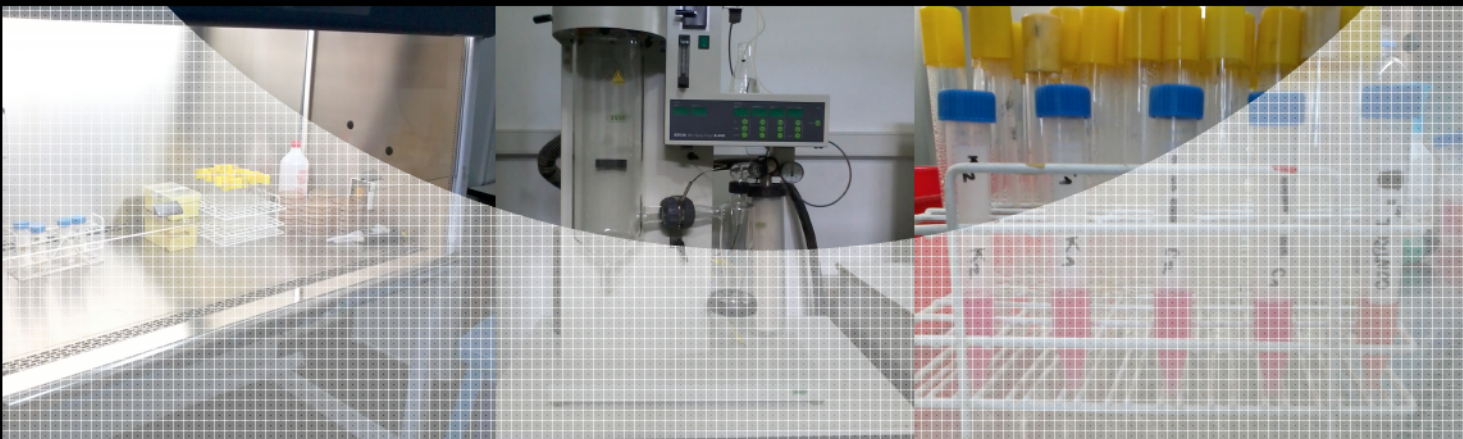


TESIS DOCTORAL

NUEVAS APLICACIONES DE POLISACÁRIDOS DE BACTERIAS LÁCTICAS: GELES DE KEFIRAN Y SU APLICACIÓN COMO VEHÍCULO DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS.

Lic. Lucía Zavala
Dirección: Dra. Analía Graciela Abraham



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias Biológicas



TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

**Nuevas aplicaciones de polisacáridos de
bacterias lácticas: Geles de kefirán y su
aplicación como vehículo de microorganismos
probióticos.**

Lic. Lucía Zavala

Dirección: Dra. Analía Graciela Abraham

2015

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos
(CIDCA)

Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata

El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), UNLP-CONICET.



AGRADECIMIENTOS,

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por la formación profesional otorgada y en especial al Departamento de Ciencias Biológicas por su apoyo para la realización de este trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haberme otorgado las correspondientes becas para el desarrollo de este trabajo de tesis.

A la Dra. Noemí Zaritzky, por abrirme las puertas del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA) y permitirme trabajar allí.

A la Dra. Analía Abraham, mi directora, por la confianza depositada, por todos los conocimientos brindados, y por la dedicación y el compromiso durante estos años de trabajo, por la enorme paciencia, cariño y apoyo en todo momento.

A mis compañeros del CIDCA y de la Cátedra, Fernando, Mica, Aye, Ale, Fer, Marina, Judith, Gaby, Caro, Mica, Agus, Pablo, Analía, Grace, Patricio, Angela, Raúl, Robert, Paula, Esteban, Eli, Mauri, Ceci, Ivanna, Jessi, María y Pato por su especial ayuda en la realización de la práctica, por transmitirme sus conocimientos y estar dispuestos cuando los he necesitado. Gracias a todos y cada uno de ustedes por los buenos momentos compartidos.

A Marina, por haber compartido conmigo gran parte de ese trabajo, por su ayuda incondicional y conocimientos brindados.

A Caro y Ale, gracias por su compañerismo y lograr que sean más amenas las largas jornadas de laboratorio.

A Judith, por haberme acompañado en gran parte de este trabajo. Gracias por estar en cada momento que lo necesité durante estos años.

A Coni, gracias por esa alegría constante. Porque compartimos poco, y mucho al mismo tiempo.

A Paula, por haber recorrido este último tramo juntas, por su paciencia y por haberme enseñado tanto.

A Yani, porque cursamos juntas, y luego terminamos trabajando juntas, gracias por estar dispuesta en cada situación y querer compartir conmigo cada momento.

A Rochi, Ari, Sil, Lour, gracias por estar y permitirme desconectarme cuando era necesario, por escucharme y aconsejarme. Porque estuvieron siempre, de una u otra forma, en cada momento y en cada etapa transcurrida, Gracias!!!

A mi familia, a mi tía y a mi abuela, por su apoyo incondicional, paciencia, cariño y aliento frente a las dificultades. Por comprender mis extraños horarios de laboratorio, por haberme acompañado en esta etapa que termina...

iii Muchas Gracias...!!!

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

Revistas periódicas:

GELLING ABILITY OF KEFIRAN IN THE PRESENCE OF SUCROSE AND FRUCTOSE AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE RESULTING CRYOGELS. 2014. Zavala, L.; Roberti, P.; Piermaría, J. A.; Abraham, A. G. *Journal of Food Science and Technology*. 9 p. *Article in Press*. DOI 10.1007/s13197-014-1577-2.

INCREASED ADHESION OF LACTOBACILLUS PARACASEI POST-INCUBATION IN SIMULATED GASTROINTESTINAL CONDITIONS. Zavala, L.; Carasi, P.; Serradel, M.; Abraham, A. *En redacción*.

LACTOBACILLUS PARACASEI ISOLATED FROM KEFIR GRAIN AND SUGARY KEFIR GRAIN: INTERACTION WITH INTESTINAL EPITHELIAL CELLS AND EFFECT ON SALMONELLA INFECTION. Zavala L.; Golowczyc, M.A.; Van Hoorde, K.; Medrano M.; Vercammen, E.; Huys, G.; Vandamme, P., Abraham A. G. *En redacción*.

Presentación oral:

XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos. IV Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos. III Simposio Argentino de Conservación de Alimentos. MICROAL 2012. LACTOBACILOS PRODUCTORES DE POLISACÁRIDOS Y CAPAS DE AISLADOS DE KEFIR: INTERACCIÓN CON SALMONELLA. Zavala, L.; Golowczyc, M. A.; Abraham, A. G. Buenos Aires, 26 al 29 de noviembre de 2012.

IV Simposio Internacional de Bacterias Lácticas (SIBAL). Alimentos, Salud y Aplicaciones. SIBAL 2013. LACTOBACILLUS PARACASEI ISOLATED FROM KEFIR: PROBIOTIC AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES. L. Zavala, P. Carasi, M. Golowczyc, M. de los A. Serradell, A G. Abraham. San Miguel de Tucumán, 16 al 18 de octubre de 2013.

JORNADAS DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA CIDCA 2014. *Lactobacillus paracasei* aislados del kefir: propiedades probióticas y tecnológicas. L. Zavala, P. Carasi, M. Golowczyc, M.A. Serradell, A.G. Abraham. La Plata, 9 al 12 de diciembre de 2014.

Trabajo completo:

XIII Congreso CYTAL - AATA Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE GELES DE KEFIRÁN CON AZÚCARES. Zavala, L.; Roberti, P.; Piermaria, J. A. 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. INHIBICIÓN DE *Salmonella sp.* Y *Escherichia COLI* POR SUERO FERMENTADO CON CEPAS AISLADAS DE KEFIR. Londero, A.; Iraporda, C.; Zavala, L.; Garrote, G. L.; Abraham, A. G. Buenos Aires - 19 Al 21 De Octubre de 2011.

XIII Congreso CYTAL - AATA Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. TERMOTOLERANCIA DE *Lactobacillus* EN PRESENCIA DE KEFIRÁN. Zavala, L.; Golowczyc, M. A.; 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 FISCOQUÍMICA DE GELES DE KEFIRÁN CON AZÚCARES. Zavala, L.; Roberti, P.; Piermaría, J. A. y Abraham, A. G. Buenos Aires - 19 Al 21 De Octubre de 2011.

XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos. IV Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos. III Simposio Argentino de Conservación de Alimentos. LACTOBACILOS PRODUCTORES DE POLISACÁRIDOS Y CAPA-S DE AISLADOS DE KEFIR: INTERACCIÓN CON *Salmonella*. Zavala, L.; Golowczyc, M. A.; Abraham, A. G. Buenos Aires, 26 al 29 de noviembre de 2012.

Simposio Argentino de Lactología. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE GELES DE KEFIRAN, UN POLISACÁRIDO PRODUCIDO POR BACTERIAS LÁCTICAS. Zavala, L.; Piermaría, J. A. y Abraham, A. G. Santa Fé, agosto 2012.

IV Simposio Internacional de Bacterias Lácticas (SIBAL). Alimentos, Salud y Aplicaciones. SIBAL 2013. *Lactobacillus paracasei* ISOLATED FROM KEFIR: PROBIOTIC AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES. L. Zavala, P. Carasi, M. Golowczyc, M. de los A. Serradell, A G. Abraham. San Miguel de Tucumán, 16 al 18 de octubre de 2013.

XIV Congreso CYTAL - AATA Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS POTENCIALMENTE PROBIÓTICOS Y EL ESTUDIO DE SU RESISTENCIA AL SECADO SPRAY Y ALMACENAMIENTO. Zavala, L.; Golowczyc, M. A.; Abraham, A. G. Buenos Aires, 23 al 25 de octubre de 2013.

IX Congreso Argentino de Microbiología General. Sociedad Argentina de Microbiología. LACTOBACILLI ISOLATED FROM KEFIR INCREASE THEIR ADHESION CAPACITY TO INTESTINAL MUCOSA *IN VITRO* AFTER SIMULATED DIGESTION. Zavala, L.; Carasi, P.; Serradell, M.; Abraham, A.G. Rosario, 5 al 7 de agosto de 2013.

I Jornadas de Investigación y Transferencia CIDCA 2014. *Lactobacillus paracasei*: PROPIEDADES PROBIÓTICAS Y PROPIEDADES TECNOLÓGICAS. L. Zavala, P. Carasi, M. Golowczyc, M. de los A. Serradell, A G. Abraham. La Plata, Argentina, 8 al 10 de diciembre de 2014.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	
Alimentos funcionales	1
Regulación de los alimentos funcionales.	2
Probióticos, prebióticos y simbióticos como componentes de alimentos funcionales	5
Probióticos.	5
Prebióticos.	7
Simbiótico.	10
Interés industrial	11
El kefir como alimento funcional natural	13
Gránulo de kefir.	15
Kefirán, exopolisacárido producido por lactobacilos del kefir	17
Funcionalidad biológica del kefiran.	19
Propiedades tecnológicas del kefiran.	20
Matrices alimentarias utilizadas para la incorporación de microorganismos probióticos	21
OBJETIVO GENERAL	23

CAPÍTULO 1. Selección de microorganismos probióticos.	
INTRODUCCIÓN	25
Microorganismos del kefir	25
Propiedades benéficas atribuidas al consumo de kefir y sus microorganismos	27
Adhesión bacteriana	31
Modelos para el estudio de adhesión bacteriana.	32



Microorganismos patógenos: <i>Salmonella entérica</i> serovar Enteritidis	35
<i>Salmonella</i> como agente causal de enfermedades.	35
Probióticos frente a la acción de <i>Salmonella</i> Enteritidis.	37
OBJETIVOS PARCIALES	41
MATERIALES Y MÉTODOS	43
Microorganismos y condiciones de cultivo	43
Resistencia a la bilis por método ecométrico	43
Hidrofobicidad superficial	45
Autoagregación	45
Resistencia al pasaje gastrointestinal <i>in vitro</i>	46
Adhesión bacteriana a epitelio intestinal <i>in vitro</i>	46
Adhesión a células Caco-2/TC-7.	47
Adhesión a mucina <i>in vitro</i> .	47
Digestión proteolítica de las proteínas de y obtención del mapa peptídico mediante Espectrometría de Masa (MS) MALDI-TOF	48
Electroforesis Bidimensional (2D).	48
Digestión de las proteínas.	49
Espectrometría de Masa (MALDI-TOF).	50
Parámetros de búsqueda en bases de datos.	50
Interacción con <i>Salmonella entérica</i> serovar Enteritidis	51
Condiciones de cultivo de <i>Salmonella entérica</i> serovar Enteritidis.	51
Ensayo de asociación e invasión de <i>Salmonella</i> a células Caco-2/TC-7.	51
Obtención de sobrenadantes libres de células y las suspensiones de lactobacilos.	52
Determinación de la concentración de ácidos orgánicos.	52
<i>Determinación de la concentración de ácido láctico no disociado.</i>	53
Coagregación de Lactobacilos con <i>Salmonella entérica</i> serovar Enteritidis.	54
Asociación e invasión de <i>Salmonella</i> Enteritidis a células Caco-2/TC-7 previa incubación de <i>Salmonella</i> con lactobacilos.	54



Asociación e invasión de <i>Salmonella</i> Enteritidis a células Caco-2/TC-7 previa incubación de la monocapa con lactobacilos.	54
<i>Marcación fluorescente del citoesqueleto con faloidina.</i>	55
Cinética de muerte de <i>Salmonella</i> Enteritidis en sobrenadantes de cultivo de lactobacilos aislados de kefir.	56
Efecto de los sobrenadantes de lactobacilos aislados de kefir sobre la asociación e invasión de <i>Salmonella</i> Enteritidis a células Caco-2/TC-7.	56
Análisis estadístico	57
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
Resistencia a la bilis	59
Adhesión bacteriana <i>in vitro</i> a células intestinales Caco-2/TC-7	60
Adhesión a mucina	63
Adhesión a epitelio y pasaje por el tracto gastrointestinal <i>in vitro</i>	67
Viabilidad bacteriana luego del pasaje.	68
Adhesión a línea celular Caco-2/TC-7 y mucina después del pasaje por el tracto gastrointestinal simulado.	70
Expresión de proteínas después del pasaje por el tracto gastrointestinal (TGI)	72
Efecto antagónico contra <i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis	78
Asociación e invasión de <i>Salmonella</i> a células Caco-2/TC-7.	78
Interacción de los lactobacilos con <i>Salmonella</i> Enteritidis y efecto en la invasión a células Caco-2/TC-7.	81
<i>Coagregación de lactobacilos con Salmonella entérica serovar Enteritidis.</i>	81
<i>Preincubación de Salmonella Enteritidis con lactobacilos aislados de kefir.</i>	85
<i>Efecto en la invasión a células Caco-2/TC-7.</i>	
Efecto barrera de los lactobacilos sobre la asociación e invasión de <i>Salmonella</i> Enteritidis. Preincubación de la monocapa de enterocitos con lactobacilos.	87
<i>Efecto de los lactobacilos en la desorganización del citoesqueleto causado por Salmonella Enteritidis.</i>	91
Efecto de los sobrenadantes libres de células de lactobacilos aislados de kefir sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis.	93



<i>Acción bactericida de los sobrenadantes libres de células de lactobacilos aislados de kefir sobre Salmonella. Curvas de muerte.</i>	93
<i>Efecto de los sobrenadantes libres de células de lactobacilos aislados de kefir sobre la asociación e invasión de Salmonella a células Caco-2/TC-7.</i>	96
CONCLUSIONES PARCIALES	101

CAPÍTULO 2. Geles de kefir como vehículo de microorganismos probióticos

INTRODUCCIÓN	105
Geles en los alimentos	105
Geles alimentarios de naturaleza glucídica.	106
Geles de proteínas.	108
Geles mixtos.	109
Inclusión de microorganismos probióticos en los geles	110
OBJETIVOS PARCIALES	113
MATERIALES Y MÉTODOS	115
Obtención de kefiran	115
Preparación de geles de kefiran con azúcares y/o proteínas	115
Geles mixtos de kefiran y azúcares.	115
Geles de proteínas.	116
Geles mixtos de kefiran y proteínas.	116
Caracterización de las soluciones	117
Caracterización de los geles	117
Actividad Acuosa.	117
Capacidad de retención de agua (WHC).	118
Reometría oscilatoria de baja amplitud de deformación.	118
Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).	119
Análisis de perfil de textura.	119



Microscopía electrónica (SEM).	121
Inclusión de microorganismos en geles mixtos	121
Obtención de <i>Lactobacillus paracasei</i> 8339 y <i>Lactobacillus kefir</i> 83102.	121
Obtención de geles de kefirán, proteínas y azúcares con microorganismos.	121
Resistencia al pasaje gastrointestinal <i>in vitro</i> de los microorganismos incluidos en el gel.	122
Capacidad de adhesión de los microorganismos incluidos en el gel.	123
Análisis estadístico	123
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Geles de kefirán con azúcares	125
Comportamiento reológico de soluciones de kefirán con sacarosa y fructosa.	125
Obtención de los geles y caracterización fisicoquímica.	127
Formación de geles de kefirán y proteínas de suero de leche	136
Geles de aislado de proteína de suero: Selección de las concentraciones de WPI capaces de formar geles.	136
Efecto del tratamiento a -20 °C en la formación de geles de proteína de suero de leche.	138
Geles mixtos de proteína de suero de leche y kefirán.	143
Inclusión de microorganismos en geles	154
Resistencia de <i>Lactobacillus paracasei</i> 8339 y <i>Lactobacillus kefir</i> 83102 al proceso de formación del gel.	155
Resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal <i>in vitro</i> de <i>Lactobacillus paracasei</i> 8339 y <i>Lactobacillus kefir</i> 83102 incluidos en los geles mixtos.	158
Adhesión a células Caco-2/TC-7 de <i>Lactobacillus paracasei</i> 8339 y <i>Lactobacillus kefir</i> 83102 incluidos en la matriz alimentaria (gel).	160
CONCLUSIONES PARCIALES	
	165
CONCLUSIÓN GENERAL	
	169



CAPÍTULO 2. Geles de kefirán como vehículo de microorganismos probióticos

MEDIOS DE CULTIVO	173
COLORACIONES	175
MEDIOS DE CULTIVO PARA CÉLULAS EUCARIOTAS	175
CULTIVO DE CÉLULAS INTESTINALES Y PREPARACIÓN DE PLACAS	176

BIBLIOGRAFÍA

179

INTRODUCCIÓN GENERAL





INTRODUCCIÓN GENERAL

Alimentos funcionales

La visión de la ciencia de la nutrición como aquella que prevenía la aparición de deficiencias nutricionales ha evolucionado hacia un concepto más amplio que incluye la óptima función de órganos y sistemas, la promoción de la calidad de vida y la disminución del riesgo de padecer enfermedades.

Los consumidores están cada vez más conscientes y buscan en el mercado aquellos productos que contribuyan a su salud y bienestar. Estos alimentos, que promueven la salud, han sido denominados genéricamente alimentos funcionales (Sloan 1999).

Los alimentos funcionales son alimentos con la característica particular de que algunos de sus componentes afectan funciones del organismo de manera específica y positiva, promoviendo un efecto fisiológico o psicológico más allá de su valor nutritivo tradicional. Su efecto adicional puede ser su contribución a la mantención de la salud y bienestar o a la disminución del riesgo de contraer enfermedades (Diplock *et al.* 1996).

El concepto de desarrollar alimentos no sólo para disminuir las deficiencias nutricionales, sino más bien para proteger la salud de la población surgió a principios de los años 80 en Japón (Arai 1996). Allí, se comenzó a dar importancia a esta función de los alimentos que está implicada en la modulación de los sistemas fisiológicos de los organismos vivos, como el sistema inmune, endocrino, nervioso, circulatorio y digestivo, y a partir de entonces, se introdujo en Occidente el término “alimentos funcionales”, haciendo referencia a los productos alimenticios fortificados con constituyentes especiales que poseen efectos fisiológicamente ventajosos. En 1991, el Ministerio de Salud de Japón introdujo las reglas para la aprobación de una categoría específica de alimentos relacionados a la salud llamada FOSHU (Food for Specified Health Uses, o Alimento para Uso Específico de la Salud), y luego de su aprobación, un alimento podía portar el símbolo “FOSHU” en su etiqueta. De esta manera, el primer alimento FOSHU



correspondió a una especie de arroz de consumo masivo en el que se eliminó por hidrólisis enzimática una proteína causante de alergia cutánea, obteniéndose un nuevo producto inmunológicamente seguro y saludable. El concepto migró a los Estados Unidos y Europa, en donde se identificó su potencial comercial para la industria alimentaria (Cóccaro 2010).

Según la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), para que un alimento pueda ser considerado funcional, debe demostrar que posee un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas del organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, que mejora el estado de salud y bienestar, o bien que reduce el riesgo de una enfermedad. Esto significa que estos alimentos deben contener, necesariamente, alguno de los llamados componentes o ingredientes funcionales.

Entre los productos que podrían considerarse como funcionales, por contener éstos u otros componentes, pueden mencionarse los lácteos enriquecidos con vitaminas, minerales, fitoesteroles u omega 3, y las barras de cereales con vitaminas y/o fibras. También, los *yogurths* con probióticos, es decir, con microorganismos vivos que, al ser ingeridos en cantidades suficientes, ejercen un efecto positivo en la salud del consumidor, y los llamados alimentos ricos en fibras o prebióticos (sustancias no digeribles que pueden ser fermentadas por la flora bacteriana intestinal, y provocan un efecto favorable sobre ella).

Regulación de los alimentos funcionales.

Muchos académicos, científicos y organismos reguladores están trabajando para encontrar maneras de establecer una base científica que apoye las alegaciones beneficiosas que se asocian a los componentes funcionales o los alimentos que los contienen. Los consumidores tienen que comprender bien y confiar en los criterios científicos utilizados para documentar los efectos de los alimentos funcionales y las atribuciones beneficiosas específicas. Japón está por delante del resto del mundo en este aspecto ya que en 1991, se estableció el concepto de "Alimentos para Uso Específico en la Salud" (FOSHU). Los alimentos que se incluyan dentro de la categoría de FOSHU deben ser autorizados por el Ministerio de Salud, tras la presentación de pruebas



exhaustivas con fundamento científico, que apoyen la alegación relativa a las propiedades de dichos alimentos, cuando son consumidos como parte de una dieta ordinaria. Cuando se solicita una licencia FOSHU al Ministerio se debe aportar la siguiente información: 1) ingredientes y composición del alimento, 2) efectos beneficiosos para la salud atribuidos al alimento, y 3) datos sobre su seguridad. Una vez aprobado el alimento, se puede indicar en la etiqueta del producto sus efectos beneficiosos para la salud, pero no de forma exagerada ni engañosa. Los fabricantes no pueden fomentar el consumo excesivo del alimento, ni incitar de forma alguna al consumidor a que no reciba tratamiento médico, ni difamar a los productos de la competencia. Japón es el único país que cuenta con una legislación específica para la comercialización y rotulado de este tipo de alimentos (Shimizu 2014).

En la Unión Europea (UE) no existe una legislación armonizada sobre las alegaciones de salud, y por lo tanto las cuestiones relativas a dichas alegaciones se resuelven a nivel nacional. El reto en los Estados Miembros de la UE es conseguir, bajo el marco regulador existente, que los mensajes que se comunican no hagan ninguna referencia a que dichos alimentos puedan reducir el riesgo de padecer enfermedades, incluso aunque existan pruebas científicas que avalen dichas afirmaciones. La legislación europea relativa al etiquetado prohíbe atribuir a los alimentos propiedades preventivas, terapéuticas o curativas, y la referencia a dichas propiedades (Roberfroid 2002; Palou *et al.* 2003, European Food Safety Authority).

En Estados Unidos se permite desde 1993 que se aleguen propiedades "que reducen el riesgo de padecer enfermedades" en ciertos alimentos. Las "alegaciones de salud" están autorizadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA), siempre que existan "evidencias científicas públicamente disponibles y haya suficiente consenso científico entre los expertos de que dichas alegaciones están respaldadas por pruebas". Aunque los fabricantes pueden utilizar alegaciones de salud para comercializar sus productos, la intención de la FDA es que el fin de dichas alegaciones sea el beneficio de los consumidores, y que se facilite información sobre hábitos alimenticios saludables, que pueden ayudar a reducir el riesgo de contraer enfermedades, como las afecciones cardíacas y el cáncer. Según la FDA, las alegaciones pueden basarse también en "declaraciones autorizadas" de Organismos Científicos Federales, como los Institutos Nacionales de la Salud (National



Institutes of Health) y los Centros para la Prevención y el Control de Enfermedades (Centres for Disease Control and Prevention), así como de la Academia Nacional de Ciencias (National Academy of Sciences). Una gran ayuda para la comercialización de los alimentos y componentes funcionales en los Estados Unidos, ha sido la aprobación del Acta de Suplementos Dietéticos para la Salud y Educación (Dietary Supplement Health and Education Act DSHEA) de 1994. Esta legislación permite el uso de “declaraciones de estructura-función” para los suplementos dietarios sin previa autorización por la FDA. Dichas declaraciones colocadas en el envase de un alimento describen cómo un componente o un ingrediente alimentario afecta alguna estructura y/o función determinada en un organismo (por ejemplo, “el alto contenido de fibra favorece la regularidad intestinal”, o “el calcio favorece la formación de huesos fuertes”) sin relacionarlo con una enfermedad específica. Debido a que estas declaraciones pueden hacerse sin previa aprobación de la FDA, muchas empresas están escogiendo comercializar los alimentos funcionales como suplementos dietéticos, lo cual es un vacío legal permisible durante el tiempo que la empresa notifica a la FDA 30 días después de la primera comercialización del producto que lleva la declaración (Siró *et al.* 2008).

En América Latina, el conocimiento de los alimentos funcionales es relativamente reciente, en algunas ciudades las autoridades sanitarias reconocen legalmente las propiedades saludables de determinados alimentos. Brasil posee una regulación en la que se define como funcional un componente alimenticio nutritivo o no, que puede producir efectos benéficos para la salud, diferentes de la nutrición básica cuando forman parte de una dieta normal sin ser un medicamento. La Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria Brasileña exige demostrar la seguridad y eficacia de dichos componentes alimenticios para legalizar su publicidad, comercialización y consumo (Lajolo 2002).

En Argentina, el Instituto Nacional de Alimentos ha organizado un grupo de trabajo orientado a proponer normativa respecto a esta cuestión. De esta manera, la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) conformada por representantes de la SAGPyA, de la Universidad de Buenos Aires, del Centro de Industria Lechera y la Cámara de Fabricantes de Alimentos Dietéticos y Afines (CAFADyA), entre otros, ha establecido normas para su funcionamiento y ha trabajado en la definición para los probióticos y prebióticos, sobre la base de la normativa internacional. En cuanto al rotulado de estos alimentos, solo se permiten declaraciones nutricionales. Es decir, en el producto se debe



indicar la presencia del compuesto bioactivo pero no se puede decir para qué sirve o cuáles son sus beneficios, dado que de esa forma se estaría induciendo su consumo en forma tendenciosa (Grupo de trabajo Alimentos Funcionales INAL – ANMAT 2003; Olagnero *et al.* 2007).

Probióticos, prebióticos y simbióticos como componentes de alimentos funcionales

Los *alimentos funcionales* más estudiados son los alimentos *probióticos*, en los últimos años ha aumentado el interés por los *prebióticos*. La asociación de un prebiótico y un probiótico se denomina *simbiótico*. A continuación nos centraremos detalladamente en cada uno de ellos.

Probióticos.

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del hospedador. Los principales géneros de microorganismos considerados probióticos son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

A medida que los consumidores entienden el papel de los probióticos en la salud, también crece la popularidad de los alimentos que los contienen. El resultado de este fenómeno es un incremento en el número de alimentos probióticos disponibles para el consumo público, que incluye una variedad de bebidas lácteas y no lácteas que contienen probióticos, que proporcionan una manera conveniente para mejorar y mantener la salud. De todas maneras, la composición de bebidas no lácteas probióticas puede plantear problemas específicos para la sobrevivencia de los microorganismos. Para superar estos retos, la selección de la cepa y las técnicas de protección juegan un papel fundamental en la formulación de un producto estable (Gawkowski & Chikindas, 2013).

Actualmente se buscan diferentes alternativas de incluir probióticos en otros alimentos, tales como vegetales y productos cárnicos fermentados (Furtado Martins *et al.* 2013).



Es esencial que los probióticos permanezcan vivos durante su tránsito por el tracto gastrointestinal. Entre las propiedades asociadas al consumo de probióticos se pueden destacar la modulación de la respuesta inmune, mejora del equilibrio de la microflora colónica, incremento de la biodisponibilidad de ciertos nutrientes, mejora del tránsito y la motilidad intestinal, regulación del nivel de colesterol sérico entre otras propiedades. Además disminuyen la intolerancia a la lactosa (Marteau *et al.* 1997) y la incidencia y duración de las diarreas por rotavirus en lactantes (Saavedra *et al.* 1994). Estos efectos son cepa dependiente, por ejemplo, *Lactobacillus casei* GG es capaz de prevenir y acortar las diarreas por rotavirus del lactante, así como incrementar las concentraciones de IgA en tracto intestinal (Isoulari *et al.* 1991). Sin embargo, no todas las cepas de bacterias ejercen efectos probióticos, por ello es necesario estudiar las diferentes propiedades de cada microorganismo.

Según el Artículo 1° de la Resolución Conj. 261/2011 SPRel y 22/2011 SAGyP el 27 de diciembre de 2011 se llevó a cabo la inclusión del término “Probióticos” en el Código Alimentario Argentino (CAA) (artículo 1389), donde se define el término probiótico como *los microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del consumidor*. Los requisitos mínimos que deberá seguir/cumplir una cepa para considerarse probiótico son:

1. *Identificación de la cepa (Género/especie/subespecie):*

Los análisis para la identificación de la cepa deberán ser llevados a cabo por laboratorios reconocidos por la Autoridad Sanitaria Nacional o internacionalmente mediante metodología validada. El método recomendado para la identificación de las cepas de probióticos por técnicas moleculares es el de la secuenciación del rDNA 16S obtenido a partir del rRNA 16S, de acuerdo con Sambrook & Russell (2001).

2. *Caracterización “in vitro” e “in vivo”:*

- Resistencia gástrica: ensayo realizado como indicador de que la cepa podrá atravesar la barrera biológica estomacal, arribando viable al intestino. Deberá observarse supervivencia de la cepa en una solución gástrica simulada, a 37 °C y en condiciones estandarizadas (tiempo y pH).



- Resistencia a bilis: ensayo realizado como indicador de resistencia de la cepa a esta barrera biológica del organismo, presente a nivel de duodeno. Deberá presentar capacidad de desarrollo en un medio de cultivo adicionado de bilis bovina al 0,3 % (entendida como la concentración fisiológica), a 37 °C y en condiciones estandarizadas (medio de cultivo y tiempo).

