al.*, 1997). Snart *et al.*, (2006) han demostrado que el consumo de β -glucanos proveniente de granos de cebada aumenta el contenido de lactobacilos en la microbiota intestinal de ratas alimentadas con una dieta suplementada con este polímero. Biedrzycka *et al.* (2004) muestra el efecto bifidogénico de fructanos, haciendo incapié en la influencia del grado de polimerización sobre el efecto que producen. Así, fructooligosacáridos de cadena corta y oligofructosas producen mayor efecto en relación a lo observado en inulina de alto grado de polimerización. Se han incorporado a la lista de sustancias prebióticas los componentes de bajo peso molecular del β -glucano (Snart *et al.*, 2006) y la rafinosa (Dinoto *et al.*, 2006 a y b). Van Loo *et al.* (1999) han recopilado información sobre el efecto de oligosacáridos no digeribles sobre la flora intestinal y el hábitat del intestino indicando que existen evidencias que permiten decir que algunos oligosacáridos afectan la absorción de minerales y el metabolismo lipídico y que el producto final del metabolismo de bacterias puede jugar un rol en la prevención del cáncer de colon ya sea directamente o modulando la flora intestinal.

1.4.2.- Exopolisacáridos de bacterias lácticas como prebióticos

Varios trabajos indican que la capacidad de los EPS bacterianos para ser degradados por la microbiota intestinal depende de la estructura y tipo de uniones que estos polímeros presenten. Los EPS producidos por *Lb. rhamnosus* 9595M-RW no son metabolizados por una suspensión de materia fecal de bebé (Cinquin *et al.*, 2006). Del mismo modo, Ruijssennars *et al.* (Ruijssenaars *et al.*, 2000) analizaron la biodegradabilidad de los EPS producidos por varias cepas de BAL pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*, y encontraron que la susceptibilidad de estos biopolímeros a la degradación biológica en una suspensión fecal varía según la cepa que los produce. Dal Bello

et al. (2001) encontraron que los HoPS producidos por *Lactobacillus sanfranciscensis* son metabolizados por la microbiota fecal humana tal como ocurre con inulina, levan o FOS, ampliamente estudiados. Este mismo estudio también se muestra el efecto bifidogénico causado por el HoPS bacteriano y la inulina, pero no con levan y FOS. Korakli *et al.* (2002) demostraron la capacidad del EPS (tipo fructano) producido por *Lactobacillus sanfranciscensis* de ser utilizado como sustrato fermentable *in vitro*. Además, EPS aislados de diferentes bifidobacterias de origen humano pueden actuar como sustrato fermentable para la microbiota intestinal promoviendo un cambio en el perfil de ácidos grasos de cadena corta, y en los perfiles poblacionales de bifidobacterias (Salazar *et al.*, 2008).

Estos resultados sugieren que los EPS bacterianos podrían actuar como sustrato fermentable para la microbiota intestinal, sin embargo son necesarios más estudios que evidencien su potencialidad para ser usado por la flora benéfica y evidencias clínicas de su funcionalidad.

2.-Metodologías para el estudio de la microbiota intestinal

El número total de microorganismos en el tracto intestinal puede ser estimado en 10^{12} bacterias por gramo de contenido intestinal. Cientos de especies bacterianas pueden ser identificadas utilizando métodos tradicionales de cultivo. Sin embargo, el uso de métodos moleculares ha aumentado el conocimiento sobre el número de bacterias en la mucosa y contenido intestinal y sobre la composición de la microbiota intestinal.

Se han utilizado y desarrollado varias metodologías para la valoración de la microbiota intestinal. Estas metodologías pueden ser dependientes o independientes del cultivo de los microorganismos que la componen.

Las metodologías dependientes del cultivo se realizan mediante el cultivo de muestras de materia fecal en medio selectivo (el método clásico

consiste en el cultivo de las muestras fecales en un medio adecuado seguido del aislamiento, caracterización e identificación de los microorganismos) o en medio no selectivo seguido por recuento específico o identificación (Por ejemplo: han sido utilizadas sondas de oligonucleótidos para la identificación y la cuantificación de la microbiota intestinal mediante la hibridación de colonias específicas (Kaufmann *et al.*, 1997; Dore *et al.*, 1998)). La principal desventaja de este tipo de técnicas es que se recuperan solo las especies cultivables en las condiciones de cultivo establecidas, además tienen baja sensibilidad y los ensayos son de larga duración. En relación a esto, Suau *et al.* (1999) mostraron que menos del 25 % de las especies identificadas por métodos moleculares se corresponden con especies conocidas, esto sugiere que la mayoría de las bacterias del intestino grueso no se han descrito todavía y que los métodos clásicos basados en el cultivo de los microorganismos no proporcionan una información precisa sobre de dicha comunidad.

Algunas de las metodologías cualitativa independientes del cultivo permiten evaluar las especies predominantes de la microbiota intestinal. Estas incluyen el uso de oligonucleótidos específicos para PCR, sondas para hibridación, análisis de secuencias de genes amplificados del ARNr 16S, análisis de genes que codifican para el ARNr 16S por DGGE-TGGE, análisis de patrones de fragmentos restricción terminales y oligonucleótidos *arrays*. Se puede destacar que la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante de amplicones del rADN y ARNr 16S fecal es una de las metodologías más importantes para el estudio y monitoreo de comunidades bacterianas en heces (Zoetendal *et al.*, 1998; Zoetendal *et al.*, 2001). Tannock *et al.* (2004) utilizaron PCR-DGGE para estudiar las poblaciones de bifidobacterias en materia fecal de humanos que ingirieron GOS en relación a un grupo control. Ellos enumeraron desventajas en el método tales como el hecho de que es semicuantitativo, difícil de estandarizar, y que no todas las especies resultan representadas en este tipo

de poblaciones complejas. En cuanto a este último inconveniente ellos proponen el uso de oligonucleótidos específicos para especies bacterianas pudiendo así visualizar especies minoritarias. Montesi *et al.* (2005) estudiaron el impacto sobre la microbiota fecal de ratones de la administración oral de prebióticos (FOS) y probióticos mediante PCR-DGGE con oligonucleótidos universales y específicos para bifidobacterias y lactobacilos. Estos autores encontraron una microbiota única para cada ratón y un aumento en el número de bandas de los perfiles electroforéticos del ADN perteneciente al grupo que recibió probióticos en relación al grupo control cuando se analizaron los amplicones obtenidos con oligonucleótidos universales. El uso de oligonucleótidos específicos les permitió detectar un aumento específico del género bifidobacterias en el grupo que recibió prebióticos. Snart *et al.* (2006), estudiaron el efecto de la ingesta de fibras dietarias de distinto origen sobre la microbiota de ratas mediante varias metodologías incluidas PCR-DGGE y destacaron que esta técnica permitió analizar la variabilidad de la flora entre ratones y entre grupos dietarios. Esta metodología es descripta en forma detallada en la introducción del Capítulo 1.

Los métodos cuantitativos independientes del cultivo más ampliamente utilizados son la hibridación fluorescente *in situ* seguido de recuento visual, con analizador de imágenes o mediante citometría de flujo y la PCR en tiempo real.

2.1.-Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)- Citometría de flujo

En la hibridación fluorescente *in situ* se utilizan sondas específicas unidas a fluorocromos que se unen o acoplan a ADN complementario. Las sondas son segmentos de ADN específicos complementarios a la región de interés (Figura 2).

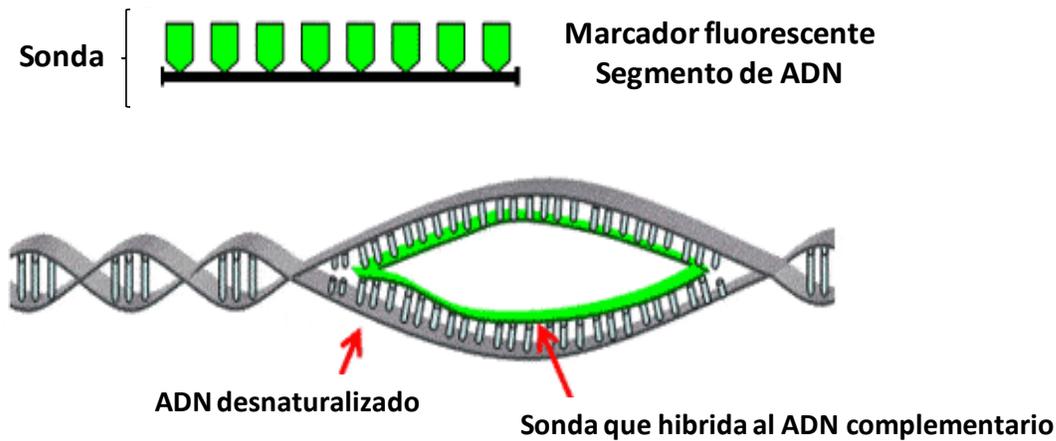


Figura 2: Esquema de la técnica de Hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

La citometría de flujo es una tecnología que permite analizar múltiples características físicas de partículas individuales en suspensión que son impulsadas por presión positiva a pasar a través de un haz de luz. Estas características se determinan usando un equipo que registra cómo las partículas dispersan la luz laser incidente y emiten fluorescencia.

El equipo está constituido por tres sistemas, un sistema de flujo que transporta las partículas en suspensión hacia el láser; un sistema óptico que consiste en un láser que ilumina las partículas que fluyen en la muestra y un filtro que dirige las señales de luz resultantes hacia los detectores apropiados y finalmente, un sistema electrónico que convierte las señales de luz detectadas en señales electrónicas que son procesados por un ordenador.

En la Figura 3 se muestra un esquema del funcionamiento básico de un citómetro de flujo.

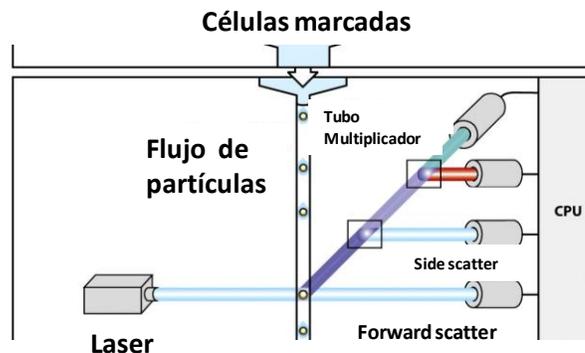


Figura 3: Esquema de un citómetro de flujo (Murphy *et al.*, 2008, *Immunobiology*)

En el citómetro debido al flujo hidrodinámico se genera un ordenamiento de partículas de manera que pasan una a una interceptando el laser produciendo la dispersión de la luz. La luz dispersada hacia delante (*forward scatter*, FSC) es detectada por una lente. La intensidad del FSC está relacionada al tamaño de la partícula y se utiliza para distinguir diferentes tipos de células de restos celulares. La luz dispersada que se detecta en un ángulo de 90° respecto a la excitación se denomina *side scatter* (SSC). El SSC provee información sobre la granularidad o complejidad de una molécula. De esta forma la combinación del FSC y SSC son únicas para cada grupo de partículas y se utilizan para diferenciar células en muestra heterogénea.

Por otro lado, si está presente alguna molécula fluorescente, al ser excitada por el laser, emite fluorescencia. La citometría de flujo usa canales de fluorescencia separadas para detectar la luz emitida permitiendo de acuerdo al equipo, detectar simultáneamente la emisión de fluorescencia a diferentes longitudes de onda. De esta manera analizando la luz dispersada debido a las características propias de la partícula, se seleccionan las poblaciones de trabajo, dentro de la cual uno puede cuantificar aquellas que emiten una fluorescencia específica.

Asociado al equipo se encuentran *sofwards* que permiten separar poblaciones mediante regiones (*gates*), que son características para cada tipo celular (Figura 4a). Si las partículas están marcadas con un solo fluorocromo en general se utilizan gráficos tipo histogramas (Figura 4b). Cuando se utiliza más de un colorante la información se maneja con *dot plots* graficando en cada eje un fluorocromo (Figura 4c).

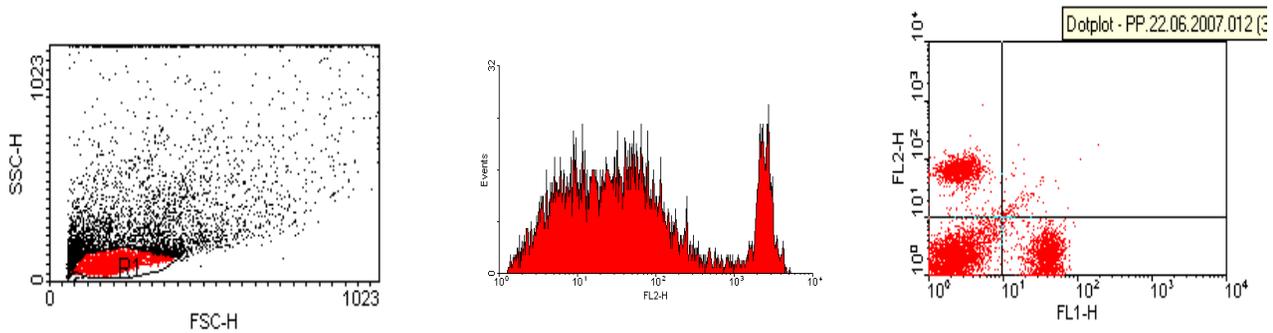


Figura 4: Ejemplo de los datos obtenidos en una citometría de flujo. A: SSC vs FSSC con región R1. B: Histograma con eventos para FL2 en células de R1, C: FL2 vs FL1 en células de R1

La combinación FISH-Citometría de flujo ha sido utilizada para la visualización diferencial de poblaciones bacterianas dentro de muestras complejas como la microbiota intestinal. Kruse *et al.* (1999), Harmsen *et al.* (2002) y Tuohy *et al.* (2001), realizaron estudios en microbiota intestinal humana para estudiar el efecto producido por la ingesta de inulina, durante distintos periodos de tiempo, mediante esta metodología y encontraron un aumento de la población de bifidobacterias. Dinoto *et al.* (2006) estudiaron las poblaciones de bifidobacterias en materia fecal de humanos que consumieron rafinosa durante 4 semanas y encontraron que durante el periodo de administración de rafinosa aumentó el número de este tipo de microorganismos. Al-Tamimi *et al.* (2006) también estudiaron el efecto sobre la

microbiota fecal humana de varios hidrolizados de azúcar de remolacha mediante FISH-Citometría, la que resultó útil para cuantificar las poblaciones de *Bifidobacterium* sp, *Bacteroides* sp, y los subgrupos *Lactobacillus* *Enterococcus* y *Clostridium histolyticum*. Ellos encontraron que las poblaciones variaron en función del grado de hidrólisis del polímero y que el número de bifidobacterias fue mayor cuanto menor fue el grado de polimerización del polímero ensayado.

Objetivo General

- ✓ 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.

Objetivos Específicos:

- ✓ Poner a punto el método de PCR-DGGE y la marcación mediante FISH-citometría para el análisis de las poblaciones de eubacterias, lactobacilos y bifidobacterias en muestras fecales.
- ✓ Evaluar cualitativamente y cuantitativamente el efecto provocado por la administración oral de kefirán sobre las poblaciones de eubacterias, lactobacilos y bifidobacterias en la microbiota intestinal en un modelo animal.
- ✓ Evaluar el efecto de la administración oral de polisacáridos producidos por lactobacilos aislados de kefir sobre las poblaciones de lactobacilos y bifidobacterias en la microbiota intestinal de ratones y compararlo con el kefirán.

Resultados y discusión

1.- Efecto de la administración oral de kefirán sobre la microbiota intestinal de ratones.

Para determinar el efecto de la administración oral de kefirán sobre la microbiota intestinal se realizaron experimentos *in vivo* utilizando como modelo ratones Balb C a los que se dividió en tres grupos. A dos de ellos se les administró una dieta base y se le administró kefirán (300mg/l) *ad libitum* en el agua de bebida durante 2 y 7 días mientras que el otro fue utilizado como control. Los 3 grupos se denominaron de la siguiente manera:

Grupo control: recibieron una dieta balanceada durante 7 días.

Grupo k/2d: recibieron una dieta balanceada y se incluyó la incorporación de kefirán (300 mg/l) en el agua de bebida durante 2 días.

Grupo k/7d: recibieron una dieta balanceada y se incluyó la incorporación de kefirán (300 mg/l) en el agua de bebida durante 7 días.

Con el objetivo de analizar los cambios producidos en la microbiota intestinal de ratones a los que se les administró kefirán se procedió a realizar una evaluación de las comunidades bacterianas en contenido intestinal mediante análisis molecular utilizando PCR y electroforesis en gel con gradiente desnaturizante químico (DGGE). Esto permite evaluar las poblaciones bacterianas sin diferenciar microorganismos cultivables de no cultivables. Con este fin se utilizó una metodología basada en la amplificación de los genes que codifican la región variable V3 del ARNr 16S. Para ello se tomaron muestras de contenido intestinal a las que se les extrajo el ADN, se amplificó con oligonucleótidos específicos para distintos grupos bacterianos y

la mezcla de fragmentos de ADNr 16S resultante fue separada por electroforesis en un gel de poliacrilamida con gradiente desnaturante de urea/formamida (Figura 5).

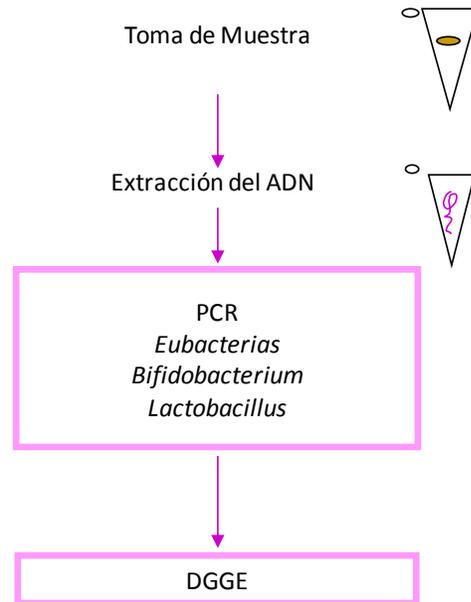


Figura 5: Esquema experimental seguido para evaluar la microbiota intestinal de ratón.

La metodología PCR-DGGE es ampliamente usada para el estudio de muestras complejas provenientes de comunidades microbianas. Sin embargo, se deben tener en cuenta ciertas consideraciones para obtener resultados reproducibles. Los puntos críticos a considerar se deben tanto a la dificultad para lograr una extracción de ADN reproducible y eficiente (Niemi *et al.*, 2001) como a problemas que se puedan generar en la amplificación. Así, la co-migración de ADN de diferentes especies en la misma banda (Sekiguchi *et al.*, 2001; Speksnijder *et al.*, 2001.), la formación de múltiples bandas como resultado de la amplificación de genes de un solo genoma (Brosius *et al.*, 1981; Nübel *et al.*, 1996), la amplificación diferencial debido a la desnaturización preferencial de genomas con bajo contenido de G- C, la accesibilidad diferencial de los genes de interés dentro del genoma, la interferencia de secuencias

adyacentes y la afinidad selectiva de los oligonucleótidos sintéticos por la secuencia blanco (Farrelly *et al.*, 1995; Suziki & Giovannoni, 1996; Hansen *et al.*, 1998; Kanagawa, 2003) son algunos de los factores que pueden traer problemas a la hora de interpretar los resultados.

