

Índice General	I
<hr/>	
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
<hr/>	
Objetivos	19
<hr/>	
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 desnaturalizante (<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