- Resistencia a lizozima (opcional): ensayo realizado como indicador de que la cepa podrá sortear esta barrera biológica presente en la boca (saliva) e intestino delgado. Deberá presentar capacidad de desarrollo en un medio de cultivo adicionado de lizozima, a 37 °C y en condiciones estandarizadas (concentración de lizozima, medio de cultivo y tiempo).

3. Ensayos “in vivo” e “in vitro” que demuestren el(los) efecto(s) probiótico(s) adjudicado(s) debidamente documentados y respaldados en estudios efectuados por organismos nacionales y/o internacionalmente reconocidos.

4. Seguridad.

La cepa probiótica no debe ser riesgosa para la salud. La bacteria no deberá presentar o promover la translocación bacteriana (pasaje de bacterias del intestino más allá de los nódulos mesentéricos) en las concentraciones en que se encuentra en el alimento. Puede ser medida sembrando en placas con agar muestras de sangre y de homogenizados de tejidos de nódulos linfáticos mesentéricos, bazo e hígado de animales de experimentación.”

Prebióticos.

Los prebióticos son compuestos de naturaleza glucídica no digeribles por el hombre que benefician al que los consume estimulando de forma selectiva el crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias intestinales (Gibson *et al.* 1995). Actualmente los compuestos más utilizados como prebióticos son los fructanos tipo inulina (oligosacáridos no digeribles: inulina, hidrolizados enzimáticos de la inulina, oligofruetosacáridos (C₂-C₁₀), fructosacáridos sintéticos de cadena larga). La



mayoría de la producción industrial procede de la achicoria. De forma natural están presentes en el trigo, la cebolla, los plátanos, el ajo y los puerros.

Las principales acciones de los prebióticos ocurren a nivel gastrointestinal. Llegan al colon sin ser digeridos por las enzimas presentes en el intestino delgado del hombre y allí son fermentados por las bacterias colónicas, lo que condiciona la selección de la microbiota (Roberfroid 2000; Gibson *et al.* 1995). En estudios *in vitro* se ha comprobado que la presencia de inulina y otros fructooligosacáridos en colon produce, como resultado final de la fermentación bacteriana, cantidades importantes de AGCC (ácidos grasos de cadena corta), hidrógeno, metano, dióxido de carbono, lactato e incremento de la biomasa bacteriana. El aumento de la concentración de lactato y acetato disminuye el pH intraluminal, inhibiendo el crecimiento de *Escherichia coli*, *Clostridium* y otras bacterias patógenas pertenecientes a los géneros *Listeria*, *Shigella*, o *Salmonella*; pero a su vez incrementa el recuento de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. La presencia de grandes cantidades de AGCC (acético, propiónico y butírico) incrementa la absorción del calcio y magnesio a través del aumento de la solubilización de sales de calcio y por medio de la activación del mecanismo de transporte para la absorción de este mineral (Abrams *et al.* 2005; Suzuki & Hara 2004). También, se señalan acciones favorables de los prebióticos con respecto al estreñimiento (Van Loo *et al.* 1999), las diarreas por infección, la osteoporosis (al incrementar la biodisponibilidad del calcio) (Reddy 1999), aterosclerosis y enfermedad cardiovascular (al corregir la dislipemia) (Davidson *et al.* 1998) y la resistencia insulínica (Takase *et al.* 1994), obesidad, diabetes mellitus tipo 2 (Takase *et al.* 1994; Jacson *et al.* 1999; Delzenne *et al.* 2011), e incluso contra el cáncer (Reddy 1999).

Bajo el enfoque tradicional, la fibra dificulta la absorción de minerales al ser secuestrados por ésta. Sin embargo, la evidencia científica actual indica que los minerales unidos a la fibra llegan al colon y allí son liberados, lo que permite entonces su absorción. Más aún, los hidratos de carbono de cadena corta aumentan la absorción colónica de zinc, calcio y magnesio al provocar la atracción de agua por ósmosis, en la que se disuelven dichos minerales (Coudray *et al.* 1997).

En noviembre de 2011 se incluyó el término “Prebióticos” en el Código Alimentario Argentino (artículo 1390), Resolución Conj. 229 SPReI 731 SAGyP, en el cual se lo define como *ingrediente alimentario o parte de él (no digerible) que posee un*



efecto benéfico para el organismo receptor, estimulando el crecimiento selectivo y/o actividad de una o de un número limitado de bacterias en el colon y que confiere beneficios para su salud. Además se enumeran los requisitos mínimos para que un alimento sea considerado como tal, entre ellos:

1. *Identificación del compuesto.*

- Nombres químicos
- Caracterización fisicoquímica
- Descripción
- Fuente / Origen
- Pureza
- Contaminantes

2. *Caracterización del prebiótico*

- Resistencia a la acidez gástrica: ensayo realizado como indicador de que el prebiótico no es modificado por la acidez estomacal.
- Resistencia a la hidrólisis por enzimas de mamíferos: ensayo realizado como indicador de que el prebiótico no es afectado por enzimas presentes en la saliva, así como por enzimas pancreáticas e intestinales.
- Resistencia a la absorción gastrointestinal: ensayo realizado como indicador de que el prebiótico no se absorbe a nivel del epitelio intestinal.
- Fermentación por la microflora intestinal.
- Estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de bacterias intestinales benéficas que contribuyen a la salud y bienestar: ensayo realizado como indicador de que el prebiótico es utilizado como nutriente selectivamente por la microflora intestinal considerada benéfica.

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



4. Seguridad.

El compuesto prebiótico no debe ser riesgoso para la salud. Deberá demostrarse mediante ensayos de toxicidad aguda, subaguda y crónica debidamente documentados y respaldados en estudios efectuados por organismos nacionales y/o internacionalmente reconocidos.

Simbiótico.

El término simbiótico se refiere a un producto alimenticio que contiene, en forma combinada, probióticos y prebióticos, los cuales pueden actuar en forma sinérgica para modular la microbiota (flora) intestinal del consumidor e impactar positivamente sobre su salud. Un factor importante en el momento de desarrollar un simbiótico es determinar la compatibilidad entre la cepa probiótica y el tipo de prebiótico utilizado. Hay que tener en cuenta que el prebiótico pueda favorecer selectivamente el crecimiento del probiótico en el tubo digestivo a condición que dicho probiótico pueda utilizarlo como sustrato, es decir, que tenga las enzimas necesarias para metabolizarlo.

Para la elaboración de un simbiótico, también es importante tener en cuenta que el componente prebiótico pueda ser incorporado con facilidad a un gran número de matrices alimenticias mientras que el componente probiótico, por ser un microorganismo que debe mantenerse viable, es un factor limitante en dichas matrices. En la actualidad, los principales alimentos con simbióticos son productos lácteos, debido al hecho que la leche es la matriz alimenticia más adecuada y fácil de usar para los probióticos que, en su mayoría, son bacterias lácticas. Existen pocos trabajos de estudios de asociación simbiótica en alimentos, entre ellos Alves *et al.* (2013) estudiaron un queso crema adicionado con inulina como matriz alimentaria de distintos probióticos y su conservación por 45 días en heladera, mientras que Araújo *et al.* (2010) desarrollaron un alimento simbiótico a base de queso de campo con inulina y *Lactobacillus delbrueckii*.



Interés industrial

La demanda del mercado nacional e internacional ha impulsado en los últimos años una nueva línea de alimentos funcionales probióticos. Conocer y difundir los mecanismos por los cuales las bacterias probióticas ejercen su efecto benéfico permite un uso adecuado por parte de los profesionales de la salud y una mayor confianza en el consumo de alimentos funcionales por parte de la comunidad.

Cabe mencionar que uno de los requisitos principales de este tipo de alimentos es que los microorganismos probióticos permanezcan viables y activos en el alimento y durante el pasaje gastrointestinal, para garantizar así su potencial efecto benéfico en el huésped (Saarela *et al.* 2000).

En la actualidad, existen alimentos con probióticos y simbióticos que se comercializan en nuestro país. Algunos de ellos, se muestran en la Figura 1.



Figura 1. Bioqueso Iloy Vita*1, SanCor Bio con *Lactobacillus casei* + fructanos, Actimel, Yakult, Ser con Biopuritas, Activia Acti Regularis.

En la siguiente tabla, se presentan las características y funciones de los mismos (Olagnero *et al.* 2007).

**Tabla 1.** Alimentos Funcionales Probióticos y Simbióticos: características y funciones.

Producto Alimenticio	Probiótico/Simbiótico	Investigación científica
ACTIMEL	<i>Lactobacillus casei</i> <i>defensis</i> DN114001 Concentración: 10 ⁸ UFC/ml	<ul style="list-style-type: none"> • Ayuda a mejorar la respuesta inmunitaria (Marcos <i>et al.</i> 2004; Turchet <i>et al.</i> 2003; Cobo Sanz <i>et al.</i> 2006; Pujol <i>et al.</i> 2000; Parra <i>et al.</i> 2004a; Parra <i>et al.</i> 2004b) • Disminuye el tiempo de duración de diarreas (Pedone <i>et al.</i> 1999; Pedone <i>et al.</i> 2000; Agarwal <i>et al.</i> 2002; Agarwal <i>et al.</i> 2001; Pereg <i>et al.</i> 2005) • Ayuda al equilibrio de la flora intestinal y favorece la absorción de nutrientes (Guerin-Danan <i>et al.</i> 1998)
YAKULT	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Shirota</i> YIT9018 Concentración: 10 ⁸ UFC/ml	<ul style="list-style-type: none"> • Modulación de la flora intestinal (Macfarlane & Cummings, 1999) • Favorece la digestión de la lactosa (Marteau <i>et al.</i> 1993) • Previene y trata constipación y diarrea (Marteau <i>et al.</i> 1993; Tanaka 1997) • Controla la reproducción de las bacterias nocivas dentro del intestino (Tanaka 1997) • Ayuda a modular el sistema de defensa natural del organismo, fortalece la resistencia a las infecciones (Higashi & Micato-Ku, 2006)
SANCOR BIO	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Sancor</i> CRL 431+ <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Sancor</i> CRL 730 (<i>johnsonii</i>) + Fructanos naturales (InulinaFOS)	<ul style="list-style-type: none"> • Disminuye tiempo de duración de diarreas persistentes (Río <i>et al.</i> 2004; Gonzalez <i>et al.</i> 1990; Gaon <i>et al.</i> 2002; Gaon <i>et al.</i> 2003) • Prevención de enfermedades respiratorias (Río <i>et al.</i> 2002) • Ayuda a prevenir la osteoporosis (Chaila <i>et al.</i> 2005) • Modula balance de linfocitos Th1 y Th2 (Laiho <i>et al.</i> 2002; Fontenla <i>et al.</i> 2002) • <i>L. casei</i> <i>SanCor</i> CRL431 puede proteger contra la infección por Salmonella (Chateau <i>et al.</i> 1993) • Disminuye síntomas de intolerancia a la lactosa (Gaon <i>et al.</i> 1995) • Estimulación del sistema inmune (Vitiñi <i>et al.</i> 2000; Maldonado & Perdígón, 2004; Perdígón <i>et al.</i> 2001)
ACTIVIA ACTI REGULARIS	<i>Bifidobacterium Animalis</i> DN 173010 + Prebiótico FOS Concentración: 10 ⁸ UFC/ml	<ul style="list-style-type: none"> • Ayuda al equilibrio de la flora, reduciendo el tiempo de tránsito intestinal (Cats <i>et al.</i> 2003; Antonie <i>et al.</i> 2000)
YOGURISIMO CON PROVITALIS	<i>Lactobacillus casei</i> + <i>Bifidobacterium</i> Concentración: 10 ⁷ UFC/ml	<ul style="list-style-type: none"> • Favorece un mejor aprovechamiento de los nutrientes (Guerin-Danan <i>et al.</i> 1998) • Modulación de la flora intestinal (Guerin-Danan <i>et al.</i> 1998)
SER CON BIOPURITAS	<i>Bifidobacterium Animalis</i> DN 173010 Concentración: 10 ⁸ UFC/ml	<ul style="list-style-type: none"> • Contribuye al equilibrio de la flora intestinal, regularizando el tránsito intestinal (Marteau <i>et al.</i> 2002; Meance <i>et al.</i> 2001; Meance <i>et al.</i> 2003; Antonie <i>et al.</i> 2000)



BIOQUESO ILOLAY VITA*1	<i>Bifidobacterium sp.</i> + <i>Lactobacillus casei</i> (<i>paracasei</i>) + <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i>	<ul style="list-style-type: none">• Colonización de los intestinos y normalización del tránsito intestinal. (Medici <i>et al.</i> 2004)• Protección contra gérmenes patógenos (Vinderola <i>et al.</i> 2003)• Estimulación del sistema inmunológico (Vinderola <i>et al.</i> 2003)• Disminución de la intolerancia a la lactosa (Medici <i>et al.</i> 2004)
------------------------------	---	--

El kefir como alimento funcional natural

El kefir es una leche fermentada originada hace miles de años en las montañas caucásicas. Aunque es muy popular en países del este europeo, en nuestro país es elaborado artesanalmente por algunas comunidades de inmigrantes. Es una leche fermentada ácida, viscosa y ligeramente carbonatada, 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). No se conocen los mecanismos por los cuales se originaron los gránulos de kefir (Koroleva 1988). Cuando éstos son adicionados a la leche, parte de los microorganismos pasan a ella donde se multiplican y producen metabolitos que otorgarán a la leche fermentada sus características químicas y físicas particulares. La composición del kefir, así como sus características organolépticas están sujetas a variaciones regionales (Garrote *et al.* 1998; Londero *et al.* 2012). Estas variaciones pueden deberse a factores tales como el origen y almacenamiento de los gránulos de kefir, el tipo de leche utilizada, así como a las condiciones de elaboración del producto, siendo relevantes la relación gránulo-leche y la temperatura de fermentación (Witthuhn *et al.* 2005; Latorre García *et al.* 2007; Garrote *et al.* 1998).

El Código Alimentario Argentino lo describe en el capítulo VIII, art. 576, como “*el producto obtenido de la fermentación con cultivos ácidolácticos elaborados con granos de kefir, Lactobacillus kefir, especies de los géneros Leuconostoc, Lactococcus y Acetobacter, con producción de ácido láctico, etanol y dióxido de carbono. Los granos de kefir están constituidos por levaduras fermentadoras de la lactosa (Kluyveromyces marxianus) y levaduras no fermentadoras de la lactosa (Saccharomyces omnispurus,*



Saccharomyces cerevisiae y *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium spp* y *Streptococcus thermophilus*”.

Actualmente su consumo es popular en distintos países del este europeo. En algunos de estos países, así como en Estados Unidos y en Canadá, su producción alcanza escala industrial y se comercializa en el mercado. En Argentina se elabora artesanalmente (Garrote *et al.* 2010).

En la Figura 2 se muestran algunas de las presentaciones comerciales del kefir disponibles en otros países.



Figura 2. Presentaciones comerciales de kefir en otros países.



El consumo de kefir ha sido asociado a la longevidad de los pueblos caucásicos y se ha observado que causa beneficios para la salud (Halle *et al.* 1994; Farnworth 2005). Ha sido administrado en forma empírica para el tratamiento de personas con desórdenes metabólicos, con arterioesclerosis, enfermedades alérgicas y tuberculosis (Lopitz-Otsoa *et al.* 2006). Se ha estudiado su acción antitumoral, la participación en la estimulación del sistema inmune y la actividad antifúngica. Además, numerosos estudios documentan la acción benéfica del kefir para la salud. Se ha demostrado acción preventiva en el tratamiento de gastritis, diarreas, males intestinales y problemas de digestión (Koroleva 1988). Asimismo, Garrote *et al.* (2000), han descrito la capacidad inhibitoria de sobrenadantes de kefir sobre el desarrollo de microorganismos Gram negativos (-), aislados de muestras clínicas y Gram positivos (+), aislados del medio ambiente. 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 llamado kefiran.

Gránulo de kefir.

Los gránulos de kefir son estructuras globulares, gelatinosas, de color blanco amarillento, de consistencia elástica y forma irregular (Figura 3). Están compuestos por una matriz de polisacárido denominado kefiran y proteínas (Abraham & De Antoni, 1999), donde se encuentran adheridas bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas (10^8 - 10^9 UFC/g de gránulo), bacterias acéticas (10^5 - 10^6 UFC/g de gránulo) y levaduras fermentadoras y no fermentadoras de lactosa (10^7 - 10^8 UFC/g de gránulo) (Garrote *et al.* 1997, 2001; Koroleva 1991). Estos microorganismos establecen entre sí una íntima relación simbiótica, producto de la cual se obtiene esta bebida de características organolépticas propias.

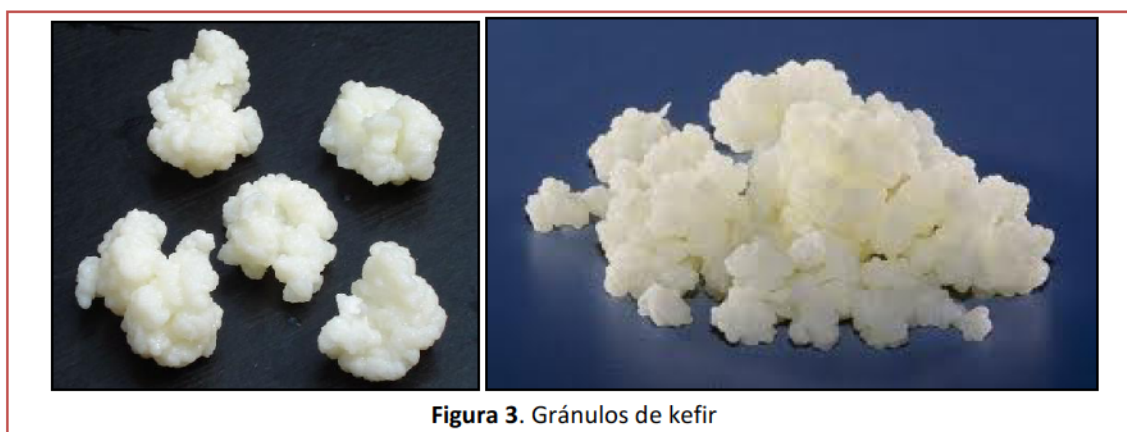


Figura 3. Gránulos de kefir

El gránulo de kefir, contiene aproximadamente 83 % de agua, 6 % de proteínas y 11 % de un polisacárido denominado kefiran (Abraham & De Antoni, 1999) y constituyen un ecosistema natural que se ha mantenido en el tiempo. 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 aumento de la temperatura de fermentación produce alteraciones en el aspecto y en la 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 gránulo de kefir es una comunidad compleja (Margulis 1996), siendo este hecho lo que dificulta su empleo como *starter* (Farnworth 2005). 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 (Molska *et al.* 1983; Zourari & Anifantakis, 1988; Farnworth 2005; Magra *et al.* 2012). 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).

Los gránulos de kefir se forman solamente a partir de otros gránulos preexistentes y en el laboratorio no ha sido posible formar un nuevo gránulo partiendo de la asociación de cepas aisladas de los mismos (Bottazzi *et al.* 1994). Sin embargo,



Wang *et al.* (2012a) propusieron que la formación de gránulo comienza con la autoagregación de *Lactobacillus kefiranofaciens* y *Saccharomyces turicensis* para formar pequeños gránulos. Luego, *Lactobacillus kefir* comienza a producir biofilms y empieza a unirse a la superficie de los pequeños gránulos y coagregar con otros microorganismos y componentes de la leche para formar los gránulos. Aquí es cuando comienza el crecimiento de los mismos. Del análisis del gránulo mediante microscopía electrónica de barrido, Wang *et al.* (2012b) pudieron concluir que los lactobacilos de cadena corta tales como *L. kefir* se ubican en la superficie del gránulo, mientras que lactobacilos de cadena larga tales como *L. kefiranofaciens* forman agregados hacia el centro de los gránulos de kefir.

El exopolisacárido producido por los microorganismos presentes en los gránulos de kefir se denomina kefiran (Kooiman 1968). La responsabilidad sobre la producción de dicho polisacárido fue adjudicada inicialmente a *Lactobacillus brevis* (La Rivière *et al.* 1967), “*atypical Streptobacterium*” (Rosi & Rossi, 1978) y finalmente a *L. kefiranofaciens* sp. Nov (WT-2B, ATCC 43761) (Fujisawa *et al.* 1988). Recientemente las especies *Lactobacillus kefiranofaciens* (Fujisawa *et al.* 1988) y *Lactobacillus kefirgranum*, lactobacilos homofermentativos aislados de gránulos de kefir fueron reclasificados en dos subespecies: *L. kefiranofaciens* subespecie *kefiranofaciens* y *L. kefiranofaciens* subespecie *kefirgranum* (Vancanneyt *et al.* 2004) siendo la subespecie *kefiranofaciens* la considerada responsable de la producción del kefiran (Fujisawa *et al.* 1988; Michelli *et al.* 1999).

Kefirán, exopolisacárido producido por lactobacilos del kefir

El kefiran es un polisacárido producido por los lactobacilos presentes en el gránulo de kefir. El kefiran es un glucogalactano ramificado, soluble en agua, que contiene aproximadamente la misma cantidad de residuos de D-glucosa y D-galactosa (Figura 4). Está presente en gránulos de kefir, formando parte de la matriz de los mismos, y también en la leche o suero fermentado por dichos gránulos (Rimada & Abraham, 2001, 2003). La enzima β ,D (1-6) glucanasa, es capaz de fragmentarlo generando pentasacáridos y glucosas (La Rivière *et al.* 1967). La unidad repetitiva del



kefiran está compuesta por hexa o heptasacáridos ramificados formados por un pentasacárido lineal y uno o dos residuos de azúcares unidos aleatoriamente al pentasacárido (Kooiman 1968; Micheli *et al.* 1999). Otros autores mediante estudios de hidrólisis y metilación demostraron que el kefiran presenta una estructura más compleja que la que se describe, indicando la coexistencia de moléculas con microheterogeneidades en su estructura (Mukai *et al.* 1988).

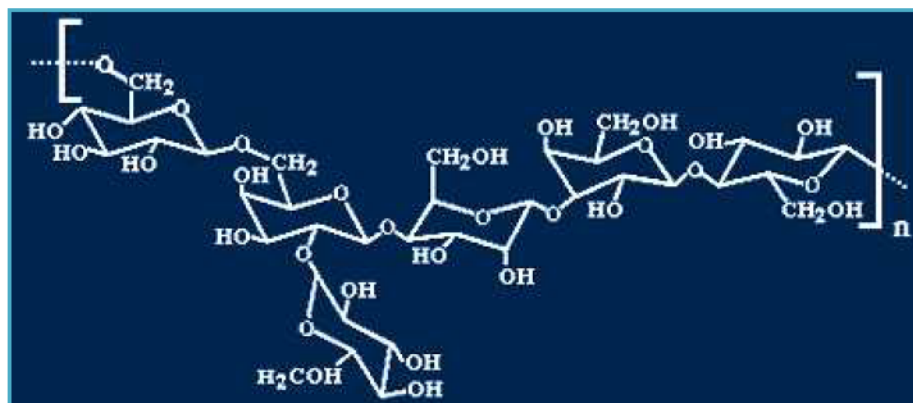


Figura 4. Estructura propuesta para la unidad repetitiva del kefiran en el año 1968 por P. Kooiman. (Carbohydrate Research, 7: 200-211).

Este polisacárido está presente en la leche fermentada en concentraciones de 250 mg/l y en los gránulos en concentración de 8 a 11 % (p/v). La extracción de este polisacárido a partir de los gránulos de kefir es un método simple con buen rendimiento (Rimada & Abraham, 2001). Los gránulos se pueden obtener durante la producción de kefir ya que aumentan su biomasa con los sucesivos repiques y los mismos son capaces de aumentar su biomasa durante la obtención de suero fermentado (Piermaría *et al.* 2008, Londero *et al.* 2012), siendo éste un medio más económico que la leche y que se genera en grandes cantidades como subproducto de la industria láctea. Por lo tanto, el kefiran sería un polisacárido que podría utilizarse como aditivo alimentario.

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 *Lactobacillus sp.* KPB-167B produce un polisacárido cuya estructura es similar al kefiran (Yokoi *et al.* 1990). El polímero procedente de *L. kefirifaciens* ZW3 fue estudiado mediante espectroscopia



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 $7,6 \cdot 10^5$ g/mol y está compuesto por glucosa y galactosa en una relación molar 1,00:1,05.

Funcionalidad biológica del kefiran.

El tipo de uniones que presenta el kefiran hace que no sea digerible por el hombre por lo cual constituiría un aporte de fibras. El kefiran es parcialmente hidrolizado por celulasas provenientes de *Trichoderma reesei*, pero no puede ser hidrolizado por β -galactosidasa de *Escherichia coli* ni por α -galactosidasa de *Mortierella vinacea* (Mukai *et al.* 1988). Como consecuencia de la estructura que presenta, el kefiran puede llegar intacto al intestino delgado, donde podría ejercer efectos biológicos. Se ha documentado mediante estudios en ratas hipertensas alimentadas con dietas de alto contenido lipídico que el kefiran posee actividad anticolesterolemica; observándose que aquellas que recibieron kefiran disminuyeron significativamente la presión sanguínea y los niveles de colesterol-LDL, colesterol total y triglicéridos en relación a aquellas que no lo recibieron (Maeda *et al.* 2004a). Al utilizar un modelo de ratas constipadas inducido por una dieta baja en fibras se observó que la administración de kefiran mejora los niveles de humedad y el 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.* 2006a; Medrano *et al.* 2011).

Estudios sobre la **acción antitumoral** del kefiran mostraron una disminución del crecimiento de tumores en ratones tratados oral o intraperitonealmente 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 produce la remisión de



tumores inducidos y 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 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 (Medrano *et al.* 2008), 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 de *B. cereus* a enterocitos, evitando alteraciones morfológicas, antagonizando la inducción de eventos de muerte celular y previniendo el desprendimiento celular. La capacidad del kefiran de interactuar tanto con la superficie de bacterias como de enterocitos podría ser la responsable del efecto protector observado.

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

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) (Rimada & Abraham, 2006).

El kefiran en soluciones acuosas es capaz de formar geles al ser sometido a un proceso de congelación-descongelación, denominados "criogeles" (del griego *kryos*, que significa escarcha o hielo) (Lozinsky *et al.* 2003). Los geles formados resultan



translúcidos con una alta capacidad de retención de agua ($90,43 \% \pm 1,51$) y son suficientemente cohesivos como para soportar su propio peso. Los espectros mecánicos de las muestras después de ser sometidas al proceso de congelación - descongelación muestran que el módulo 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 kefirán a 37 °C determina su habilidad para fundirse a la temperatura de la boca; esta propiedad resulta relevante para su aplicación en alimentos (Piermaría *et al.* 2008). Pintado *et al.* (1996) demostraron que el kefirán forma geles en solución acuosa conteniendo etanol. La fuerza de los geles preparados con 3 % de kefirán en 8 % de etanol es equivalente a la obtenida en los geles formados con 3 % de gelatina (Mukai *et al.* 1990).

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

Matrices alimentarias utilizadas para la incorporación de microorganismos probióticos

El mercado mundial de bebidas y alimentos funcionales representa un segmento dinámico y creciente de la industria de los alimentos debido a sus efectos beneficiosos sobre la salud humana (Global Industry Analysts, Inc., 2012), estimándose que llegará a US\$ 130 millones para el 2015. Los alimentos funcionales probióticos, una parte significativa de este mercado, tenían un valor aproximado de US\$ 15,9 mil millones en 2008 (Marco Trade News, 2012) y se espera que alcance un valor de US\$ 28,8 mil millones en el presente año.



Uno de los criterios más importantes para determinar la eficacia y el éxito del producto que contiene probióticos es la aceptación del producto por los consumidores y la supervivencia de los microorganismos probióticos durante su producción (Heenan *et al.* 2004). En general, la industria alimentaria ha aplicado el nivel recomendado de 10^6 UFC/g en el momento de consumo de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* y otros microorganismos probióticos (Boylston *et al.* 2004).

Sin embargo, los productos y suplementos probióticos comercialmente disponibles a menudo proporcionan poblaciones de células insuficientes debido a la pérdida de viabilidad durante la fabricación del producto (Doherty *et al.* 2011). Además, la sobrevivencia de probióticos durante el paso a través del tracto gastrointestinal humano (TGI) sigue siendo un reto importante (Anal & Singh, 2007).

Se han evaluado diferentes alimentos para la incorporación de microorganismos probióticos. Aragon-Alegro *et al.* (2007) estudiaron la aplicación de mousse de chocolate como vehículo para microorganismos probióticos, incorporando inulina como componente prebiótico. Asimismo, la inclusión en chocolate de *Lactobacillus helveticus* CNCM I-1722 y *Bifidobacterium longum* CNCM I-3470 microencapsulado mejoró la supervivencia frente a las condiciones gastrointestinales *in vitro* (Possemiers *et al.* 2010). Por otro lado, los procesos de microencapsulación, particularmente mediante secado spray, podrían permitir el uso de probióticos (y por ende de simbióticos) en matrices alimentarias con baja actividad de agua, como es el pan o productos similares.

Dado que, los microorganismos probióticos deben resistir el proceso de elaboración y almacenamiento con el fin de permanecer viables en el producto comercial a una concentración mayor de 10^6 UFC/g (Kurmann & Rasic, 1991), y deben resistir las condiciones adversas del tracto gastrointestinal, como ácidos y secreciones biliares y competir con la microbiota fecal (Fooks & Gibson, 2002), se han buscado alternativas para mejorar la supervivencia de los mismos.

Actualmente los geles alimentarios se plantean como alternativa para vehicular microorganismos probióticos ya que además, poseen aplicaciones en la industria farmacéutica (Lozinsky *et al.* 2003).



OBJETIVO GENERAL

Teniendo en cuenta la capacidad del polisacárido kefiran de formar geles, se pretende profundizar el conocimiento del comportamiento de este polisacárido en sistemas complejos y utilizar los mismos como vehículo de sustancias bioactivas o microorganismos.

Se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- A.** Seleccionar microorganismos aislados de kefir con potencialidad probiótica.

- B.** Utilizar los geles de kefiran como vehículos para la inclusión de componentes activos y/o microorganismos probióticos para el desarrollo de alimentos funcionales. Para ello, se propone explorar la capacidad del kefiran de formar geles mixtos con proteínas de suero de leche y azúcares, y evaluar el comportamiento de los microorganismos probióticos en dicha matriz.



CAPÍTULO 1

SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS





INTRODUCCIÓN

Microorganismos del kefir

En el año 2001, *Food and Agriculture Organization* (FAO) definió al kefir desde el punto de vista microbiológico 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 describen además, la presencia de otros microorganismos que se detallan en la siguiente lista, adaptada de Garrote *et al.* 2010.

- Lactobacilos

-*Lactobacillus kefir* (Koroleva, 1991; Pintado *et al.* 1996; Kandler & Kunath, 1983; Takizawa *et al.* 1994; Garrote *et al.* 2001; Santos *et al.* 2003; Angulo *et al.* 1993; Chen *et al.* 2008; Jianzhong *et al.* 2009).