Por lo tanto, para llevar a cabo esta estrategia de análisis fue necesario optimizar las condiciones de amplificación del ADN y las condiciones de la electroforesis.

1.1.- Optimización de las condiciones para el análisis mediante PCR-DGGE.

1.1.1.- Verificación de la especificidad de los oligonucleótidos empleados

Se utilizaron 3 pares de oligonucleóticos específicos para distintos grupos bacterianos dirigidos a amplificar la región variable V3 del ARNr 16S. Los grupos bacterianos a analizar con los respectivos oligonucleótidos utilizados se detallan a continuación:

- ✓ Eubacterias: oligonucleótidos 518R y 341F-GC que producen amplicones de 193 pb (Muyzer *et al.*, 1993).
- ✓ *Lactobacillus*: oligonucleótidos Lac1 y Lac2-GC que producen amplicones de 327 pb (Walter *et al.*, 2001).
- ✓ *Bifidobacterium*: oligonucleótidos Bif164F y Bif662-GC que producen amplicones de 523 pb (Satokari *et al.*, 2001).

Para la puesta a punto de la técnica se procedió a determinar si los oligonucleótidos elegidos amplificaban solamente el grupo bacteriano al que están dirigidos. Para ello, el ADN extraído de los microorganismos *Saccaromyces cereviceae* CIDCA 812, *Saccharomyces unisporum* CIDCA 81107, *Isatchenquia* CIDCA 9125, *Kluyveromyces lactis* CIDCA B, *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* ATCC 25865, *Bifidobacterium* sp. CIDCA 5320,

Lactobacillus kefiranofaciens subsp *kefiranofaciens* JCM 6985, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 332, *Lactobacillus acidophilus* DSMZ 20071, *Lactobacillus parakefir* DSMZ 10551, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* LMG 15132, *Lactobacillus plantarum* 337, *Lactobacillus casei* DSMZ 20011, *Lactococcus* sp. NZ 9000, *Lactobacillus kefir* ATCC 8007, *Lactobacillus hilgardii* DSMZ 20176, *Propionibacterium acnés* ATCC 11827, *Propionibacterium jensenii* ATCC 4869, *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154, *Lactobacillus plantarum* DSMZ 20174, *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus brevis* JCM 1059, *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314, fue amplificado con los oligonucleótidos 518R y 341F-GC, Lac1 y Lac2-GC y Bif164F y Bif662-GC utilizando los programas de amplificación y mezclas de reacción descritas por Montesi *et al.*, 2005. Los amplicones resultantes fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Como resultado se observó que la reacción de amplificación llevada a cabo con los oligonucleótidos dirigidos a Eubacterias generó amplicones del tamaño esperado cuando se utilizaron como molde los ADN de todas las bacterias descritas anteriormente. Contrariamente, no se produjo amplificación cuando se usó como molde el ADN proveniente de levaduras. La reacción de amplificación del ADN de los microorganismos ensayados con los oligonucleótidos Bif164F y Bif662-GC generó amplicones de un tamaño entre 500 y 600 pb solamente cuando se utilizó como molde el ADN proveniente de cepas del género *Bifidobacterium*. Finalmente, los oligonucleótidos específicos para *Lactobacillus* resultaron en una amplificación positiva solo en los casos donde el ADN molde provenía de cepas de éste género. Por lo tanto se pudo constatar que los oligonucleótidos seleccionados son específicos para los grupos bacterianos a los que están dirigidos.

En la Figura 6 se muestra, a modo de ejemplo, el perfil electroforético en gel de agarosa (1 % p/v) de los amplicones resultantes de la amplificación, con

oligonucleótidos específicos para la especie *Lactobacillus*, del ADN extraído de las cepas *Saccaromyces cereviceae* CIDCA 812; *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154; *Lactobacillus brevis* 1059; *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985; *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348; *Bifidobacterium* sp. CIDCA 5320; *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 332, *Lactobacillus parakefir* DSMZ 10551; *Lactobacillus casei* DSMZ 20011; *Lactobacillus plantarum* DSMZ 20174; *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 y *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* ATCC 25865. Como se puede observar, sólo el ADN proveniente de cepas del género *Lactobacillus* generaron amplicones del tamaño esperado (entre 300 y 400 pb). Sin embargo, se puede observar que a pesar de haber partido de la misma concentración de ADN molde para todas las cepas, la intensidad de las bandas no es igual en todas. Esto podría deberse a que la accesibilidad de los oligonucleótidos sintéticos por los sitios de unión específico en los genomas no es igual en todos los ADN molde utilizados (de Araújo *et al.*, 2008) y permite inferir que la intensidad de las bandas no está relacionada a la concentración de ADN molde presente en la reacción de amplificación.

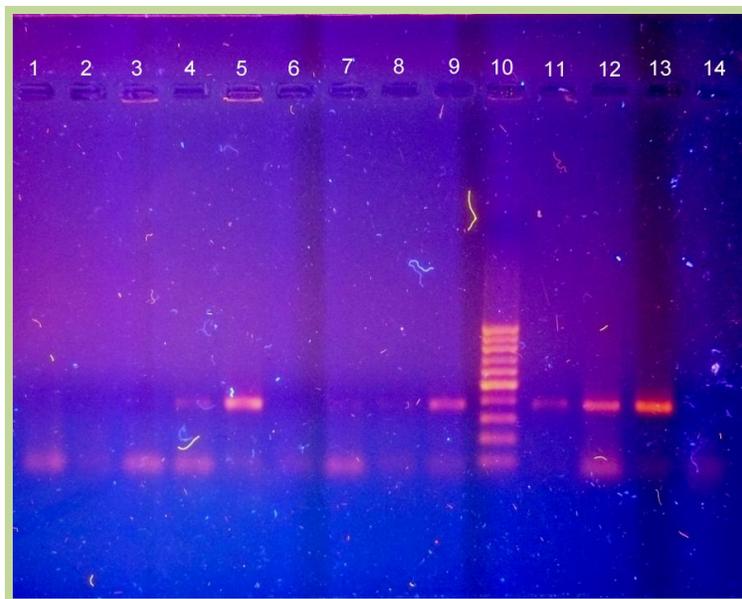


Figura 6: Perfil electroforético en gel de agarosa (1 % p/v) de los productos de amplificación con oligonucleótidos específicos para la especie *Lactobacillus*, del ADN extraído de las cepas: 1: *Saccaromyces cereviceae* CIDCA 812; 2: *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154; 3: *Lactobacillus brevis* JCM 1059; 4: *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* JCM 6985; 5: *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348; 6: *Bifidobacterium* sp. CIDCA 5320; 7: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314; 8: *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* CIDCA 332, 9: *Lactobacillus parakefir* DSMZ 10551; 10: Patrón de peso molecular de 1000 pb; 11: *Lactobacillus casei* DSMZ 20011; 12: *Lactobacillus plantarum* DSMZ 20174; 13: *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 ;14: *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* ATCC 25865.

1.1.2.- Selección de las condiciones de amplificación

Dada la complejidad de las muestras y que no todos los oligonucleótidos poseen la misma afinidad por el ADN molde se buscaron las condiciones de amplificación que generen el mayor número de bandas en los perfiles electroforéticos obtenidos mediante DGGE.

Las variables utilizadas fueron duplicar y triplicar tanto la cantidad de ADN molde como la cantidad de enzima polimerasa utilizada en la reacción de amplificación. Los amplicones resultantes fueron sembrados en un gel con gradiente desnaturizante químico.

Como resultado se encontró un mayor número de bandas en los perfiles electroforéticos cuando se triplicó la cantidad de ADN molde para los 3 pares de oligonucleótidos usados.

Cuando se varió la cantidad de enzima polimerasa los resultados variaron de acuerdo a los oligonucleótidos utilizados. Los oligonucleótidos Lac1 y Lac2-GC, Bif164F y Bif662-GC generaron mayor número de bandas en los perfiles electroforéticos cuando se duplicó la concentración de enzima polimerasa en la mezcla de reacción. Cuando se usaron los oligonucleótidos 518R y 341F-GC para la amplificación los mejores resultados se obtuvieron utilizando la concentración más baja de enzima estudiada.

1.1.3.- Selección de las condiciones de corrida para la Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante químico.

Se procedió a seleccionar los rangos de gradiente desnaturalizante a utilizar en los geles de poliacrilamida a fin de obtener una buena separación de los fragmentos de ADN amplificados.

Para ello se amplificó el ADN proveniente de contenido intestinal de ratón utilizando los tres pares de oligonucleótidos en las condiciones seleccionadas en el punto anterior y los amplicones obtenidos fueron separados por electroforesis en geles con gradiente desnaturalizante de urea/formamida. Los gradientes ensayados fueron 30/60, 40/60, 45/65 y 45/70.

Como resultado se observó una buena separación de bandas para los amplicones obtenidos con los oligonucleótidos 518R / 341R-GC y Lac1 / Lac2-GC cuando se utilizó un gradiente de urea formamida 40/60. En los perfiles electroforéticos de los amplicones obtenidos con los oligonucleótidos Bif164F / Bif662-GC se observó una acumulación de bandas en la parte inferior en los geles con gradientes desnaturalizantes 30/60 y 40/60 y una buena distribución

de bandas a lo largo de todo el gel cuando se utilizó el gradiente desnaturalizante 45/65 (Figura 7) seleccionándose este gradiente para geles posteriores.

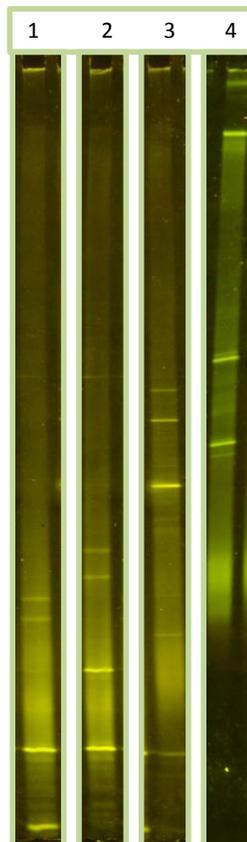


Figura 7: Perfiles electroforéticos con diferentes gradientes desnaturalizantes de los productos de amplificación de una muestra de ADN extraída de contenido intestinal de ratón con los oligonucleótidos Bif164F / Bif662-GC. Calle 1: Gradiente 30/60; Calle 2: Gradiente 40/60; Calle 3: Gradiente 45/65; Calle 4: Gradiente: 45/70.

1.2.- Análisis de la población de Eubacterias.

Luego de poner a punto la metodología se analizó el contenido intestinal de los ratones a los que se les administró kefirán durante 2 y 7 días en el agua de bebida y de los ratones control.

Con este objetivo, el ADN obtenido de contenido intestinal de los ratones de los 3 grupos fue amplificado con oligonucleótidos para Eubacterias y separados por electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante en las

condiciones seleccionadas previamente. En la Figura 8a se pueden observar los perfiles electroforéticos de la microbiota intestinal de los ratones de cada grupo. Analizando el grupo de ratones control podemos ver que existe una diversidad entre los perfiles obtenidos que también se observa en los ratones que consumieron kefiran. Este tipo de variaciones entre individuos ha sido ampliamente documentada utilizando esta metodología. Snart *et al.* (2006) al igual que Montesi *et al.* (2005) documentan la variabilidad de la microbiota intestinal entre ratones cuando analizan la microbiota de ratones alimentados con prebióticos. Los mismos resultados fueron descritos cuando se analiza la microbiota intestinal humana (Zoetendal *et al.*, 1998; Vanhoutte *et al.*, 2006).

Comparando los perfiles de los ratones que ingirieron kefiran durante 2 y 7 días con respecto a los ratones control se puede observar la aparición de bandas nuevas. Estos resultados indicarían un cambio en la microbiota intestinal inducido por el consumo de kefiran. La zona del gel donde aparecen mayoritariamente las nuevas bandas se encuentra remarcada en la Figura 8a. Se puede destacar que las nuevas bandas aparecen principalmente en la zona de mayor concentración de gradiente desnaturalizante, o sea que las fracciones de ADN contienen mayor contenido de GC en sus secuencias.

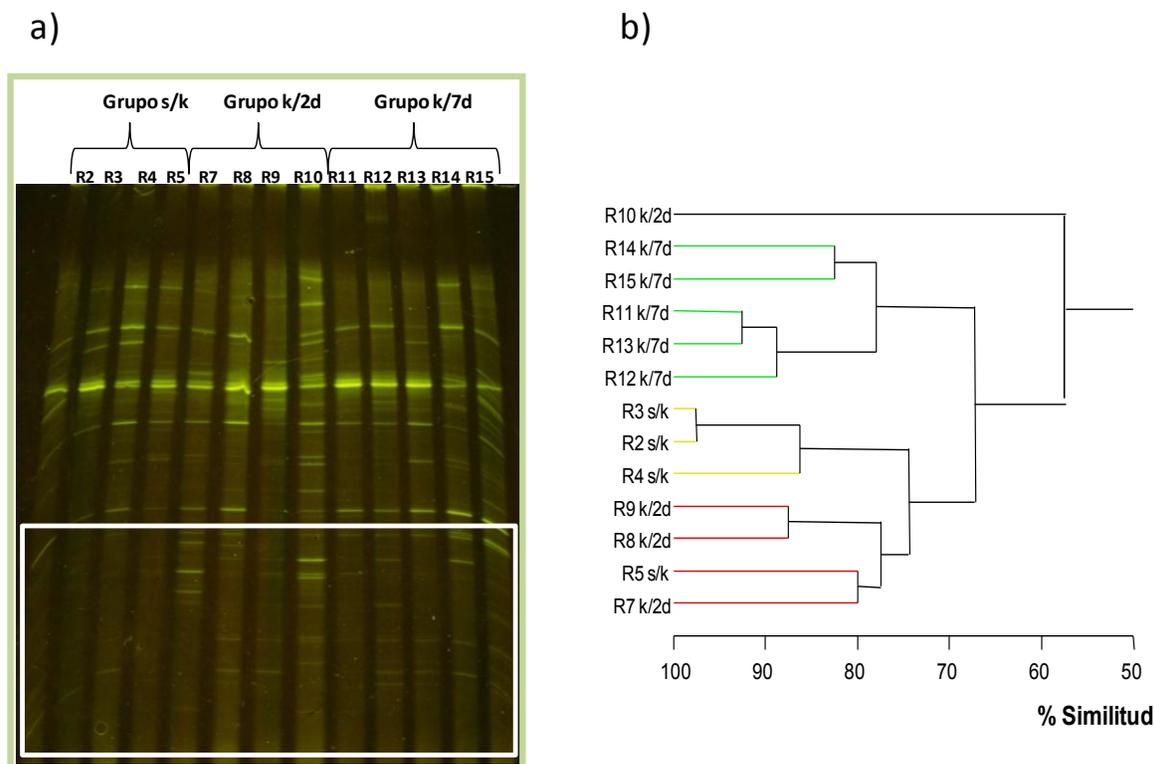


Figura 8: a) Perfil DGGE en gradientes 40-60% de productos de la amplificación de ADN de contenido intestinal de ratón utilizando oligonucleótidos universales para el gen que codifica el ARNr 16S en Eubacterias. **Grupo control (s/k)**: ratones que no consumieron kefiran; **Grupo k/2d**: ratones que recibieron kefiran *ad libitum* en el agua de bebida durante 2 días; **Grupo k/7d**: ratones que recibieron kefiran *ad libitum* en el agua de bebida durante 7 días. En el recuadro blanco se puede observar la zona donde aparece el mayor número de bandas. b) Análisis de cluster de los perfiles obtenidos en el gel a) utilizando el coeficiente de Jaccard y UPGMA.

La similitud existente entre los perfiles electroforéticos obtenidos por DGGE de los distintos grupos fue evaluada mediante el coeficiente de Jaccard y se realizó un análisis de cluster mediante el método de agrupamiento de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA) utilizando el programa Systat 12 (Figura 8b).

La mayoría de los perfiles agruparon con una similitud de 67% evidenciándose dos grupos. Uno de los grupos está constituido por los perfiles

representativos de la microbiota de ratones que recibieron una dieta suplementada con kefirán durante 7 días y el otro grupo está formado por los perfiles de la microbiota de los ratones de los grupos control y los que consumieron kefirán durante dos días. En este último cluster se puede observar la existencia de dos subgrupos con una homología entre ambos de 74 %. Uno que agrupo a los perfiles de los ratones control y otro que agrupa a los perfiles de los ratones que consumieron kefirán durante 2 días. Solo el ratón 10, que recibió una dieta suplementada con kefirán durante 2 días, presenta marcadas diferencias con respecto a los demás perfiles analizados; esto puede deberse a la variabilidad en la microbiota intestinal propia de cada ratón.

Cabe destacar que, a pesar de la variabilidad existente entre los individuos de un mismo grupo, la ingesta de kefirán produce un cambio en los perfiles electroforético sobre todo en los ratones que consumieron kefirán durante 7 días.

Con el objetivo de asignarle identidad a las bandas del gel que se muestra en la Figura 8a) se procedió a secuenciarlas

Con este fin se determinó inicialmente si cada banda provenía de un solo amplicón o bien era consecuencia de la co-migración de más de una banda. Para ello las bandas fueron cortadas del gel que se muestra en la Figura 8a), re-amplificadas (con los oligonucleótidos los 518R/341F-GC) y separadas nuevamente por electroforesis en gel con gradientes desnaturizante 40/50 o 50/60 dependiendo de la región del gel de donde provenían. Luego, las bandas fueron cortadas de estos geles, re-amplificados con los oligonucleótidos 518R/341R (sin GC) y enviados a secuenciar. Las secuencias encontradas fueron contrastadas con las presentes en el GenBank.

Como resultado se encontró que la mayoría de las secuencias no alineaban con ninguna especie descrita en el GenBank o bien alineaban con porciones del ARNr 16S de bacterias no cultivables.

Sin embargo se lograron identificar, con distintos porcentajes de similitud, las secuencias obtenidas de las bandas que se encuentran marcadas con letras en la Figura 9. En esta Figura cada letra señala a la banda que se encuentra por debajo de la misma. Además, cuando una letra se repite a una misma altura en el gel significa que las secuencias encontradas en el GenBank para esas bandas coinciden. Las bandas (señaladas con cada letra) y secuencias del Gen Bank con las cuales coinciden fueron las siguientes: a: *Dehalococcoides* sp., b: *Gardnerella vaginalis*, c: *Acidovorax radicus*/*Verminophrobacter* sp/*Acidovorax delafieldii*, d: *Bacteroides capillosus*, e: *Dehalogenimonas lykanthroporepellens*, f: *Clostridium difficile*, g: *Alistipes putredinis*, h: *Bacteroides* sp, i: *Listeria monocytogenes*, j: *Bifidobacterium* sp. De los microorganismos listados sólo algunos están descriptos para el hábitat de la microbiota intestinal. Sin embargo, el conocimiento que existe sobre los microorganismos que lo constituyen es aún escaso. Varios autores cuando estudiaron la composición de la microbiota fecal humana, mediante métodos independientes del cultivo, encontraron que un alto porcentaje de los microorganismos correspondían a bacterias no conocidas. Zoetendal *et al.* (1998) analizaron la microbiota fecal humana mediante DGGE encontraron que la mayoría de las bacterias no correspondían a bacterias conocidas, también demostraron la variación entre individuos de la microbiota intestinal. Suau *et al.* (1999) mostraron, mediante un análisis comparativo de clones de genes que codifican para el ARNr 16S, que el 76 % de los clones analizados (cultivables y no cultivables) corresponden a microorganismos desconocidos. Blaut *et al.* (2002) mostraron que la diversidad de la microbiota intestinal aumenta en adultos donde la mayoría de las unidades taxonómicas que estudiaron correspondieron a bacterias desconocidas.

Por otro lado se debe destacar que la banda “j” presente en los ratones R8 y R9, perteneciente al grupo que ingirió kefirán durante dos días, y R11 y

R12 pertenecientes al grupo que ingirió kefirán durante 7 días tienen una secuencia similar a la secuencia del gen que codifica para el ARNr 16S de microorganismos del género *Bifidobacterium* (Figura 9). Esto resulta de gran interés porque éste género juega un rol importante y se lo asocia a mejoras en la salud y disminución en el riesgo de enfermedades en humanos (Robertfroid, 2010) y un aumento en el número de estos microorganismos en el tracto gastrointestinal (efecto bifidogénico) suele ser un marcador a seguir a la hora de analizar el efecto prebiótico de distintas sustancias.

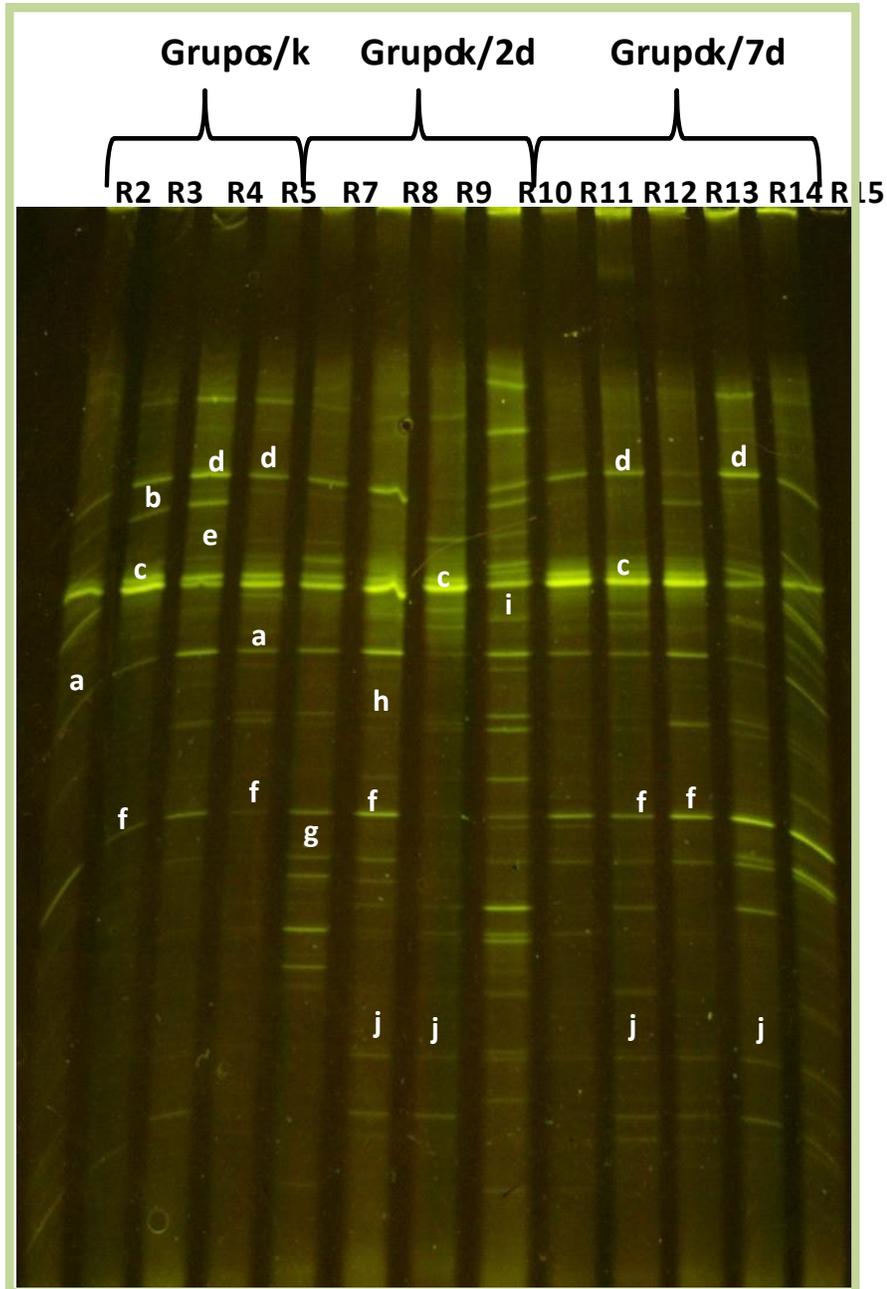


Figura 9: Perfil electroforético de los productos de la amplificación de ADN de contenido intestinal de ratones del grupo control s/k y ratones que ingirieron kefirán 2 y 7 días (grupo k/2d y grupo k/7d, respectivamente) en el agua de bebida utilizando oligonucleótidos para el gen que codifica el ARNr 16S en Eubacterias. Las bandas marcadas con letras (a hasta j) corresponden a aquellas cuyas secuencia coinciden con secuencias presentes en el GenBank. Cada letra señala a la banda que se encuentra debajo de la misma.

1.3.- Estudio de las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos.

Para analizar si existe una variabilidad específica de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* dentro de la microbiota intestinal se amplificó el ADN de todos los individuos con los oligonucleótidos Bif164F y Bif662-GC y LAC1 y LAC2-GC y se analizó mediante DGGE.

Los perfiles de bandas obtenidos con los oligonucleótidos Bif164F y Bif662-GC se muestran en la Figura 10. En los perfiles obtenidos a partir de los amplicones proveniente de los ratones del grupo control se observó un muy bajo número de bandas o ausencia de las mismas. Por otro lado, los perfiles de los amplicones provenientes de los ratones de los grupos que ingirieron kefirán durante 2 días y 7 días mostraron un mayor número de bandas. Esto indicaría un cambio en la microbiota intestinal de los ratones dentro del género *Bifidobacterium* inducido por la ingesta de kefirán.

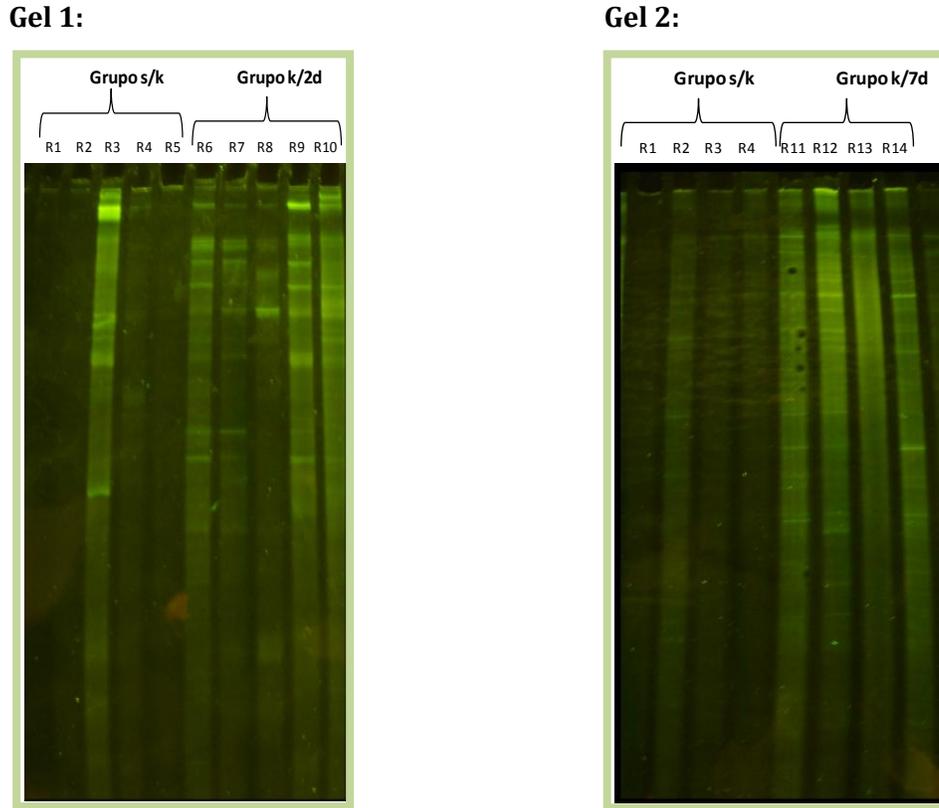


Figura 10: Perfiles DGGE, en gradientes 45-65%, de productos de la amplificación de ADN de contenido intestinal de ratón utilizando oligonucleótidos específicos para el género *Bifidobacterium* (Bif164F y Bif662-GC). **Gel 1: Grupo control s/k:** ratones que no consumieron kefirán (R1, R2, R3, R4, R5); **Grupo k/2d:** ratones que recibieron kefirán *ad libitum* en el agua de bebida durante 2 días (R6, R7, R8, R9, R10). **Gel 2: Grupo control s/k:** ratones que no consumieron kefirán (R1, R2, R3, R4); **Grupo k/7d:** ratones que recibieron kefirán *ad libitum* en el agua de bebida durante 7 días (R11, R12, R13, R14).

La metodología utilizada para el análisis de la variabilidad específica del género *Lactobacillus* dentro de la microbiota intestinal de ratón fue la misma que la empleada en los casos anteriores, pero en este caso se utilizaron oligonucleótidos Lac1 y Lac2-GC como iniciadores en la reacción de amplificación. Como resultado se observaron perfiles electroforéticos muy similares para los individuos de los distintos grupos (Figura 11). Esto indicaría

que la adición de kefirán a la dieta de los ratones no provocó cambios en la población del género *Lactobacillus*.

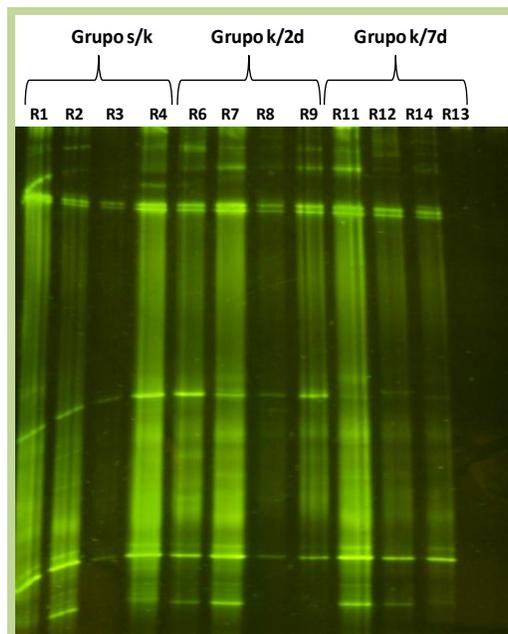


Figura 11: Perfiles DGGE, en gradientes 40-60%, de productos de la amplificación de ADN de contenido intestinal de ratón utilizando oligonucleótidos específicos para el género *Lactobacillus* (LAC1 y LAC2-GC). **Grupo control s/k:** ratones que no consumieron kefirán (R1, R2, R3, R4); **Grupo k/2d:** ratones que recibieron kefirán *ad libitum* en el agua de bebida durante 2 días (R6, R7, R8, R9); **Grupo k/7d:** ratones que recibieron kefirán *ad libitum* en el agua de bebida durante 7 días (R11, R12, R13, R14).

El análisis de los resultados obtenidos mediante PCR-DGGE y secuenciación del ADN extraído de la microbiota del contenido intestinal de ratones, evaluado con oligonucleótidos dirigidos a bacterias, permitió evidenciar un efecto en la microbiota intestinal de los ratones producido por la ingesta oral del kefirán. Esto se evidenció mediante el aumento en el número de bandas de los perfiles electroforéticos de amplicones obtenidos por amplificación del ADN de contenido intestinal de ratones que consumieron kefirán. Además mediante secuenciación se pudo confirmar que uno de los géneros que cambian dentro de la microbiota intestinal es *Bifidobacterium*, ya

que se vieron bandas que los representan sólo en los perfiles de ratones que consumieron kefirán. Estos resultados fueron confirmados al amplificar el ADN de las muestras con oligonucleótidos específicos para bifidobacterias ya que solo se detectaron bandas en los perfiles DGGE de los ratones que consumieron kefirán por 2 y 7 días. Por otro lado, la población de lactobacilos no fue modificada por la ingesta de kefirán en los tiempos ensayados.

Resultados similares encontraron Montesi *et al* (2005) cuando estudiaron los cambios producidos sobre la microbiota de ratones que ingirieron fructooligosacáridos comparado con un grupo control utilizando PCR específicas para especie con los mismos oligonucleótidos iniciadores que los utilizados en este trabajo de tesis.

2.- Efecto de la administración oral de kefirán sobre la evolución de la microbiota fecal de ratones.

Con el objetivo de analizar los posibles cambios inducidos por la ingesta de polisacárido en la microbiota fecal se realizaron ensayos en los cuales ratones de la línea Balb C fueron individualizados dentro de cada grupo dietario y se siguió como marcador la evolución de la microbiota fecal durante el periodo de ingesta del polisacárido.

Los ratones fueron divididos grupos:

Grupo control: (ratones 1 a 6) recibieron una dieta balanceada durante 21 días.

Grupo k/21d: (ratones 7 a 12) recibieron una dieta balanceada y se incorporó kefirán en el agua de bebida en una concentración de 300 mg/l.

2.1.- Evolución de poblaciones bacterianas en muestras de materia fecal

El análisis del efecto de la administración oral del kefirán sobre la evolución de la microbiota fecal se realizó mediante PCR-DGGE. Las poblaciones microbianas que se estudiaron fueron, al igual que en el experimento anterior, Eubacterias, bifidobacterias y lactobacilos utilizándose los mismos oligonucleótidos sintéticos que en el punto anterior.

2.1.1.- Análisis de la evolución de la población de Eubacterias.

El ADN extraído de materia fecal de cada ratón en los días 0, 2, 7, 14 y 21 fue amplificado utilizando oligonucleótidos para Eubacterias y los amplicones obtenidos fueron separados por DGGE. En la Figura 12 se muestra, a modo de ejemplo, los perfiles obtenidos en las muestras obtenidas a partir del ratón 1 del grupo control los días 0, 2, 7, 14 y 21 del tratamiento. Los perfiles obtenidos en las muestras de materia fecal durante el ensayo son similares, observándose algunas pocas diferencias en el número e intensidad de las bandas presentes.

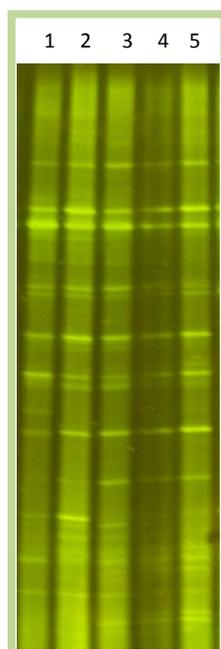


Figura 12: Perfil DGGE, en gradientes desnaturalizantes 40-60%, de productos de la amplificación de ADN de materia fecal del ratón 1, perteneciente al grupo control, utilizando los oligonucleótidos 518R y 341F-GC. Calles: 1: ratón 1, día 0; 2: ratón 1, día 2; 3: ratón 1 día 7; 4: ratón 1 día 14; 5: ratón 1 día 21.

El ADN extraído de muestras de materia fecal de los ratones del grupo que consumió kefiran en el agua de bebida (ratones 7, 8, 9, 10, 11 y 12) tomadas los días 0, 2, 7, 14 y 21 del tratamiento fueron amplificadas por PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para Eubacterias y los fragmentos de ADN obtenidos fueron separados por DGGE. Los perfiles electroforéticos se muestran en la Figura 13.

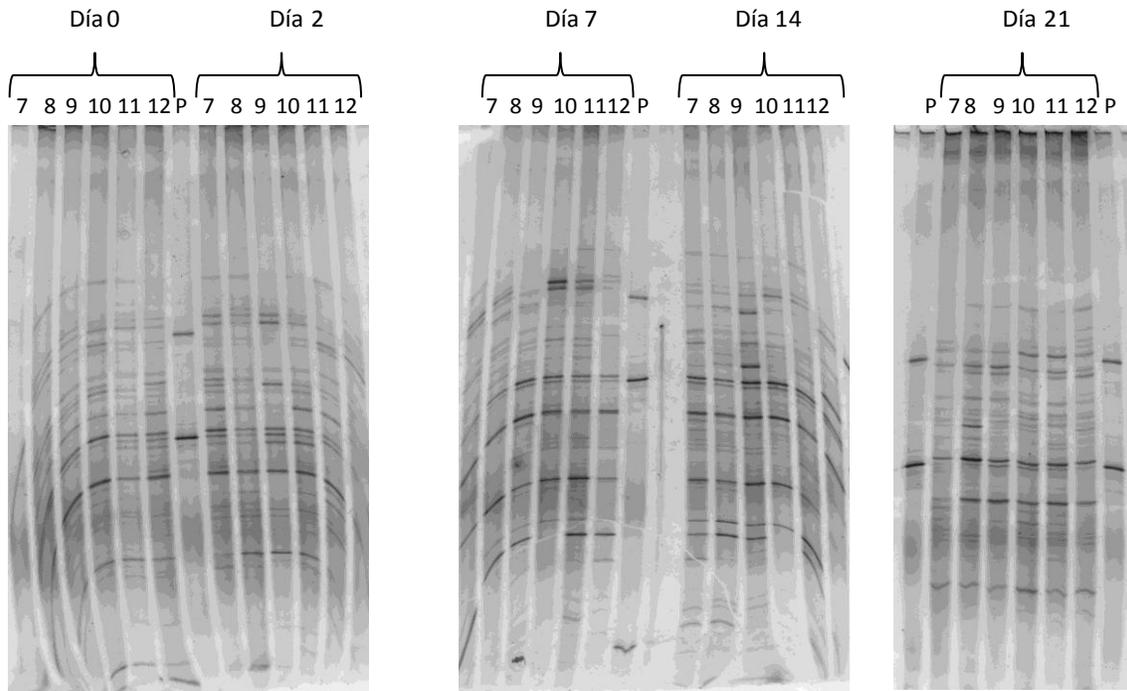


Figura 13: Perfiles DGGE, en gradiente desnaturalizante 40-60%, de productos de la amplificación de ADN extraído de muestras de materia fecal de los ratones del grupo k/21d (ratones 7, 8, 9, 10, 11 y 12) tomadas los días 0, 2, 7, 14 y 21 de tratamiento. Para la amplificación se utilizaron los oligonucleótidos 518R y 341F-GC. P: patrón formado por productos de amplificación de ADN de *Lb casei* DSMZ 20011, *Lb plantarum* DSMZ 20174 y *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6984 con los oligonucleótidos 518R y 341F-GC.