-*Lactobacillus kefiranofaciens* (Fujisawa *et al.* 1988; Takizawa *et al.* 1994; Santos *et al.* 2003; Chen *et al.* 2008; Jianzhong *et al.* 2009; Magalhães *et al.* 2010).

-*Lactobacillus kefirgranum* (Takizawa *et al.* 1994).

-*Lactobacillus parakefir* (Takizawa *et al.* 1994; Garrote *et al.* 2001).

-*Lactobacillus brevis* (Ottogalli *et al.* 1973; Simova *et al.* 2002; Santos *et al.* 2003; Angulo *et al.* 1993).

-*Lactobacillus plantarum* (Garrote *et al.* 2001; Santos *et al.* 2003).

-*Lactobacillus helveticus* (Koroleva, 1991, Simova *et al.* 2002; Jianzhong *et al.* 2009; *Lactobacillus acidophilus* (Ottogalli *et al.* 1973; Santos *et al.* 2003; Angulo *et al.* 1993).

-*Lactobacillus gasseri* (Angulo *et al.* 1993).

-*Lactobacillus delbrueckii* (Koroleva, 1991, Simova *et al.* 2002; Santos *et al.* 2003).

-*Lactobacillus rhamnosus* (Koroleva, 1991; Angulo *et al.* 1993).

-*Lactobacillus casei* (Simova *et al.* 2002; Jianzhong *et al.* 2009).

-*Lactobacillus paracasei* (Santos *et al.* 2003).



-*Lactobacillus fructivorans* (Yoshida & Toyoshima 1994).

-*Lactobacillus hilgardii* (Yoshida & Toyoshima 1994).

-*Lactobacillus fermentum* (Angulo *et al.* 1993).

-*Lactobacillus viridescens* (Angulo *et al.* 1993).

-*Lactobacillus crispatus* (Garbers *et al.* 2004).

- Bacterias ácido acéticas

-*Acetobacter sp.* (Garrote *et al.* 2001).

-*Acetobacter pasteurianus* (Ottogalli *et al.* 1973).

-*Acetobacter aceti* (Koroleva, 1991; Rosi & Rossi, 1978).

- Lactococos

-*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Koroleva, 1991; Pintado *et al.* 1996; Yüksekdag *et al.* 2004); Dousset & Caillet, 1993; Ottogalli *et al.* 1973; Simova *et al.* 2002; Yoshida & Toyoshima, 1994; Garrote *et al.* 2001; Angulo *et al.* 1993).

-*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Koroleva, 1991; Yüksekdag *et al.* 2004; Dousset & Caillet, 1993).

- Enterococos

-*Enterococcus durans* (Rosi & Rossi, 1978; Yüksekdag *et al.* 2004); descrita como *Streptobacterium durans* (Rosi & Rossi, 1978); descrita como *Streptococcus durans* en Yüksekdag *et al.* 2004).

- Estreptococos

-*Streptococcus thermophilus* (Yüksekdag *et al.* 2004; Simova *et al.* 2002).

-*Streptococcus durans* (Yüksekdag *et al.* 2004).

- Leuconostoc

-*Leuconostoc sp.* (Angulo *et al.* 1993).



-*Leuconostoc mesenteroides* (Koroleva, 1991; Ottogalli *et al.* 1973; Garrote *et al.* 2001; Garbers *et al.* 2004; Chen *et al.* 2008; Jianzhong *et al.* 2009; descrita como *Leuconostoc kefir* en Ottogalli *et al.* 1973).

- Otras bacterias

-*Bacillus sp.* (Angulo *et al.* 1993).

-*Bacillus subtilis* (Ottogalli *et al.* 1973).

-*Pseudomonas spp.* (Chen *et al.* 2008; Jianzhong *et al.* 2009).

-*Escherichia coli* (Angulo *et al.* 1993; Chen *et al.* 2008).

-*Micrococcus sp.* (Angulo *et al.* 1993).

Propiedades benéficas atribuidas al consumo de kefir y sus microorganismos

Algunas de las propiedades observadas de los microorganismos del kefir se describen a continuación:

- Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana del kefir ha sido asociada fundamentalmente a su contenido de ácidos orgánicos (Garrote *et al.* 2000), aunque se ha sugerido que podrían estar involucradas otras moléculas como peróxido de hidrógeno, acetaldehído, dióxido de carbono y péptidos (bacteriocinas) por parte de las bacterias presentes en el ecosistema del kefir (Powell *et al.* 2007). Garrote *et al.* (2001) mostraron que el kefir obtenido a partir de diferentes gránulos, alcanza un 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 de *Escherichia coli*. Gulmez & Guven (2003) compararon la seguridad microbiológica de yogurt y kefir utilizando como indicador *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) demostraron la actividad antimicrobiana de kefir contra *Candida albicans*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*,



Salmonella typhimurium y *Shigella sonnei*. Kakisu *et al.* (2007) probaron que el kefir disminuye la viabilidad y la germinación de esporas de *Bacillus cereus*. Otros autores han estudiado la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de productos fermentados con kefir o con microorganismos aislados a partir de ellos (Brialy *et al.* 1995; Santos *et al.* 2003; Yüsekdağ *et al.* 2004; Rodríguez *et al.* 2005, Londero *et al.* 2012). Golowczyc *et al.* (2008) demostraron que los sobrenadantes de 11 cepas de *Lactobacillus plantarum*, aisladas de gránulos de kefir, producen una fuerte inhibición del crecimiento de *Salmonella enterica* serovar Thipymurium y *E. coli* y que alguno de ellos también inhibe el crecimiento de *Salmonella gallinarum*, *Salmonella enterica* y *Sigella 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 lacticina 3147, que tiene efecto inhibitorio contra muchos patógenos de alimentos y microorganismos esporulados (Ryan *et al.* 1996; Dobson *et al.* 2011). *L. plantarum* ST8K aislado de kefir produce una bacteriocina de 3,5 kDa (bacST8KF) que es activa contra *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus curvatus* y *Listeria innocua* (Powell *et al.* 2007). También se demostró su actividad antifúngica (Cevikbas *et al.* 1994; Ismaiel *et al.* 2011). Carasi *et al.* (2012) mostraron la capacidad de las proteínas de la capa-S de lactobacilos kefir para antagonizar los efectos biológicos de toxinas de origen bacteriano, en especial de *Clostridium difficile*. Así también, fue demostrado que la capa-S de *L. kefiri* antagoniza la adhesión y/o invasión de *Salmonella* Enteritidis *in vitro* (Golowczyc *et al.* 2007).

- Adhesión a superficie intestinal

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 (Ouweland *et al.* 1999a). La habilidad de adherirse a células epiteliales *in vitro* es común en *Lactobacillus* y es dependiente de la cepa. *L. plantarum* y *L. kefiri* aislados de gránulos de kefir son capaces de adherirse a células Caco-2 con diferentes porcentajes de asociación (0,97 a 10 % de adherencia). Esta capacidad no se relaciona con la hidrofobicidad, ya que tanto cepas de *L. kefiri* altamente hidrofóbicas (Golowczyc *et al.* 2007) como cepas de *L. plantarum* altamente hidrófilas (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 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 *L. plantarum* CIDCA 83114, viable o no, protege las células epiteliales (Hep-2) en cultivo del daño inducido por los factores de virulencia de *E. coli*. En este trabajo los autores 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. Los microorganismos de kefir disminuyen significativamente el número de *Clostridium* en intestino delgado y grueso respecto a grupos controles (Marquina *et al.* 2002). 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.

- **Actividad antitumoral**

La actividad antitumoral también ha sido relacionada al consumo de kefir. De Moreno de LeBlanc *et al.* (2007) 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. Liu *et al.* (2002) encontraron que el kefir indujo un proceso de apoptosis en células tumorales que permitieron una disminución significativa en el crecimiento de tumores en ratones. 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. Los primeros en documentar un efecto antitumoral relacionado al polisacárido aislado de kefir fueron Shiomi *et al.* (1982). 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).

- Actividad moduladora de la respuesta inmune

Se ha propuesto que la modulación del sistema inmune sería uno de los mecanismos por los cuales las bacterias probióticas podrían ejercer sus efectos benéficos para la salud del hospedador (Gill & Rutherford, 2001; De Simone, 2005). Thoreux & Schmucker (2001) concluyeron que el kefir ejerce un efecto adyuvante en el sistema inmune de mucosas al demostrar un aumento de inmunoglobulina IgA específica y un aumento significativo en los niveles séricos de IgG no específica en ratones tratados con kefir frente al desafío con toxina colérica comparado con ratones control. Otros autores demostraron actividad antiinflamatoria y antialérgica del kefir en un modelo murino de asma (Lee *et al.* 2007). Además, de acuerdo a la evidencia presentada en los últimos años, los polisacáridos presentes en el producto fermentado podrían tener implicancia en la modulación de la respuesta inmune, habiéndose demostrado este efecto para el kefiran (Furukawa *et al.* 1992; Vinderola *et al.* 2006a; Medrano *et al.* 2011).

- Tratamiento para el colesterol

La fermentación de la leche con gránulos de kefir de distintos orígenes durante 24 horas a 20 °C es capaz de reducir los niveles de colesterol presentes en leche hasta 62 % (Vujicic *et al.* 1992). Además, *Lactobacillus acidophilus* CU 673 aislado de kefir presenta capacidad de asimilar colesterol *in vitro* (Yoon *et al.* 1999) y *Kluyveromyces marxianus* es capaz de capturarlo en su pared celular (Yoshida *et al.* 2005). Sin embargo, estudios *in vivo* arrojan resultados contradictorios respecto al efecto anticolesterolémico del kefir. Liu *et al.* (2006) demostraron que el kefir, producido en leche de vaca y de soja, disminuye la concentración de colesterol y de triglicéridos en suero en hámster. Urdaneta *et al.* (2007), en contraposición con los resultados descritos por Liu *et al.* (2006), hallaron un pequeño incremento en los niveles de colesterol y triglicéridos en ratas que consumieron kefir. St-Onge *et al.* (2002) describieron que el consumo de kefir en sujetos con hipercolesterolemia no produjo efecto alguno sobre los niveles de



colesterol total, y tampoco sobre la concentración de colesterol LDL, colesterol HDL y triglicéridos. En consecuencia, el efecto hipocolesterolémico del kefir está en discusión. Por otro lado, *L. plantarum* LP09 y LP45 aisladas de kefir redujeron el colesterol, triglicéridos y colesterol-LDL y podrían utilizarse como agentes probióticos para el tratamiento de la hipercolesterolemia (Huang *et al.* 2013a, 2013b).

- Efecto hipertensivo

Quirós *et al.* (2005) revelaron que el kefir elaborado a partir de leche de cabra inhibe a la enzima transformadora de la angiotensina (ACE) *in vitro* por la presencia de péptidos de bajo peso molecular producidos por la proteólisis durante la fermentación. También se ha descrito que la administración oral de kefir a ratones reduce la actividad ACE en suero (Maeda *et al.* 2004a).

- Trastornos intestinales

El kefir mejora la digestibilidad y absorción de la lactosa debido a la presencia de la enzima β -galactosidasa cuya actividad en el kefir es 60 % mayor que en el yogurt (De Vrese *et al.* 1992; Hertzler & Clancy, 2003). Chen *et al.* 2013, observaron tanto *in vivo* como *in vitro*, un efecto anticolitis atribuido a *L. kefirifaciens* M1 aislado de kefir, teniendo el potencial de ser aplicado en productos lácteos fermentados como una terapia alternativa para los trastornos intestinales. Además, Bolla *et al.* (2013) demostraron que un tratamiento oral con una mezcla de bacterias y levaduras aisladas del kefir, entre ellas *Lactococcus lactis* sub *lactis* CIDCA 8221, *L. plantarum* CIDCA 83114, *L. kefiri* CIDCA 8348, *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 y *Saccharomyces cerevisiae* CIDCA 8112, fueron capaces de prevenir la diarrea y enterocolitis en un modelo animal de hamsters Syrian provocada por *C. difficile*.

Adhesión bacteriana

Uno de los principales criterios para la selección de cepas de probióticos es su capacidad de adherirse al epitelio intestinal, ya que esto determina sus interacciones con el huésped y los microorganismos presentes en el sistema anfitrión (Alander *et al.*



1999). Sin embargo el concepto que las bacterias probióticas tienen que ser capaces de colonizar el segmento gastrointestinal está muy discutido. El término colonización describe la habilidad de una cepa particular de establecerse en el hospedador por un período prolongado de tiempo sin necesidad de que la misma sea introducida constantemente (Guarner *et al.* 2005). Se sabe que a nivel de género, la microbiota de una persona adulta sana es estable, mientras que a nivel de especie, se producen variaciones menores (Zoetendal *et al.* 1998). Sin embargo, la administración de antibióticos puede cambiar bruscamente la composición microbiana intestinal y en este caso, la administración de bacterias probióticas puede modular el balance microbiano positivamente, causando un incremento de las mismas y cambios en el nivel de otras bacterias. De todas formas, no hay pruebas que las bacterias probióticas tengan que colonizar el intestino para ejercer efectos benéficos para la salud (Isolauri *et al.* 2004).

Aunque generalmente la adhesión al intestino es considerada como un factor importante para lograr la colonización y pre-requisito esencial para ejercer una actividad probiótica, también hay que considerar que la adhesión no es esencial dado que un rápido crecimiento puede lograr el mismo fin si los microorganismos son consumidos en forma constante (Fuller 1997; Ehrmann *et al.* 2002; Servin & Coconnier, 2003). Algunos trabajos demuestran que la adhesión al epitelio intestinal no garantiza la colonización (Lee *et al.* 2000). Otro punto importante para tener en cuenta es que algunos investigadores sugieren que la adhesión de las bacterias al intestino puede causar la traslocación y posterior infección de órganos en personas con predisposición a la bacteriemia, aunque consideran que existen otros factores que podrían estar involucrados (Apostolou *et al.* 2001; Rinkinen *et al.* 2003).

Modelos para el estudio de adhesión bacteriana.

La capacidad de adhesión de los probióticos está estrechamente relacionada con sus propiedades de la superficie. La pared celular de las bacterias Gram positivas se compone de una capa gruesa de peptidoglicano, que está “decorado” con varios componentes, entre ellos ácido lipoteicoico, polisacáridos, proteínas, y entre ellas, las proteínas de la capa-S (Schar-Zammaretti *et al.* 2005; Deepika *et al.* 2010).



Una aproximación simple para obtener información acerca de la capacidad de adhesión en el ecosistema intestinal es estudiar las propiedades superficiales de las cepas seleccionadas. Esto se puede lograr utilizando una combinación de metodologías tales como partición en hidrocarburos, interacción con otros microorganismos, adhesión a monocapas celulares en cultivo, etc. Hasta ahora no ha sido desarrollada una técnica que por sí misma pueda caracterizar adecuadamente todos los aspectos de la interacción microorganismo-sustrato.

Existen diferentes modelos para estudiar las características de la superficie bacteriana y la capacidad de adhesión de microorganismos. Estos modelos van desde los estudios de hidrofobicidad superficial hasta los estudios de adhesión *in vivo*. La hidrofobicidad como una característica de la superficie bacteriana ha sido estudiada ampliamente. Cuando un componente no polar está en un medio acuoso tiende a agregarse para disminuir el área de la interface hidrocarburo-agua. En este fenómeno están involucradas las proteínas, entre otras moléculas, que contienen aminoácidos con residuos hidrofóbicos que podrían intervenir en las reacciones de adhesión entre microorganismos entre sí y con algún sustrato. Un microorganismo se va a adherir a una superficie a través de un efecto hidrofóbico si posee una alta densidad de sitios no polares sobre su superficie. Para muchos microorganismos, la partición en hexadecano parece ser proporcional a la adherencia a determinadas superficies. Sin embargo, varios autores (Ouwehand *et al.* 1999a; Schillinger *et al.* 2005; Golowzyc *et al.* 2008) han demostrado que no existe correlación entre la hidrofobicidad de la superficie celular y la adherencia a las células epiteliales. Por lo tanto, la hidrofobicidad podría contribuir a la adhesión, pero no es indispensable.

La adhesión de las bacterias probióticas en el tracto gastrointestinal comúnmente se prueba *in vitro* utilizando líneas celulares modelo, tales como las células Caco-2 (Tuomola & Salminen, 1998), células productoras de mucus (HT-29 MTX) o mucus en sí mismo (Ouwehand *et al.* 1999) y componentes de la matriz extracelular, tales como los colágenos, fibronectina y laminina (De Leeuw *et al.* 2006). Estos sistemas permiten y facilitan la selección preliminar de cepas potencialmente adherentes (Collado *et al.* 2005). Las células Caco-2 son células de carcinoma de colon humano y se diferencian en enterocitos maduros luego de la confluencia, son células polarizadas con



desarrollo del borde apical “en cepillo” característico de las células intestinales (Blum *et al.* 1999). El tiempo de incubación y la composición del medio de crecimiento son factores que influyen en la adhesión bacteriana a las células Caco-2. (Deepika *et al.* 2009; Ojeda *et al.* 2008). Esta línea es una de las más utilizadas para estudiar y seleccionar bacterias lácticas en base a su capacidad de adhesión (Pinto *et al.* 1983; Tuomola & Salminen, 1998), sin embargo existen otras líneas celulares, también derivadas de carcinoma de colon humano, ampliamente utilizadas, tales como HT29, HT29-MTX (productora de mucus) y Caco-2/TC-7 que son un clon de las células Caco-2 (Blum *et al.* 1999; Servin 2004). Haeri *et al.* 2012 compararon el nivel de adherencia de bacterias probióticas en tres líneas celulares de diferente origen tales como Caco-2, células HEp-2 y líneas de células T84 (Tabla 2). El porcentaje de adhesión de 14 de los 16 microorganismos estudiados fue similar en células HEp-2 y Caco-2. La similitud observada entre T84 y Caco-2 fue de 10 sobre 16. Estos sistemas ofrecen la ventaja de que las células presentan una uniformidad celular, hay mayor reproducibilidad entre ensayos que en los ensayos *in vivo* y los experimentos son más simples. Por otro lado, tienen la desventaja que pueden presentar una superficie diferente a la original, especialmente en términos de distribución y accesibilidad de receptores.

Tabla 2. Líneas celulares más usadas y origen correspondiente.

Línea Celular	Origen
Caco-2	Células epiteliales de intestino – Origen humano
Caco-2/TC-7	Clon de la línea Caco-2
HEp-2	Células epiteliales de laringe – Origen humano
T84	Células epiteliales de intestino – Origen humano
HT29	Células epiteliales de intestino – Origen humano
Raw	Monocitos macrófagos de ratón
Vero	Fibroblastos de riñón de mono

Los estudios de adhesión a tejidos vivos son la mejor aproximación. Ciertos estudios sugieren una correlación entre los resultados *in vitro* e *in vivo*, lo que indica que la adhesión *in vitro* podría ser utilizada para predecir el tiempo de residencia de los



probióticos en el tracto gastrointestinal humano (Jacobsen *et al* 1999; Dunne *et al.* 2001).

La inoculación de animales o voluntarios humanos es el sistema más natural y adecuado (Gardiner *et al.* 2004; Valeur *et al.* 2004). Los ensayos con animales son un modelo que presenta buena correlación con los ensayos en humanos. Hay que tener en cuenta que para el relevamiento de un número elevado de bacterias los ensayos pueden ser complicados ya que para los experimentos se necesita contar con una población suficientemente grande de animales para obtener resultados estadísticamente representativos.

Microorganismos patógenos: *Salmonella entérica* serovar Enteritidis

Salmonella como agente causal de enfermedades.

Salmonella pertenece a la familia enterobacteriaceae, es un bacilo Gram negativo (-), no esporulado. Es uno de los microorganismos patógenos más estudiados debido a que es el agente etiológico causante de muchas enfermedades definidas como Salmonelosis. La enfermedad comúnmente se manifiesta por enterocolitis aguda, con aparición repentina de cefalea, dolor abdominal, diarrea, náuseas y a veces vómitos; y puede evolucionar a septicemia o infección focal. Rara vez es mortal, excepto en niños de corta edad, personas de avanzada edad e inmunodeprimidos. Las estrategias convencionales para el tratamiento de esta enfermedad como la terapia con antibióticos y la vacunación tienen no sólo demostrado que son de eficacia sub-óptima sino que también conducen al desarrollo de cepas resistentes a múltiples fármacos contra *Salmonella*. Los cuadros clínicos de *Salmonella entérica* serovar Enteritidis están asociadas principalmente al consumo de huevos crudos o mal cocidos y productos derivados contaminados, tales como mayonesas y merengues entre otros (Vaquero *et al.* 2011). A pesar de las mejoras en sanidad e higiene, la salmonelosis continúa siendo un grave problema económico y para la salud (Patrick *et al.* 2004; Velge *et al.* 2005).



En la Unión Europea se estima que se producen cerca de 160.000 casos anuales de gastroenteritis causada principalmente por *Salmonella entérica* serovar Typhimurium y serovar Enteritidis. En el período 1995-1999, *Salmonella* fue el segundo agente causal más importante (35,3 %) de brotes de ETA (Enfermedades Transmitidas por Alimentos) en América Latina y el Caribe. Durante el periodo 1993-2002 se han registrado en Latinoamérica 1256 brotes de salmonelosis, que afectaron a 48334 personas y produjeron 15 muertes. El 29,2 % de los casos fue consecuencia del consumo de huevos o productos derivados y el 9,4 %, fue debido a la ingesta de carne de aves. El 9,8 % de los brotes fue causado por *Salmonella enterica* serovar Enteritidis y en el 85 % de los casos no se pudo determinar la serovariedad implicada (Fuente: Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos [SIRVETA]).

En Argentina durante el período 1993-2002 ocurrieron 60 brotes de salmonelosis que produjeron 889 enfermos y 4 muertos. Según un informe del Boletín epidemiológico Nacional publicado en 2006 las 5 serovariedades prevalentes en muestras de origen humano en Argentina en el período 2004-2005 fueron: *S. Enteritidis* (36,0 %), *S. Typhimurium* (20,5 %), *S. Infantis* (8,7 %), *S. Newport* (5,3 %) y *S. Agona* (4,9 %); siguiendo la misma tendencia que en años anteriores. La mortalidad por salmonelosis en países desarrollados es poco frecuente (<5 %) sin embargo en países en desarrollo con mayor frecuencia de enfermedades invasivas la mortalidad se encuentra entre 18 y 24 % (Chimalizeni *et al.* 2010).

Para llevar a cabo el proceso patogénico, *Salmonella* presenta varios mecanismos de virulencia. Los genes de virulencia más importantes son los que se encuentran dentro de las denominadas islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI). Hasta el momento, se ha descrito que cinco SPI tienen una importante contribución a la patogénesis (Frábega & Vila, 2013). En la primera etapa de la infección, la bacteria debe encontrar y **adherirse** a uno o más tipos de células del tejido intestinal. Algunos mecanismos de adhesión pueden involucrar varios tipos de fimbrias o pili (Salyers & Whit, 2002). El ribete en cepillo del epitelio intestinal permanece intacto hasta el momento en que *Salmonella* llega al intestino y se acerca a la superficie epitelial. A partir de ese momento, las microvellosidades circundantes empiezan a degenerarse con elongación, edema y



crecimiento en un proceso llamado *ruffling* (rizado). Aquí, los efectores interactúan con las proteínas de la célula hospedadora para arreglar el citoesqueleto de actina e inducir cambios morfológicos que causan que estas células, normalmente no fagocíticas, internalicen la bacteria en un proceso llamado **invasión** (Darwin & Miller, 1999).

Maciel *et al.* (2012) mostraron que la administración oral de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis a ratones provoca alteraciones en las microvellosidades del intestino delgado de distintos grados de degeneración, y crecimiento bacteriano en el ciego luego de 2-3 semanas de la administración de *Salmonella*.

Probióticos frente a la acción de *Salmonella* Enteritidis.

Las bacterias probióticas, principalmente bacterias lácticas y bifidobacterias, producen un efecto positivo sobre la inmunomodulación y actúan eficazmente en la prevención de diversos desórdenes gastrointestinales (Fooks & Gibson, 2002; Perdigon *et al.* 2002; Servin & Coconier, 2003). Las bacterias de género *Lactobacillus spp.* tienen la capacidad de interferir en la adhesión de *Salmonella* y otros patógenos intestinales a las células de epitelio intestinal. Existen numerosos trabajos, donde se demuestra este papel protector, tanto sobre células en cultivo como *in vivo*. *Lactobacillus acidophilus* LB y *Lactobacillus johnsonii* La1 junto con su sobrenadante de cultivo demostraron inhibir la adhesión de *E. coli* enterotoxigenica, *S. enterica* serovar Typhimurium, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Listeria monocytogenes* (ETEC) a células Caco-2, de manera dosis-dependiente (Coconier *et al.* 1993; Bernet-Camard *et al.* 1997; Hudault *et al.* 1997). Lee *et al.* (2002) demostraron que *L. casei rhamnosus* GG y *L. casei* Shirota fueron capaces de competir con *E. coli* y *Salmonella spp* por la unión a células Caco-2 a través de un impedimento estérico, y el grado de inhibición estuvo relacionado con la distribución de los receptores a los que se unen los lactobacilos sobre las células Caco-2. Dos lactobacilos aislados de intestino de pollo, *L. acidophilus* y *L. fermentum*, fueron capaces de excluir por competición a *S. pullorum* y *S. enterica* serovar Typhimurium en cultivo de células intestinales, aunque no ocurrió lo mismo cuando las células fueron infectadas con *S. enterica* serovar Enteritidis (Jin *et al.* 1996). En estudios sobre células HT-29, Casey *et al.* (2004) observaron que las cepas aisladas de intestino de porcinos



pertenecientes a las especies *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* DPC6005 y *L. murinus* DPC6002 y DPC6003, redujeron un 78 % la invasión de *Salmonella*. Santos *et al.* (2003) demostraron que dos cepas aisladas de kefir, *L. acidophilus* CYC 10051 y *L. kefiranofaciens* CYC 10058, fueron capaces de adherir a células Caco-2, presentaron resistencia a pH ácidos y ácidos biliares y fueron capaces de inhibir la adhesión de *S. enterica* serovar Typhimurium a células Caco-2.

Reid & Burton (2002) señalan que mas allá de que los estudios de actividad antagónica de lactobacilos y bifidobacterias probióticas sobre células intestinales en cultivo son un buen modelo y sirven para simular las condiciones *in vivo*, es difícil extrapolar los resultados *in vitro* al proceso que se produce en el sistema digestivo *in vivo*. Además, la flora residente, la presencia de mucus y el continuo movimiento peristáltico podrían modificar la adhesión de las bacterias exógenas.

Los modelos animales podrían reflejar más acertadamente el comportamiento de las bacterias probióticas. El modelo *in vivo* más comúnmente usado para estudiar la protección de bacterias probióticas contra la infección por *Salmonella* es el ratón. *L. johnsonii* La1 (Bernet-Camard *et al.* 1997) y *Lactobacillus* GG (Hudault *et al.* 1997) administrado a ratones gnotobióticos (con flora microbiana conocida), demostraron tener actividad antibacteriana contra la infección con *S. enterica* serovar Typhimurium C5, aumentando la supervivencia de los ratones. *L. rhamnosus* HN001 ha demostrado aumentar la respuesta inmune y proteger a ratones BALB/C frente a la infección con *S. entérica* serovar Typhimurium 1772 (Gill *et al.* 2001). También el sobrenadante de cultivo de la cepa *L. acidophilus* LB administrado diariamente a ratones infectados con *Salmonella* demostró reducir los niveles de *Salmonella* viable en las heces (Coconnier *et al.* 1997). Das *et al.* (2013) evaluaron la eficacia de *L. plantarum* KSBT 56, (aislado a partir de un producto alimenticio tradicional de la India), en la prevención de *Salmonella entérica* serovar Enteritidis y su patogenicidad *in vitro*. Observaron que inhibe el crecimiento, la invasión y la capacidad de formación de biofilm de *Salmonella* Enteritidis sin inhibir el crecimiento de otras cepas de *Lactobacillus*. En los estudios realizados en ratones hay que considerar que la patología que provoca *Salmonella* difiere marcadamente de lo que ocurre en el humano por lo que algunos trabajos han



propuesto algunas modificaciones, por ejemplo, tratamiento con estreptomicina previo a la infección, para favorecer que se desencadene la enfermedad (Barthel *et al.* 2003).





OBJETIVOS PARCIALES

El objetivo del siguiente capítulo es la selección de microorganismos aislados de kefir con potencialidad probiótica.

Para cumplir dicho objetivo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar la superficie de microorganismos aislados de kefir mediante diferentes aproximaciones experimentales que van desde hidrofobicidad superficial hasta adhesión a células intestinales *in vitro*.
- Evaluar la resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal (TGI).
- Estudiar el efecto de los sobrenadantes de lactobacilos aislados de kefir sobre la viabilidad de *Salmonella entérica* serovar Enteritidis y en el proceso de asociación e invasión del patógeno.
- Estudiar la interacción patógeno-lactobacilo y su efecto en el proceso de adhesión e invasión en células Caco-2/TC-7.





MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y condiciones de cultivo

Se estudiaron 13 lactobacilos aislados de gránulos de kefir pertenecientes a la colección del CIDCA (Hamet *et al.* 2013) y una cepa de colección:

-*L. sp.*: CIDCA 8383, CIDCA 8384.

-*L. kefir*: CIDCA 8381, CIDCA 83101, CIDCA 83102.

-*L. paracasei*: CIDCA 8339, CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123, CIDCA 83124.

-*L. kefiranofaciens*: CIDCA 8371, CIDCA 83118, CIDCA 83119, JCM 6985 (JCM *Japan Collection of Microorganisms, Institute of Physical and Chemical Research, Japan*).

En todos los experimentos, se procedió a realizar un primer repique de cada microorganismo a partir del cepario a -80 °C en caldo De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) y a partir de ese primer repique se realizó un segundo repique de trabajo. La pureza de los cultivos se verificó por coloración de Gram y características de las colonias en agar MRS.

Los cultivos de *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus kefir* CIDCA 83102 se realizaron en caldo MRS a 30 °C en aerobiosis durante 48 horas y 72 horas, respectivamente. Para la obtención de las suspensiones, los microorganismos se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos, se lavaron 2 veces en *buffer* fosfato pH 7 (Apéndice), y se resuspendieron en el mismo *buffer*.