En la misma se pueden comparar los perfiles obtenidos para distintos ratones al comienzo del ensayo indicando que los perfiles no son exactamente iguales y se puede seguir la evolución de la microbiota de cada ratón durante el tiempo de consumo de kefiran. Los datos se analizaron utilizando el programa Systat 12 (Figura 14). La similitud existente entre los perfiles electroforéticos

fue evaluada mediante el coeficiente de Jaccard y se realizó un análisis de cluster mediante el método de agrupamiento de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA).

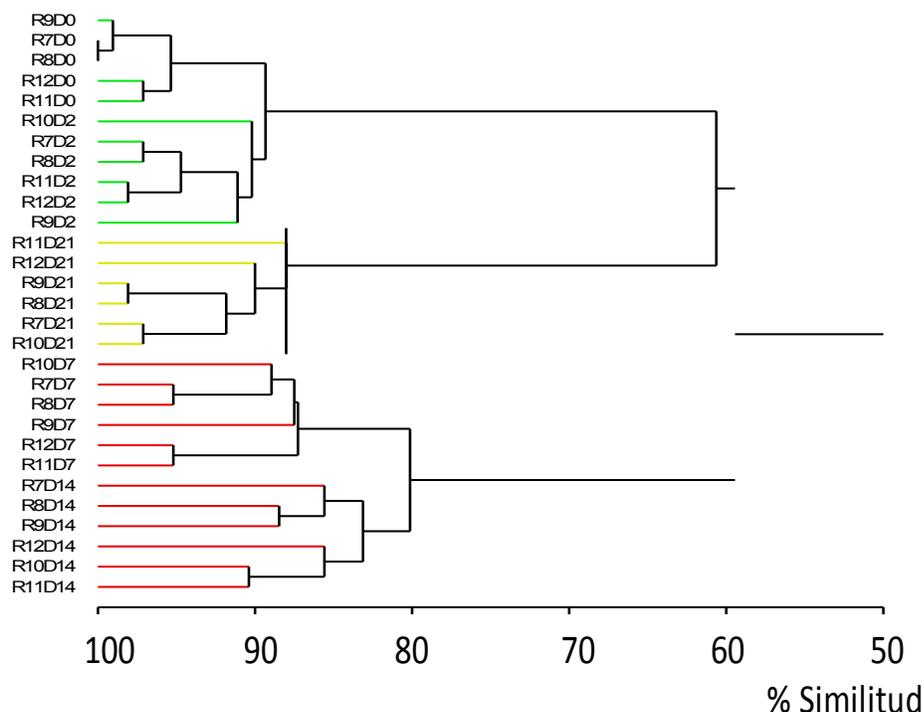


Figura 14: Dendrograma obtenido por análisis estadístico de los perfiles DGGE mostrados en la Figura 13 de los productos de amplificación del ADN extraído de las muestras tomadas de los ratones que ingirieron kefirán a los 0, 2, 7, 14 y 21 de tratamiento (ratones 7, 8, 9, 10, 11 y 12)

El análisis de cluster muestra un 59 % de similitud entre los perfiles de la microbiota fecal de los ratones que consumieron kefirán en el agua de bebida durante el ensayo. Se puede observar la formación de 3 clusters bien definidos. El cluster 1 está formado por las muestras tomadas los días 0 y 2 de ensayo que se agrupan de manera independiente con un alto porcentaje de similitud entre

las mismas (89, 3 %), el cluster 2 está formado por las muestras tomadas a los ratones el día 21 del ensayo y el cluster 3 está integrado por las muestras tomadas el día 7 y el día 14 del tratamiento agrupadas con un 80 % de similitud. Se puede destacar que las muestras agrupan según el tiempo de ingesta de kefirán (día en que fue tomada la muestra) indicando qué, a pesar de la variabilidad propia de la microbiota de cada ratón, este polisacárido estaría induciendo cambios que se evidencian en los perfiles DGGE.

2.1.2.- Evolución en los perfiles de bifidobacterias y lactobacilos

El ADN extraído de la materia fecal de los ratones que ingirieron kefirán y los ratones utilizados como control se amplificó también con los oligonucleótidos específicos para los grupos bifidobacterias y lactobacilos.

En la Figura 15 a y b se muestran, a modo de ejemplo, los perfiles DGGE obtenidos a partir de la amplificación con oligonucleótidos específicos para el grupo *Bifidobacterium* del ADN extraído de la materia fecal de los ratones 7 y 9 que consumieron kefirán a los días 0, 2, 7, 14 y 21 del ensayo. En la Figura 15 a) se ve claramente un aumento tanto en el número como en la intensidad de las bandas al día 7 del ensayo para el ratón 7. Se puede destacar que las nuevas bandas observadas en el perfil desde el día 7 mantuvieron su intensidad hasta el día 21 del ensayo, lo que indicaría un aumento en la población de bifidobacterias que se mantiene durante el tiempo del ensayo. La Figura 15 b) muestra el perfil DGGE del ratón 9 observándose un aumento del número de bandas desde el día 14 del tratamiento. En el ratón 9 se observa un menor número de bandas que en el ratón 7 y además una de las bandas presente en el día 14 disminuye en intensidad en el día 21 (banda marcada con un círculo en la Figura 15 b). Estas dos tendencias se observaron en todos los ratones de este grupo. Por lo tanto podemos inferir que hay un cambio en la población de bifidobacterias en la microbiota de los ratones que ingirieron kefirán.

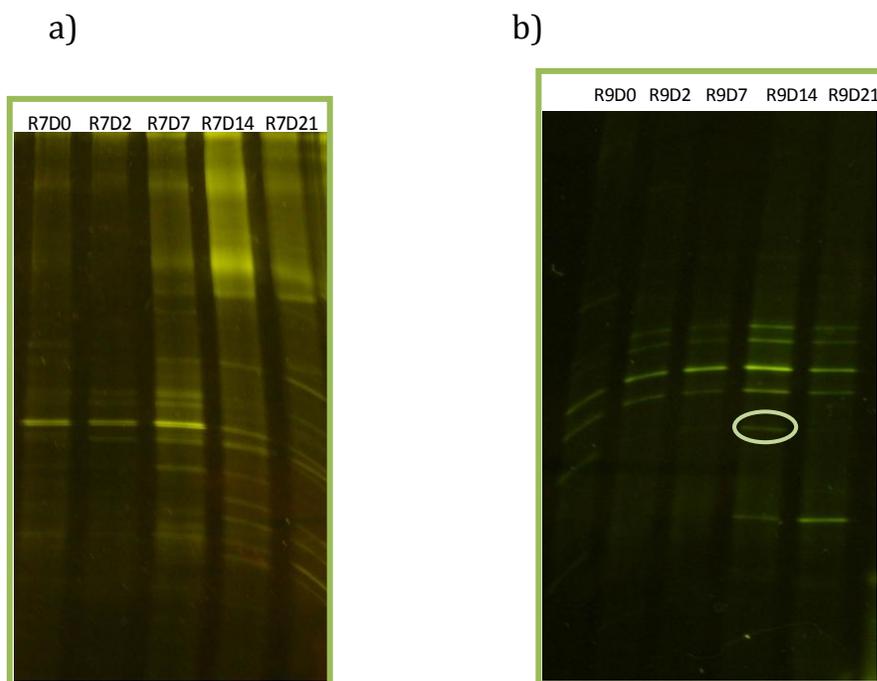


Figura 15: a) Perfil DGGE de productos de la amplificación de ADN extraído de muestras de materia fecal del ratón 7 (grupo k/21d) tomadas los días 0, 2, 7, 14 y 21 de tratamiento. b) Perfil DGGE de productos de la amplificación de ADN extraído de muestras de materia fecal del ratón 9 (grupo k/21d) tomadas los días 0, 2, 7, 14 y 21 de tratamiento. Para la amplificación se utilizaron oligonucleótidos específicos para el género *Bifidobacterium* (Bif164F y Bif662-GC) y el gradiente desnaturalizante fue 45-65%.

El género *Lactobacillus* fue analizado por esta técnica utilizando el ADN extraído de la materia fecal de los ratones de los distintos grupos y amplificado con los oligonucleótidos específicos para el grupo *Lactobacillus*. Los perfiles electroforéticos mostraron un muy bajo número de bandas en todas las muestras analizadas y no se observaron cambios en la posición de las bandas, coincidiendo con los resultados del ensayo anterior.

Teniendo en cuenta los resultados presentados se puede concluir que la ingesta de kefir produce una modificación en la microbiota fecal de ratones específicamente en la población de bifidobacterias, no observándose cambios en la población de lactobacilos.

2.2.- Cuantificación de poblaciones bacterianas mediante hibridación *in situ* fluorescente y citometría de flujo.

Para cuantificar los cambios en las poblaciones microbianas se evaluó la materia fecal de los ratones pertenecientes a ambos grupos mediante hibridación *in situ* con sondas fluorescentes y citometría de flujo. Se utilizaron sondas específicas para Eubacterias (Eub 338) y Non eubacterias (NONEub), marcadas con FITC, bifidobacterias (Bif 164) marcadas con Alexa FLuor 532 y lactobacilos (Lab 158) marcadas con Alexafluor 647. Los fluorocromos FITC y Alexafluor 647 emiten fluorescencia verde y Alexa FLuor 532, fluorescencia roja.

2.2.1.- Puesta a punto del método. Especificidad de las sondas.

Para analizar la especificidad de las sondas y constatar una hibridación efectiva se tomaron cultivos puros de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8324 y *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* ATCC 25865, se marcaron con las sondas Eub 338-FITC, NonEUB-FITC, Bif 164-Alexa FLuor 532 y Lab 158-Alexafluor 647 y se observaron en un microscopio laser confocal. En la Figura 16 a y b, se observan las microfotografías de un cultivo de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8324 marcado con sondas específicas para Eubacteria y lactobacilos, respectivamente. En la Figura 16 c y d se muestra la microfotografía de un cultivo de *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* ATCC 25865, marcado con sondas específicas para bifidobacterias y Eubacterias, respectivamente. Se puede observar que cada sonda hibrida con los microorganismos para los cuales son específicas demostrando que el tratamiento realizado a la muestra para permeabilizar e hibridar las bacterias es efectivo. Además, las muestras de *Lb plantarum* CIDCA 8324 sin marcar y marcadas con sondas para bifidobacterias y NON-Eubacteria no mostraron fluorescencia en ninguno de los casos. El mismo resultado se encontró cuando

muestras de *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* ATCC 25865 sin marcar y marcadas con sondas específicas para lactobacilos y NON-Eubacterias fueron evaluadas. Indicando la especificidad de las sondas utilizadas.

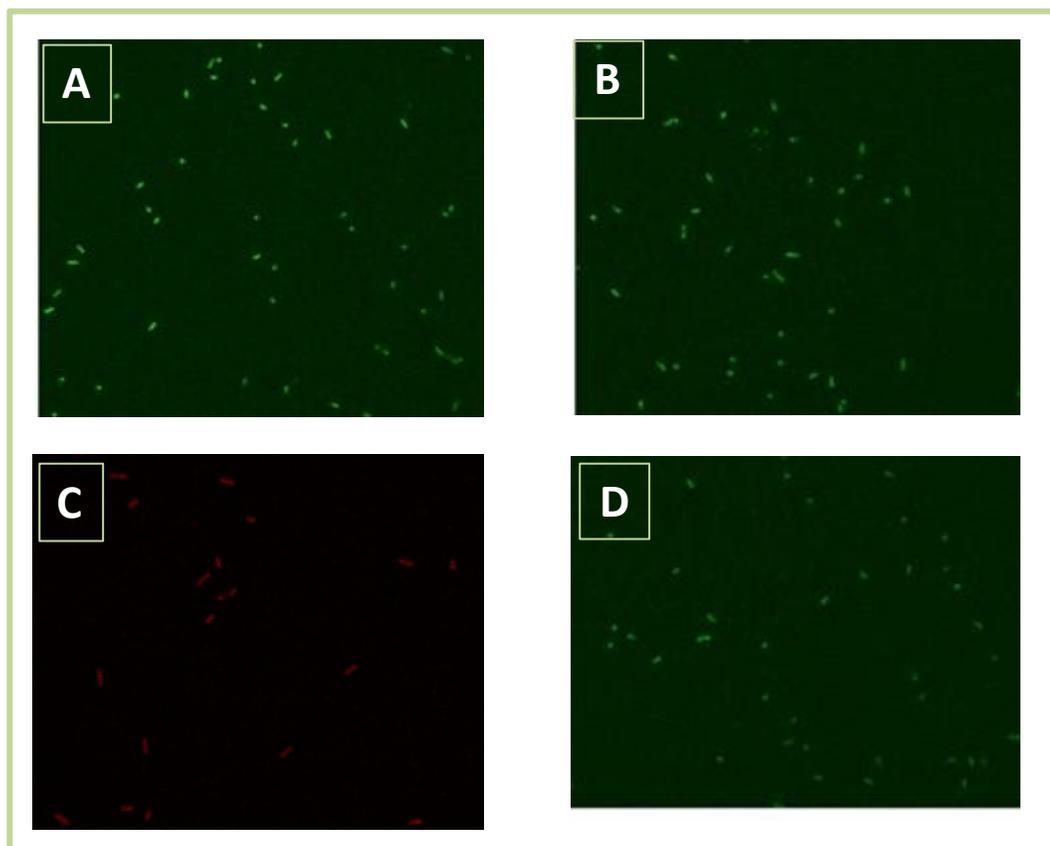


Figura 16: a y b: Microfotografías de un muestra de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8324 marcada con sondas específicas para Eubacteria y lactobacilos, respectivamente. c y d: Microfotografía de una muestra de *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* ATCC 25865, marcada con sondas específicas para bifidobacteria y Eubacteria, respectivamente. Ambas microfotografías fueron tomadas en un microscopio laser confocal.

2.2.2.- Cuantificación de poblaciones de lactobacilos y bifidobacterias mediante Hibridación *in situ* fluorescente y citometría de flujo.

Para determinar la cantidad de lactobacilos y bifidobacterias presentes en la materia fecal de los ratones de los grupos que ingirieron kefiran y control

se procedió a marcar las muestras con las sondas fluorescentes anteriormente mencionadas y se realizó la adquisición de eventos en un citómetro de flujo.

La hibridación fue constatada por observación de las muestras en microscopio laser confocal, obteniéndose los mismos resultados que en el caso de las muestras puras, confirmándose la efectividad de la hibridación. En las Figuras 17 a y b se presentan, a modo de ejemplo, una fotografía de una muestra de materia fecal (ratón 1, día 0 de tratamiento) marcada con sonda fluorescente específica para Eubacterias y observada con y sin fluorescencia, respectivamente.

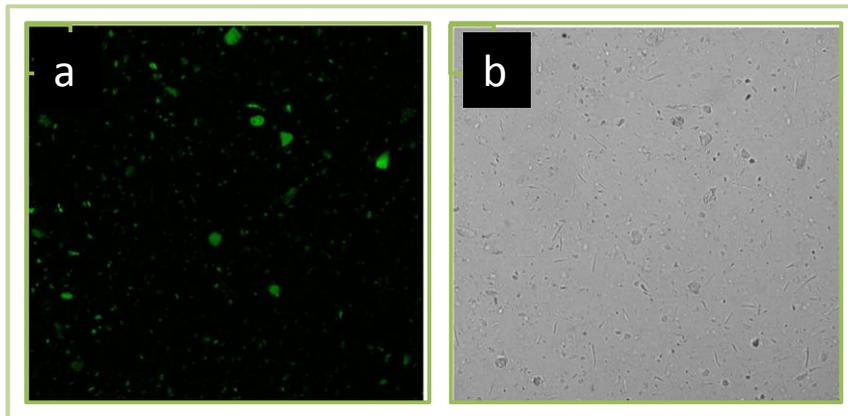


Figura 17 a y b: Microfotografías de un muestra de materia fecal marcada con sonda específica para Eubacteria observadas con y sin fluorescencia, respectivamente.

En la fotografía se pueden observar diferentes estructuras que florecen de manera tal que se observan de color verde. La citometría de flujo permite diferenciar estas partículas por su tamaño y complejidad, por lo tanto este pegado inespecífico de las sondas no generaría errores en la determinación de las poblaciones bacterianas.

Dado que en las muestras se encuentran partículas no bacterianas se seleccionó la zona de trabajo donde se encuentra a esta población. Para ello se marcó una muestra de materia fecal con la sonda fluorescente Eub 338-FITC, se

analizó con el citómetro y se delimitó, en el gráfico de el *side scatter* (SSC) en función de *forward scatter* (FSC), la región donde se encuentran partículas del tamaño y forma adecuadas.

La metodología utilizada para el análisis de resultados se resume en la Figura 18. La Figura 18a muestra a modo de ejemplo un gráfico de puntos que representa la adquisición de eventos en una muestra de materia fecal marcada con la sonda Eub 338-FITC específica para Eubacterias. En este gráfico se representa el *side scatter* (SSC) en el eje “y” en función de *forward scatter* (FSC) en el eje “x”. La región R2 que está delimitada en este gráfico muestra los eventos correspondientes a Eubacterias de los eventos totales de la muestra. Esta zona se delimitó teniendo en cuenta los resultados de la Figura 18b). La figura 18b representa la fluorescencia roja (FL4) en función de la fluorescencia verde esperada para Eubacterias (FL1). Allí se observa la región marcada como R1 que representa la población de bacterias con fluorescencia verde, o sea es representativa de la población de Eubacterias. Con los eventos adquiridos en la región R2 se realizó el gráfico fluorescencia roja (FL4) en función de la fluorescencia verde esperada para Eubacterias (FL1) y se delimitó la región R3 (Figura 18c) para hacer el histograma representado en la Figura 18d) La porción del histograma que está marcada como M1 corresponde al porcentaje de bacterias marcadas.