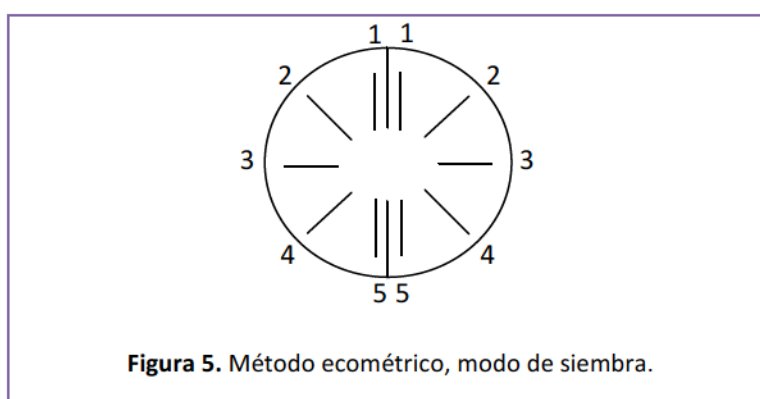
Resistencia a la bilis por método ecométrico

Para estudiar el desarrollo de los lactobacilos en presencia de bilis se utilizó el método ecométrico (Kociubinski *et al.* 1999). De un cultivo abundante de microorganismos en caldo MRS se tomó una ansada y se realizaron cinco estrías en forma consecutiva (Figura 5) sin cargar nuevamente el ansa de manera tal de depositar



la totalidad del inóculo, quedando en la última estría una pequeña cantidad de bacterias. Este procedimiento es equivalente a la siembra en tubos con diferentes diluciones, de modo que el desarrollo bacteriano en la dilución más grande evidencia la tolerancia real del microorganismo a la presencia de bilis.

La siembra se realizó sobre una placa de Petri conteniendo 9 ml de agar MRS adicionado de 1 ml de solución de bilis de buey al 5 % (p/v) esterilizada por filtración. En forma paralela, se realizó un control de crecimiento de la cepa en placas con agar MRS. Se incubó a 30 °C durante 48 - 72 horas.



Para el análisis de los resultados se comparó el crecimiento en el medio sin bilis (control) y el crecimiento en presencia de bilis. Se asignó un valor de 1 al crecimiento en la primera estría, de 2 en la segunda, 3 en la tercera, 4 en la cuarta, y 5 en la quinta estría. Luego se sumaron los valores obtenidos, siendo 15 el valor máximo que indica un alto grado de resistencia a la bilis. En caso que exista en una estría con menos crecimiento que en el control sin bilis, se le asigna un valor igual a la mitad del valor correspondiente para un buen crecimiento en dicha estría. En forma paralela, como control del experimento, se ensayaron cepas de microorganismos cuya resistencia a la bilis de buey es conocida. Aquellas cepas cuyo valor fue de 0 - 5 se les asignó (+), de 5 - 10 (++) y de 10 - 15 (+++).

Hidrofobicidad superficial



A los efectos de caracterizar los microorganismos de kefir en cuanto a sus propiedades superficiales se comenzó a evaluar su hidrofobicidad superficial. El método seleccionado en este trabajo es el denominado MATH (Microbial Adhesion to Hexadecan) y está basado en la tendencia de ciertos microorganismos de interactuar con hidrocarburos líquidos, luego de un breve período de contacto (Ofek & Doyle, 1994). Se utilizó n-hexadecano (J. T. Baker, Mallinckroft Inc.). Para las determinaciones se utilizaron tubos de vidrio lavados con solución sulfocrómica para eliminar cualquier sustancia que pudiera interferir con el resultado.

Una suspensión de lactobacilos en fase estacionaria se ajustó a $DO_{600} = 1$ en un espectrofotómetro Spectronic 20D+ (Spectronic Instruments, U.S.). Se tomaron 2 ml de la suspensión ($DO_{600} = 1$) y se le agregaron 0,5 ml de n-hexadecano. Se procedió a la medición de la densidad óptica inicial de la fase acuosa (DO_i) y luego se agitó en vortex por 120 segundos a máxima velocidad. Se esperó 10 - 15 minutos para permitir la separación de las fases y se midió nuevamente la densidad óptica (DO_f) de la fase acuosa a 600 nm. Se utilizó como blanco 2 ml de *buffer* fosfato con 0,5 ml de n-hexadecano. La temperatura durante los ensayos se mantuvo entre los 22 y los 24 °C y se determinó el porcentaje de hidrofobicidad:

$$\% H = [(DO_i - DO_f) / DO_i] \times 100$$

donde DO_i y DO_f son la densidad óptica inicial y final de la fase acuosa después de la extracción con n-hexadecano, respectivamente.

Autoagregación

Se prepararon suspensiones de microorganismo de $DO_{600} = 1$ en *buffer* fosfato pH 7. Se colocaron 2 ml de la suspensión bacteriana en cubetas de vidrio cilíndricas, se agitó rápidamente y se introdujo la cubeta en el espectrofotómetro Spectronic 20D+ (Spectronic Instruments, U.S.) manteniendo las cubetas dentro del espectrofotómetro sin agitar la suspensión. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente entre 22 y 24 °C. Inmediatamente se tomó la densidad óptica inicial y luego se midió la disminución



de la turbidez de las suspensiones durante 24 horas. Los resultados se expresaron como cinética de coagregación en función del tiempo.

Resistencia al pasaje gastrointestinal *in vitro*

Para la evaluación de la resistencia de lactobacilos a las condiciones gastrointestinales, se utilizó el protocolo descrito por Grimoud *et al.* (2010). Se prepararon suspensiones de 10^8 UFC/ml de lactobacilos en una solución gástrica simulada (NaCl 125 mM, KCl 7 mM, NaHCO₃ 45 mM, pepsina porcina 3 g/l (P7125 Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) ajustando el pH final a 2,5) y se incubaron 90 minutos, a 200 rpm y 37 °C con agitación. Los microorganismos se lavaron con PBS (KH₂PO₄ 0,144 g/l, NaCl 9 g/l, Na₂HPO₄ 0,795 g/l, pH 7,2), los pellets se resuspendieron en una solución intestinal simulada (NaCl 22 mM, KCl 3,2 mM, NaHCO₃ 7,6 mM, pancreatina porcina 0,1 % (p/v) (P1625 Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA), sales biliares 0,15 % (p/v) (48305 Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) ajustando el pH final a 8 y se incubaron 180 minutos a 37 °C con agitación (200 rpm). Se realizaron diluciones seriadas en triptona 0,1 % (p/v) y se realizó el recuento de microorganismos viables en agar MRS. Las placas fueron incubadas a 30 °C en aerobiosis durante 48 horas. Los resultados se presentaron como el número de microorganismos que resistieron el proceso. Los ensayos se realizaron al menos tres veces, con cuadruplicados intra-ensayo.

Adhesión bacteriana a epitelio intestinal *in vitro*

Se estudió la adhesión de lactobacilos al epitelio intestinal utilizando dos modelos: adhesión a mucina y adhesión a células Caco-2/TC-7. Se analizó la adhesión a partir de cultivos en fase estacionaria y de los microorganismos luego de la simulación por el pasaje del tracto gastrointestinal.

Adhesión a células Caco-2/TC-7.



Se estudió la adhesión de lactobacilos aislados de kefir a monocapas de células intestinales *in vitro*. Se utilizaron células de la línea Caco-2/TC-7 cultivadas como se indica en el Apéndice.

Para los ensayos de adhesión de bacterias lácticas, las monocapas fueron lavadas con PBS a temperatura ambiente. A cada fosa se le agregó 500 μ l de suspensión bacteriana previamente lavada con PBS llevada a $DO_{600} = 1$ de un cultivo en fase estacionaria ($1-5 \cdot 10^8$ UFC/ml), resuspendida en DMEM de adhesión (Apéndice) a esta concentración no se observa saturación en la curva de adhesión bacteriana (datos no mostrados). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 1 hora en atmósfera controlada (5 % CO_2 – 95 % aire) sin agitación. Luego fueron lavadas 3 veces con PBS para remover las bacterias no adheridas. A cada fosa se le colocó 500 μ l de agua bidestilada estéril y se dejó 1 hora a 37 °C para permitir la lisis y desprendimiento de la monocapa. Se tomó todo el volumen de la fosa, se realizaron diluciones seriadas en triptona 0,1 % (p/v) y se realizó el recuento de microorganismos viables en agar MRS. Las placas fueron incubadas a 30 °C en aerobiosis durante 48 horas y las bacterias adheridas se expresaron como UFC/ml. Los resultados son la media de al menos tres ensayos independientes en tres pasajes consecutivos.

Adhesión a mucina *in vitro*.

Los ensayos se realizaron según lo descrito por Tallon *et al.* (2007). Se sensibilizaron placas de 96 fosas (Maxisorp Nunc, Roskilde, Denmark) con una solución de mucina gástrica porcina tipo III parcialmente purificada (Sigma-Aldrich, USA) en PBS a una concentración final de 10 mg/ml, toda la noche a 4 °C. Luego, se adicionó a cada fosa 100 μ l de suspensión bacteriana en PBS llevada a $DO_{600} = 1$ ($1-5 \cdot 10^8$ UFC/fosa), incubándose durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, las fosas se lavaron exhaustivamente con PBS para eliminar los microorganismos no adheridos, se removieron las bacterias adheridas con una solución 0,5 % (v/v) de Tritón X-100 y se cuantificaron mediante recuento en placa. Los resultados son la media de al menos tres ensayos independientes, cada uno de los cuales contó con 4 replicados intra-ensayo.



Digestión proteolítica de las proteínas y obtención del mapa peptídico mediante Espectrometría de Masa (MS) MALDI-TOF

Electroforesis Bidimensional (2D).

L. paracasei CIDCA 83123 antes y después de ser sometida a la soluciones que simulan el pasaje por el tracto gastrointestinal fueron resuspendidas en 400 μ l de Tris-HCl 30 mM a pH 8,0 conteniendo urea 7 M, tiourea 2 M, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) 4 % (p/v) y amidosulfobetaine-14 (ASB14) 2 % (p/v). Las suspensiones bacterianas fueron sonicadas durante 1 minuto con pulsos cada 0,5 segundos y luego centrifugadas a 16.000 g por 5 minutos. Los sobrenadantes fueron tratados con 2D Clean-up kit (GE Healthcare, USA), y las proteínas que resultaron precipitadas fueron resuspendidas en 100 ml de Tris-HCl 30 mM a pH 8,5 con urea 8M, CHAPS 2,5 % (p/v) y ASB14 2 % (p/v). La primer dimensión (isoelectroenfoque) fue corrida en el equipo Ettan™ IPGphor 3, usando una gama de anfólitos de 3-10 (tiempo: 8 hs, voltaje total: 16525 volts). Luego de la primera corrida, fueron tratados con 10 mg/ml Ditiotreitól (DTT) para reducir los grupos disulfuro, y luego tratados con 25 mg/ml de iodoacetamida con el fin de alquilar los grupos sulfhidrilos libres. La segunda dimensión (SDS-PAGE) fue realizada en geles de poliacrilamida al 12 % usando un equipo BioRad Mini-Protean IV (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) según Laemmli (1970). Como referencia de peso molecular se usó Bench Mark Protein Ladder (GE Healthcare). Los geles se revelaron usando la tinción Colloidal Blue, y luego se seleccionaron los spots que fueron removidos usando un bisturí y se cortaron en piezas de 1 mm³.

Digestión de las proteínas.



Para obtener la huella peptídica (peptide mass fingerprint) mediante espectrometría de masa MALDI-TOF se realizó una digestión triptica *in situ* de los polipéptidos separados mediante SDS-PAGE, siguiendo el protocolo detallado a continuación:

- Las muestras conteniendo los polipéptidos a ser digeridos se sometieron a SDS-PAGE y se colorearon con la tinción de Coomasie. Las bandas seleccionadas se separaron con bisturí, se cortaron en cubos de aproximadamente 1 mm de lado y éstos se transfirieron a un tubo *ependorf*.
- Se lavaron durante 5 minutos con 100-150 ml de agua MilliQ, se centrifugaron y se retiró el líquido.
- Se agregó un volumen de acetonitrilo equivalente a 3 o 4 veces el volumen que ocupaban los trozos de gel y se incubó durante 10-15 minutos. Luego se centrifugó, se retiró el líquido y se secó en vacío.
- Para decolorar completamente los trozos de gel se rehidrataron con 100-150 μ l de NH_4HCO_3 25 mM / Acetonitrilo (ACN) 5 % (p/v) (pH 9), con agitación durante 20 min. Luego se lavó con 100 μ l de NH_4HCO_3 25 mM / ACN 50 % (p/v) (pH 9) y finalmente con 100 μ l de ACN.
- Las proteínas se trataron con 100 μ l de ditiotretitol 10 mM en NH_4HCO_3 25 mM / ACN 5 % (p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente, y luego los sulfhidrilos de las cisteínas fueron alquilados mediante el tratamiento con iodoacetamida 50 mM en NH_4HCO_3 25mM / ACN 5 % (p/v) durante 1 hora a 37 °C.
- Finalmente se realizó otro lavado y se secó al vacío.

Para la digestión enzimática de las proteínas, a las piezas de gel se les agregó tripsina (Promega Trypsin Gold, TPCK treated) en NH_4HCO_3 25 mM /ACN 5 % (p/v), en una relación aproximada de 1:20 tripsina a proteína. La reacción enzimática se mantuvo durante 3 h a 37 °C, y luego se centrifugó, reservando el sobrenadante en un tubo.

Los péptidos se extrajeron de los trozos de gel mediante tres incubaciones sucesivas con 100 μ l de ácido trifluoroacético (TFA) 0,2 % (p/v), y finalmente una incubación con 15 μ l de ACN 50 % (p/v) y TFA 0,1 % (p/v).

Luego de cada incubación se realizó una centrifugación y todos los sobrenadantes se reunieron en un tubo. Los sobrenadantes colectados se secaron en



SpeedVac y luego los péptidos se resuspendieron en 5 μ l ACN 50 % / TFA 0,1 % para analizarlos por MALDI-TOF MS.

Todos los reactivos utilizados fueron provistos por Sigma-Aldrich.

Espectrometría de Masa (MALDI-TOF).

Se utilizó MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) para determinar las identidades de las proteínas. La labor experimental se realizó en colaboración con el Dr. Sebastián Trejo y el Dr. Francesc Xavier Avilés Puigvert, en el laboratorio de Ingeniería de Proteínas y Enzimología del Instituto de Biotecnología y Biomedicina (IBB) de la Universidad Autónoma de Barcelona, España.

El análisis se llevó a cabo en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Bruker modelo UltraFlex TOFTOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA) equipado con un láser de N₂ (337 nm con pulsos de 1-5 ns) y una fuente de aceleración de iones de 25 kV. En un tubo se mezcló 0,5 μ l de cada muestra con 1 ml de solución de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico 10 mg/ml en una solución acuosa de acetonitrilo 30 % (p/v) y ácido trifluoroacético 0,1 % (p/v)). Se depositó 0,5 a 1 ml de la mezcla sobre una placa GroundSteel (Bruker Daltonics) y se dejó cristalizar. Para la calibración externa se utilizó una mezcla de patrones Bruker Daltonik GmbH. Las masas peptídicas fueron adquiridas dentro del rango de m/z 800 a 4000.

Parámetros de búsqueda en bases de datos.

Luego de la calibración externa e interna de los espectros se generaron listas de péptidos monoisotópicos con una sola carga que se utilizaron como valores de entrada para la búsqueda en bases de datos usando el programa flexAnalysis (Bruker Daltonics). Las búsquedas se llevaron a cabo en las bases de datos MSDB y NCBIInr, usando la herramienta de búsqueda MASCOT PMF (www.matrixscience.com). Se incluyeron como posibles modificaciones la oxidación de metionina y la alquilación de cisteínas, se consideraron hasta dos cortes trípticos no realizados y se fijó en 100 ppm la tolerancia



para la masa de los péptidos monoisotópicos. Se realizaron asignaciones de picos de manera interactiva utilizando el programa BioTools (Bruker Daltonics).

Interacción con *Salmonella entérica* serovar Enteritidis

Condiciones de cultivo de *Salmonella entérica* serovar Enteritidis.

Salmonella entérica serovar Enteritidis CIDCA 101 aislada de una muestra clínica del Hospital de Pediatría Prof. Juan P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina, fue provista por el Dr. H. Lopardo. La cepa se conservó a -80 °C, se reactivó en caldo nutritivo y luego se sembró en agar nutritivo inclinado (que se mantuvo a 4 °C). Para todos los ensayos, se tomó una ansada del agar inclinado y se creció en caldo nutritivo a 37 °C durante 18 horas.

Ensayo de asociación e invasión de *Salmonella* a células Caco-2/TC-7.

Para determinar la capacidad de asociación e invasión de la cepa de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis las células de la línea Caco-2/TC-7 se incubaron 7 días en placas de 24 fosas. Las monocapas fueron lavadas 2 veces con PBS a temperatura ambiente. Se centrifugó un cultivo de *Salmonella* a 5.000 g durante 5 minutos y se resuspendió en DMEM de adhesión (Apéndice). A cada fosa se le agregó 500 µl de suspensión de *Salmonella* (aproximadamente $1 \cdot 10^8$ UFC/ml). Las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C en atmósfera controlada (5 % CO₂ – 95 % aire) sin agitación y luego se lavaron 3 veces con PBS para eliminar las bacterias no asociadas. Para cuantificar la asociación (bacterias adheridas + internalizadas), a cada fosa se le agregó 500 µl de agua bidestilada estéril y se incubó 1 hora a 37 °C. Esto permitió desprender la monocapa. Luego, se tomó todo el volumen de la fosa, se realizaron diluciones en triptona 0,1 % (p/v) y se sembraron en agar nutritivo.

Para diferenciar las bacterias asociadas de las internalizadas se utilizó gentamicina como antibiótico. La gentamicina no difunde a través del dominio apical de



las células; las bacterias que no internalizan son afectadas por el antibiótico y las que están internalizadas sobreviven. La concentración de gentamicina utilizada fue de 100 µg/ml en PBS, teniendo como stock solución 100 X (100 mg/ml) (Golowzycy *et al.* 2007). Para ello se colocó a cada fosa 0,5 ml de gentamicina (100 µg/ml PBS) y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Luego de la incubación, la monocapa fue lavada 3 veces con PBS para eliminar el antibiótico y se agregaron 500 µl de agua bidestilada estéril (1 hora a 37 °C) para lisar la monocapa y permitir que las bacterias internalizadas se liberen. Se realizaron diluciones apropiadas en triptona 0,1 % (p/v) y el recuento en placas de agar nutritivo. Los resultados se expresaron como UFC/ml.

Obtención de sobrenadantes libres de células y las suspensiones de lactobacilos.

Los cultivos de *L. kefir* y *L. paracasei* incubados en las condiciones descriptas en el presente capítulo fueron centrifugados a 10.000 g durante 15 minutos. Para obtener los sobrenadantes libres de células, éstos fueron filtrados a través de una membrana de celulosa con un diámetro de poro de 0,45 µm (Millipore Corporation, Milford, MA 01757, USA). El pH de estos sobrenadantes se determinó con un microelectrodo combinado de vidrio (Cole-Parmer).

Los pellet de cada bacteria fueron resuspendidos en PBS y se ajustaron a la concentración requerida en cada ensayo, siendo la misma de 10⁸ UFC/ml.

Determinación de la concentración de ácidos orgánicos.

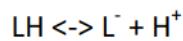
La concentración de ácidos orgánicos en los sobrenadantes se determinó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) según el método descrito por Lombardi *et al.* (1994). La separación de los ácidos se llevó a cabo en una columna de intercambio iónico AMINEX HPX- 87H (Biorad Labs) equipado con un detector UV a 214 nm (Waters TM 996, Millipore Corporation, Milford, MA 01757, USA). La identificación se basó en la comparación de los tiempos de retención de los ácidos de las muestras con soluciones *standard* de ácido láctico y ácido acético (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Los sobrenadantes se filtraron a través de una membrana de 0,45 µm (Millipore



Corporation) y se inyectó en el cromatógrafo un volumen de 10 μ l. La determinación se llevó a cabo a una velocidad de flujo de 0,7 ml / minuto a 60 °C utilizando H₂SO₄ 0,009 N como fase móvil. Los solventes fueron desgaseados previamente bajo vacío. Se realizaron curvas de calibración con ácido láctico y ácido acético mediante las cuales se calcularon las concentraciones de dichos ácidos en las muestras.

Determinación de la concentración de ácido láctico no disociado.

Para el cálculo de la concentración de ácido láctico no disociado ([LH]) se tuvo en cuenta que la reacción de disociación del ácido es,



Con una constante de equilibrio

$$K_{\text{eq}} = [\text{L}^-] [\text{H}^+] / [\text{LH}]$$

La concentración de ácido láctico total está dada por la suma del ácido disociado ([L⁻]) y el no disociado ([LH])

$$C_{\text{ácido}} = [\text{LH}] + [\text{L}^-]$$

A partir de lo anterior se puede expresar la K_{eq} como

$$K_{\text{eq}} = (C_{\text{ácido}} - [\text{LH}]) [\text{H}^+] / [\text{LH}]$$

Considerando que $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$ y que el $\text{pK} = -\log K_{\text{eq}} = 3,86$ (para el ácido láctico), el cálculo de la concentración de ácido láctico no disociado se realizó con la siguiente expresión:

$$[\text{LH}] = C_{\text{ácido}} / 1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK})}$$

Coagregación de Lactobacilos con *Salmonella enterica* serovar Enteritidis.

Las suspensiones de bacterias lácticas se ajustaron a DO₆₀₀ = 1, se tomó 1 ml y se la mezcló en una cubeta cilíndrica con 1 ml de suspensión de *Salmonella enterica*



serovar Enteritidis. Luego de mezclados 10 segundos por vortex, la cubeta con la mezcla se introdujo en el espectrofotómetro, se tomó el valor de $DO_{inicial}$ y se midió la DO_t cada 15 minutos por un total de 8 horas y se graficó la cinética de coagregación.

Asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis a células Caco-2/TC-7 previa incubación de *Salmonella* con lactobacilos.

Se prepararon suspensiones de lactobacilos (en una concentración de aproximadamente 1.10^8 UFC/ml) y de *Salmonella* de 1.10^6 UFC/ml aproximadamente. Se preincubó 200 μ l de la suspensión de lactobacilos con 200 μ l de la suspensión de *Salmonella* durante 1 hora a 37 °C y luego, fueron adicionados a la placa de Caco-2/TC-7 junto con 400 μ l de DMEM de adhesión. Se incubaron las placas durante 1 hora a 37 °C en atmósfera controlada (5 % CO_2 – 95 % aire) sin agitación. Luego de lavar las fosas 3 veces con PBS, se cuantificó *Salmonella* asociada e internalizada. Como control, 200 μ l de suspensión de *Salmonella* se preincubó con 200 μ l de PBS sin lactobacilos a 37 °C y se procedió de la misma forma.

Asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis a células Caco-2/TC-7 previa incubación de la monocapa con lactobacilos.

Se utilizaron placas de 24 fosas con células Caco-2/TC-7. Las fosas se lavaron 3 veces con PBS para eliminar el medio de cultivo. A cada fosa se le agregó 500 μ l de una suspensión de lactobacilos previamente lavada y resuspendida en DMEM de adhesión (Apéndice). La concentración de lactobacilo agregada a la fosa fue de 1.10^8 UFC/ml. Las placas se incubaron 1 hora a 37 °C en atmósfera controlada (5 % CO_2 – 95 % aire) sin agitación. Luego, se lavaron 3 veces para eliminar los lactobacilos no adheridos. A las fosas preincubadas con los lactobacilos se agregó 500 μ l de una suspensión de *Salmonella* en DMEM de adhesión y se incubó nuevamente durante 1 hora a 37 °C en atmósfera controlada (5 % CO_2 – 95 % aire). La concentración de *Salmonella* agregada a la fosa fue de 1.10^6 UFC/ml. Luego de la incubación, se determinó el número de bacterias asociadas e internalizadas y se analizó el citoesqueleto mediante tinción con



faloidina marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Se realizó un control de la asociación e invasión de *Salmonella*. Para ello, 4 fosas (2 para evaluar asociación y 2 para evaluar invasión) fueron preincubadas con DMEM de adhesión sin lactobacilos antes de adicionar la suspensión de *Salmonella*.

Marcación fluorescente del citoesqueleto con faloidina.

Las células Caco-2/TC-7 se sembraron en placas de 24 fosas sobre portaobjetos de vidrio (Assistent, Alemania). Estos vidrios fueron previamente lavados con agua y detergente no iónico (Extran MAO2 neutro, Merck, Darmstadt, Alemania) y luego de un enjuague exhaustivo con agua destilada, se colocaron en cajas de Petri y se esterizaron en autoclave. Se realizaron ensayos de infección con *Salmonella* Enteritidis CIDCA 101 sin tratar y luego de tratar la célula epitelial con lactobacilos tal como se describió en el ítem anterior.

Las muestras se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron durante 2 min con paraformaldehído 3 % (p/v) en PBS y se trataron durante 10 minutos con NH_4Cl 50 mM para bloquear las funciones aldehído libres. Luego fueron permeabilizadas mediante tratamiento durante 4 min con 0,2 % (p/v) de Tritón X -100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), se agregó PBS y se incubó durante 10 min. Las células lavadas dos veces con PBS fueron tratadas durante 10 minutos con 0,2 % (p/v) de gelatina en PBS. Se extrajo completamente el *buffer* y se agregaron a cada fosa 20 μl de faloidina fluorescente (Sigma Chemical, St. Louis, USA) en concentración 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS-gelatina. Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 45 min en cámara húmeda y al abrigo de la luz. Luego fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas durante 10 minutos en PBS-gelatina. Los vidrios fueron retirados de las fosas, escurridos y montados invertidos sobre 7 μl de glicerol 50 % (p/v) en PBS con 0,1 % (p/v) de azida de sodio. Las muestras fueron conservadas en oscuridad hasta su observación en un microscopio invertido de fluorescencia *Nikon TI-Eclipse* en combinación con un software de procesamiento de imágenes *NIS-elements*.

Cinética de muerte de *Salmonella* Enteritidis en sobrenadantes de cultivo de lactobacilos aislados de kefir.



Un cultivo de *Salmonella* de 18 horas en caldo nutritivo a 37 °C se centrifugó durante 4 minutos a 5.000 g. El pellet se resuspendió en el mismo volumen de sobrenadante de cultivo libre de células de lactobacilos y se incubó a 37 °C. A intervalos de tiempo predeterminados se tomaron alícuotas y se realizaron diluciones en triptona 0,1 % (p/v). Las diluciones se sembraron en agar nutritivo y las colonias se contaron después de 24 horas de incubación. Como control se resuspendió el pellet de *Salmonella* en el mismo volumen de MRS acidificado artificialmente con ácido láctico a los pH correspondientes de los sobrenadantes de cada lactobacilo.

Efecto de los sobrenadantes de lactobacilos aislados de kefir sobre la asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis a células Caco-2/TC-7.

Para estos ensayos se realizó una preincubación de *Salmonella* con sobrenadantes de cultivo de diferentes lactobacilos aislados de kefir. Para esto, un cultivo de 18 horas de *Salmonella* se centrifugó (5.000 g, 4 minutos) y el pellet fue resuspendido en igual volumen de sobrenadante de cultivo de lactobacilos libre de células llevado a pH 4,5. Luego, se incubó a 37 °C durante 1 hora, condición donde no se ve afectada la viabilidad de *Salmonella*. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó y se resuspendió en DMEM de adhesión. Se cuantificó la asociación e invasión de *Salmonella* a las células en cultivo como se indicó anteriormente. Se realizaron los siguientes controles:

- Salmonella* sin ningún pretratamiento resuspendida en PBS.
- Salmonella* pretratada con MRS acidificado artificialmente con ácido láctico a pH 4,5.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm desvío standard de al menos tres experimentos independientes. El estudio estadístico se realizó con el programa GRAPHPAD Prism version 5.0 para Windows (San Diego, CA). Se efectuó un análisis de



varianza simple (ANOVA) para determinar la diferencia entre medias. Las diferencias significativas entre los valores medios de cada experimento fueron determinadas por el test Tukey (intervalo de confianza del 95 %).





RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resistencia a la bilis

La selección de nuevas cepas con propiedades probióticas es un aspecto de interés ya sea desde el punto de vista básico como aplicado. Una cepa para ser considerada probiótica debe llegar viable al intestino para ejercer su efecto promotor de la salud. En consecuencia, debe resistir el pasaje por el tracto gastrointestinal, ser capaz de colonizar el intestino al menos en forma transitoria, ejercer efecto probiótico *in vivo* o *in vitro* contra algún microorganismo patógeno, y no producir riesgos para la salud (Código Alimentario Argentino, artículo 1389). Para llegar viable al intestino las bacterias deben tolerar las condiciones adversas a las que son sometidas al atravesar el tubo digestivo. Se estudió como primera propiedad para la selección de microorganismos potencialmente probióticos la capacidad de crecer en presencia de bilis de buey a 0,5 % (p/v). En este trabajo se utilizaron 13 cepas de *Lactobacillus* aisladas de gránulos de kefir que fueron identificados como *L. paracasei* (5 cepas), *L. kefiri* (3 cepas), *L. kefiranofaciens* (4 cepas) y dos cepas de *Lactobacillus* cuya especie no pudo determinarse con las técnicas utilizadas (Hamet *et al.* 2013). En la Tabla 3 se muestran los resultados del crecimiento de las cepas mencionadas en presencia de bilis.

De las 13 cepas de *Lactobacillus* estudiadas sólo 3 de ellas, *L. kefiri* CIDCA 83101 y *L. kefiranofaciens* CIDCA 8371 y CIDCA 83118, no mostraron crecimiento en medio con bilis. El resto de los lactobacilos fue capaz de desarrollar en presencia de bilis siendo *L. paracasei* CIDCA 83124 y *L. kefiri* CIDCA 83102 las cepas que presentaron mayor capacidad de desarrollar en esta condición (Tabla 3). Cabe destacar que lactobacilos de la misma especie presentaron comportamientos diferentes en cuanto a su capacidad de crecer en presencia de bilis de buey 0,5 % (p/v) confirmando que esta propiedad es cepa-dependiente.



Tabla 3. Crecimiento de lactobacilos en presencia de bilis de buey 0,5 % (p/v).

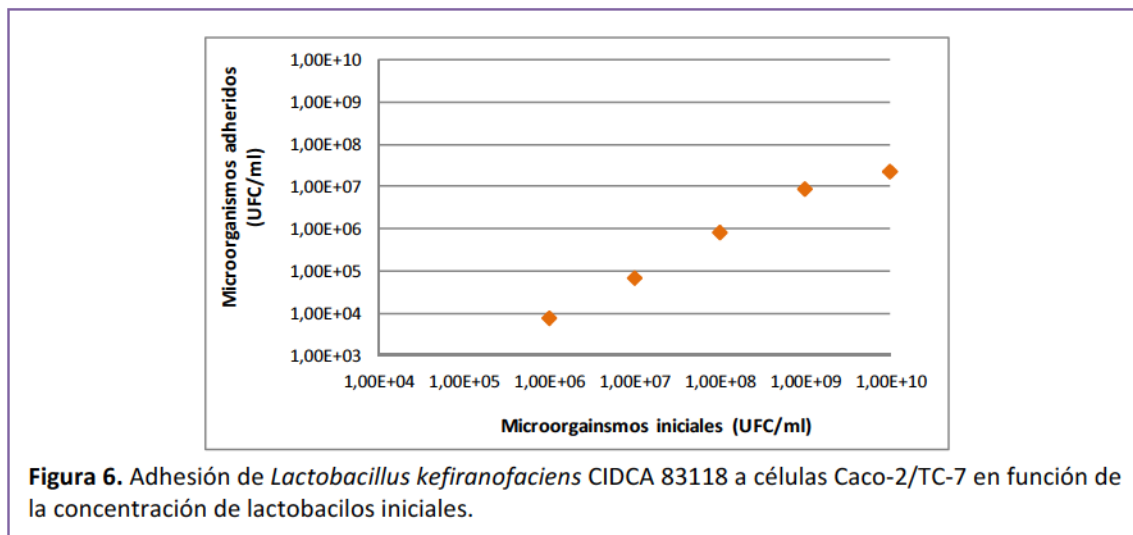
Cepa (código CIDCA) *	Especie	Crecimiento en bilis (método ecométrico)
8383	<i>Lactobacillus sp</i>	+
8384	<i>Lactobacillus sp</i>	++
8339	<i>Lactobacillus paracasei</i>	+
83120	<i>Lactobacillus paracasei</i>	++
83121	<i>Lactobacillus paracasei</i>	++
83123	<i>Lactobacillus paracasei</i>	++
83124	<i>Lactobacillus paracasei</i>	+++
83102	<i>Lactobacillus kefir</i>	+++
83101	<i>Lactobacillus kefir</i>	-
8381	<i>Lactobacillus kefir</i>	+
8371	<i>Lactobacillus kefiranoferiens</i>	-
83118	<i>Lactobacillus kefiranoferiens</i>	-
83119	<i>Lactobacillus kefiranoferiens</i>	+

(*) CIDCA: Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos.

Adhesión bacteriana *in vitro* a células intestinales Caco-2/TC-7

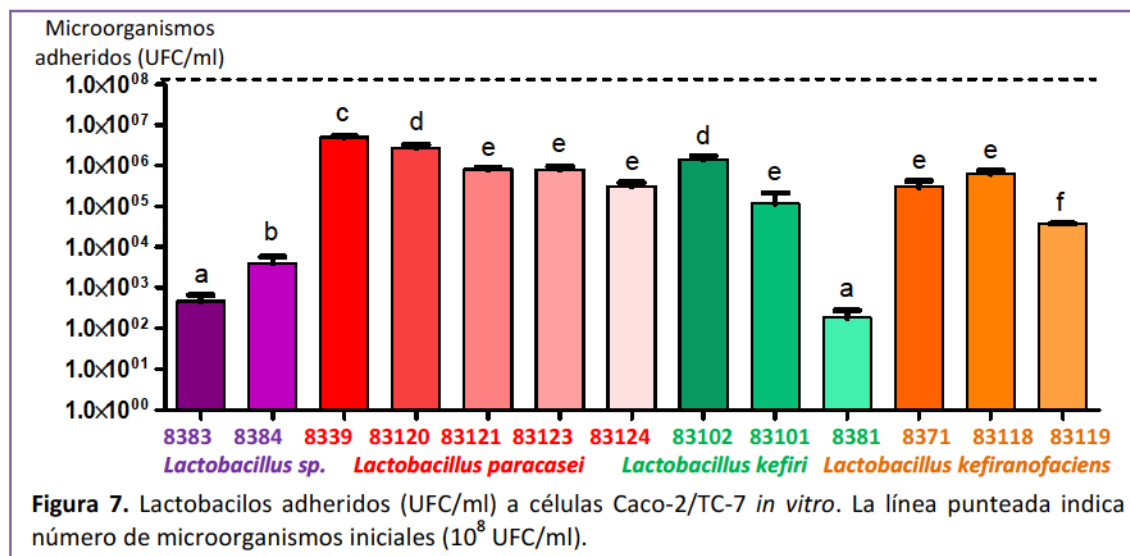
La adhesión a epitelio es un requisito previo para la colonización bacteriana y ha sido considerado como uno de los principales criterios para la caracterización de bacterias probióticas (Castro & De Robetto, 2006; Tuomola *et al.* 2000). Al adherirse, las bacterias extienden su tiempo de residencia en el intestino y como consecuencia, pueden influir en la salud del hospedador modificando la microbiota local o modulando la respuesta inmune. Los experimentos de adhesión *in vivo* son difíciles de llevar a cabo, por ello se han desarrollado varios modelos *in vitro* para evaluar la capacidad de adhesión de diversas bacterias. Se han utilizado muchas matrices para ensayos de adhesión *in vitro* que incluyen mucus, proteínas de membrana (colágeno, laminina, fibronectina, etc) y diferentes líneas celulares entre las que se puede mencionar la línea celular Caco-2 que es modelo de epitelio intestinal. En este trabajo se seleccionó la línea Caco-2/TC-7 para realizar los ensayos de adhesión *in vitro* de las 13 cepas de lactobacilos. En una primera etapa se analizó el efecto de la concentración de bacterias

iniciales agregadas a la monocapa de células en la adhesión. A modo de ejemplo, en la Figura 6 se muestra la adhesión de *L. kefiranofaciens* CIDCA 83118 en función del número de microorganismos iniciales. Se observó una relación lineal entre microorganismos adheridos e iniciales cuando el número inicial varió entre 1.10^6 y 1.10^9 UFC/ml. A una concentración inicial de 10^9 UFC/ml, el número de lactobacilos adheridos fue 1.10^7 UFC/ml. A partir de dicha concentración no se observó aumento en el número de microorganismos adheridos indicando que los sitios probables de adhesión de las células ya estarían cubiertos o saturados. El mismo comportamiento se observó para todos los lactobacilos estudiados, aunque en algunas cepas, la relación lineal se mantuvo hasta mayores concentraciones de lactobacilos iniciales (1.10^{10} UFC/ml).



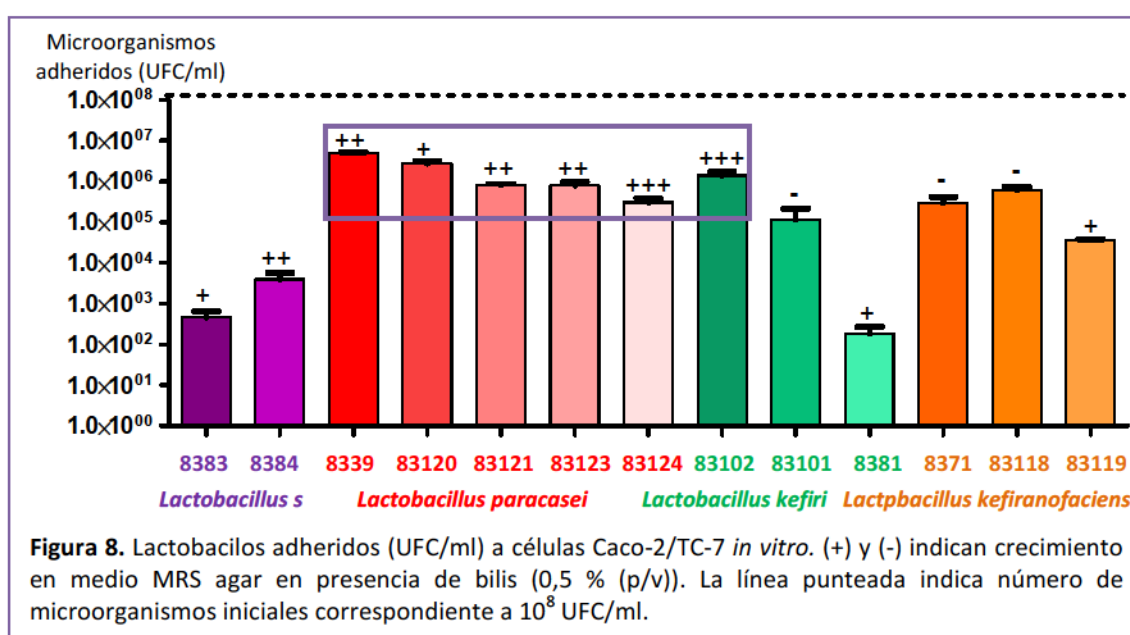
Teniendo en cuenta estos resultados, la concentración de lactobacilos elegida para comparar la capacidad de adhesión de las cepas en estudio a esta línea celular fue 1.10^8 UFC/ml. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 7.

Se observó que las cinco cepas de *L. paracasei* presentaron los mayores valores de adhesión (entre 1.10^6 y 1.10^7 UFC/ml). *L. kefiranofaciens* CIDCA 8371 y CIDCA 83118 presentaron valores de adhesión próximos a 1.10^6 UFC/ml. *L. kefiri* CIDCA 83101 y CIDCA 83102 mostraron valores de adhesión del orden de 10^5 - 10^6 UFC/ml mientras que *L. kefiri* CIDCA 8381, *Lactobacillus sp.* CIDCA 8383 y CIDCA 8384 presentaron los menores valores de adhesión (10^2 y 10^3 UFC/ml).



La capacidad de adhesión de lactobacilos es muy variada, inclusive dentro de una misma especie. Los mayores valores de adhesión en las condiciones del presente trabajo se obtuvieron con las 5 cepas de *L. paracasei*, con *L. kefir* CIDCA 83102 y CIDCA 83101 y *L. kefiranofaciens* CIDCA 8371 y CIDCA 83118. Sin embargo, algunos trabajos describen que cepas de *L. paracasei* aisladas de otras fuentes presentan una capacidad de adhesión entre 0,08 % a 0,11 % (Minelli *et al.* 2004; Maragkoudakis *et al.* 2006), menor a la encontrada en el presente trabajo cuyos valores oscilan entre 0,31 % y 5,04 %.

En la Figura 8 se presentan los resultados de resistencia a la bilis y adhesión a células Caco-2/TC-7 de las cepas estudiadas.





Las 5 cepas de *L. paracasei* estudiadas en este trabajo presentaron resultados similares entre ellas en la capacidad de adhesión a células Caco-2/TC-7 *in vitro* y todas fueron capaces de crecer en presencia de bilis de buey 0,5 % (p/v), pero presentaron distinta capacidad de crecimiento. *L. paracasei* CIDCA 83124 presentó la mayor resistencia al desarrollo en bilis, *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83121 y CIDCA 83123 presentaron una resistencia intermedia, mientras que *L. paracasei* CIDCA 83120 presentó una menor resistencia al crecimiento en bilis. La capacidad de adhesión y de crecimiento en presencia de bilis de las distintas cepas de *L. kefir* fue variable, y sólo *L. kefir* CIDCA 83102 presentó alta capacidad de adhesión a células de epitelio intestinal y resistencia al crecimiento en bilis.

Teniendo en cuenta el crecimiento en bilis y la capacidad de adherirse al epitelio intestinal (Figura 8), se seleccionaron las siguientes cepas para continuar los estudios de propiedades probióticas: *L. kefir* CIDCA 83102, *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123 y CIDCA 83124.

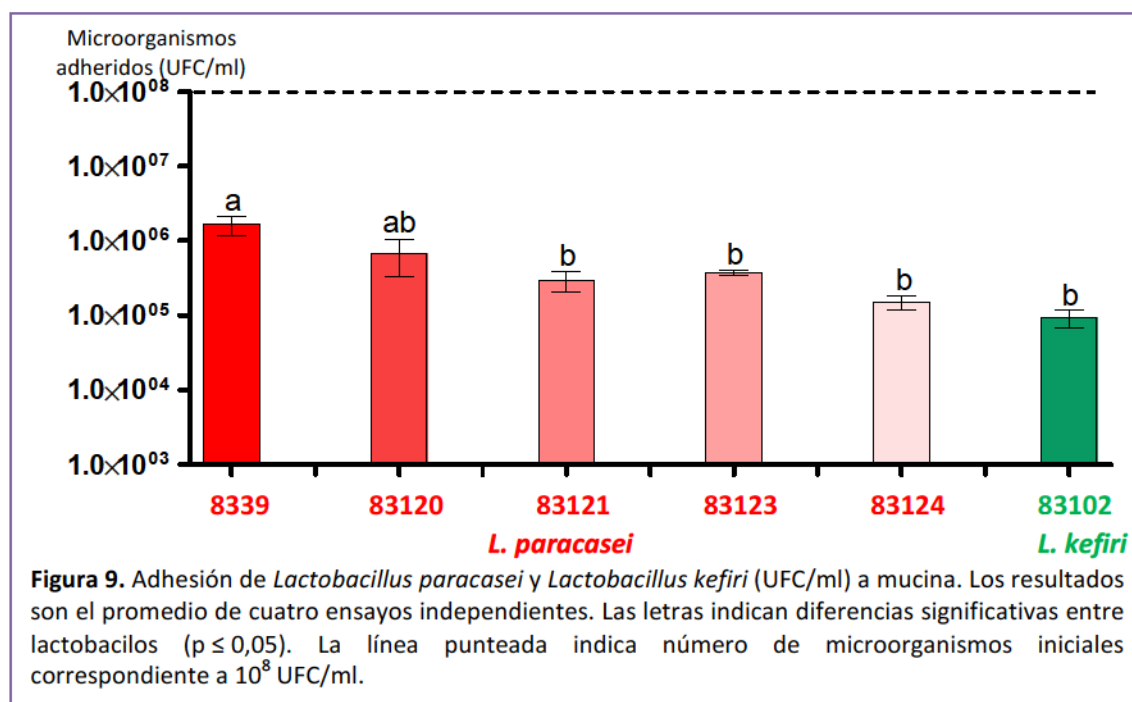
Adhesión a mucina

Las células epiteliales del tracto gastrointestinal están cubiertas por una capa de mucus que protege al epitelio de los daños mecánicos, de patógenos, y también proporciona un hábitat y nutrientes para la microflora intestinal (Tuomola *et al.* 1999). El mucus es la primera barrera en el intestino que enfrentan los microorganismos, por lo tanto, la adhesión a esta matriz se considera requisito previo para la colonización del intestino (Ouwehand *et al.* 1999). Los componentes principales del mucus son glicoproteínas poliméricas llamadas mucinas que han sido ampliamente utilizadas para los ensayos de adhesión *in vitro* de probióticos (Tuomola *et al.* 2000; Matsumoto *et al.* 2002). Algunos autores estudiaron la adhesión sobre células productoras de mucus tales como HT-29 MTX y se ha informado que muchos lactobacilos y bifidobacterias son capaces de unirse a esta capa protectora que cubre la mucosa intestinal (Collado *et al.* 2007b; Ruas-Madiedo *et al.* 2006).



Se evaluó la capacidad de adhesión de las cepas seleccionadas a mucina gástrica porcina tipo III parcialmente purificada y los resultados se presentan en la Figura 9.

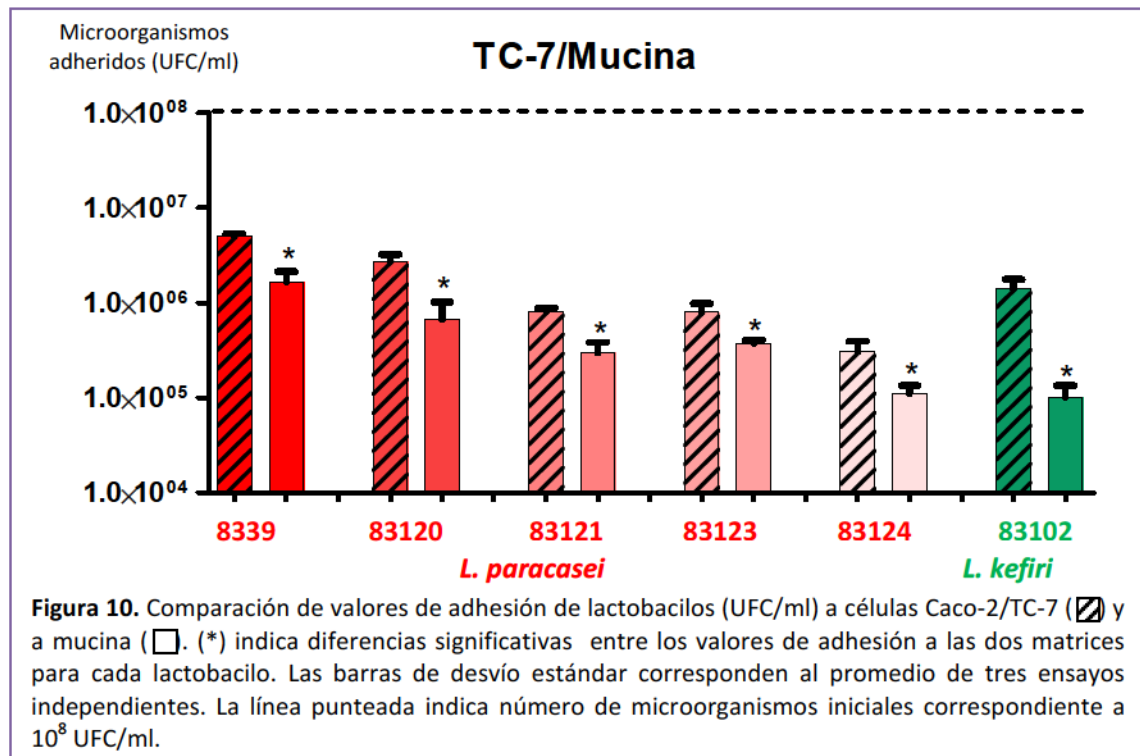
Los 6 lactobacilos estudiados (5 cepas de *L. paracasei* y una de *L. kefir*) fueron capaces de adherirse a mucina en concentraciones entre 1.10^5 y 1.10^6 UFC/ml cuando la concentración de microorganismos iniciales fue de 1.10^8 UFC/ml. *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83120 fueron las cepas que presentaron mayor capacidad de adhesión a mucus. El resto de las cepas estudiadas presentaron menor capacidad de adhesión y entre ellas no se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$).



Los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo la adhesión a mucus son poco conocidos pero se ha descrito la participación de proteínas de superficie bacterianas ya que se ha observado una disminución de la adhesión después de tratamientos con proteasas sobre las bacterias (Tuomola *et al.* 2000; Lorca *et al.* 2002). Además las proteínas de superficie purificadas son capaces de adherirse a mucus o a células epiteliales (Roos *et al.* 1996; Sillanpaa *et al.* 2000). Muchas de ellas presentan componentes glicosídicos en su estructura. Por ejemplo, la cepa *L. kefir* 8348 posee capa-S glicosilada (Mobili *et al.* 2009) y tiene capacidad de adhesión a mucus (Carasi *et al.* 2013) y a células epiteliales (Golowczyc *et al.* 2007). Por otro lado, la adhesión de *Lactobacillus plantarum* a células HT-29 es una propiedad cepa-dependiente y mediada

por manosa (Adlerberth *et al.* 1996). Las cepas de *L. paracasei* estudiadas en este trabajo son productoras de polisacárido (Hamet *et al.* 2013), en consecuencia sería factible pensar en la intervención de componentes glucídicos en las propiedades de adhesión.

En la Figura 10 se compara la adhesión de los lactobacilos estudiados a células del epitelio intestinal Caco-2/TC-7 y a mucina.



Todos los lactobacilos estudiados presentaron valores de adhesión a mucina significativamente diferentes respecto a los obtenidos en la adhesión a células Caco-2/TC-7. La diferencia entre ambas matrices no superó el orden logarítmico excepto para *L. kefir*. La adhesión de lactobacilos a distintos modelos ha sido estudiada por otros autores y los porcentajes de adhesión observados resultaron muy variables, incluso entre cepas de una misma especie de microorganismos (Cebrián *et al.* 2012; Piątek *et al.* 2012). La capacidad de adhesión a diferentes superficies de cepas de *L. plantarum* depende de la cepa y la matriz biológica utilizada (Tallon 2007; Jacobsen *et al.* 1999). Resultados similares se han descrito con diferentes cepas de *L. casei* (Tuomola & Salminen, 1998).



La capacidad de adhesión a diferentes superficies estaría asociada a los componentes presentes en la superficie microbiana. Los componentes presentes en la superficie de los microorganismos afectan el valor de la hidrofobicidad superficial.

El método más común para medir la hidrofobicidad es medir la partición de una suspensión bacteriana en un hidrocarburo, tal como el hexadecano. Este método es popular por su simplicidad, reproducibilidad y por ser no destructivo para las bacterias (Doyle & Rosenberg, 1990).

En este trabajo se utilizó el denominado MATH (*Microbial Adhesion to Hexadecan*), una técnica basada en la tendencia de ciertos microorganismos de mantenerse en la fase acuosa (hidrofílico) o migrar a la fase no polar (hidrofóbico) luego de un breve período de contacto (Ofek & Doyle, 1994). Los resultados de partición en hexadecano se presentan en la Tabla 4. En la tabla también se muestra un lactobacilo hidrofóbico como *L. kefir* CIDCA 8348 y un lactobacilo hidrofílico como *L. plantarum* CIDCA 83114, que fueron utilizadas como controles.

Tabla 4. Porcentajes de hidrofobicidad superficial de los lactobacilos estudiados.

<i>L. plantarum</i> CIDCA 83114	5,28 ± 1,29
<i>L. kefir</i> CIDCA 8348	37,41 ± 2,62
<i>L. kefir</i> CIDCA 83102	5,22 ± 1,20
<i>L. paracasei</i> CIDCA 8339	7,13 ± 0,09
<i>L. paracasei</i> CIDCA 83120	9,00 ± 1,23
<i>L. paracasei</i> CIDCA 83121	3,83 ± 0,14
<i>L. paracasei</i> CIDCA 83123	5,74 ± 0,19
<i>L. paracasei</i> CIDCA 83124	5,39 ± 0,73

Todos los lactobacilos estudiados mostraron ser altamente hidrofílicos, y durante el ensayo no presentaron una tendencia a pasar al solvente orgánico sino que se quedaron en el *buffer* (fase acuosa) que las contenía (Tabla 4). Este comportamiento hidrofílico podría ser debido a la presencia de componentes de naturaleza glucídica en la superficie bacteriana.



La hidrofobicidad superficial se ha asociado con la habilidad de un microorganismo de adherirse a un sustrato, aunque la adhesión a superficies generalmente involucra múltiples factores. En bifidobacterias, la hidrofobicidad superficial se ha relacionado con la capacidad de adherirse al epitelio intestinal (Perez *et al.* 1998), sin embargo en lactobacilos existen resultados contradictorios sobre la relación entre la hidrofobicidad superficial y la adhesión a epitelio (Ouwehand *et al.* 1999; Vinderola *et al.* 2004; Schillinger *et al.* 2005; Golowczyc *et al.* 2008; Wadstrom *et al.* 1987; Ehrmann *et al.* 2002; Van Der Mei *et al.* 2003). En este trabajo demostramos que cepas altamente hidrofílicas son capaces de adherirse tanto a células epiteliales como a mucina, indicando una posible interacción de componentes de naturaleza glucídica, ya sea asociado a proteínas o la presencia de exopolisacáridos en la superficie.

Adhesión a epitelio y pasaje por el tracto gastrointestinal *in vitro*

Si bien la adhesión a epitelio y a mucus es una de las propiedades a estudiar de las bacterias potencialmente probióticas, las mismas antes de llegar al epitelio deben pasar por el tracto gastrointestinal, es así, que la resistencia al ácido y a la bilis es otro de los parámetros a analizar que podrían afectar la capacidad de adhesión (Kalliomaki *et al.* 2008). La exposición a los fluidos gástricos e intestinales a lo largo del tracto digestivo es el principal estrés que afecta la viabilidad de los probióticos ingeridos (Liong & Shah, 2005). Si una cepa probiótica está destinada para la administración oral, es requisito esencial sobrevivir a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal para llegar viva al sitio de acción de destino, el intestino delgado y grueso. La tolerancia a la acidez, bilis y pancreatina *in vitro* permiten predecir el comportamiento de las bacterias lácticas en las condiciones encontradas en el tracto gastrointestinal (OMS / FAO, 2006). Sin embargo, hay muy pocos resultados sobre las propiedades de adhesión a epitelio y mucus de los microorganismos después de pasar por el tracto gastrointestinal (TGI).



Viabilidad bacteriana luego del pasaje.

Para evaluar la capacidad de los microorganismos para sobrevivir a las condiciones de estrés del tracto gastrointestinal humano, principalmente pH bajo en el estómago y las sales biliares y jugo pancreático en el intestino delgado (Sánchez *et al.* 2008), se realizaron dos incubaciones seriadas, la primera simulando las condiciones gástricas, a pH ácido y en presencia de pepsina, y la segunda, simulando las condiciones intestinales, a pH alcalino y en presencia de sales biliares y pancreatina. Se realizaron recuentos de microorganismos iniciales, luego del pasaje gástrico simulado, y luego del pasaje intestinal simulado en forma secuencial, según se detalla en el esquema de la Figura 11. El número de microorganismos viables después de las diferentes etapas del tránsito gastrointestinal simulado se muestran en la Figura 12.

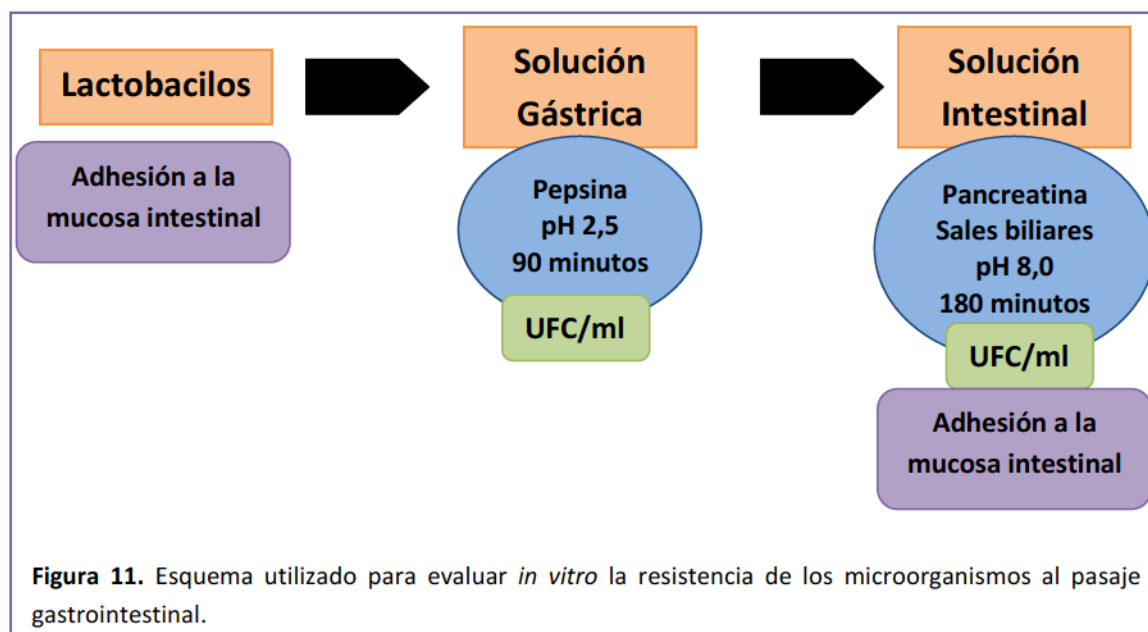
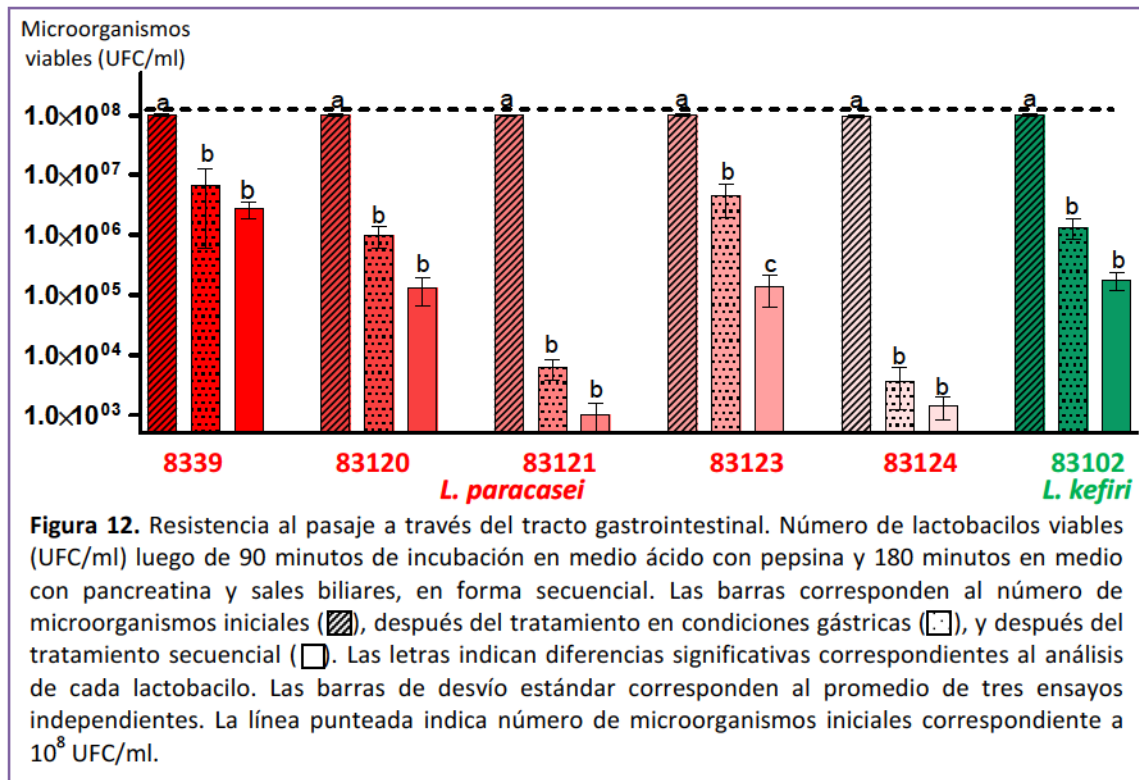


Figura 11. Esquema utilizado para evaluar *in vitro* la resistencia de los microorganismos al pasaje gastrointestinal.