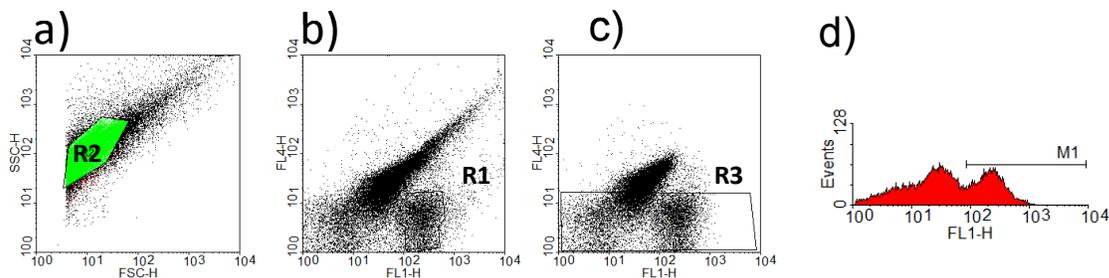


Figura 18: Ejemplo del análisis de datos para el estudio de poblaciones de Eubacterias en materia fecal marcada con la sonda fluorescente Eub 338-FITC por citometría de flujo.

Este mismo análisis se realizó cuando las muestras fueron marcadas con sondas para bifidobacterias y lactobacilos.

Como resultado de la cuantificación de las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos se encontró que en la materia fecal el porcentaje inicial (día 0) de la población de bifidobacterias varió entre 6 y 14 % y la población de lactobacilos entre 30 y 45 %.

La Figura 19 muestra, a modo de ejemplo, el porcentaje de bifidobacterias presente en la materia fecal de un ratón del grupo control (R5) entre los días 0 y 21 del ensayo. Como se puede observar la población de bifidobacterias aumenta de 11 a 17 % entre los días 0 y 14 del ensayo y disminuye hasta su valor inicial el día 21 (11%). El mismo comportamiento, con distintos porcentajes, se observó para los demás ratones de éste grupo.

En la misma Figura (Figura 19) se muestran los porcentajes de bifidobacterias presente en la materia fecal de ratones que ingirieron kefiran (R7, R9 y R11) entre los días 0 y 21 del ensayo. En este grupo de ratones no se observó una tendencia única de aumento o disminución a lo largo del tiempo. El ratón 7 mostró una disminución en el porcentaje de bifidobacterias el día 2 del ensayo y aumento los días 7, 14 y 21. El porcentaje de bifidobacterias en este ratón fue de 14 % el día 0 y de 28 % el día 21. El ratón 9 mostró una disminución del porcentaje de bifidobacterias el día 7 del ensayo y aumento los

días 2, 14 y 21. El porcentaje de bifidobacterias en este ratón fue de 8 % el día 0 y de 26 % el día 21. El ratón 11 mostró una disminución del porcentaje de bifidobacterias los días 2 y 7 y aumento los días 14 y 21. El porcentaje de bifidobacterias en este ratón fue de 9 % el día 0 y de 23 % el día 21

De estos resultados se puede destacar 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 duplican o triplican la cantidad de bifidobacterias en materia fecal entre el día 0 y 21.

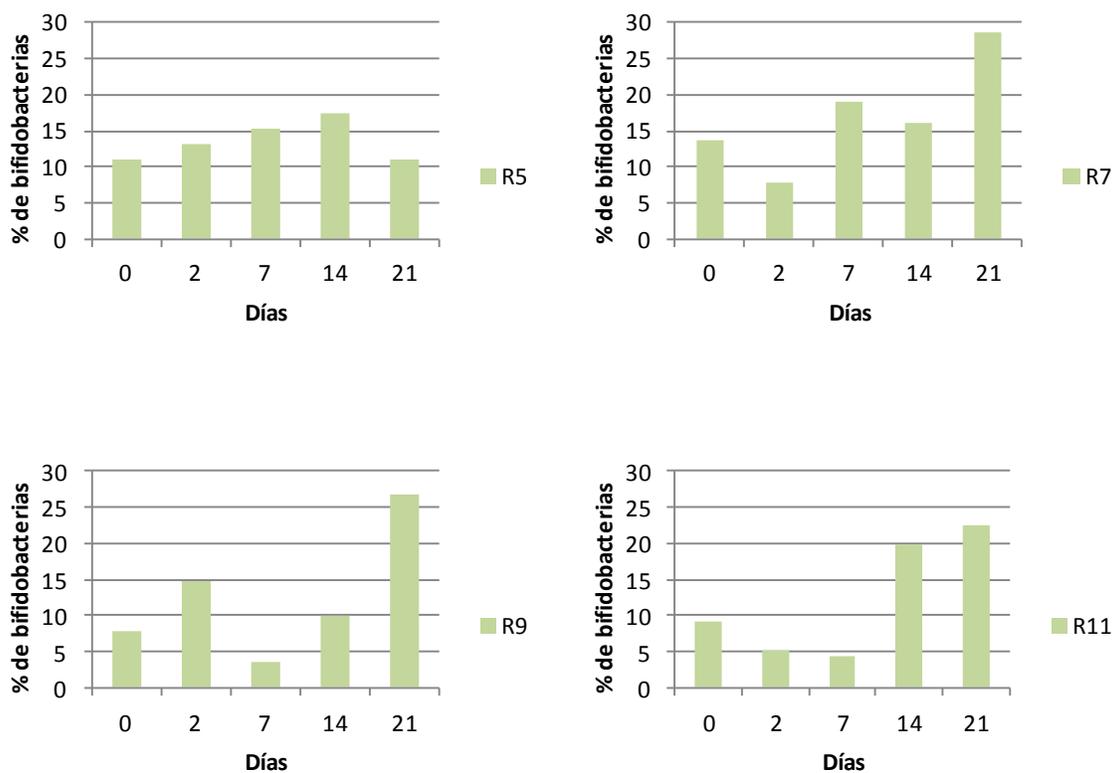


Figura 19: Porcentaje de bifidobacterias presentes en la materia fecal del ratón R5, grupo control y de los ratones R7, R9 y R11, grupo que ingirió kefiran.

La Figura 20 muestra, a modo de ejemplo, los porcentajes de lactobacilos presente en la materia fecal de un ratón del grupo control (R5) entre los días 0 y 21 del ensayo. Como se puede observar la población de lactobacilos se mantiene constante entre los días 0 y 7 (aproximadamente 39 %), disminuye el día 14 (26%) y disminuye, en relación al día 0, el día 21 (34 %). En la misma Figura se muestran los porcentajes de lactobacilos presente en la materia fecal de ratones que ingirieron kefiran (R7, R9 y R11) entre los días 0 y 21 del ensayo. Como se puede observar para este grupo de ratones el porcentaje de lactobacilos tiende a disminuir entre el día 0 y 21. Para el ratón 7 el porcentaje de lactobacilos varió entre 48 y 20 %; para el ratón 9 entre 38 y 28 % y para el ratón 11 entre 30 y 21%, entre los días 0 y 21 del ensayo.

Estos resultados muestran que, tanto en los ratones del grupo control como en los ratones que ingirieron kefiran, el porcentaje de lactobacilos en materia fecal disminuye entre el inicio y el final del ensayo.

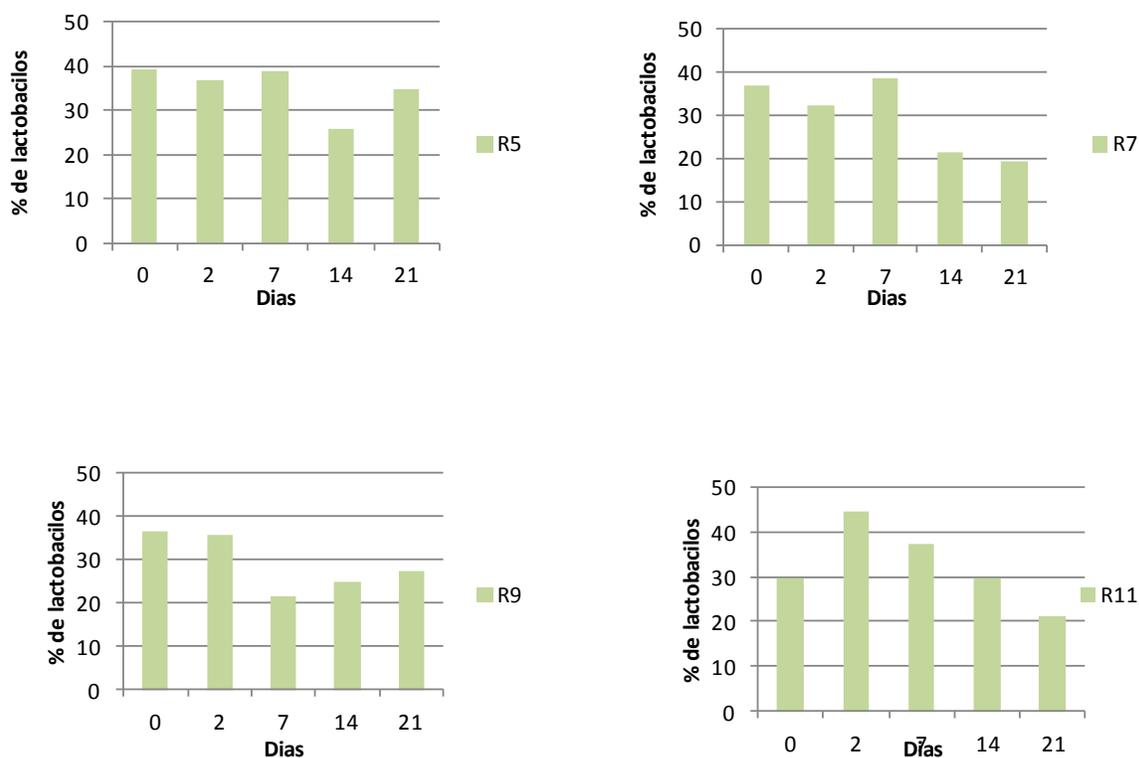


Figura 20: Porcentaje de lactobacilos presentes en la materia fecal del ratón R5, grupo control y de los ratones R7, R9 y R11, grupo que ingirió kefiran.

Si comparamos los resultados obtenidos por PCR-DGGE y FISH-citometría para este ensayo podemos concluir que las tendencias observadas por la primer metodología descrita es confirmada mediante la cuantificación por FISH-citometría. Cuando se analizaron las poblaciones de bifidobacterias en materia fecal por PCR-DGGE se observó un aumento de número de bandas con el tiempo del ensayo para los ratones que consumieron kefiran hecho que se confirmó mediante FISH-citometría. Asimismo cuando se estudiaron las poblaciones de lactobacilos mediante PCR-DGGE en materia fecal de ratones que consumieron kefiran no se observaron nuevas bandas y los resultados de la cuantificación mediante FISH-citometría mostraron una tendencia a disminuir de ésta población.

3.-Efecto de la administración oral del polisacárido producido por *Lb paracasei* CIDCA 83124 sobre la evolución de la microbiota fecal de ratones

El efecto de la administración oral del polisacárido de *Lb paracasei* CIDCA 83124 sobre la evolución de la microbiota fecal de ratones se llevo a cabo utilizando el mismo diseño experimental que para el estudio del efecto de la ingesta de kefiran. Para ello los ratones se dividieron en los siguientes grupos:

Grupo control: (ratones 1 a 6) recibieron una dieta balanceada durante 21 días;

Grupo 83124/21d: (ratones 13 a 18) recibieron una dieta balanceada y se incorporó el polisacárido producido por la cepa CIDCA 83124 en el agua de bebida en una concentración de 300 mg/l.

3.1.- Evolución de poblaciones bacterianas en muestras de materia fecal.

El análisis del efecto de la administración oral del polisacárido del microorganismo CIDCA 83124 sobre la evolución de la microbiota fecal se realizó mediante PCR-DGGE. Las poblaciones celulares que se estudiaron fueron bifidobacterias y lactobacilos.

3.1.1.- Evolución en los perfiles de bifidobacterias y lactobacilos

La Figura 21 muestra, a modo de ejemplo, el perfil electroforético obtenido a partir de la amplificación con oligonucleótidos específicos para el grupo *Bifidobacterium* del ADN extraído de la materia fecal del ratón 14 perteneciente al grupo que ingirió el polisacárido del microorganismo *Lb paracasei* CIDCA 83124 los días 0, 2 , 7, 14 y 21 de tratamiento. Como se puede

observar no hay una cambio detectable por esta técnica en la población de bifidobacterias de la materia fecal de los ratones alimentados con este EPS. Este mismo resultado se observó para todos los ratones de este grupo.

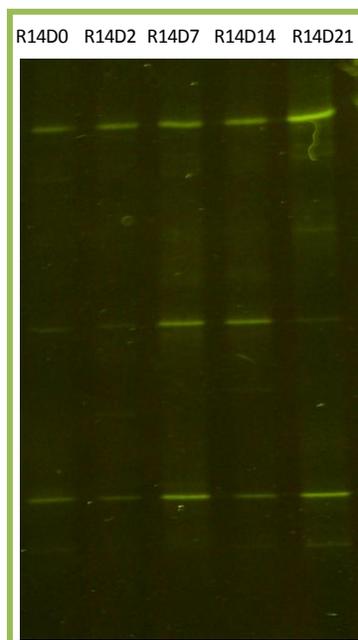


Figura 21: Perfil DGGE de productos de la amplificación de ADN extraído de muestras de materia fecal del ratón 14 (grupo 83124/21d) tomadas los días 0, 2, 7, 14 y 21 de tratamiento. Para la amplificación se utilizaron oligonucleótidos específicos para el género *Bifidobacterium* (Bif164F y Bif662-GC) y el gradiente desnaturalizante fue 45-65%.

En los perfiles obtenidos por amplificación del ADN de la materia fecal de los ratones a los cuales se les administró el polisacárido producido por *Lb paracasei* CIDCA 83124 con oligonucleótidos específicos para lactobacilos se observó bajo número de bandas, no detectándose cambios en los perfiles.

Estos resultados permiten inferir que este polisacárido no es capaz de inducir cambios en las poblaciones específicas de bifidobacterias y lactobacilos en la microbiota de los ratones que lo ingirieron, mostrando una marcada diferencia con los resultados obtenidos para la microbiota de los ratones que ingirieron kefiran. Este polisacárido presenta un peso molecular similar al del kefiran pero está constituido por diferentes monosacáridos ya que posee en su

composición aminoazúcares. Es factible que esta diferencia estructural sea la responsable del diferente comportamiento encontrado en los ensayos *in vivo*.

3.2.- Comparación del efecto del consumo de kefirán y del consumo del polisacárido producido por el *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83124

Se estudiaron el efecto en el peso de los ratones y el efecto en la cantidad de lactobacilos y bifidobacterias viables, mediante recuento en placa, en los ratones del grupo control y los ratones que ingirieron kefirán o el polisacárido producido por *Lb paracasei* CIDCA 83124 en el agua de bebida.

3.2.1.-Peso de los ratones.

Para analizar el efecto de la dieta sobre el peso de los ratones se calcularon las diferencias entre el peso inicial (P_i) y final (P_f) para cada ratón y luego se promediaron los valores obtenidos para los ratones pertenecientes a cada grupo. Los resultados muestran un aumento de peso promedio para el grupo control de 1,07 kg, para el grupo que ingirió kefirán de 1,04 kg y para el grupo que ingirió el polisacárido de *Lb paracasei* CIDCA 83124 de 1,08 kg, siendo estas diferencias no significativas con un 95% de confianza (Figura 22). Por lo tanto podemos decir que la ingesta de ambos polisacáridos en el agua de bebida no provoca cambios significativos en el peso de los ratones no encontrándose una relación con la modificación de las poblaciones de bifidobacterias que se asoció a la ingesta de kefirán

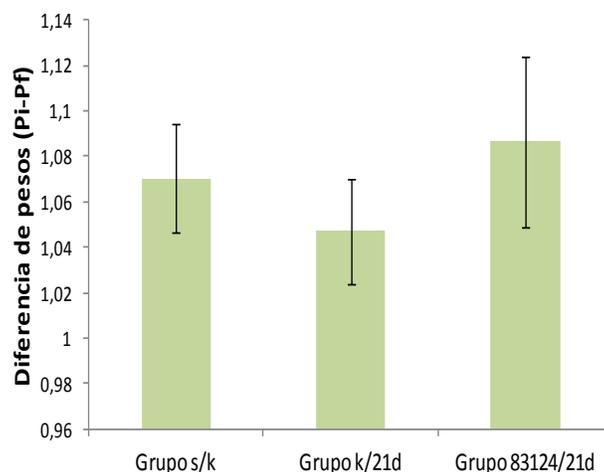


Figura 22: Aumento de peso de los ratones. Valor promedio de las diferencias de peso inicial menos final (Pi-Pf) de los ratones pertenecientes a cada grupo dietario. Grupo s/k: grupo control. Grupo k/21d: grupo suplementado con kefiran (300 mg/L) *ad libitum* en el agua de bebida durante 21 días. Grupo 83124/21d: grupo suplementado con EPS aislado de la cepa *Lb paracasei* CIDCA 83124 (300 mg/L) *ad libitum* en el agua de bebida durante 21 días

3.2.2.- Recuento de microorganismos viables.

Se realizó un recuento total de bifidobacterias y lactobacilos en la materia fecal de cada ratón los días 0 y 21 del ensayo. Los resultados de los recuentos (ufc/ml) se presentan en la Figura 23.

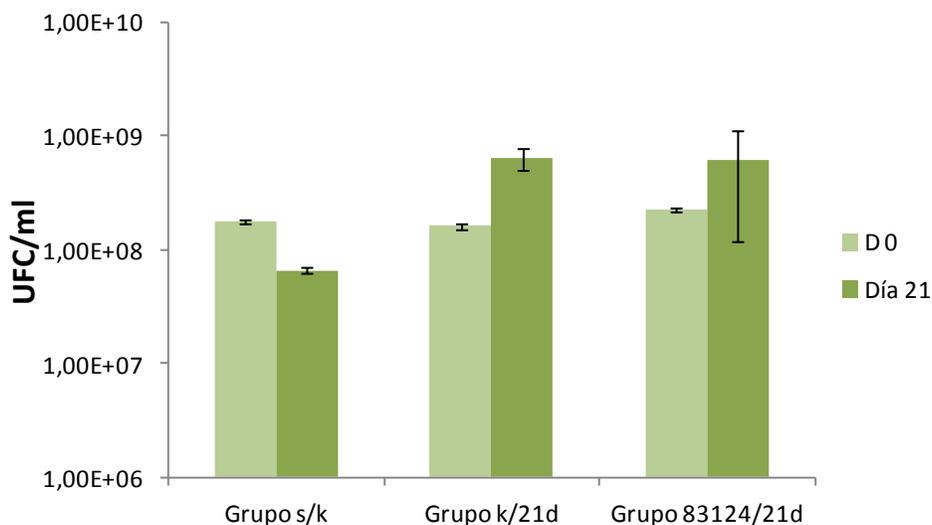


Figura 23: Recuento de lactobacilos y bifidobacterias de materia fecal de animales del grupo s/k, 83124/21d y k/21d en los días 0 y 21 del tratamiento. Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Como resultado se observó en la materia fecal de los ratones del grupo control una disminución en la cantidad de lactobacilos y bifidobacterias entre el inicio y el final del ensayo; en la materia fecal de los ratones del grupo que ingirió el polisacárido de la cepa CIDCA 83124 no se revelaron diferencias en dichas poblaciones. Finalmente, los ratones que ingirieron kefiran mostraron un aumento significativo del número de lactobacilos y bifidobacterias viables en su materia fecal, entre el inicio y el final del ensayo.