El estrés al ácido conferido por el jugo gástrico afectó la viabilidad de la mayoría de los lactobacilos. *L. paracasei* CIDCA 83121 y CIDCA 83124 fueron los más afectados disminuyendo el número de microorganismos viables hasta 4 unidades logarítmicas. Este hecho pone de manifiesto la alta sensibilidad de los mismos al pH bajo. Al someter a *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83120, CIDCA 83121 y CIDCA 83124 y *L. kefir* CIDCA 83102 al tratamiento secuencial no se encontraron diferencias significativas en el número de microorganismos viables comparado con los que se mantuvieron viables después del pasaje por jugo gástrico, mientras que *L. paracasei* CIDCA 83123 disminuyó su viabilidad en un orden logarítmico. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Fumnilola *et al.* (2011) quienes estudiaron la resistencia al pasaje gástrico de dos *L. paracasei* en condiciones similares a las del presente trabajo, encontrando que la acidez (solución ácido - pepsina) producía una caída del número de microorganismos viables de hasta 6 ciclos logarítmicos. También demostraron que el jugo intestinal simulado (sales biliares - pancreatina) no afectó la viabilidad de los aislados, concordando con los resultados obtenidos en este trabajo con las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83120, CIDCA 83121 y CIDCA 83124 y *L. kefir* CIDCA 83102. Se cree que una buena supervivencia a la bilis puede reflejar también una buena resistencia del microorganismo probiótico a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal



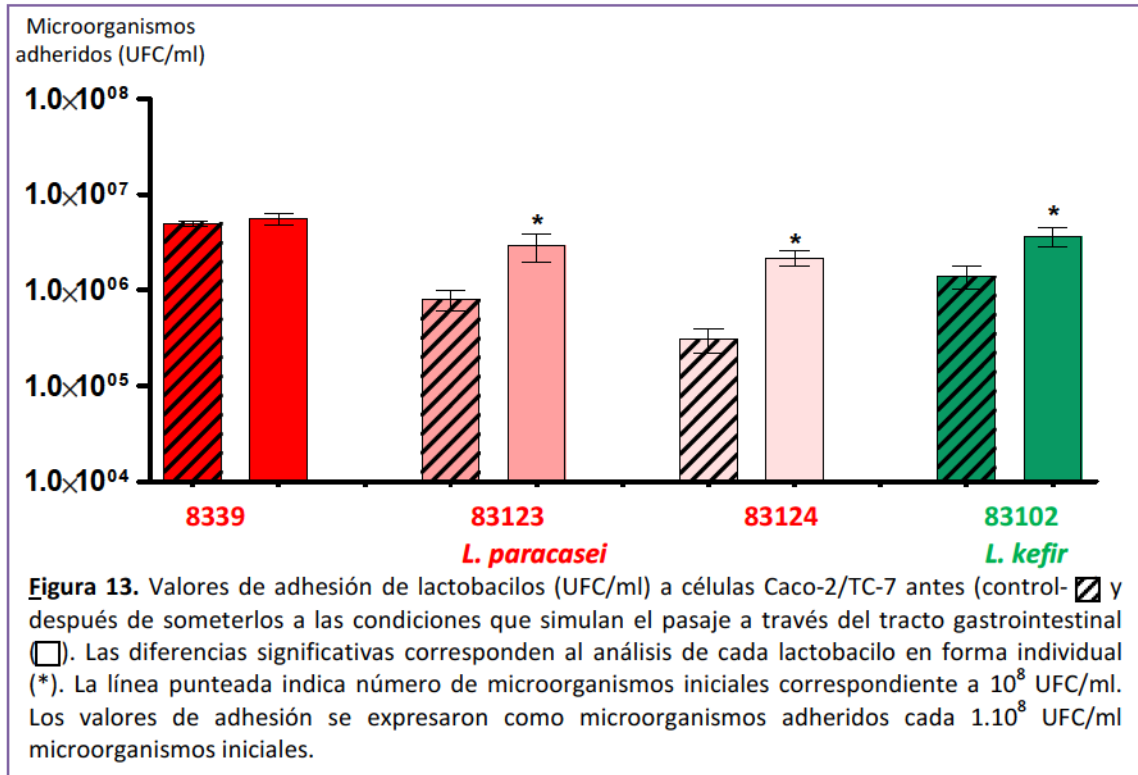
humano (Watson *et al.* 2008). Por esta razón, los lactobacilos seleccionados podrían ser propuestos para su utilización en alimentos potencialmente probióticos.

Las variaciones observadas en la resistencia al pasaje gastrointestinal simulado y secuencial nos proporcionan un importante primer criterio de análisis, seleccionando lactobacilos con diferente capacidad de resistencia tales como *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123, CIDCA 83124 y *L. kefir* CIDCA 83102 para estudiar su respectiva adhesión a células epiteliales o mucus. Es factible pensar que la capacidad de producir exopolisacáridos esté relacionada a la resistencia a la bilis, correlación que ya fue descrita en otras especies de bacterias como *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.* y *Pediococcus spp.* aislados del kefir (Sabir *et al.* 2010). Sin embargo, la resistencia a la bilis también se observó en cepas no productoras de exopolisacáridos tal como lo es *L. kefir* CIDCA 83102.

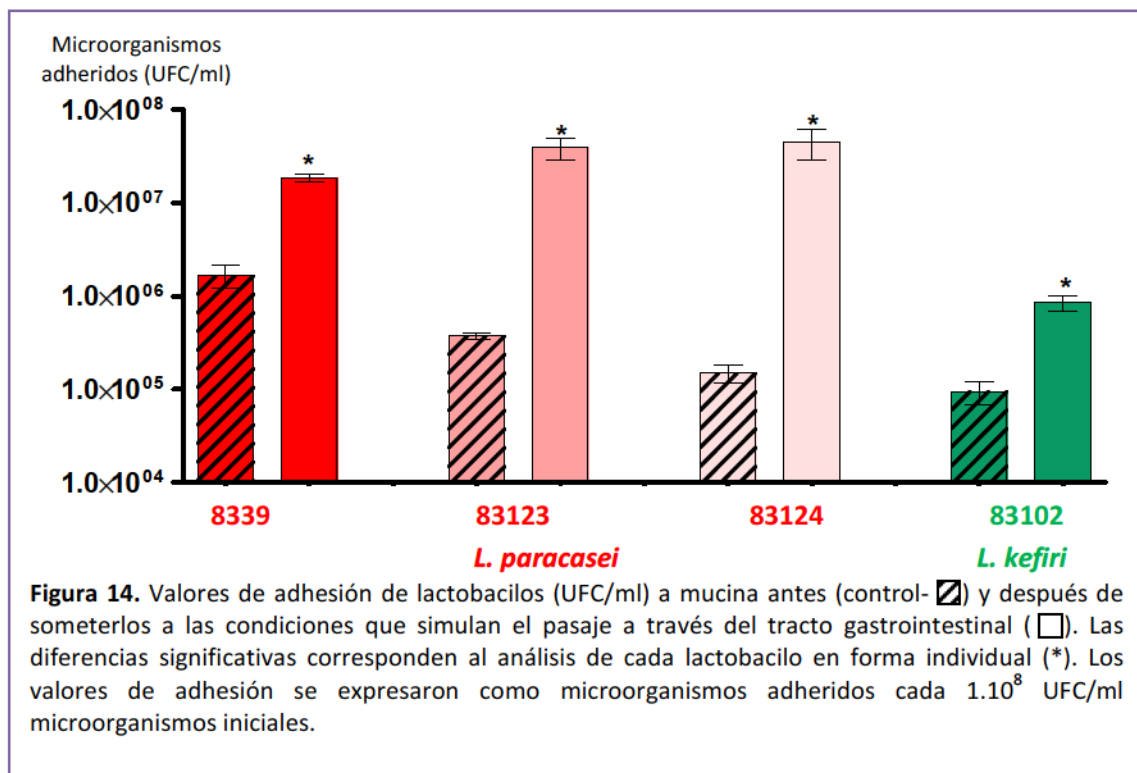
Adhesión a línea celular Caco-2/TC-7 y mucina después del pasaje por el tracto gastrointestinal simulado.

Se evaluó la adhesión de los 4 lactobacilos seleccionados a células epiteliales intestinales de la línea Caco-2/TC-7 luego del pasaje simulado por el tracto gastrointestinal. Los valores de adhesión a las células luego del pasaje por el tracto gastrointestinal se expresaron normalizando los valores obtenidos a un recuento inicial de 1.10^8 UFC/ml (Figura 13).

La adhesión de tres de los lactobacilos seleccionados a células Caco-2/TC-7 fue mayor después del tratamiento a las condiciones gastrointestinales. Esto indicaría que el estrés al que fueron sometidos generó cambios en la superficie bacteriana que se vieron reflejados en un aumento significativo de la adhesión. Sólo *L. paracasei* CIDCA 8339 no presentó diferencias en los valores de adhesión antes y después del tratamiento.



Posteriormente se evaluó la capacidad de adhesión a mucina de lactobacilos sometidos a las condiciones gastrointestinales simuladas. En la Figura 14 se muestran los valores de adhesión a mucina expresados de la misma forma que para los resultados de adhesión a células Caco-2/TC-7.





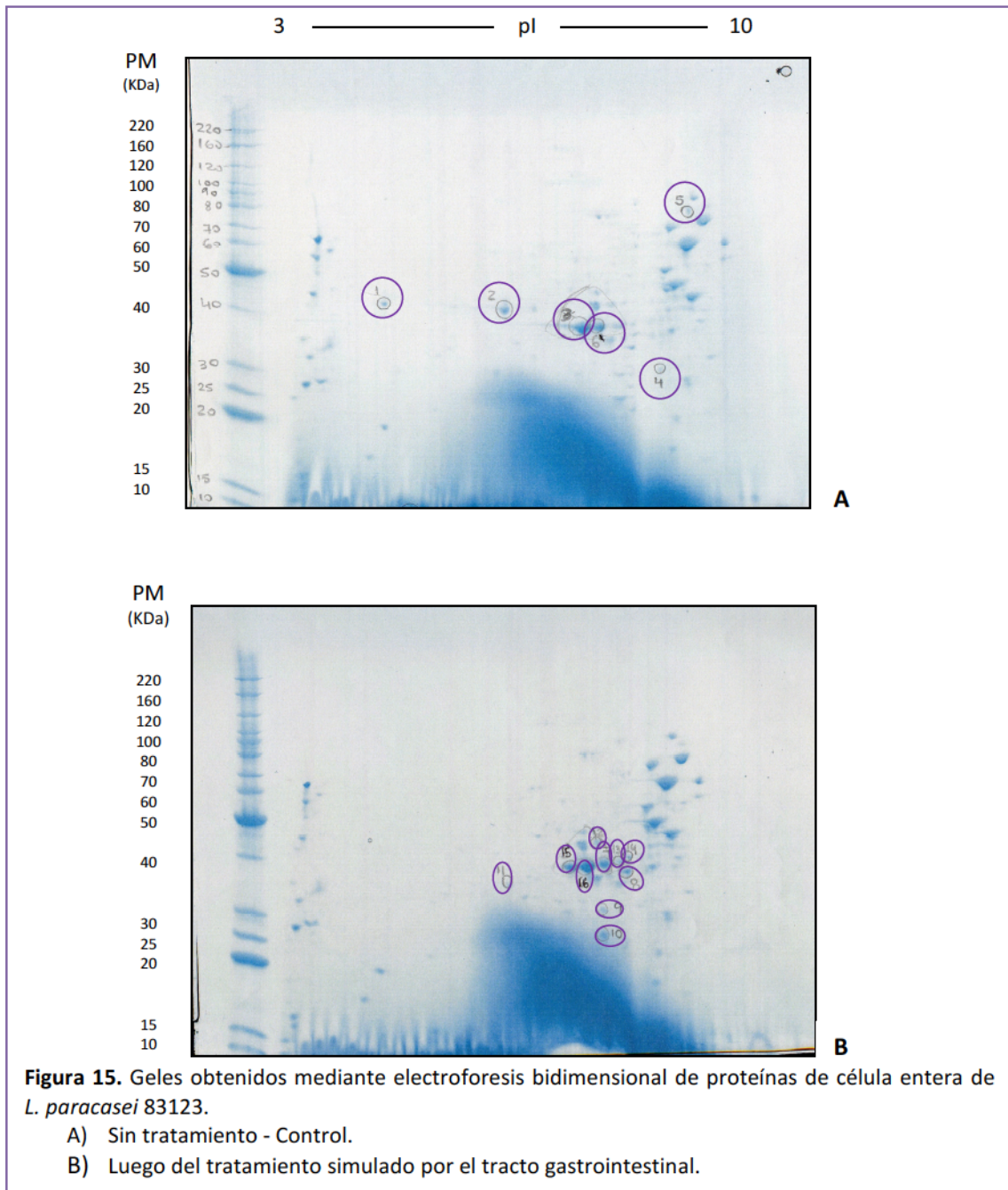
En lo que respecta a la adhesión a mucina, se observó que los 4 lactobacilos presentaron un aumento en su capacidad de adhesión luego del tratamiento gastrointestinal, en coincidencia con los resultados obtenidos en el modelo celular Caco-2/TC-7.

Hasta el momento, la mayoría de los trabajos publicados evalúan la sobrevivencia a la simulación de las condiciones del tracto gastrointestinal y la adhesión a células epiteliales en forma independiente. La evaluación de la capacidad de adhesión luego de someter a los lactobacilos al estrés gastrointestinal permite avanzar hacia un modelo que se acerca a las condiciones fisiológicas. Es interesante destacar que la capacidad de adhesión de los lactobacilos aumentó después del estrés ácido y presencia de bilis. Esto indicaría que este tratamiento modifica la superficie de los microorganismos favoreciendo la interacción con las células epiteliales y la mucina. Estos cambios podrían ser sólo cambios en la conformación de los componentes de la superficie, o debidos a que el estrés podría inducir la expresión de diferentes proteínas a nivel de la superficie bacteriana que contribuyan al proceso de adhesión.

La buena adhesión de los lactobacilos seleccionados al epitelio intestinal luego de ser sometidos a la simulación del pasaje por el tracto gastrointestinal, es un indicador para proponer su uso como potencial probiótico.

Expresión de proteínas después del pasaje por el tracto gastrointestinal (TGI)

Con la finalidad de indagar los efectos inducidos por el ácido y las sales biliares, e interpretar qué cambios podrían ocurrir en la bacteria que lleven a un aumento en su capacidad de adherirse a epitelio, se seleccionó *L. paracasei* 83123 porque presentó un aumento significativo en la adhesión a células luego de ser sometida a la simulación de las condiciones del tracto gastrointestinal. Se obtuvieron extractos de las proteínas de las bacterias por lisis de las mismas antes y después de la simulación por el tracto gastrointestinal. Se llevó a cabo una electroforesis de dos dimensiones (2D). Los resultados se muestran en la Figura 15.



La inspección visual de los *spots* obtenidos en los geles mostraron algunas diferencias entre los perfiles de las electroforesis bidimensional (2D) de los lactobacilos sometidos al tratamiento de simulación del pasaje gastrointestinal y los lactobacilos no tratados. Se evidenciaron 16 *spots* que presentaron intensidades diferentes en ambos geles, que corresponden a las proteínas expresadas de manera diferencial antes y después del tratamiento (marcado en la Figura 15).



Con el fin de averiguar qué proteínas se vieron afectadas por el estrés gastrointestinal que puedan desempeñar un papel en las propiedades de adhesión, se analizaron por espectrometría de masas los 16 *spots* resultantes cuya intensidad relativa se vio modificada entre los lactobacilos sometidos al estrés ácido y a la presencia de bilis y aquéllos que no lo fueron (Tabla 5). No fue posible la identificación de 3 de los *spots* seleccionados, por ello no se listan en la tabla.

Tabla 5. Proteínas expresadas de manera diferencial en *L. paracasei* CIDCA 83123 sometida al estrés ácido y de bilis.

<i>Spots</i>	PM (KDa)	pI	Intensidad relativa de los <i>spots</i> (TGI/C)	Identificación por MALDI-TOF
01	41	4,34	0,08	-Hidrolasa de pared celular, de la familia amilasa (<i>L. paracasei</i>) -Antígeno de superficie, parcial (<i>L. paracasei</i>)
02	39	5,99	0,22	-Antígeno de superficie (<i>L. casei</i> ATCC 334) -Hidrolasa de pared celular, de la familia amilasa (<i>L. paracasei</i>)
03	36	7,15	0,59	-Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i>)
04	29	8,09	0,53	-Proteína LacX, plásmido, parcial (<i>L. paracasei</i>) -Galactosa mutarotasa, parcial (<i>L. paracasei</i>)
05	75	8,51	0,26	-Hidrolasa asociada a la pared celular, parcial (<i>L. paracasei</i>)
06	36	7,25	1,69	-Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i>)
07	36	7,48	2,7	-Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i>)
08	35	7,83	4,3	-L-lactato deshidrogenasa (<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i>)
10	~ 25	~ 7,45	ND	-Fosfogliceromutasa (<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i>)
11	34	6,14	2,6	UTP-glucosa-fosfato uridiltransferasa (<i>L. casei</i> BL23, <i>L. paracasei</i>)
12	41	7,43	1,0	-Fosfoglicerato quinasa OS (<i>L. casei</i>)
13	37	6,96	1,5	No se pudo identificar.
14	37	7,88	1,8	No se pudo identificar.

Cuando los lactobacilos fueron sometidos a las condiciones gastrointestinales *in vitro*, 6 *spots* de los seleccionados fueron más intensos, mientras que 5 disminuyeron su intensidad respecto a los lactobacilos control, no tratados. Un spot que visualmente parecía tener diferente intensidad en los geles después del tratamiento, al ser analizado el densitograma dio una relación 1.



Se identificaron 3 péptidos que podrían estar asociados a las proteínas de superficie de *L. paracasei* cuya intensidad relativa disminuyó después del pasaje simulado por el tracto gastrointestinal, mientras que las otras 2 proteínas también reguladas negativamente fueron identificadas como gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (vía glicolítica) y galactosa mutarotasa. La mayoría de las células vivas poseen un galactosa mutarotasa (Galm), que cataliza rápidamente la conversión de β -D-galactosa en α -D-galactosa (Beebe & Frey, 1998). La regulación negativa de esta enzima indicaría una acumulación de β -D-galactosa que podría ser precursor de exopolisacáridos.

De los 8 *spots* con mayor intensidad que fueron seleccionados, sólo pudieron identificarse 6 proteínas que se regularon positivamente. Se identificaron 2 isoformas de la enzima de la vía glicolítica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, un péptido fue identificado como fragmento de L-lactato deshidrogenasa, otro como fosfogliceromutasa, otro como UTP glucosa-1-fosfato uridiltransferasa y el último *spot* fue identificado como fosfoglicerato quinasa. La enzima L-lactato deshidrogenasa participa en la obtención de piruvato a partir de lactato. Las enzimas fosfoglicerato quinasa y fosfogliceromutasa intervienen también en la síntesis de piruvato.

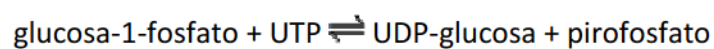
Por lo tanto, se observó que la mayoría de las proteínas que fueron reguladas positivamente corresponden a enzimas de la ruta glicolítica, siendo un efecto general del estrés activar la fuente de energía. Esto mismo fue observado recientemente para *Lactobacillus casei* lbz-2 luego de ser sometido a una adaptación ácida durante 1 hora a pH 4,5, donde encontraron que fueron reguladas positivamente 5 proteínas (Pkg, LacD, Hpr, y Galm) implicadas en el metabolismo de los carbohidratos y otras 5 proteínas de respuesta al estrés (GroEL, GrpE, DnaK, Hsp1 y LCAZH_2811). Entre ellas, GrpE en combinación con GroEL interaccionan con las enzimas glicolíticas a pH bajo y aumentan la estabilidad de las proteínas en presencia de ácido, mientras que se cree que Dnak puede servir como un "termómetro celular" que transduce señales a otros factores celulares en respuesta al estrés térmico (Wu *et al.* 2014).

Bron *et al.* (2004) investigaron la base genética de la persistencia de *Lactobacillus plantarum* WCFS1 a través del tracto gastrointestinal en ratón. Identificaron 72 genes cuya expresión se indujo durante el pasaje a través del tracto gastrointestinal. Nueve de



estos genes codifican para funciones relacionadas al metabolismo de azúcares, incluyendo ribosa, celobiosa, sacarosa y sorbitol. Otros 9 genes codifican para funciones involucradas en la adquisición y la síntesis de aminoácidos, nucleótidos, cofactores y vitaminas. También encontraron cuatro genes que codifican para proteínas extracelulares que podrían estar implicadas en la interacción con factores específicos del huésped.

La enzima UTP glucosa-1-fosfato uridiltransferasa interviene en la activación de azúcares catalizando la siguiente reacción:



La regulación positiva de las enzimas que puedan estar relacionadas a la activación de azúcares podría indicar que frente al estrés aumentaría la producción de exopolisacáridos. El rol fisiológico que los exopolisacáridos (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. 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 (Ruas-Madiedo *et al.* 2008).

Muchos trabajos describen el efecto del estrés ácido y de bilis de manera separada. Se ha descrito que la respuesta al tratamiento con bilis implica una variedad de procesos dirigidos tanto al proceso de detoxificación de la bilis (la activación de la salida de bilis o sales biliares o su hidrólisis) y a contrarrestar el efecto del medio en estructuras celulares mediante cambios en la pared o membrana celular. La exposición a la bilis puede dar lugar a cambios en la composición de ácidos grasos y fosfolípidos de las membranas bacterianas y a la distorsión de la superficie celular. Entre ellos la producción de EPS o generación de proteínas de superficie podrían ser mecanismos de respuesta al estrés (Ruiz *et al.* 2013). En *Bifidobacterium* se ha demostrado que la producción de EPS es un mecanismo de respuesta al estrés de bilis (Ruas-Madiedo *et al.* 2009). El ambiente hidrofílico creado por el exopolisacárido alrededor de las estructuras celulares externas podría favorecer la absorción de nutrientes e iones, o bien actuar



como mecanismo de desintoxicación bloqueando el contacto de compuestos tóxicos con la pared y membrana celular. 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.

La enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una enzima citoplasmática que participa en la glicólisis, sin embargo muchas enzimas del metabolismo de carbohidratos a menudo se encuentran asociadas a la pared celular y son capaces de ejercer otras funciones denominadas "*Moonlighting functions*". Se ha descrito en *L. plantarum* que la GAPDH asociada a superficie es capaz de interactuar con otras matrices como mucina y fibronectina (Gonzalez-Rodríguez *et al.* 2012). En consecuencia la regulación positiva de esta enzima no sólo podría asociarse a una activación de las vías que producen energía, en caso de que estas enzimas se encuentren en el citosol, sino también podría pensarse que las isoenzimas de GAPDH que están reguladas positivamente estarían asociadas a pared y jugarían un rol en los procesos de interacción con células epiteliales o mucus del hospedador.



Efecto antagónico contra *Salmonella enterica* serovar Enteritidis

Para estudiar el efecto antagónico contra *Salmonella* Enteritidis de *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 y *L. kefir* CIDCA 83102 se empleó el modelo de células de epitelio intestinal Caco-2/TC-7. Se analizó la capacidad de asociación e invasión de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis utilizando diferentes diseños experimentales. Se evaluó luego el efecto antagónico de los microorganismos seleccionados como también de sus sobrenadantes.

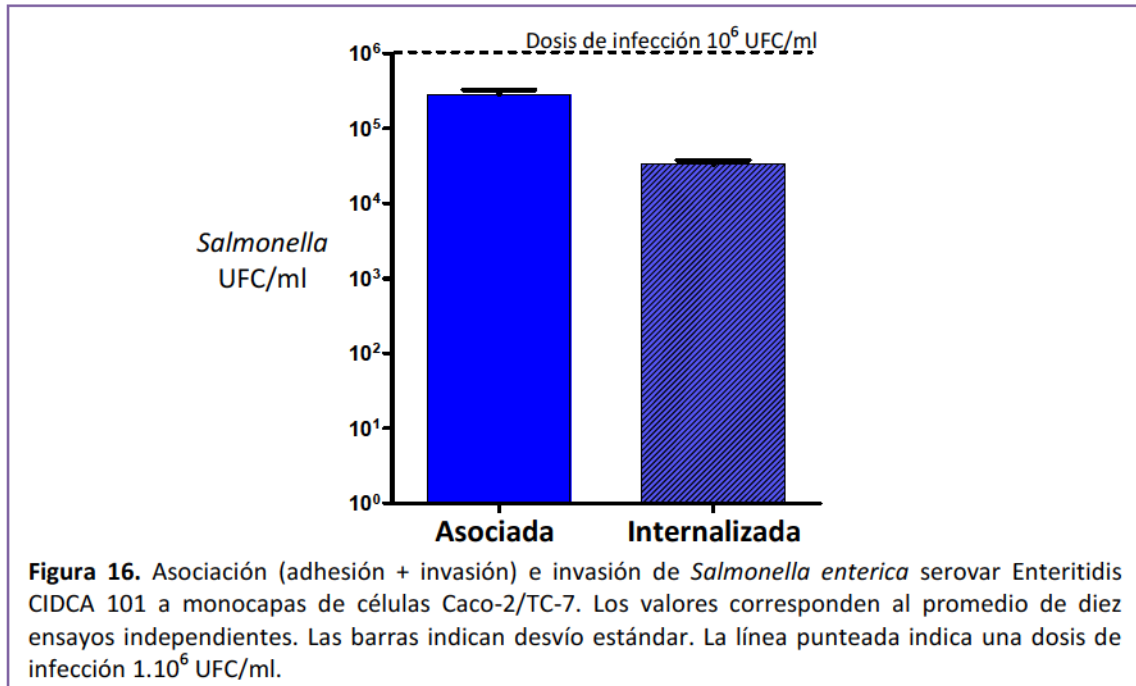
Asociación e invasión de *Salmonella* a células Caco-2/TC-7.

En una primera etapa, se estudió la capacidad de asociación e invasión de *Salmonella* a células Caco-2/TC-7 en cultivo. *Salmonella* posee un sistema altamente especializado que le permite interactuar con la célula epitelial y causar una infección. El primer paso es la colonización del epitelio intestinal que va a depender de la capacidad de adhesión de las bacterias. Hay numerosos receptores fisiológicos en la superficie de las células intestinales donde la bacteria se puede unir (Lu & Walker, 2001). Generalmente, adherirse al epitelio intestinal es un paso esencial para poder resistir el flujo de fluidos y los movimientos peristálticos en el intestino. Una vez adherida al epitelio, se producen cambios morfológicos y arreglos en el citoesqueleto que tienen como consecuencia que las células intestinales internalicen la bacteria (Darwin & Miller, 1999).

Para los estudios de asociación de *Salmonella* a las células epiteliales *in vitro* se realiza un recuento del total de bacterias (adheridas + internalizadas), mientras que para determinar el nivel de internalización o invasión es necesario diferenciar las bacterias adheridas de las que se encuentran dentro de las células utilizando un antibiótico. Uno de los más utilizados es la gentamicina. Este antibiótico tiene la particularidad que no difunde a través del dominio apical de las células por lo que las bacterias que no se internalizan se ven afectadas por el antibiótico y las que están internalizadas sobreviven. Se utilizó 100 µg/ml de gentamicina durante 1 hora de incubación, considerándose este tratamiento apropiado para los estudios de invasión (Golowczyc *et al.* 2007; Mynott *et al.* 2002).



Se analizó la asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis empleando una dosis infectiva de patógeno de 10^6 UFC/ml, lo que representa una multiplicidad de infección (mdi) de 1 bacteria por cada célula epitelial. Los estudios de asociación e invasión a células Caco-2/TC-7 mostraron que *Salmonella enterica* serovar Enteritidis se asocia ($2,85 \cdot 10^5$ UFC/ml) un orden menos, e invade ($3,34 \cdot 10^4$ UFC/ml) dos órdenes menos que las bacterias iniciales (Figura 16).



Los resultados también se pueden presentar como el porcentaje de bacterias asociadas e internalizadas con respecto al total de bacterias agregadas por ml. En este caso, se pudo observar que aproximadamente un 28,50 % de las bacterias se asocian y un 3,33 % de las bacterias totales agregadas invaden siendo la relación entre las bacterias que internalizan con respecto a las que se asocian de 12,72 % aproximadamente.

Golowczyc *et al.* (2007) describieron que la asociación de esta cepa a células Caco-2/TC-7 es 6,5 % y la invasión de 0,11 % coincidiendo con los resultados de Londero *et al.* (2014). Ambos ensayos se realizaron utilizando una dosis inicial de 10^8 UFC/ml. Sin embargo los ensayos realizados con una dosis de infección de 10^6 UFC/ml, presentaron valores de asociación e internalización de *Salmonella* (Londero *et al.* 2014) similares a los obtenidos en esta tesis.



Shah *et al.* (2011) hallaron que la capacidad de invadir células Caco-2 de 55 cepas de *Salmonella* Enteritidis era variable, encontrando que de las cepas evaluadas, 30 presentaron capacidad invasiva alta (~0,60 %), 18 intermedia (~0,10 %), y 7 baja (~0,05 %). Considerando la clasificación descrita por estos autores la capacidad invasiva de *Salmonella* Enteritidis CIDCA 101 evaluada en el presente trabajo fue alta (3,33 %).

La capacidad de asociación de *Salmonella* varía según la línea celular utilizada debido a los diferentes tipos de receptores superficiales celulares y las estructuras de adhesión del patógeno. *Salmonella* establece un estrecho contacto con el ribete en cepillo del epitelio intestinal. Cuando la bacteria se acerca a la superficie epitelial, las microvellosidades circundantes empiezan a degenerarse con elongación, edema y crecimiento en un proceso llamado *ruffling* (rizado). Aquí, los efectores interactúan con las proteínas de la célula hospedadora para arreglar el citoesqueleto de actina e inducir cambios morfológicos que causan que estas células, normalmente no fagocíticas, internalicen la bacteria en un proceso llamado invasión.

Se ha descrito que luego de la entrada de *Salmonella* a los enterocitos, las bacterias internalizadas en vacuolas membranosas son rodeadas por estructuras densas de 5-10 μm conformadas por varios componentes del citoesqueleto. Estas estructuras consisten en agregados de actina polimerizada, alfa-actinina y tropomiosina sobre la bacteria invasora y a los costados de la misma, y son evidentes luego de la adición de la bacteria patógena a células epiteliales en cultivo, siendo detectadas luego de 20 a 60 minutos de incubación dependiendo del modelo de células empleado (Finlay *et al.* 1991). A fin de estudiar las modificaciones en el citoesqueleto de las células Caco-2/TC-7 luego de su infección con *Salmonella*, se analizó la red de actina del citoesqueleto mediante la utilización de faloidina que presenta alta afinidad por esta estructura. Se utilizó como marcador fluorescente isotiociano de fluoresceína unido a faloidina (FITC-faloidina) (Figura 17).