A pesar de que mediante esta metodología no se pueden diferenciar las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos, las tendencias encontradas se pueden comparar con los resultados encontrados mediante la cuantificación de bifidobacterias por FISH-citometría y PCR-DGGE para los ratones de los grupos control y los ratones que ingirieron kefiran durante 21 días. Se puede destacar que el aumento que se evidenció en la población de microorganismos viables detectado para el grupo que ingirió kefiran podría estar relacionado al aumento de la población de bifidobacterias de este grupo de ratones.

En cuanto al polisacárido producido por el *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 y demostrando que el efecto modulador de la microbiota es específico para cada molécula.

De acuerdo a los resultados presentados y para considerar al kefiran como prebiótico, éste debe cumplir con una serie de requisitos.

En relación a esto podemos decir que el kefiran es un compuesto correctamente identificado en cuanto a su nombre químico, características físico-química, descripción, fuente y origen, pureza y contaminantes. Además es resistente a la acidez gástrica y no se han documentado riesgos para la salud provocadas por este polisacárido. Los efectos fisiológicos documentados para el kefiran en modelos murinos incluyen actividad inmunomoduladora, anticolesterolémica, antitumoral, antagonista de factores de virulencia de *Bacillus cereus* y antimicrobiano (ítem 2.4.2.- Funcionalidad biológica del kefiran de Introducción General). Por otro lado, los resultados documentados en este capítulo muestran que el kefiran tiene la capacidad de aumentar selectivamente la población potencialmente benéfica de bifidobacterias en la materia fecal de los ratones utilizados. Por lo tanto el kefiran se podría considerar una sustancia potencialmente prebiótica contribuyendo a las propiedades promotoras de la salud que se le atribuyen al kefir.

Conclusiones

- La evaluación de la microbiota fecal de ratones mediante DGGE utilizando oligonucleótidos universales 518R/341F-GC permitió obtener perfiles electroforéticos con un alto número de bandas.
- Triplicar la concentración de ADN molde en la reacción de amplificación con los oligonucleótidos 518R/341F-GC, Lac1/Lac2-GC y Bif164F/Bif662-GC generó amplicones que producen mayor número de bandas en los perfiles electroforéticos.
- Duplicar la cantidad de enzima polimerasa en la reacción de amplificación con los oligonucleótidos Lac1/Lac2-GC y Bif164F/Bif662-GC y mantener la mínima cantidad de enzima polimerasa en la amplificación con los oligonucleótidos 518R/341F-GC fueron las condiciones más eficientes de amplificación.
- El gradiente desnaturizante de urea formamida 40/60 seleccionado para separar electroforéticamente los amplicones obtenidos con los oligonucleótidos 518R/341R-GC y Lac1/Lac2-GC y el gradiente desnaturizante 45/65 seleccionado para separar los amplicones obtenidos con los oligonucleótidos Bif164F/Bif662-GC fueron los que permitieron mejor resolución de las bandas en los geles.
- La microbiota intestinal de los ratones que ingirieron kefirán presentaron un aumento en el número de bandas de los perfiles

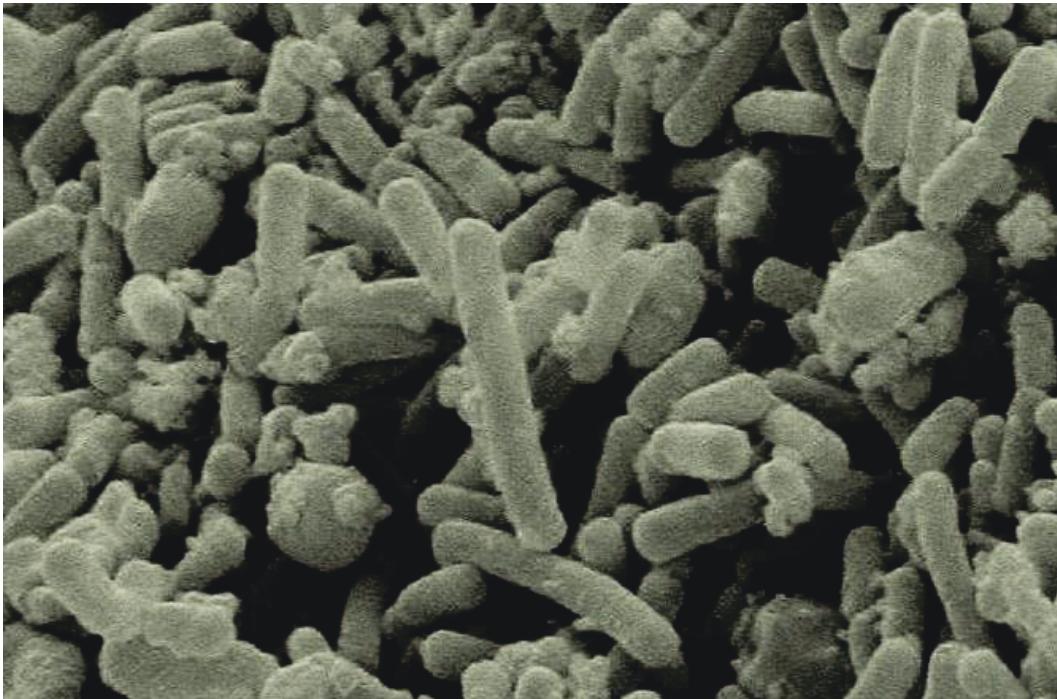
electroforéticos de los productos de amplificación del ADN de contenido intestinal con oligonucleótidos dirigidos a Eubacterias en relación a los ratones control

- Se comprobó, mediante PCR-DGGE, que hay variabilidad en la microbiota intestinal entre ratones.
- Se determinó, mediante secuenciación, que una de las bandas presentes solamente en los ratones que ingirieron kefiran es *Bifidobacterium*.
- Mediante PCR-DGGE específica para el género *Bifidobacterium* se pudo evidenciar una modulación positiva para este género en el contenido intestinal de ratones que consumieron kefiran. Asimismo, no se evidenciaron cambios en la población de lactobacilos, mediante PCR-DGGE específica para este género.
- 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.
- La población de bifidobacterias, evidenciada mediante un aumento de número de bandas en los perfiles PCR-DGGE (específica para bifidobacterias), cambió a partir del día 7 o 14 de ingesta de kefiran dependiendo del ratón analizado. Asimismo, no se evidenciaron cambios de la población de lactobacilos en microbiota intestinal de ratones que consumieron kefiran durante el tiempo del ensayo.
- Se pudieron cuantificar las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos mediante FISH-citometría. Como resultado de la

cuantificaron se obtuvo 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 kefirán duplican o triplican la cantidad de bifidobacterias en materia fecal entre el día 0 y 21.

- La modulación positiva de la población de bifidobacterias debido a la ingesta de kefirán se evidenció tanto en los análisis de contenido intestinal de colon como en los ensayos de evolución de microbiota fecal en el modelo ratón estudiado.
- El polisacárido producido por *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83124 no provocó cambios en las poblaciones no cultivables de lactobacilos y bifidobacterias.
- La ingesta de kefirán y el polisacárido producido por *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83124 no provocaron cambios significativos en el peso de los ratones que los consumieron.
- La población de lactobacilos y bifidobacterias viables en la materia fecal de los ratones que consumieron kefirán aumentó entre el inicio y el final del ensayo. Asimismo, la población de lactobacilos y bifidobacterias viables en materia fecal de ratones que consumieron el polisacárido producido por *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83124 disminuyó entre el inicio y el final del ensayo.
- El aumento en la población de bifidobacterias evidenciado mediante recuento de viables, FISH-citometría y PCR-DGGE en ratones que consumieron kefirán indicaría que éste polisacárido podría considerarse potencialmente prebiótico.

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.

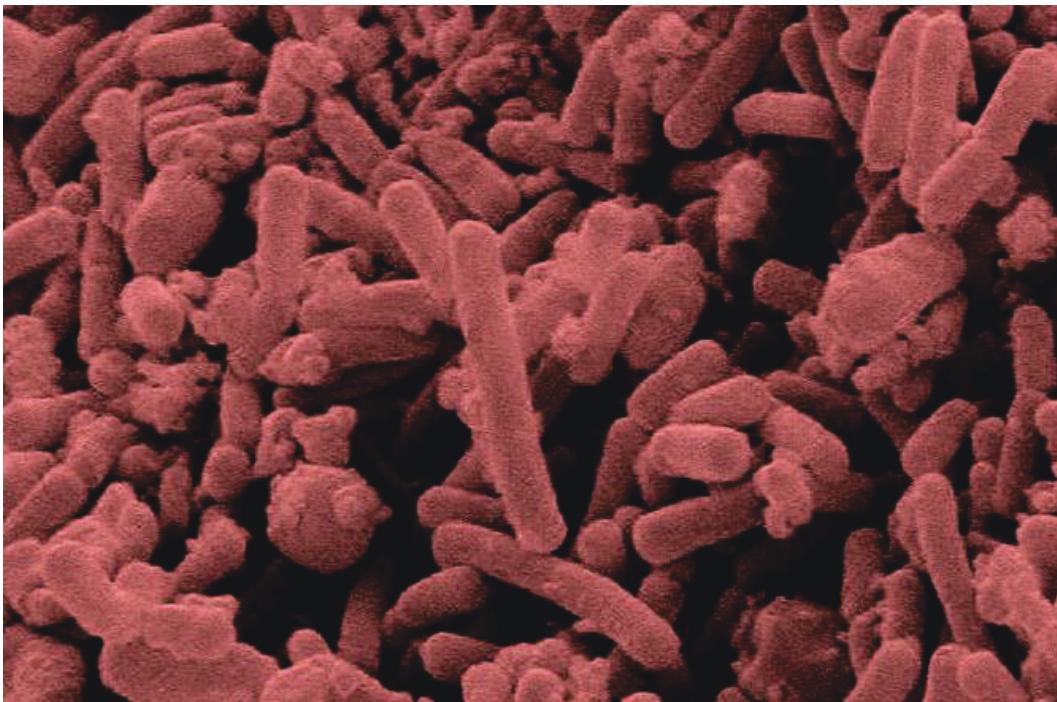
En cuanto al polisacárido producido por la cepa *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83124 no demostró ser efectivo en la modificación de las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos confirmando que el polisacárido producido por este microorganismo es diferente al kefiran. Estos resultados también demuestran 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.

Bibliografía



Referencias Bibliográficas

- Abraham A. G. & de Antoni G. 1999. Characteristics of kefir grain grown in milk and in soy milk. *Journal of Dairy Research*. 66, 327-333.
- Al-Tamimi M. A. H. M., Palframan R. J., Cooper J. M., Gibson G. R. & Rastall R. A. 2006. In vitro fermentation of sugar beet arabinan and rabinoligosaccharides by the human gut microflora. *Journal of Applied Microbiology*. 100, 407-414.
- Amatayakul T., Halmos A. L., Sherkat F., & Shah N. P. 2006. Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharideproducing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*. 16, 40-51.
- Angulo L., Lopez E. & Lema C. 1993. Microflora present in kefir grains of the Galician Region (North-West of Spain). *Journal of Dairy Research*. 60, 263-267
- Babel S., Bernardi T. & Michaud P. 2011. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*. 29, 54–66
- Bassete R. & Acosta J. S. 1988. Composition of milk products. In *Fundamentals of Dairy Chemistry*, 3rd ed. Ed.: Wong. N. P. 39-79. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Biedrzycka E. & Bielecka M. 2004. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends in Food Science & Technology*. 15, 170–175.
- Blaut M., Collins M. D., Welling G. W., *et al.* 2002. Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. *British Journal Nutrition*. 87, Suppl. 2, S203–S211.
- Boon N., De Windt W., Verstraete W. & Top E. M. 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from

different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*. 39, 101–112.

- Bosch A., Golowczyc M., Abraham A. G., Garrote G. L., De Antoni G., & Yantorno O. 2006. Rapid discrimination of *Lactobacilli* isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology*. 111, 280–287.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Brosius J., Dull T. J., Sleeter D. D. & Noller H. F. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*. 148, 107–127.
- Canquil N., Villarroel M., Bravo S., Rubilar M. & Shene C. 2007. Behavior of the rheological parameters of exopolysaccharides synthesized by three lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*. 68, 270-279.
- Cerning J. & Marshall V. M. 1999. Exopolysaccharides produced by the dairy lactic acid bacteria. *Recent Research and Developments in Microbiology*. 3, 195–209.
- Chen H. C., Wang S. Y. & Chen M. J. 2008. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*. 25, 492–501.
- Cinquin C., Le Blay G., Fliss I. & Lacroix, C. 2006. Comparative effects of exopolysaccharides from lactic acid bacteria and fructo-oligosaccharides on infant gut microbiota tested in an in vitro colonic model with immobilized cells. *FEMS Microbiology Ecology*. 57, 226-238.
- Clark A. H. & Ross-Murphy S. B. 1987. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advances in Polymer Science*. 83, 57–192.

- Código Alimentario Argentino. Resolución Conjunta 261/2011 y 22/2011. BOLETIN OFICIAL N° 32.279. pp 22-23.
- Código Alimentario Argentino. Resolución Conjunta 229/2011 y 731/2011. BOLETIN OFICIAL N° 32.304. pp 5-6.
- Cocolin L., Manzano M., Cantoni C. & Comi G. 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 5113–5121.
- Colwell R. R. 1970. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *Journal of Bacteriology*. 104, 410–433.
- Costas M. 1992. Classification, identification, and typing of bacteria by the analysis of their one-dimensional polyacrylamide gel electrophoretic protein patterns. *Advances in Electrophoresis*. 5, 351–408.
- Cummings J. H., Antoine J-M., Azpiroz F., *et al.* 2004. Gut health and immunity. *European Journal of Nutrition*. 43, 118–73.
- Da Cruz Pedrozo Miguel M. G., Gomes Cardoso P., de Assis Lago L. & Freitas Schwan R. 2010. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. *Food Research International* 43, 1523–1528.
- Dal Bello F., Walter J., Hartel C. & Hammes W. P. 2001. *In vitro* study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from *Lactobacilli* and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *Systematic & Applied Microbiology*. 24, 232-237.
- de Araújo J. C., Schneider P. R. 2008. DGGE with genomic DNA: Suitable for detection of numerically important organisms but not for identification of the most abundant organisms. *Water Research*. 42, 5002-5010.

- De Man J. C., Rogosa M. & Sharpe M. 1960. A medium for cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. 23, 130-135.
- de Moreno de LeBlanc A., Matar C., Farnworth E. & Perdigon G. 2007. Study of immune cells involved in the antitumor effect of kefir in a murine breast cancer model. *Journal Dairy Science*. 90, 1920–1928.
- De Vrese M., Keller B. & Barth C. A. 1992. Enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by microbial β -galactosidase (EC 3.2.1.23) of kefir. *British Journal of Nutrition*. 67, 67-75.
- De Vuyst L. & Degeest B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 23, 153-177.
- De Vuyst L. & Vaningelgem F. Developing new polysaccharide. 2004. In: *Texture in Food*. Ed: McKenna B. M. pp 27-308. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, England.
- De Vuyst L., De Vin F., Vaningelgem F. & Degeest B. 2001. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 11, 687-707.
- Delfederico L., Hollmann A., Martínez M., Iglesias N. G., De Antoni G. & Semorile L. 2005. Molecular identification and typing of *lactobacilli* isolated from kefir grains. *Journal of Dairy Research*. 73, 20-7.
- Dellaglio F. & Felis G. E. 2005. Taxonomy of *lactobacilli* and *bifidobacteria*. In: *Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects*, pp. 25–50. Eds.: Tannock G.W. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Dellaglio F., Felis G. & Torriani S. 2002. The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52, 285–287.

- Dinoto A., Marques T. M., Sakamoto K., Fukiya S., Watanabe J., Ito S. & Yokota A. 2006b. Population dynamics of *Bifidobacterium* species in human feces during raffinose administration monitored by fluorescence *in situ* hybridization-flow cytometry. *Applied And Environmental Microbiology*. 72, 7739–7747.
- Dinoto A., Suksomcheep A., Ishizuka S., Kimura H., Hanada H., Kamagata Y, Asano K., Tomita F. & Yokota A. 2006a. Modulation of rat cecal microbiota by administration of raffinose and encapsulated *Bifidobacterium breve*. *Applied And Environmental Microbiology*. 72, 784–792.
- Dobson A., O'Sullivan O., Cotter P. D., Ross P. & Hill C. 2011. High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain. *FEMS Microbiology Letters*. 320, 56-62.
- Dore J., Sghir A., Hannequart-Gramet G., Corthier G. & Pochart P. 1998. Design and evaluation of a 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe for specific detection and quantitation of human faecal *Bacteroides* populations. *Systematic and Applied Microbiology*. 21, 65–71.
- Duboc P. & Mollet B. 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*. 11, 759-768.
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. & Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28, 350-356.
- Eisen J. A. 1995. The RecA protein as a model molecule for the molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of RecAs and 16S RNA from the same species. *Journal of Molecular Evolution*. 41, 1105–1123.
- Engel G., Krusch U. & Teuber M. 1986. Microbiological composition of kefir I. Yeasts. *Milchwissenschaft*. 41, 418-421.

- Ercolini D., Moschetti G., Blaiotta G. & Coppola S. 2001. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of important lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Current Microbiology*. 42, 199–202.
- Faber E. J., Zoon P., Kamerling J. P. & Vliegenthart J. F. G. 1998. The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. *Carbohydrate Research*. 310, 269-276.
- FAO/WHO. 2001. CODEX Standard for Fermented Milks #243. http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.jsp
- FAO/WHO. 2002. Conceptos sobre alimentos funcionales. <http://www.argenbio.org/adf/uploads/pdf/alimentosfuncionalesiLSI.pdf>
- Farnworth E. R., 2005. Kefir: a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*. 2, 1–17.
- Farrelly V., Rainey F. A. & Stackebrandt E. 1995. Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 2798–2801.
- Felis G. E. & Dellaglio F. 2007. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 8, 44–61.
- Felske A., Adl A. & Vos M. W. 1998. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperatura gradient gel electrophoresis fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 4581-4587.
- Fernandez E., Bienvenu T., Arramond F. D., Beldjord KKaplan., J. C. & Beldjord C. 1993. Use of chemical clamps in denaturing gradient gel electrophoresis: application in the detection of the most frequent Mediterranean beta-thalassemic mutations. *PCR Methods and Applications*. 3, 122–124.