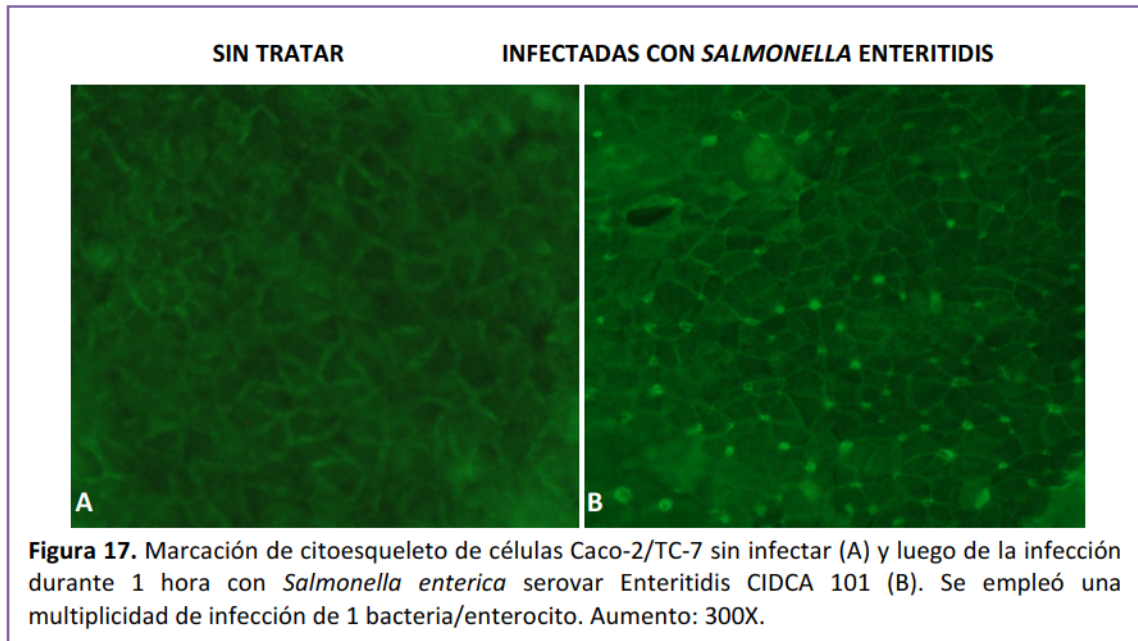


Figura 17. Marcación de citoesqueleto de células Caco-2/TC-7 sin infectar (A) y luego de la infección durante 1 hora con *Salmonella enterica* serovar Enteritidis CIDCA 101 (B). Se empleó una multiplicidad de infección de 1 bacteria/enterocito. Aumento: 300X.

En las células sin infectar, la actina se distribuyó de modo uniforme en los bordes de las células y en las microvellosidades, asimismo se observó un patrón continuo de contacto entre las células (Figura 17 A). Las células infectadas presentaron una alteración de la estructura del citoesqueleto, en algunas zonas de la monocapa se observó una distribución menos homogénea de la actina y mayor concentración de la misma en los contactos entre células (Figura 17 B) coincidiendo con trabajos publicados con diferentes cepas de *Salmonella* (Londero *et al.* 2014; Coconnier *et al.* 1999; Zihler *et al.* 2011).

Interacción de los lactobacilos con *Salmonella* Enteritidis y efecto en la invasión a células Caco-2/TC-7.

Coagregación de lactobacilos con Salmonella entérica serovar Enteritidis.

Existen microorganismos probióticos que tienen la capacidad de interactuar con microorganismos patógenos. Ciertos lactobacilos pueden coagregar con *Salmonella* y mediante esta coagregación modificar la capacidad de adhesión o invasión de este patógeno. Por este motivo, se estudió primero el potencial de coagregación de estos microorganismos con *Salmonella*, y luego el efecto de esta interacción respecto a la asociación-internalización de *Salmonella* a las células epiteliales Caco-2/TC-7.



Podemos definir como coagregación a la interacción entre diferentes microorganismos a través de moléculas superficiales tales como proteínas, carbohidratos, etc. Durante la coagregación actúan mecanismos físicoquímicos, tales como fuerzas de Van der Waals, electrostáticas, interacción mediada por lectina (Golowczyc *et al.* 2009), etc. La coagregación es altamente específica y cada microorganismo tiene un conjunto de moléculas y mecanismos de reconocimiento célula-célula que le permite interactuar sólo con microorganismos que presenten ese mismo patrón (Kolenbrander 1991). La coagregación entre pares microbianos es frecuentemente estudiada mezclando ambos microorganismos en un tubo de ensayo y realizando la evolución de la coagregación mediante diferentes determinaciones. Uno de los métodos más sencillos es el macroscópico, donde se ve a simple vista la formación de agregados. También se puede ver la formación de cúmulos bajo el microscopio (método microscópico). Estas dos formas tienen la ventaja que son simples y rápidas pero no son métodos cuantitativos. Una forma de medir cuantitativamente la coagregación es por el método turbidimétrico donde se mide en un espectrofotómetro la caída de la densidad óptica en el tiempo, producto de la sedimentación de los agregados. Este método no sólo es simple y cuantitativo sino que permite tener una idea de la cinética de coagregación, es decir, cuán rápido se produce la interacción entre los pares coagregantes. En estos ensayos, si ocurre la coagregación, se observa una sedimentación más rápida.

Se realizaron ensayos de coagregación enfrentando los lactobacilos con *Salmonella entérica* serovar Enteritidis CIDCA 101 en *buffer* fosfato pH 7. En la Figura 18 se muestran las curvas de descenso de DO (600 nm) en función del tiempo de *L. paracasei* 8339, *L. paracasei* 83123 y *L. kefir* 83102, junto con la curva de descenso de DO correspondiente a *Salmonella* (autoagregación) y la curva correspondiente a la coagregación de cada lactobacilo con *Salmonella*. Las suspensiones fueron ajustadas a $DO_{600} = 1$ y la concentración de bacterias lácticas fue de 1.10^8 UFC/ml.

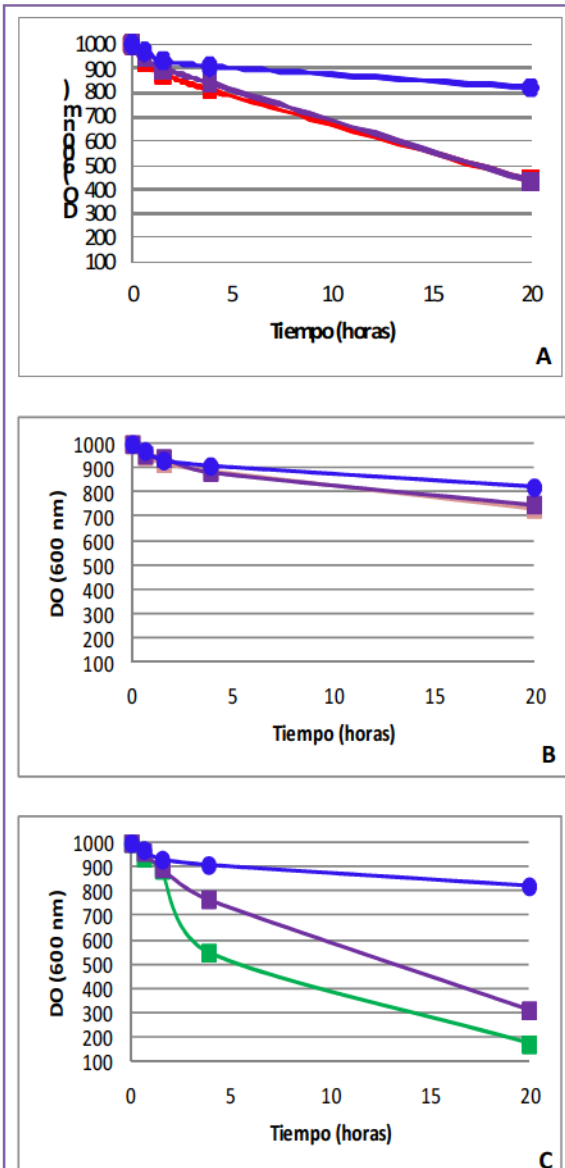


Figura 18. Descenso de DO en función del tiempo de lactobacilos (autoagregación) o lactobacilos con *Salmonella* entérica serovar Enteritidis CIDCA 101 (coagregación).
Lactobacillus paracasei CIDCA 8339 (A)
Lactobacillus paracasei CIDCA 83123 (B)
Lactobacillus kefir CIDCA 83102 (C)
 Autoagregación de lactobacilos (■ ■ ■), coagregación con *Salmonella* entérica serovar Enteritidis CIDCA 101 (■) y autoagregación de *Salmonella* entérica serovar Enteritidis CIDCA 101 (●).

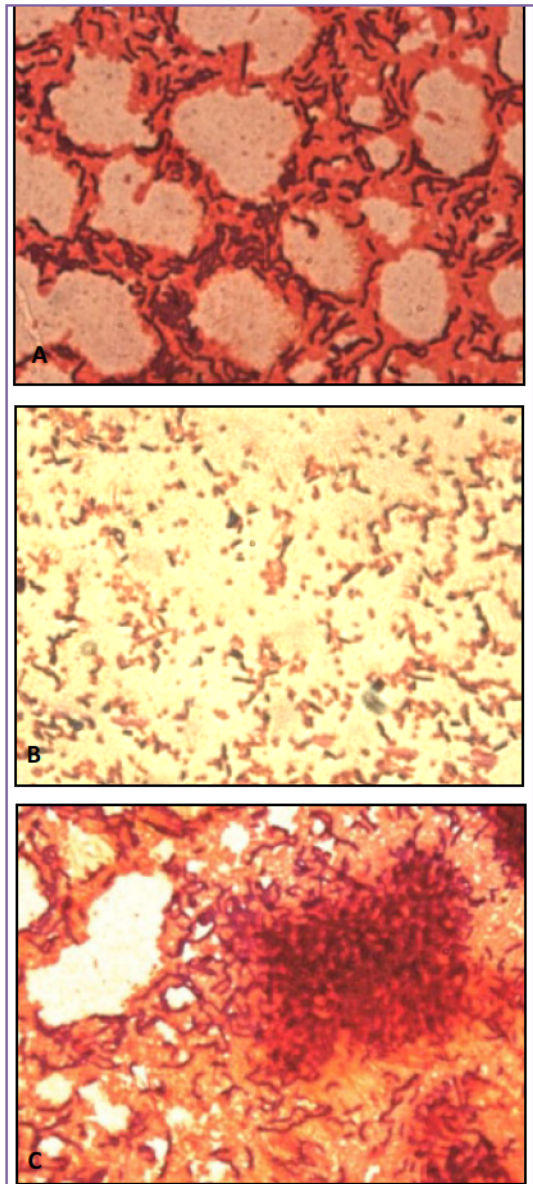


Figura 19. Observación microscópica de la coagregación de *Salmonella* entérica serovar Enteritidis CIDCA 101 (100X) con *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 (A) *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 (B) *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83102 (C) a las 20 horas de ensayo.

En la Figura 18 se puede observar que *Salmonella* Enteritidis no mostró autoagregación alguna (curva azul). Las curvas roja, rosa y verde (■ ■ ■) representan el descenso de DO (600 nm) en función del tiempo de los lactobacilos indicando que las



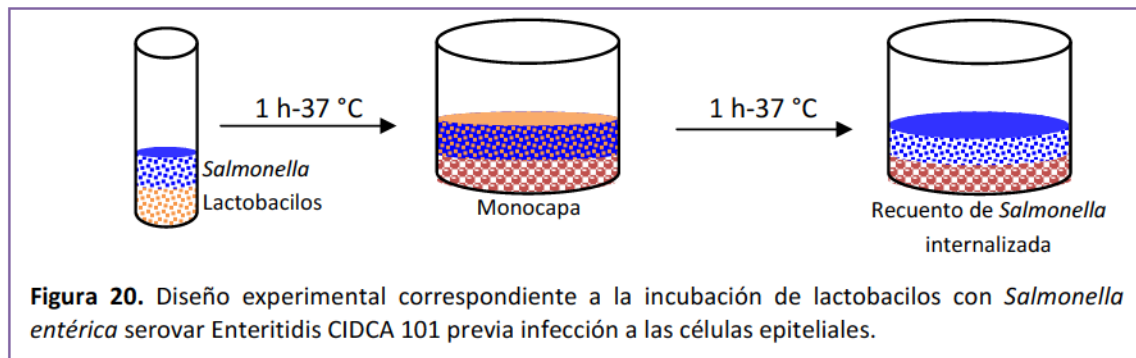
cepas seleccionadas presentan un comportamiento diferente. Se observó que *L. kefir* CIDCA 83102 (verde) es capaz de autoagregar, mientras que *L. paracasei* CIDCA 8339 (roja) presenta un comportamiento parcialmente autoagregante y *L. paracasei* CIDCA 83123 (rosa) no tiene la capacidad de autoagregar. Las curvas violetas (■) indican la coagregación entre cada lactobacilo y *Salmonella*. En la Figura 18 A se observó un descenso parcial de DO (600 nm) indicando autoagregación de *L. paracasei* CIDCA 8339, no encontrándose diferencias con el descenso de la DO al incubarlo con *Salmonella*. Al analizar el aspecto del sedimento a las 20 horas de contacto, mediante microscopía óptica (100X), se observó interacción de *L. paracasei* CIDCA 8339 (Gram +) con *Salmonella* (Gram -) (Figura 19 A). *L. paracasei* CIDCA 83123 no mostró descenso de DO en función del tiempo (Figura 18 B), tanto cuando el lactobacilo se ensayó solo como con *Salmonella*, siendo ambas curvas muy similares a la correspondiente a *Salmonella*. La observación al microscopio de los sedimentos se presenta en la Figura 19 B, en la cual se observaron los lactobacilos dispersos sin interacción evidente con *Salmonella*, concluyendo que *L. paracasei* CIDCA 83123 no autoagrega ni coagrega con *Salmonella*. Por último, en la Figura 18 C se presentaron las curvas de descenso de DO correspondientes a *L. kefir* CIDCA 83102. Se observó que el descenso en la curva de DO en función del tiempo correspondiente al lactobacilo con *Salmonella* es menor al del lactobacilo solo. En las imágenes al microscopio óptico (Figura 19 C) se observaron “cúmulos” de diferentes tamaños de lactobacilos (coloración violeta) y *Salmonella* (coloración roja). Esto indicaría que al cabo de 20 horas, existe interacción entre ambos microorganismos. Los resultados obtenidos con *L. paracasei* CIDCA 83120, CIDCA 83121 y CIDCA 83124 se asemejan a los obtenidos para *L. paracasei* CIDCA 83123, no coagregantes con *Salmonella* (Tabla 6).

Tabla 6. Valores de DO (600 nm) obtenidos a partir de las cinéticas de coagregación de lactobacilos con *Salmonella entérica* serovar Enteritidis CIDCA 101 determinadas a 1 y 20 horas de incubación.

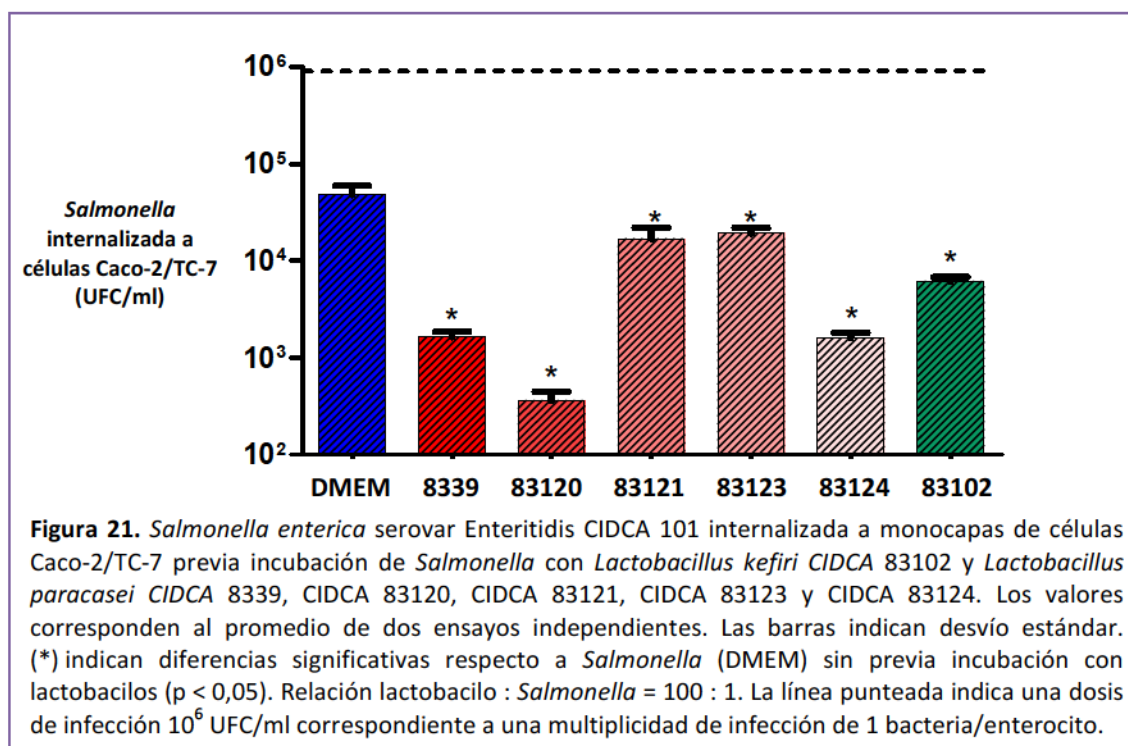
	Coagregación con <i>Salmonella</i>	
	1 hora	20 horas
<i>L. paracasei</i> CIDCA 8339	0,674 ± 0,023	0,374 ± 0,082
<i>L. paracasei</i> CIDCA 83120	0,708 ± 0,006	0,603 ± 0,066
<i>L. paracasei</i> CIDCA 83121	0,670 ± 0,014	0,477 ± 0,033
<i>L. paracasei</i> CIDCA 83123	0,686 ± 0,006	0,583 ± 0,059
<i>L. paracasei</i> CIDCA 83124	0,608 ± 0,002	0,523 ± 0,075
<i>L. kefir</i> CIDCA 83102	0,724 ± 0,037	0,275 ± 0,049

Preincubación de Salmonella Enteritidis con lactobacilos aislados de kefir. Efecto en la invasión a células Caco-2/TC-7.

Se estudió la capacidad de *Salmonella* de asociarse y/o invadir la monocapa de células Caco-2/TC-7 previa incubación de *Salmonella* Enteritidis con los lactobacilos seleccionados. Para ello, se siguió el protocolo experimental que se detalla en la Figura 20.



Los resultados se presentan en la Figura 21 donde se muestra el recuento de *Salmonella* internalizada en las células epiteliales (columna azul) y el recuento de *Salmonella* internalizada previa incubación de este patógeno con los lactobacilos estudiados.



La incubación previa de *Salmonella* con *L. kefir* CIDCA 83102 y *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 (Figura 21) tuvo como consecuencia una disminución significativa del número de *Salmonella* internalizada ($p < 0,05$) con respecto al control (*Salmonella* internalizada sin previa incubación con lactobacilos). Todos los lactobacilos presentaron diferencias significativas respecto al control.

Esto indicaría que la incubación del lactobacilo con el patógeno estaría induciendo algunos cambios en *Salmonella* que afectan su capacidad de invadir el epitelio, resultando en un menor número del patógeno internalizado. Esta disminución fue más acentuada (dos órdenes logarítmicos) cuando *Salmonella* fue incubada previamente con *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83120 y CIDCA 83124, mientras que cuando *Salmonella* fue incubada previamente con *L. kefir* CIDCA 83102 la disminución de *Salmonella* internalizada fue de sólo un orden. *L. paracasei* CIDCA 83121 y CIDCA 83123 fueron los lactobacilos que afectaron la internalización de *Salmonella* en menor medida, siendo la disminución sólo de medio orden logarítmico.

Estos resultados demuestran que la preincubación de los lactobacilos con *Salmonella* afecta la capacidad que tiene este patógeno de invadir la monocapa. La interacción lactobacilo-patógeno comienza antes de que ambos microorganismos tomen



contacto con el epitelio intestinal y como resultado de esta interacción, determinados sitios o estructuras necesarias del patógeno para la invasión podrían ser enmascarados o modificados por el diálogo que se establece con el lactobacilo. Otros investigadores demostraron que la coagregación con patógenos previene la colonización del epitelio por estos microorganismos (Reid *et al.* 1988; Boris *et al.* 1998; Šušković *et al.* 1997; Del Re *et al.* 2000). Golowczyc *et al.* (2007) usaron 8 cepas de *L. kefir*, de las cuales sólo 4 de ellas coagregaron con *Salmonella enterica* serovar Enteritidis CIDCA 101, siendo las mismas capaces de afectar significativamente la capacidad de *Salmonella* de invadir las células. Por otro lado, se ha descrito que *L. plantarum* CIDCA 8327 no coagrega con *Salmonella* Enteritidis (Golowczyc 2008), y sin embargo Londero *et al.* (2014) describieron que esta cepa ejerce un efecto antagónico sobre la invasión de *Salmonella* a células epiteliales, coincidiendo con los resultados obtenidos con *L. paracasei* CIDCA 83120 y CIDCA 83124, lactobacilos no coagregantes con *Salmonella*. De acuerdo a los resultados presentados con las cepas en estudio, todas las cepas de *L. paracasei* estudiadas y *L. kefir* CIDCA 83102 tuvieron la capacidad de disminuir significativamente la cantidad de *Salmonella* internalizada a células de epitelio intestinal *in vitro*, aunque en diferente medida, siendo las que ejercieron un mayor efecto protector *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83120 y CIDCA 83124 y *L. kefir* CIDCA 83102, no asociándose este efecto con la capacidad de coagregación.

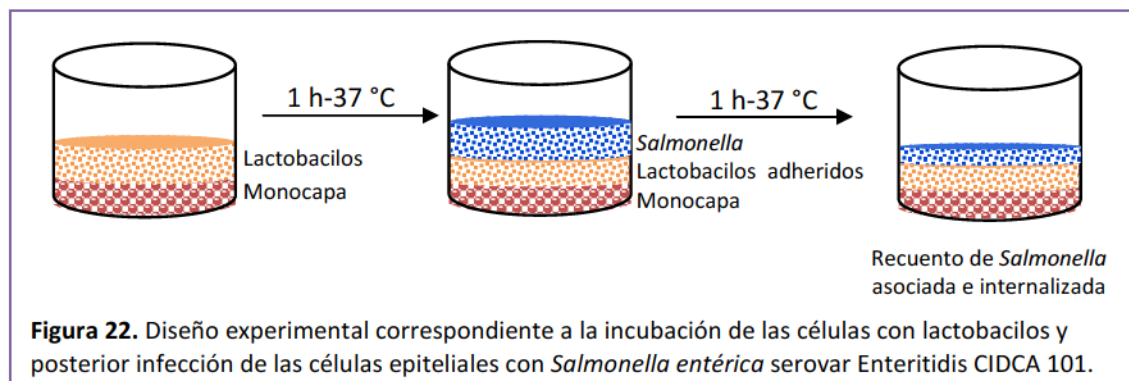
Efecto barrera de los lactobacilos sobre la asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis. Preincubación de la monocapa de enterocitos con lactobacilos.

Uno de los mecanismos a través del cual los probióticos pueden proteger al hospedador de la acción de patógenos intestinales es mediante el denominado “efecto barrera”. Este hace referencia al proceso mediante el cual los microorganismos benéficos asociados a la monocapa impiden el contacto del patógeno con las células epiteliales evitando así su asociación e invasión.

A fin de evaluar si los lactobacilos seleccionados son capaces de ejercer el efecto barrera en la asociación del patógeno, los mismos fueron resuspendidos en PBS e incubados con las células de epitelio intestinal durante 1 hora a 37 °C. Durante este

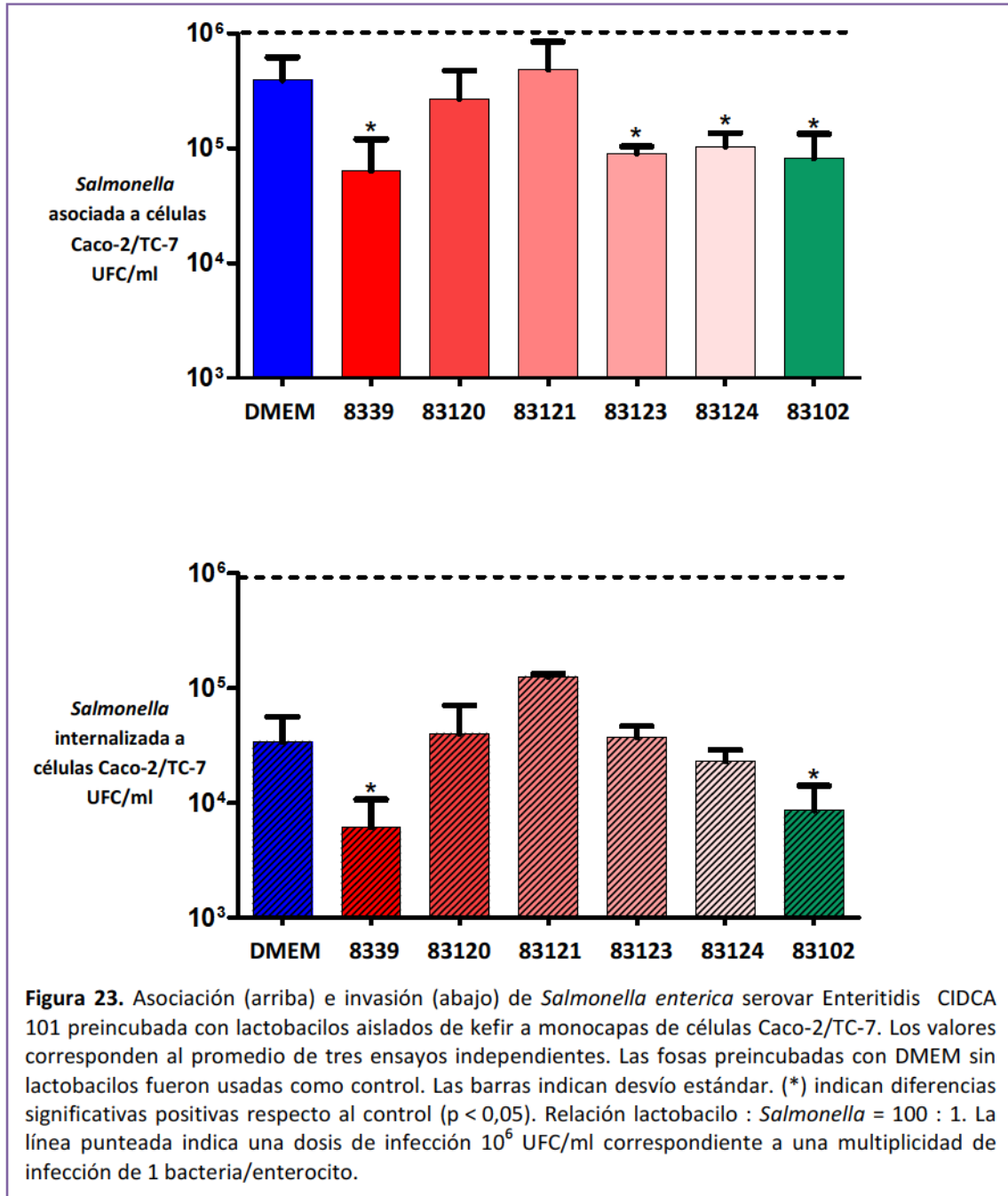


tiempo quedaron adheridos a la monocapa bacterias ácido lácticas en el orden de $3 \cdot 10^5$ a $5 \cdot 10^6$ UFC/ml (Figura 7). Luego se procedió a la infección con *Salmonella* Enteritidis CIDCA 101 a una concentración 10^6 UFC/ml y se evaluó la asociación e invasión del patógeno (Figura 22).



La acción protectora de microorganismos probióticos sobre la asociación de *Salmonella* Enteritidis a enterocitos en cultivo depende de la relación numérica entre el patógeno y los probióticos (Bernet *et al.* 1994, Coconnier *et al.* 1993). Londero *et al.* (2014) demostraron que era necesario que el número de probióticos supere en dos órdenes logarítmicos al de patógeno para ejercer un efecto protector, por ello, en este trabajo se eligió una relación entre lactobacilo y patógeno 100 : 1.

En la Figura 23 se presentan los resultados correspondientes a los ensayos de *Salmonella* asociada e internalizada a las células epiteliales en presencia de diferentes cepas de lactobacilos siguiendo el diseño experimental de la Figura 22.



La capacidad de las cepas de lactobacilos para inhibir la asociación de bacterias patógenas es una propiedad altamente específica, dependiendo tanto de la cepa probiótica como del patógeno (Lee *et al.* 2003). La incubación de la monocapa con las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83123, CIDCA 83124 y *L. kefir* CIDCA 83102 disminuyeron el número de *Salmonella* asociada a las células epiteliales en cultivo. Sin embargo, sólo las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339 y *L. kefir* CIDCA 83102 disminuyeron la capacidad de *Salmonella* de internalizar en la monocapa.



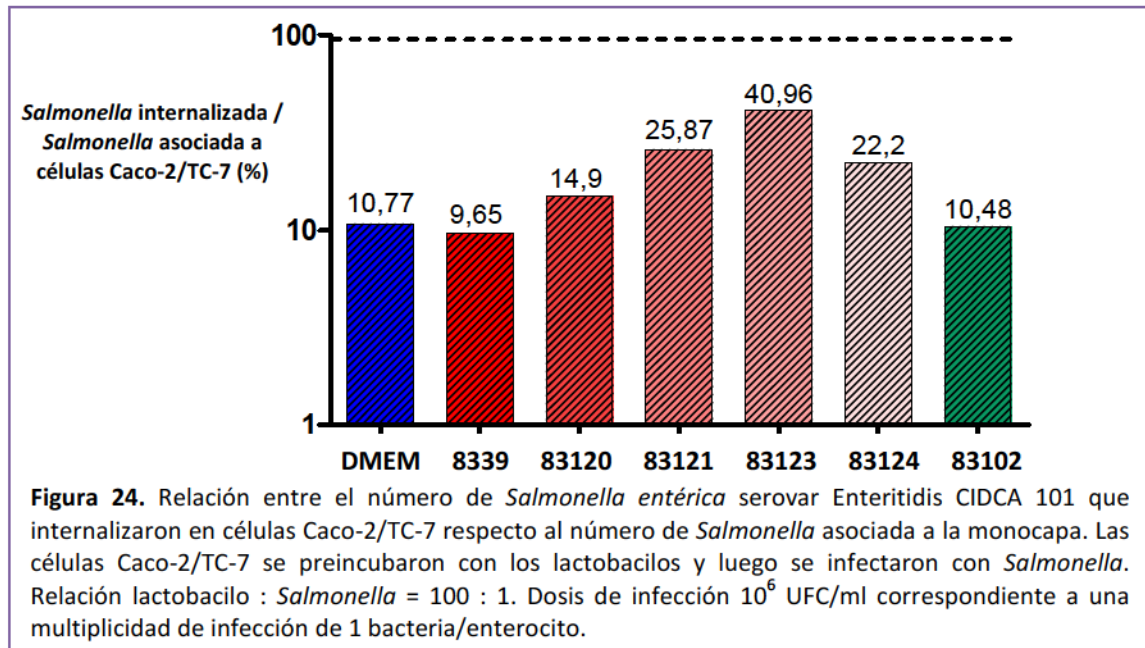
Trabajos previos demostraron que la inhibición de la asociación de patógenos a células Caco-2 está directamente relacionada con la capacidad de adhesión de los lactobacilos (Bernet-Camard *et al.* 1997; Fernandez *et al.* 2003; Lee *et al.* 2003; Santos *et al.* 2003). En este trabajo se encontró que si bien todos los lactobacilos seleccionados presentaron buena capacidad de adhesión a células Caco-2/TC-7, los lactobacilos que se adhirieron en menor medida como *L. paracasei* CIDCA 83123 y CIDCA 83124 afectaron solamente la capacidad de asociación de *Salmonella* a las células epiteliales, mientras que los lactobacilos que presentaron los valores de adhesión a células Caco-2/TC-7 más altos como *L. paracasei* CIDCA 8339 y *L. kefir* CIDCA 83102 disminuyeron no sólo la capacidad de *Salmonella* de asociarse al epitelio sino también su capacidad de internalizar en las células. Por otro lado, *L. paracasei* CIDCA 83120 y *L. paracasei* CIDCA 83121 no presentaron efecto alguno sobre la infección con *Salmonella*.