- Ferris M. J. & Ward D. M. 1997. Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied And Environmental Microbiology*. 63, 1375–1381
- Folkenberga D. M., Dejmekc P, Skriverb A., Guldagerb H. S. & Ipsen R. 2006. Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yoghurt cultures. *International Dairy Journal*. 16, 111-118
- Font de Valdez G., Torino M. I., De Vuyst L. & Mozzi F. 2003. Food-grade heteropolysaccharides: ongoing research and future trends of biopolymers from lactic acid bacteria. *Applied biotechnology food science and policy*. 1, 223-234.
- Fontán M. C. G., Martínez S., Franco I., & Carballo J. 2006. Microbiological and chemical changes during the manufacture of Kefir made from cow's milk, using a commercial starter culture. *International Dairy Journal*. 16, 762–767.
- Fujisawa T., Adachi S., Toba T., Arihara K., & Mitsuoka T. 1988. *Lactobacillus kefiranofaciens* sp. nov. isolated from kefir grains. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 38, 12–14.
- Furukawa N., Iiyama R., Takahashi T. & Yamanaka Y. 1992. Effect of oral administration of water soluble fraction from kefir grain on antibody production in mice. *Animal Science Technology*. 63, 428-436.
- Furuno T. & Nakanishi M. 2012. Kefiran Suppresses Antigen-Induced Mast Cell Activation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 35, 178—183.
- Garrity G. M., Bell J. A. & Lilburn T. G. 2004. Taxonomic Outline of the Procaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, Release 5.0, Springer-Verlag, New York. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200405>.

- Garrote G. L., Abraham A. G. & De Antoni G. L. 1998. Characteristics of kefir prepared with different grain: milk ratios. *Journal of Dairy Research*. 65, 149-154.
- Garrote G., Abraham A.G., & De Antoni G. 2001. Chemical and microbiological characterization of kefir grains from different origins. *Journal of Dairy Research* 68, 639–652.
- Garrote G. L., Abraham A. G. & De Antoni G. L. 2010. Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink. In *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. 18, 327-340. Ed. Mozzi F., Raya R. & Vignolo G. M.
- Gevers D., Huys G. & Swings J. 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*. 205, 31-36.
- Gevers D., Cohan F. M., Lawrence J. G., Spratt B. G., Coenye T., Feil E. J., Stackebrandt E., Van de Peer Y., Vandamme P., Thompson F.L. & Swings J. 2005. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*. 3, 733–739.
- Gibson G. & Roberfroid M. 1995. Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*. 125, 1401-1412.
- Gibson G. R., Beatty E. R., Wang X., *et al.* 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*. 108, 975–982.
- Golowczyc M. A., Mobili P., Garrote G. L., Abraham A. G. & De Antoni G. L. 2007. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Internationaal Journal Food Microbiology*. 118, 264–273.

- Golowczyc M. A., Gugliada M. J., Hollmann A., Delfederico L, Garrote G. L., Abraham A. G., Semorile L. & De Antoni G. L. 2008. Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: potential use as probiotic. *Journal Dairy Reserch.* 75, 211-217.
- Gomez-Zavaglia A., Abraham A., Giorgieri S. & De Antoni G. 1999. Application of polyacrylamide gel electrophoresis and capillary gel electrophoresis to the analysis of *Lactobacillus delbrueckii* whole-cell proteins. *Journal of Dairy Science.* 82, 870-877
- Gorret N., Renard C. M. G. C., Famelart M. H., Maubois J. L. & Doublier J. L. 2003. Rheological characterization of the EPS produced by *P. acidipropionici* on milk microfiltrate. *Carbohydrate Polymers.* 51, 149-158.
- Green G. L., Brostoff J., Hudspith B., *et al.* 2006. Molecular characterization of the bacteria adherent to human colorectal mucosa. *Journal of Applied Microbiology.* 100, 460-469.
- Guarner F. & Malagelada J. R. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet.* 361, 512-519.
- Gulmez M. & Guven A. 2003. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 4b and *Yersinia enterocolitica* O3 in different yogur and kefir combinations as prefermentation contaminant. *Journal of Applied Microbiology.* 95, 631-636.
- Haarman M. & Knol J. 2005. Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied And Environmental Microbiology.* 71, 2318-2324.
- Halle' C., Leroi F., Dousset X. & Pidoux M. 1994. Les kefirs. Des associations bacteries lactique-levures. In: *Bacteries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques.* 2, 169-182. Eds.: de Roissart, H. & Luquet, F. M.

- Hammes W. P. & Vogel R. F. 1995. The genus *Lactobacillus*. In: The Genera of Lactic Acid Bacteria. vol. 2, pp. 19–54. Eds.: Wood B. J. B. & Holzapfel W.H. Blackie Academic & Professional (UK).
- Hammes W.P. & Hertel C. 2003. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: The Prokaryotes Release 3.15. Ed.: Martin Dworkin
- Hansen M. C., Tolker-Nielsen T., Givskov M. & Molin S. 1998. Biased 16S rDNAPCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. FEMS Microbiology Ecology. 262, 141-149.
- Harmsen H. J. M., Raangs G. C., He T., Degener J. E. & Welling G. W. 2002. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. Applied Environmental Microbiology. 68, 2982–2990.
- Hassan A. N., Frank J. F., Schmidt K. A. & Shalabi S. I. 1996. Rheological properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. Journal of Dairy Science. 79, 2091–2097.
- Hassan A. N., Frank J. F., & Qvist K. B. 2002. Direct observation of bacterial exopolysaccharides in dairy products using confocal scanning laser microscopy. Journal Dairy Science. 85,1705–1708.
- Hassan A. N., Ipsen R., Janzen T. & Qvist K. 2003. Microstructure and rheology of yogurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharide. Journal of Dairy Science. 86, 1632-1638.
- Hertzler S. R. & Clancy S. M. 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. Journal of the American Dietetic Association. 103, 582-587.
- Heuer H. & Smalla K. 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. In: Modern Soil Microbiology. Eds.: van Elsas J. D., Trevors J. T. & Wellington E. M. H. Marcel Dekker, New York. pp. 353–373

- Hill M. J. 1997. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *European Journal of Cancer* prev. 6, 43-45
- Hugo A., Kakisu E., De Antoni G. & Perez P. F. 2008. Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* *in vitro*. *Letter in Applied Microbiology*. 46, 613-619.
- Huys G., Vanhoutte T., & Vandamme P. 2008. Application of sequence-dependent electrophoresis fingerprinting in exploring biodiversity and population dynamics of human intestinal microbiota: what can be revealed?. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 1-26
- Itoh K., Toba T, Itoh T. & Adachi S. 1992. Properties of β -galactosidase of *Lactobacillus kefirifaciens* K-1 isolated from kefir grains. *Letters in Applied Microbiology*. 15, 232-234.
- Jacquet J. & Thevenot R. 1961. Le lait et le froid. 216-218. Ed.: J.B. Baillière, Paris.
- Jianzhong Z., Xiaoli L., Hanhu J. & Mingsheng, D. 2009. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*. 26, 770-775.
- Jolly L., Vincent S. J. F., Duboc P., & Neeser J. R. 2002. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 82, 367-374.
- Kakisu E. J., Abraham A. G., Pérez P. F. & De Antoni G. L. 2007. Inhibition of *Bacillus cereus* in milk fermented with kefir grains. *Journal of Food Protection*. 70, 2613-2616.
- Kanagawa T. 2003. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 96, 317-323.
- Kandler O. & Kunath P. 1983. *Lactobacillus kefir* sp. Nov., a component of the microflora of kefir. *Systematic and Applied Microbiology*. 4, 286-294.

- Kaufmann P., Pfefferkorn A., Teuber M. & Meile L. 1997. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Applied Environmental Microbiology*. 63, 1268–1273.
- Kersters K., Pot B., Dewettinck D., Torck U., Vancanneyt M., Vauterin L. & Vandamme P. 1994. Bacterial diversity and systematics. In: Identification and typing of bacteria by protein electrophoresis, p. 51–66. Eds.: Priest F. G., Ramos-Cormenzana A., & Tyndall B. Plenum Press, New York.
- Kesmen Z. & Kacmaz, N. 2011. Determination of lactic microflora of kefir grain and kefir beverage by using culture dependent and culture independent methods. *Journal of Food Science*. 76, M276–M283.
- Keswani J. & Whitman W. B. 2001. Relationship of 16S rRNA sequence similarity to DNA hybridization in prokaryotes. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 51, 667–678.
- Kimmel S. A. & Roberts R. F. 1998. Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR. *International Journal of Food Microbiology*. 40, 87–92.
- Kleerebezem M., van Kranenburg R., Tuinier R., Bolees I. C., Zoon P., Looijesteijn E., Hugenholtz J. & de Vos W. M. 1999. Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*: from genetic engineering to improved rheological properties? *Antonie van Leeuwenhoek*. 76, 357-365.
- Kolida S. & Gibson G. R. 2007. Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *Journal Nutrition*. 137, 2503S–2506S.
- Kooiman P. 1968. The chemical structure of kefirin, the water-soluble polysaccharide of kefir grain. *Carbohydrate Research*. 7, 200-211.
- Korakli M., Ganzle M. G. & Vogel R.F. 2002. Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Journal of Applied Microbiology*. 92, 958–965.

- Koroleva, N. S. 1982. Special products (kefir, koumyss, etc.). Proceedings.
- Koroleva N. S. 1988. Starters for fermented milks, section 4: kefir and kumys starters. Bulletin of the International Dairy Federation. 227, 35-40.
- Koroleva, N.S. 1991. Products prepared with lactic acid bacteria and yeasts. In: Therapeutic properties of fermented milks. 159-179. Ed.: Robinson, R. K., Elsevier Applied Sciences Publishers, London, UK.
- Kruse H. P., Kleessen B. & Blaut M. 1999. Effects of inulin on faecal bifidobacteria in human subjects. British Journal of Nutrition. 82, 375-382.
- Kuo Ch. Y. & Lin Ch. W. 1999. Taiwanese kefir grains: their growth, microbial and chemical composition of fermented milk. Australian Journal of Dairy Technology. 54, 19-23.
- Kwon O. K., Ahn K. S., Lee M. Y., Kim S. Y., Park B. Y., Kim M. K., Lee I. Y., Oh S. R. & Lee H. K. 2008. Inhibitory effect of kefiran on ovalbumin-induced lung inflammation in a murine model of asthma. Archives of Pharmacal Research. 31, 1590-1596.
- La Riviere J. W. M., Kooiman P. & Schmidt K. 1967. Kefiran, a novel polysaccharide produced in the Kefir grain by *Lactobacillus brevis*. Archiv für Mikrobiologie. 59, 269-278.
- Laemmli U. K. 1973. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227, 680-685.
- Langlands S. J., Hopkins M. J., Coleman N., *et al.* 2004. Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel. Gut. 53, 1610-1616.
- Latorre-García L., Castillo-Agudo L. & del Polaina J. 2007. Taxonomical classification of yeast isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. World Journal Microbiology and Biotechnology. 23, 785-791.

- Lee M. Y., Ahn K. S., Kwon O. K., Kim M. J., Kim M. K., Lee I. Y., Oh S. R. & Lee H. K. 2007. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. *Immunobiology*. 212, 647-654.
- Lin C. W. & Kuo C. Y. 1999. Identification and characterization of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. *Australian Journal of Dairy Technology*. 54, 14-18
- Liu J-R., Wang, S-Y., Lin Y-Y. & Lin C-W. 2002. Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. *Nutrition and Cancer*. 44, 182-187.
- Lloyd A. T. & Sharp P. M. 1993. Evolution of the recA gene and the molecular phylogeny of bacteria. *Journal of Molecular Evolution*. 37, 399-407.
- Londero A., Hamet M. F., De Antoni G. L., Garrote G. L., & Abraham A. G. 2012. Kefir grains as starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterization. *Journal of Dairy Research*. Artículo en prensa.
- Looijesteijn P. J., Trapet L., de Vries E., Abee T. & Hugenholtz. J. 2001. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*. 64 71-80.
- Lopitz-Otsoa F., Rementeria A., Elguezabal N. & Garaizar, J. 2006. Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micología*. 23, 67-74.
- Macfarlane S., Macfarlane G. T., & Cummings J. H. 2006. Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 24, 701-714.
- Maeda H., Zhu X., Suzuki S., Suzuki K. & Kitamura S. 2004a. Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* WT-2B(T). *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 52, 5533-5538.

- Maeda H., Zhu X., Omura K., Suzuki S. & Kitamura S. 2004b. Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. *Biofactors*. 22, 197-200.
- Manning T. S., Rastall R. & Gibson G. 2004. Prebiotics and Lactic Acid Bacteria. In *Lactic Acid Bacteria*. Eds.: Salminen S, von Wright A., Ouwehand A.
- Margulis L. 1996. From kefir to death. In: *How things are*. 69-78. Eds.: Brockman, J. & Matson, K. William Morrow & Co., New York, USA.
- Marquina D., Santos A., Corpas I., Munoz J., Zazo J. & Pienado J.M. 2002. Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel. *Letters in Applied Microbiology*. 35, 136-140.
- Marshall V. M., Cole W. M. & Farrow J. A. E. 1984. A note on the heterofermentative *Lactobacillus* isolated from kefir grains. *Journal of Applied Bacteriology*. 56, 503-505.
- Marshall V. M. 1993. Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. *Journal Society Dairy Technology*. 46, 49-56.
- Marshall V. M., Cowie E. N. & Moreton R. S. 1995. Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LC330. *Journal of Dairy Research*. 62, 621-628.
- Marshall V. M. & Rawson H. L. 1999. Effects of exopolysaccharide produced by strain of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yogurt. *International Journal of Food Science & Technology*. 34, 137-143.
- Medrano M., Perez P. F. & Abraham A. G. 2008. Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *International Journal of Food Microbiology*. 122, 1-7.

- Medrano M., Hamet M. F., Abraham A. G. & Pérez P. F. 2009. Kefiran protects Caco-2 cells from cytopathic effects induced by *Bacillus cereus* infection. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*. 96, 505-513
- Medrano M., Racedo S. M., Rolny I, Abraham A. G. & Perez P. F. 2011. Oral administration of kefir induces changes in the balance of immune cells in a murine model. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 59, 5299–5304.
- Miambi E., Guyot J. P. & Ampe F. 2003. Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent. *International Journal of Food Microbiology*. 82, 111–120.
- Micheli L., Uccelletti D., Palleschi C., Crescenzi V. 1999. Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefir. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53, 69–74.
- Mitsue T., Tachibana K. & Fujio Y. 1998. Isolation of kefir producing lactic acid bacteria from kefir grain and improvement of kefir productivity. *Seibutu-Kogaku Kaishi*. 76, 447–450.
- Mitsuoka T., Hidaka H. & Eida T. 1987. Effect of fructooligosaccharides on intestinal microflora. *Nahrung*. 31, 427–436.
- Miyamoto M., Seto Y., Nakajima H., Burenjargal S., Gombojav A., Demberel S. & Miyamoto T. 2010. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Lactic Acid Bacteria and Yeasts in Traditional Mongolian Fermented Milk. *Food Science and Technology Research*. 16 , 319 – 326.
- Molska I., Moniuszco I., Komorows K. A. M. & Merilanen V. 1983. Characteristics of bacilli of *Lactobacillus casei* species appearing in kefir grains. *Acta Alimentaria PoloUnica*. 9, 80-88

- Monchois V., Willemot R.-V., & Monasn P. 1999. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS Microbiology Review*. 23, 131-151.
- Monsan P., Bozonnet S., Albenne C., Joucla G., Willemot R. M. & Remaud-Simeon M. 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 11, 675-685.
- Montesi A., García-Albiacha R., Pozueloa M. J., Pintado C., Gonñic I. & Rotgerb R. 2005. Molecular and microbiological analysis of caecal microbiota in rats fed with diets supplemented either with prebiotics or probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 98, 281– 289.
- Mozzi F., Savoy de Giori G. & Font de Valdez G. 1996. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* in milk under different growth conditions. *Milchwissenschaft*. 51, 670-673.
- Mozzi F., Vaningelgem F., Hébert E. M., Van der Meulen R., Foulquié Moreno M. R., Font de Valdez G. & De Vuyst L. 2006. Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Applied and environmental microbiology*. 72, 4431–4435.
- Mukai T., Toba T., Itoh T. & Adachi S. 1988. Structural Microheterogeneity of Kefiran from Kefir Graiss. *Japanese Journal of Zootechnical Science*. 59, 167-176.
- Mukai T., Toba T., Itoh T., Nimura T. & Adachi, S. 1990. Carboxymethyl kefirin: preparation and viscometric properties. *Journal of Food Science*. 55, 1483-1484.
- Mukai T., Watanabe N., Toba T., Itoh T. & Adachi S. 1991. Gel-Forming Characteristics and Rheological Properties of Kefiran. *Journal of Food Science*. 56, 1017-1018.
- Mukai T., Onose Y., Toba T. & Itoh T. 1992. Presence of glycerol teichoic acid in the cell wall of *Lactobacillus kefiranofaciens*. *Letters in Applied Microbiology*. 15, 29-31.

- Murofushi M., Shiomi M. & Aibara K. 1983. Effect of orally administered polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*. 36, 49-53.
- Murofushi M., Mizuguchi J., Aibara K. & Matuhasi T. 1986. Immunopotentiative effect of polysaccharide from kefir grain, KGF-C, administered orally in mice. *Immunopharmacology*. 12, 29-35.
- Murphy K., Travers P. & Walport M. 2008. The Mucosal Immune System. In Janeway's *Immunobiology*, 7th ed. pp: 459-495. Eds: Murphy K.; Travers P. & Walport M. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. New York.
- Muyzer G., De Waal E. & Uiterlinden A. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59, 695-700.
- Muyzer G. & Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73, 127-141.
- Muyzer G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. 2, 317-322.
- Naser S., Thompson F. L., Hoste B., Gevers D., Dawyndt P., Vancanneyt M. & Swings J. 2005. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology*. 151, 2141-2150.
- Naser S., Dawyndt P., Hoste B., Gevers D., Vandemeulebroecke K., Cleenwerck I., Vancanneyt M., & Swings J. 2007. Identification of *Lactobacilli* by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57, 2777-2789

- Ninane V., Mukandayambaje R. & Berben G. 2007. Identification of lactic acid bacteria within the consortium of a kefir grain by sequencing 16S rDNA variable regions. *Journal of AOAC International*. 90, 1111-1117.
- Nübel U., Engelen B., Felske A., Snaidr J., Wieshuber A., Amann R.I., Ludwig W. & Backhaus H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*. 178, 5636–5643.
- Ohya T., Kubo M. & Watase H. 1988. Electrophoretic protein patterns in *Campylobacter* species with special reference to *Campylobacter mucosalis* and *Campylobacter hyointestinalis*. *Japanese Journal of Veterinary Research*. 50, 692–698.
- Oliveira R. P. D. S., Perego P., Oliveira M. N. D. & Converti A. 2011. Effect of inulin as prebiotic and synbiotic interactions between probiotics to improve fermented milk firmness. *Journal of Food Engineering*. 107, 36-40.
- Otes S. & Cagindi O. 2003. Kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspect. *Pakistan Journal Nutrition*. 2, 54-59.
- Ottogalli G., Galli A., Resmini P. & Volonterio G. 1973. Composizione microbiologica, chimica ed ultraestructura dei granuli di kefir. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*. 23, 109-121
- Ouwehand A. C., Niemi P. & Salminen S. J. 1999. The normal faecal microbiota does not affect the adhesion of probiotic bacteria in vitro. *FEMS Microbiol Letters*. 177, 35-38.
- Petry S., Furlan S., Waghorne E., Saulnier L., Cerning J., & Maguin E. 2003. *FEMS Microbiology Letter*. 221, 285.
- Piermaria J., de la Canal M. & Abraham A. G. 2008. Gelling properties of Kefiran, a food grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids*. 22, 1520-1527.

- Piermaria J., Pinotti A., García M. A., & Abraham A. G. 2009. Films based on kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: development and characterization. *Food Hydrocolloids*. 23, 684-690.
- Piermaria J., Bosch A., Pinotti A., Yantorno O., Garcia M. A. & Abraham A. G. 2011. Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food Hydrocolloids*. 25, 1261-1269.
- Pilosof A. M. R. Gelificación. 2000. In *Caracterización funcional estructural de proteínas*. Eds: Pilosof A. M. R., Bartholomai B.
- Pintado M. E., Lopes Da Silva J. A., Fernandes P. B., Malcata F. X. & Hogg T. A. 1996. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. *International Journal of Food Science & Technology*. 31, 15-26.
- Powell J. E, Witthuhn R.C, Todorov S. D & Dicks. L. M. T. 2007. Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *International Dairy Journal*. 17, 190-198.
- Renard D., van de Velde F. & Visschers R. W. 2006. The gap between food gel structure, texture and perception. *Food Hydrocolloids*. 20, 423-431.
- Rimada P. S. & Abraham A. G. 2001. Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *Journal of Dairy Research*. 68, 653-661.
- Rimada P. S. & Abraham A. G. 2003. Comparative study of different methodologies to determine the exopolysaccharide produced by kefir grains in milk and whey. *Le lait*. 83, 79-88.
- Rimada P. S. & Abraham A. G. 2006. Kefiran improves rheological properties of glucono-delta-lactone induced skim milk gels. *International Dairy Journal*. 16, 33-39.
- Roberfroid M. B., Bornet F., Bouley C., Cummings J. H., 1995. Colonic microflora: nutrition and health: summary and conclusion of an international Life Science Institute (ILSI) (Europe). 53, 127-30.

- Roberfroid M. B. 1998. Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. *British Journal of Nutrition*. 80, S197–S202.
- Roberfroid M. B., Van Loo J. A., Gibson G. R. 1998. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *Journal Nutrition*. 128, 11-9.
- Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B, Guarner F, Respondek F, Whelan K, Coxam V, Davicco MJ, Léotoing L, Wittrant Y, Delzenne NM, Cani PD, Neyrinck AM, Meheust A. 2010. Prebiotic concept and health. *British Journal of Nutrition*. 2, S1-S63
- Rodrigues K. L., Carvalho J. C. & Schneedorf J. M. 2005a. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. *Inflammopharmacology*. 13, 485-492.
- Rodrigues K. L., Caputo L. R., Carvalho, J. C., Evangelista J. & Schneedorf J. M. 2005b. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 25, 404-408.
- Rohm H., Eliskases-Lchner F. & Brauer M. 1992. Diversity of yeasts in selected dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*. 72, 370-376.
- Rohm H., & Kovac A. 1994. Effects of starter cultures on linear viscoelastic and physical properties of yogurt gels. *Journal of Texture Studies*, 25, 311–329.
- Rosado A. S., Duarte G. F., Seldin L. & van Elsas J. D. 1998. Genetic diversity of nifH gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 4:2770–2779.
- Rosi J. & Rossi, J. 1978. I microorganismi del kefir: I fermenti lattici. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*. 29, 291-305.
- Rosselló-Mora R. & Amann R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Review*. 25, 39–67.

- Ross-Murphy S. B. 1995. Rheology of biopolymer solutions and gels. In *New Physico-Chemical Techniques for the Characterization of Complex Food Systems*. pp 130–156. Ed.: Dickinson E.. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- Rowland I. R., Mallett A. K. & Wise A. 1985. The effect of diet on the mammalian gut flora and its metabolic activities. *Critical Reviews Toxicology*. 16, 31–103.
- Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J. & Zoon P. 2002a. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 12, 167-171.
- Ruas-Madiedo P., Tuinier, R., Kanning M. & Zoon, P. 2002b. Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks. *International Dairy Journal*. 12, 689–695.
- Ruas-Madiedo P. & Zoon P. 2003. Effect of exopolysaccharide-producing *Lactococcus lactis* strains and temperature on the permeability of skim milk gels. *Colloids and Surfaces*. 213, 245-253
- Ruas-Madiedo P. & de los Reyes-Gavilán C. G. 2005. Invited Review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. 88, 843-856.
- Ruas-Madiedo P., Moreno J. A., Salazar N., Delgado S., Mayo B., Margolles A. & de los Reyes-Gavilán C. G. 2007. Screening of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. *Applied And Environmental Microbiology*. 73, 4385–4388.

- Ruas-Madiedo P., Abraham A. G., Mozzi F., & de los Reyes-Gavilán C. G. 2008. Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. In Molecular aspects of lactic acid bacteria for traditional and new applications. pp. 137-166. Eds.: Mayo B., López P., & Pérez-Martínez G. Kerala: Research Signpost.
- Ruijsenaars H. J., F. Stinglele & Hartmans S. 2000. Biodegradability of food-associated extracellular polysaccharides. Current of Microbiology. 40, 194–199.
- Ruijsenaars H. J., Stinglele F. & Hartmans S. 2000. Biodegradability of food-associated extracellular polysaccharides. Current Microbiology. 40, 194-199.
- Ryan M.P., Rea M.C., Hill C. & Ross P. 1996. An application in Cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. Applied and Environmental Microbiology. 62, 612-619.
- Salazar N, Gueimonde M, Hernandez-Barranco A, Ruas-Madiedo P & de los Reyes-Gavilan C. 2008. Exopolysaccharides produced by intestinal *Bifidobacterium* strains act as fermentable substrates for human intestinal bacteria. Applied And Environmental Microbiology. 15, 4737–4745.
- Salles J. F., De Souza F. A. & van Elsas J. D. 2001. Molecular method to assess the diversity of burkholderia species in environmental samples. Applied And Environmental Microbiology. 68, 1595–1603.
- Salminen S., Bouley C., Bouton-Ruault M. C., *et al.* 1998. Functional Food, science and gastrointestinal physiology and function. British Journal of Nutrition. 80, 147-171.
- Salminen S., Roberfroid M., Ramos P. & Fonden R. 1998. Prebiotic substrates and lactic acid bacteria. In Lactic Acid Bacteria. pp 343–358. Eds.: Salminen S., von Wright A. Marcel Dekker: New York.

- Santos A., San Mauro M., Sanchez A., Torres J. M. & Marquina D. 2003. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *Systematic and Applied Microbiology*. 26, 434-437.
- Satokari R. M., Vaughan E. , Akkermans A. D. L., Saarela M., & De Vos W. M. 2001. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 504-413.
- Schleifer K. H. & Ludwig W. 1994. Molecular taxonomy: classification and identification. In: *Bacterial Diversity and Systematics*. F.G. Priest Eds.
- Schrezenmeir J. & de Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American Journal of Clinical nutrition*. 73, 361S–364S.
- Schwab C. & Gänzle M. G. 2006. Effect of membrane lateral pressure on the expression of fructosyltransferases in *Lactobacillus reuteri*. *Systematic of Applied Microbiology*. 29, 89-99.
- Sekiguchi H., Tomioka N., Nakahara T., Uchiyama H., 2001. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gel electrophoresis analyses. *Biotechnology Letters*. 23, 1205–1208.
- Serot T., Dousset X., Zucca J. & Torcatis N. 1990. Mise en évidence et purification partielle de substances antibactériennes produites par *Leuconostoc mesenteroides* et *Lactobacillus plantarum* isolés de grains de kéfir. *Microbiology Alim. Nutr.* 8, 71-76.
- Shiomi M., Sasaki K., Murofushi M. & Aibara K. 1982. Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*. 35, 75-80.
- Silva K. R., Rodrigues S. A., Filho L. X. & Lima A. S. 2009. Antimicrobial Activity of Broth Fermented with Kefir Grains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 152, 316-325.

- Simon G. L. & Gorbach S. L. 1984. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology*. 86, 174.
- Snart J., Bibiloni R., Grayson T., Lay C., Zhang H., Allison G. E., Laverdiere J. K., Temelli F., Vasanthan T., Bell R. & Tannock G. W. 2006. Supplementation of the Diet with High-viscosity β -Glucan: Results in Enrichment for *Lactobacilli* in the Rat Cecum. *Applied and Environmental Microbiology*. 72, 1925–1931
- Southgate D. A. 1976. Selected methods. In *Determination of Food Carbohydrates*. pp. 99-144. Applied Science Publishers Ltd. Essex, UK.
- Speksnijder A. G. C. L., Kowalchuk G. A., De Jong S., Kline E., Stephen J. R. & Laanbroek H. J.. 2001. Microvariation Artifacts Introduced By Pcr And Cloning Of Closely Related 16s Rrna Gene Sequences Applied And Environmental. *Microbiology*. 69, 469–472.
- Staley J. T. & Krieg N. R. 1989. Classification of procaryotic organisms: an overview. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3, pp. 1601– 1603. Eds. Staley J. T., Bryant M. P., Pfennig N. & Holt J. G., Baltimore Williams & Wilkins
- Steffe J. F. 1996. *Rheological methods in food process engineering*. Second edition. Freeman Press. East Lansing, USA.
- Suau A., Bonnet R., Sutren M., Godon J-J., Gibson G., Collins M. A. & Dore J. 1999. Direct analysis of genes encoding 16S RNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied Environmental Microbiology*. 65, 4799–4807.
- Suzuki M. T. & Giovannoni S. J. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 625-630.

- Takizawa S., Kojima S., Tamura S., Fujinaga S., Benno Y. & Nakase T. 1994. *Lactobacillus kefirgranum* sp. nov. and *Lactobacillus parakefir* sp. nov., two new species from kefir grains. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44, 435-439.
- Takizawa S., Kojima S., Tamura S., Fujinaga S., Benno Y. & Nakase T. 1998. The composition of the lactobacillus flora in kefir grains. *Systematic and Applied Microbiology*. 21, 121-127.
- Tamime A. Y., Muir D. D. & Wszolek M. 1999. Kefir, koumiss and kishk. *Dairy Industries International*. 64, 32-33.
- Tannock G.W. 1995. Sticky microbes: the association of microbes with host surface. In *Normal microflora. An Introduction to Microbes Inhabiting the Human Body*. . pp. 49-60. Ed.: Tannock G. W Chapman & Hall. London.
- Tannock G. W., Munro K., Bibiloni R., Simon M. A., Hargreaves P., Gopal P., Harmsen H. & Welling G. 2004. Impact of consumption of oligosaccharide-containing biscuits on the fecal microbiota of humans. *Applied And Environmental Microbiology*. 70, 2129–2136.
- Thompson J. K., Johnston D. E., Murphy R. J. & Collins M. A. 1990. Characteristics of a milk fermentation from rural Northern Ireland which resembles kefir. *Irish Journal of Food Science Technology*. 14, 35-49.
- Thoreux K. & Schmucker D. L. 2001. Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rats. *Journal of Nutrition*. 131, 807-812.
- Toba T., Uemura H., Mukai T., Fujii T., Itoht T. & Adachi S. 1991. A new fermented milk using capsular polysaccharide-producing *Lactobacillus kefiranofaciens* isolated from kefir grains. *Journal of Dairy Research*. 58, 497-502.
- Tolstoguzov V. 2003, *Food Hydrocolloid.*, 17, 1.
- Torino M. I., Mozzi F., & Font de Valdez G. 2005, Exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68, 259-165.

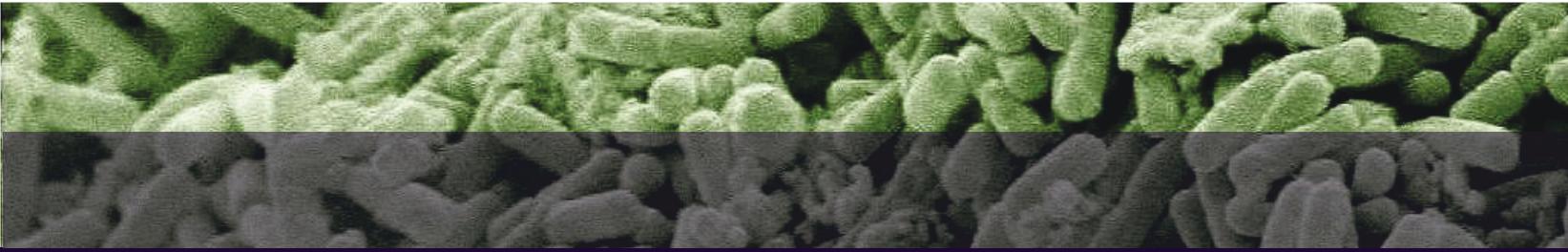
- Tuinier R., Zoon P., Olieman C., Cohen Stuart M. A., Fler G. J., & de Kruif C. G. 1999. Isolation and physical characterization of an exocellular polysaccharide. *Biopolymers*. 49, 1-9.
- Tuohy K.M., Finlay R.K., Wynne A.G., *et al.* 2001a. A human volunteer study on the prebiotic effects of HP-inulin Faecal bacteria enumerated using fluorescent in situ hybridisation (FISH). *Anaerobe* 7, 113–118.
- Tuohy K.M., Kolida S., Lustenberger A.M., *et al.* 2001b. The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolysed guar gum and fructo-oligosaccharides – a human volunteer study. *British of Journal Nutrition*. 86, 341–348.
- van de Wiele T., Boon N., Possemiers S., *et al.* 2004 Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*. 51, 143–153.
- Van der Meulen R., Grosu-Tudor S., Mozzi F., Vaningelgem F., Zamfir M., Font de Valdez G. & De Vuyst L. 2007. Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. *International Journal of Food Microbiology*. 118, 250–258.
- Van Geel-Schutten G. H., Faber E. J., Smit E., Bonting K., Smith M. R., Ten Brink B., *et al.* 1999. Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutantstrains. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 3008–3014.
- van Hijum S. A. F. T., Kralj S., Ozimek L. K., Dijkhuizen L. & Van Geel-Schutten I. G. H. 2006. Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*. 70, 157.
- Van Loo J., Franck A, Roberfroid M. 1999. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides. *British Journal of Nutrition*. 82, 329-402.

- Van Marle M. E., & Zoon P. 1995. Permeability and rheological properties of microbially and chemically acidified skim-milk gels. *Netherlands Milk & Dairy Journal*. 49, 47–65.
- Vancanneyt M., Mengaud J., Cleenwerck I., Vanhonacker K., Hoste B., Dawyndt P., Degivry M. C., Ringuet D., Janssens D. & Swings, J. 2004. Reclassification of *Lactobacillus kefirgranum* Takizawa *et al.* 1994 as *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* subsp. nov. and emended description of *L. kefiranofaciens* Fujisawa *et al.* 1988. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54, 551-556.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K. & Swings J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *American Society for Microbiology. Microbiological Reviews*. 60, 407–438
- Vanhoutte T., de Preter V., De Brandt E., *et al.* 2006. Molecular monitoring of the fecal microbiota of healthy human subjects during administration of lactulose and *Saccharomyces boulardii*. *Applied Environmental Microbiology*. 72, 5990–5997.
- Vaningelgem F., Zamfir M., Mozzi F., Adriany T., Vancanneyt M., Swings J. & De Vuyst L. 2004a). Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 900-912.
- Vaningelgem F, Van der Meulen R, Zamfir M, Adriany T., Laws A & De Vuyst L. 2004b). *Streptococcus thermophilus* ST 111 produces a stable high molecular mass exopolysaccharide in milk-based medium. *International Dairy Journal*. 14, 857-864.
- Vauterin L., Swings J. & Kersters K. 1993. Protein electrophoresis and classification. In *Handbook of new bacterial systematics*. pp. 251–280. Eds.: Goodfellow M. & O'Donnell A. G. Academic Press Ltd., London.

- Vedamuthu E. R. 1982. Fermented milks. In Economic Microbiology ., pp. 199–226. Ed.: Rose A. H. Academic Press: Washington.
- Vinderola G., Perdigon G., Duarte J., Farnworth E. & Matar C. 2006. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* on the gut mucosal immunity. Cytokine. 36, 254–260.
- Walstra P. 1990. On the stability of casein micelles. Dairy foods. Journal of Dairy Science. 73, 1965-1979.
- Walter J., Tannock G. W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S, Loach D. M, Munro K., & Alatosava T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific pcr primers. Applied And Environmental Microbiology. 66, 297–303.
- Wang Y. P., Zaheer A., Feng W., Li C., & Song S. Y. 2008. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. International Journal of Biological Macromolecules, 43, 283– 288
- Witthuhn R. C., Schoeman T. & Britz T. J. 2005. Characterisation of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. International Dairy Journal. 15, 383–389.
- Woese C. R. 1987. Bacterial evolution. Microbiological Reviews. 51, 221–271.
- Wolfaardt G. M., Lawrence J. R. & Korber D. R. 1999. Functions of EPS. In: Microbial extracellular polymeric substances. pp. 172–200. Ed.: Wingender J. Springer: Berlin
- Wyder M. T. 2001. Yeast in Dairy Products. FAM Swiss Federal Dairy Research Station. 4, 1-21.

- Yazawa K., Imai K. & Tamura Z. 1978. Oligosaccharides and polysaccharides specifically utilizable by bifidobacteria. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*. 26, 3306–3311.
- Yokoi H., Watanabe T., Fujii Y., Toba T., & Adachi, S. 1990. Isolation and characterization of polysaccharide producing bacteria from kefir grains. *Journal of Dairy Science*. 73, 1684–1689.
- Yokoi H., Watanabe T., Fujii Y., Mukai T., Toba T. & Adachi S. 1991. Some taxonomical characteristics of encapsulated *Lactobacillus* sp. KPB-167B isolated from kefir grains and characterization of its extracellular polysaccharide. *International Journal of Food Microbiology* 13, 257-264.
- Zacconi C., Scolari G., Vescovo M. & Sarra P. G. 2003 Competitive exclusion of *Campylobacter jejuni* by kefir fermented milk. *Annals of Microbiology*. 53, 179-187.
- Zhou J., Liu X., Jiang H. & Dong M. 2009. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*. 26, 770–775.
- Zoetendal E. G., Akkermans A. D. L. & de Vos W. M. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied Environmental Microbiology*. 64, 3854–3859.
- Zoetendal E. G., Akkermans A. D. L., Akkermans van-Vliet W. M., de Visser J. A. G. M. & de Vos W. M. 2001. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microbial Ecology in Health Disease*. 13, 129–134.
- Zourari A. & Anifantakis E. M. 1988. Le kefir caracteres physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. *Technologie de Production. Le Lait*. 68, 373-392.

- Zweig G. & Sherma J. 1978. Section A: General Data and Principles Volume II. En Handbook Series in Chromatography. CRC Press Inc., Florida. Pág.124-130.



Universidad Nacional de La Plata