Teniendo en cuenta el número de lactobacilos adheridos (Figura 7) y el número de células en la monocapa, la misma no está homogéneamente cubierta por los lactobacilos apareciendo zonas descubiertas donde *Salmonella* podría asociarse e invadir (Golowczyc *et al.* 2008). Se ha descrito que, cuando los microorganismos adheridos a células epiteliales *in vitro* no forman una cubierta homogénea, no impiden la asociación del patógeno (Martins *et al.* 2010). De acuerdo a nuestros resultados este hecho no sería tan relevante ya que lactobacilos con capacidad de adherirse a epitelio muestran diferentes efectos protectores del daño inducido por *Salmonella*, indicando que este resultado no se debe solamente a un efecto barrera y que podrían existir otros cambios en la célula epitelial que mejoren la resistencia a la infección.

La interacción previa de los lactobacilos con la célula epitelial es esencial para ejercer un efecto protector. Das *et al.* (2013) observaron una reducción significativa en la asociación de *S. Enteritidis* a células HCT-116 (línea celular de carcinoma colorrectal humano) cuando se preincubaron las células con *L. plantarum* KSBT 56. La eficiencia de la invasión se redujo en un 80 % con la adición de *L. plantarum* KSBT 56 1 hora antes de la adición de *S. Enteritidis*. Sin embargo, algunos autores mostraron que hay un aumento en la adhesión de patógenos a células y mucus en presencia de probióticos (Rinkinen *et al.* 2003).



Al analizar el porcentaje de *Salmonella* que internalizó en las células respecto a las que se asociaron se pudo evidenciar que los ensayos realizados preincubando con *L. paracasei* CIDCA 8339 y *L. kefir* CIDCA 83102 presentaron la misma relación que *Salmonella* control (10,77 %) (Figura 24), indicando que la disminución en la capacidad de invasión de *Salmonella* observada en la Figura 23 se debe principalmente a la disminución en la capacidad de asociación a epitelio.



Efecto de los lactobacilos en la desorganización del citoesqueleto causado por Salmonella Enteritidis.

Habiendo demostrado que las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339 y *L. kefir* CIDCA 83102 fueron capaces de disminuir la invasión de *Salmonella* a los enterocitos se estudió la morfología de la red de F-actina de las células Caco-2/TC-7 luego de la preincubación de las células con los lactobacilos e infectadas con *Salmonella* (Figura 25).

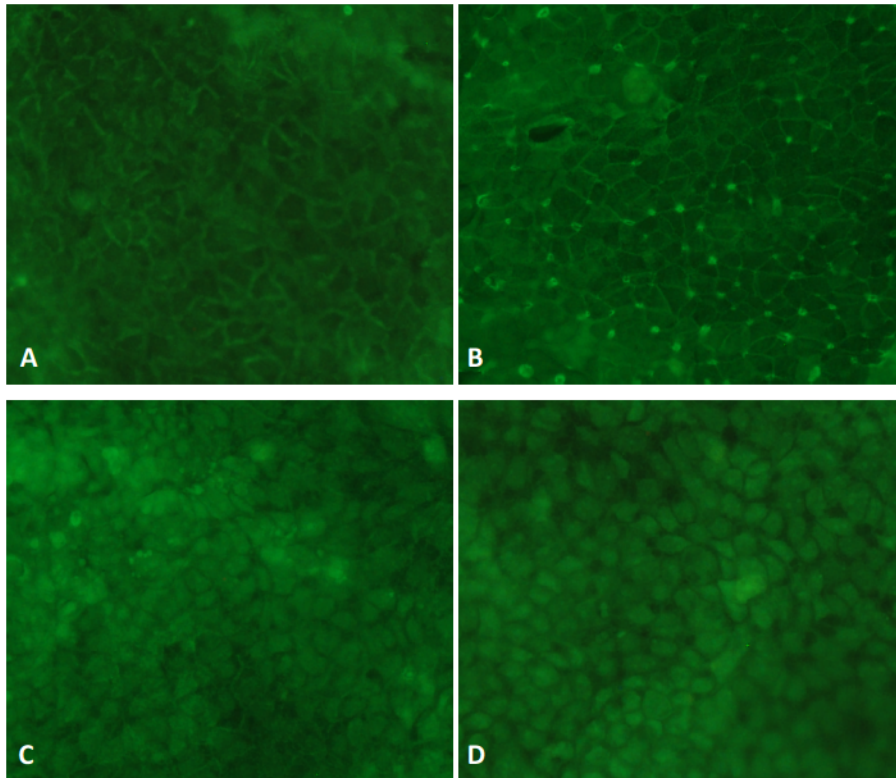


Figura 25. Marcación de citoesqueleto con faloidina FITC de células Caco-2/TC-7 sin tratamiento (A), infectadas con *Salmonella entérica* serovar Enteritidis CIDCA 101 (B), incubadas con *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 (C) y con *Lactobacillus kefir* CIDCA 83102 (D) antes de la infección. Se empleó una dosis de infección 10^6 UFC/ml correspondiente a una multiplicidad de infección de 1 bacteria/enterocito. Aumento: 300X.

Como se muestra en la Figura 25 B la infección de la monocapa con *Salmonella* causó una desorganización de la red de actina que se evidenció mediante acumulación de esta proteína en las uniones entre las células sin llegar a redondearlas ni causar su desprendimiento. La observación microscópica de la morfología y del citoesqueleto de los enterocitos demostró que la preincubación de las monocapas con *L. paracasei* CIDCA 8339 (Figura 25 C) y *L. kefir* CIDCA 83102 (Figura 25 D) fue capaz de antagonizar el efecto del patógeno en las células eucariotas, preservando la monocapa y mostrando un aspecto similar al control sin tratamiento (Figura 25 A).



Efecto de los sobrenadantes libres de células de lactobacilos aislados de kefir sobre *Salmonella* Enteritidis.

Acción bactericida de los sobrenadantes libres de células de lactobacilos aislados de kefir sobre Salmonella. Curvas de muerte.

En una primera etapa se evaluó el efecto sobre la viabilidad de *Salmonella* de los sobrenadantes libres de células de los lactobacilos crecidos en caldo MRS. En la Tabla 7 se muestra el pH y la concentración de ácido láctico presente en los sobrenadantes de cultivo de cada lactobacilo. Sólo se consideró el ácido láctico debido a que los valores de ácido acético encontrados en los sobrenadantes de cultivo no fueron significativamente diferentes al encontrado en el medio MRS fresco. El pH de los sobrenadantes de *L. kefir* CIDCA 83102 fue cercano a 4,28 mientras que el pH de los sobrenadantes de *L. paracasei* variaron entre 3,70 y 4,09. Los valores bajos de pH se correlacionan con un mayor contenido de ácido láctico (Tabla 7). En la misma tabla se presentan los valores de ácido láctico no disociado.

Tabla 7. pH, concentración de ácido láctico total y ácido láctico no disociado de los sobrenadantes de cultivo en MRS de lactobacilos aislados de kefir.

Lactobacilo	pH sobrenadante (SN)	Concentración de ácido láctico total (mM)*	Concentración de ácido láctico no disociado (mM)
<i>L. paracasei</i> CIDCA 8339 ■	3,70	291,32 ± 6,78	175,02
<i>L. paracasei</i> CIDCA 83120 ■	4,09	282,98 ± 4,21	105,98
<i>L. paracasei</i> CIDCA 83121 ▲	3,76	281,19 ± 10,30	160,77
<i>L. paracasei</i> CIDCA 83123 ◆	3,85	282,93 ± 1,86	143,76
<i>L. paracasei</i> CIDCA 83124 ●	3,70	287,28 ± 2,45	168,78
<i>L. kefir</i> CIDCA 83102 ●	4,28	144,42 ± 8,73	39,78

*analizado por HPLC

La Figura 26 A muestra las curvas de muerte de *Salmonella* en los sobrenadantes de *L. paracasei* CIDCA 83120 (■) y *L. kefir* CIDCA 83102 (●) cuyos pH son 4,09 y 4,28 respectivamente. Estas curvas están representadas junto al control de *Salmonella* (▲) en caldo MRS acidificado artificialmente con ácido láctico (pH 4,25). Se observó que al cabo de una hora, el número de *Salmonella* viable es menor en los sobrenadantes de



ambos lactobacilos respecto al medio acidificado artificialmente con un pH similar al de los sobrenadantes de los lactobacilos antes mencionado. Este efecto fue más marcado cuando *Salmonella* se incubó en el sobrenadante de *L. kefir* CIDCA 83102, indicando que en este sobrenadante podrían existir otros factores que conllevan a una pérdida de la viabilidad de hasta 3 órdenes logarítmicos con respecto al valor inicial correspondiente al tiempo cero.

En la Figura 26 B se muestran las curvas de muerte de *Salmonella* en los sobrenadantes de cultivo de *L. paracasei* CIDCA 8339 (pH 3,70-■), CIDCA 83121 (pH 3,76-▲), CIDCA 83123 (pH 3,85-◆) y CIDCA 83124 (pH 3,70-●). Estas curvas, al igual que en la figura anterior, fueron representadas junto a una curva control de *Salmonella* (●) en caldo MRS artificialmente acidificado con ácido láctico (pH 3,75). En este caso, se observó un mayor poder bactericida de los sobrenadantes de los lactobacilos mencionados anteriormente sobre *Salmonella*, alcanzando a la hora de incubación una caída del número de microorganismos viables de 6 órdenes logarítmicos, dos órdenes mayor que el obtenido en el control de MRS acidificado artificialmente.

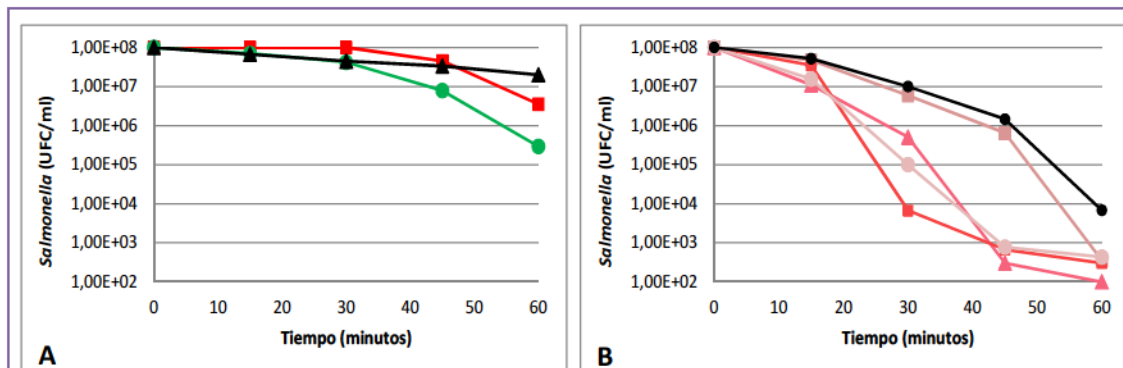


Figura 26. Acción bactericida de los sobrenadantes de cultivo de lactobacilos heterofermentativos aislados de kefir sobre *Salmonella entérica* serovar Enteritidis CIDCA 101.

Figura A: (▲) Control MRS pH 4,25, sobrenadante *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83120 pH 4,09 (■), sobrenadante *Lactobacillus kefir* CIDCA 83102 pH 4,28 (●).

Figura B: (●) Control MRS pH 3,75, sobrenadante *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 pH 3,70 (■), sobrenadante *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83121 pH 3,76 (▲), sobrenadante *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 pH 3,85 (◆), sobrenadante *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83124 pH 3,70 (●).

Los sobrenadantes de los cultivos de *L. paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83121 y CIDCA 83124, que presentaron los valores más bajos de pH, mostraron un mayor efecto bactericida sobre *Salmonella* en 1 hora (●▲■◆), respecto al resto de los



sobrenadantes de lactobacilos (●■). De todas formas, ambos grupos de lactobacilos presentaron un efecto inhibitorio más pronunciado que el correspondiente a los controles con MRS acidificados artificialmente. El sobrenadante de *L. paracasei* CIDCA 83120 es el que provoca menos efecto inhibitorio sobre *Salmonella*, debido tal vez, a que es uno de los sobrenadantes que posee pH más alto y en consecuencia menor cantidad de ácido láctico no disociado. El resto de los sobrenadantes tuvieron un mayor efecto bactericida. Al llevar el pH de estos sobrenadantes hasta 4,5, se observó una disminución del efecto inhibitorio como consecuencia de una disminución del ácido láctico no disociado.

Trabajos previos encontraron que *Salmonella* se muestra más resistente a la acción del ácido en fase estacionaria que en fase exponencial (Rychlick & Barrow, 2005). Por lo tanto, es importante destacar el marcado efecto bactericida de los sobrenadantes de lactobacilos aislados de kefir sobre este patógeno, aún en fase de crecimiento estacionaria.

Varios trabajos describen el efecto inhibitorio de sobrenadantes de cultivo de distintas bacterias lácticas. En ese sentido el sobrenadante libre de células de *L. casei* subsp. *rhamnosus* Lcr35 inhibe el desarrollo de nueve patógenos humanos (Forestier *et al.* 2001). Fayol-Messaoudi *et al.* (2005) demostraron que sobrenadantes de *L. johnsonii* La1, *L. rhamnosus* GG, *L. casei* Shirota YIT9029, *L. casei* DN-114 001 disminuyen la viabilidad de *S. Typhimurium* 4-6 órdenes de magnitud al cabo de 4 horas. De la misma manera, Ogawa *et al.* (2001) demostraron que los sobrenadantes de dos especies de lactobacilos inhibían el desarrollo de *E. coli* O157:H7 (STEC) dependiendo de la concentración de ácido láctico no disociado. Bernet *et al.* (1997), observaron una disminución de dos órdenes aproximadamente en la viabilidad de *S. Tiphimurium* cuando fue incubado el patógeno con sobrenadante de *L. acidophilus* LA1-SCS.

Lin *et al.* (2008), estudiaron el efecto antagonista de sobrenadante de *L. acidophilus* (LAP5-SCS) contra dos cepas de *S. Choleraesuis* encontrando que el efecto bactericida se revertía parcialmente cuando los sobrenadantes fueron sometidos previamente al calor, y completamente cuando los sobrenadantes fueron neutralizados.

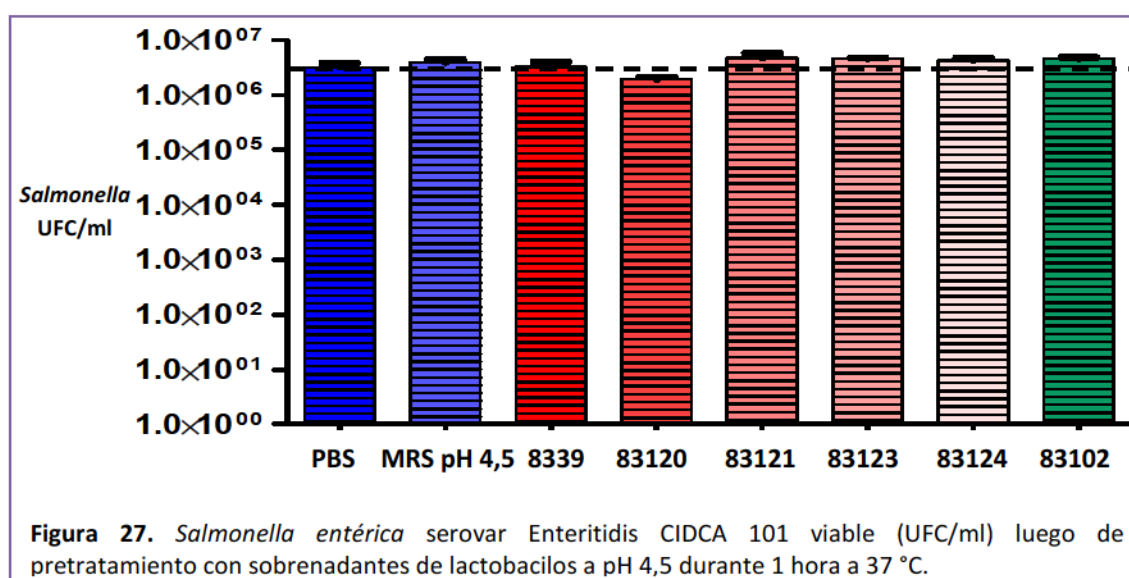
Los sobrenadantes de las cepas de *Lactobacillus*, contienen varios compuestos antimicrobianos (Gopal *et al.* 2001, Banerjee *et al.* 2009; Servin 2004), que pueden



afectar la viabilidad de diversos enteropatógenos (Servin & Coconnier, 2003). El ácido láctico es el producto principal del metabolismo de azúcares por bacterias lácticas y se sabe que ejerce una acción inhibitoria contra *Salmonella* por la alta concentración producida (Fayol-Messaoudi *et al.* 2005; Rishi *et al.* 2009; Botes *et al.* 2008) o bien porque actúa permeabilizando la membrana externa de las bacterias Gram (-) permitiendo el ingreso de sustancias antimicrobianas (Alakomi *et al.* 2000). Nuestros estudios han demostrado que los sobrenadantes de cultivo de lactobacilos aislados de kefir ejercen un efecto antagónico frente a *Salmonella*. Se podría asociar esta pérdida de viabilidad tanto a ácidos orgánicos como a otras sustancias aún no determinadas en los sobrenadantes diferentes al ácido láctico.

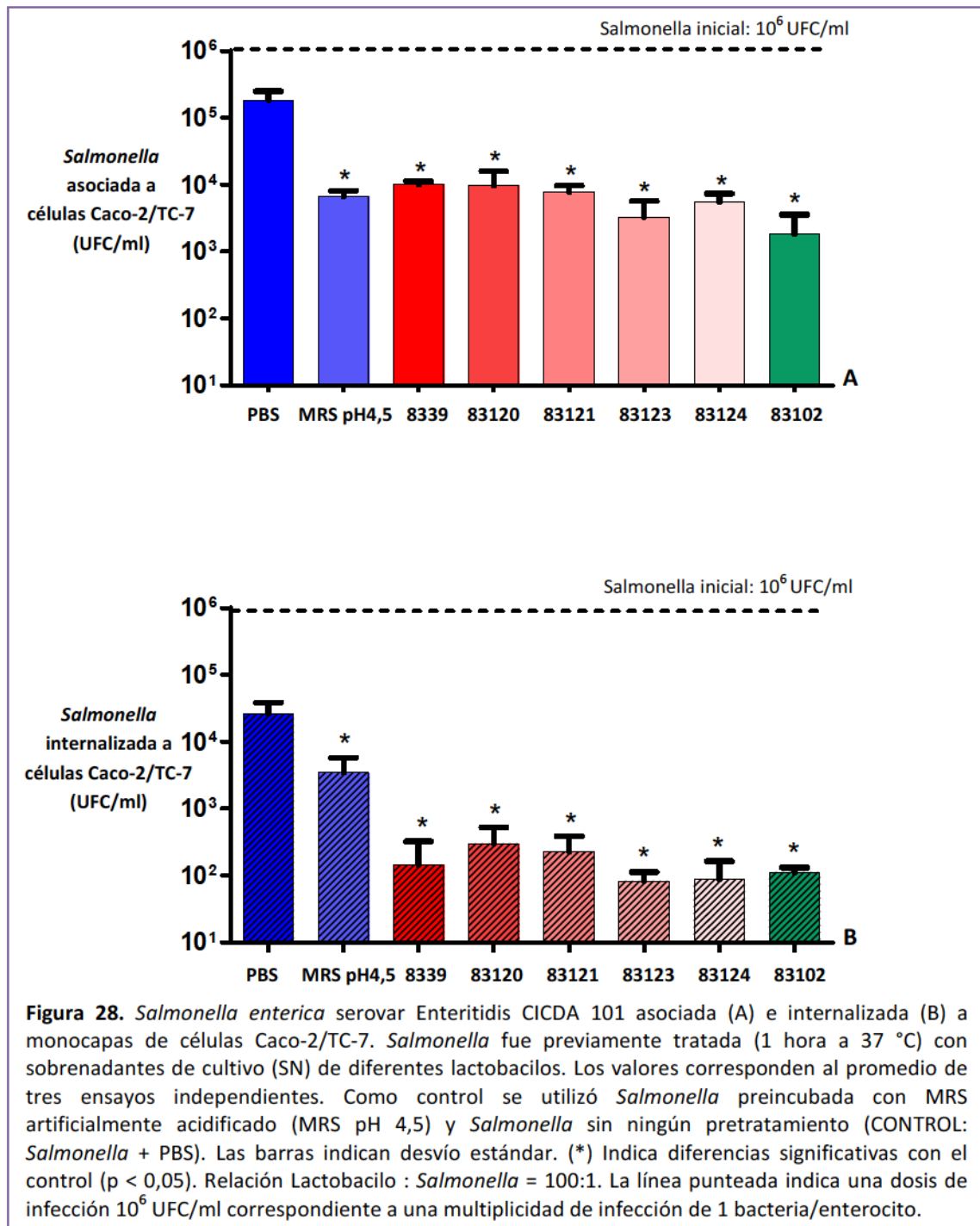
Efecto de los sobrenadantes libres de células de lactobacilos aislados de kefir sobre la asociación e invasión de Salmonella a células Caco-2/TC-7.

A fin de evaluar el efecto de los sobrenadantes de lactobacilos en la asociación e internalización de *Salmonella* Enteritidis a células epiteliales, este patógeno se resuspendió en los sobrenadantes libres de células de los distintos lactobacilos llevados a pH 4,5 y se determinó su viabilidad después de 1 hora de incubación a 37 °C (Figura 27).



La viabilidad de *Salmonella* Enteritidis no fue afectada por los componentes presentes en los sobrenadantes de los distintos lactobacilos estudiados en las condiciones de este ensayo, siendo igual a la viabilidad de *Salmonella* en PBS.

Posteriormente, se realizaron los ensayos de asociación e internalización de *S. Enteritidis* a células Caco-2/TC-7 después del tratamiento durante una hora con los distintos sobrenadantes (Figura 28).



Los ensayos de asociación e internalización de *Salmonella* después de la incubación con los sobrenadantes de diferentes lactobacilos a pH 4,5 (1 hora a 37 °C) demostraron que su capacidad de asociarse a epitelio disminuyó significativamente



($p < 0,05$). Asimismo, se observó una fuerte inhibición de la capacidad de *Salmonella* de internalizarse en la célula epitelial, siendo este efecto menos pronunciado cuando *Salmonella* se preincubó con MRS artificialmente acidificado al mismo pH de los sobrenadantes estudiados. Debido a que *Salmonella* depende de sus estructuras superficiales para adherirse e invadir las células intestinales, algún componente del sobrenadante de cultivo podría causar modificaciones en estas estructuras impidiendo la interacción con las células y el posterior daño celular. De manera similar a lo hallado en el presente estudio, Hudault *et al.* (1997) demostraron que al tratar *Salmonella* Typhimurium durante 1 hora con el sobrenadante de un cultivo de *L. casei* GG, la invasión del patógeno a células Caco-2 se reduce. Sin embargo a diferencia de nuestros resultados, no encontraron efecto en la capacidad de asociación. Hay que tener en cuenta que el efecto de cada sobrenadante en la capacidad de invasión de *Salmonella* a células Caco-2 también depende de la cepa de *Salmonella* estudiada (Lin *et al.* 2008).

Al determinar el porcentaje de *Salmonella* internalizada (Figura 28 B) respecto a *Salmonella* asociada (Figura 28 A) se pudo observar que el tratamiento con todos los sobrenadantes dio un valor entre 0,76 % y 4,13 %, mientras que el valor obtenido con el control de MRS fue de 7,90 %. La diferencia entre el control y los sobrenadantes fue significativamente diferente, indicando que los sobrenadantes afectarían tanto la asociación como la capacidad de internalización de *Salmonella* a células epiteliales.

Como el MRS acidificado a pH 4,5, disminuye la asociación e internalización de *Salmonella*, se puede concluir que el ácido láctico en el sobrenadante es en parte responsable de la inhibición. Trabajos previos demuestran que los sobrenadantes de cultivo de lactobacilos previenen la adhesión de enteropatógenos a mucus intestinal, epitelio intestinal, e inhiben el desarrollo de patógenos (Ouwehand & Conway, 1996) y lo relacionan a la presencia de ácidos orgánicos. Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) pueden interferir en la expresión de genes asociados a la invasión de *Salmonella*, reprimiendo o induciendo el proceso de acuerdo al tipo de ácido y a la concentración en que se produzca (Altier 2005). Lawhon *et al.* (2002) demostraron que una mezcla de AGCC que simula las condiciones del íleon distal induce la expresión de genes SPI-1, implicados en la invasión, mientras que los mismos ácidos en las proporciones que se encuentran en el colon pueden reprimir los mismos genes. Si bien el efecto sobre la



invasión de *Salmonella* de ácidos orgánicos que se encuentran en el tracto gastrointestinal, tales como el acético, el butírico y el propiónico, ha sido bien caracterizado (Durant *et al.* 1999, 2000; Lawhon *et al.* 2002; Van Immerseel 2003, 2004, 2006) poco se conoce sobre el efecto del ácido láctico. Hudault *et al.* (1997) observaron que el efecto protector de la invasión de *S. Typhimurium* a células Caco-2 por el tratamiento con sobrenadante de un cultivo de *L. casei* GG se perdía al neutralizar el sobrenadante. En consecuencia, atribuyeron el efecto a algún metabolito producido por el lactobacilo activo a bajo pH sugiriendo que podría deberse a la presencia de ácido láctico en concentración subletal. Makras *et al.* (2006) probaron que sobrenadantes de cultivo de 4 cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* sp. y medio de cultivo adicionado con la misma concentración de ácido láctico presente en los sobrenadantes ejercían idéntico efecto reductor de la invasión de *S. Typhimurium* a células Caco-2/TC-7, indicando que el ácido láctico es responsable de la inhibición. Sin embargo, estos mismos autores observaron que la reducción de la invasión mediada por sobrenadantes de *L. johnsonii* La1 y *L. plantarum* no podía explicarse sólo por la presencia de este ácido, sugiriendo que habría implicada otra sustancia inhibitoria de naturaleza desconocida.

Los resultados presentados en la Figura 28 indican que los componentes presentes en los sobrenadantes estudiados afectarían a *Salmonella* inhibiendo su internalización a la célula. Los sobrenadantes de los lactobacilos podrían tener diferentes moléculas que no afectarían la viabilidad del patógeno pero que disminuirían marcadamente su capacidad de invasión a células intestinales. Golowcycz *et al.* (2007) describieron que el efecto protector de sobrenadantes de 5 cepas de *L. kefir* sobre la asociación e invasión de *S. Enteritidis* no podía explicarse sólo por la presencia de ácido láctico. Estos autores hallaron que la proteína de capa-S a la concentración en que se encuentra en sobrenadantes de cultivo de *L. kefir* es capaz de asociarse a la superficie de *Salmonella* e interferir con su capacidad de invasión como también Blomberg *et al.* (1993) encontraron que el sobrenadante de *L. fermentum* 104R contiene una proteína que inhibe la interacción de *E. coli* K88 a mucus porcino. Silva *et al.* (1987) observaron que *L. sp.* GG, aislada de las heces de humanos, produce una sustancia activa a pH entre 3 y 5, la cual tiene capacidad inhibitoria contra varias especies bacterianas incluyendo bacterias Gram (+) y Gram (-). Asimismo, Rammelsberg & Radler (1990) demostraron



que la bacteriocina de *Lactobacillus brevis* o *L. casei* pierde su actividad a valores de pH neutro. Por otro lado, Bernet *et al.* (1997), vieron una disminución en la capacidad de adhesión e invasión a células Caco-2 de *S. Tiphimurium* al concentrar sobrenadante de *L. acidophilus* ya que el mismo secreta una sustancia antimicrobiana (LA1-SCS).

Estos resultados indican la existencia de un mecanismo alternativo, además de la exclusión competitiva del patógeno para reducir la internalización de *S. Enteritidis* en las células epiteliales del colon. Los sobrenadantes afectaron tanto la capacidad de asociación de *S. Enteritidis* como la capacidad de internalizarse en las células. Se podría postular que los sobrenadantes de los lactobacilos estudiados secretan componentes que pueden regular los genes relacionados con la virulencia de *S. Enteritidis*. Esto indicaría que los mecanismos de acción de los sobrenadantes son diferentes al efecto debido a la presencia del microorganismo ya que se ve afectada la asociación como la internalización a las células. Sin embargo, más estudios son necesarios a fin de determinar en qué medida este efecto se debe a la presencia de ácidos orgánicos u otros metabolitos como la capa-S de *L. kefir* CIDCA 83102, o debido al exopolisacárido producido por las 5 cepas de *L. paracasei*.



CONCLUSIONES PARCIALES

CAPACIDAD DE ADHESIÓN A EPITELIO Y PASAJE POR EL TRACTO GASTROINTESTINAL

- El modelo experimental de células epiteliales Caco-2/TC-7 permitió estudiar la capacidad de adhesión de los 13 lactobacilos estudiados. Asimismo, fue un modelo adecuado para evaluar la asociación e internalización de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis CIDCA 101 a células epiteliales.
- En base a su resistencia a la bilis y adhesión a epitelio se seleccionaron las cepas *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 y *Lactobacillus kefir* CIDCA 83102 para profundizar los ensayos para determinar su potencialidad probiótica.
- Los lactobacilos seleccionados fueron capaces de adherir a células de epitelio intestinal y a mucina *in vitro*. Los lactobacilos presentaron valores de adhesión entre 10^5 y 10^6 UFC/ml en ambos modelos evaluados.
- Los 6 lactobacilos evaluados presentaron una baja hidrofobicidad superficial. No se observó relación entre la adhesión de lactobacilos a células de epitelio intestinal *in vitro* y su hidrofobicidad superficial.
- Todos los lactobacilos disminuyeron su viabilidad al ser sometidos al estrés ácido conferido por el jugo gástrico. El tratamiento posterior con sales biliares no modificó el número de células viables en 4 de los lactobacilos estudiados.
- *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83121 y CIDCA 83124 fueron los más afectados por el tratamiento secuencial con ácido y sales biliares, disminuyendo el número de microorganismos viables 4 unidades logarítmicas. Los lactobacilos que mejor se adaptaron a estas condiciones fueron *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339, CIDCA



83120 y CIDCA 83123 y *Lactobacillus kefir* CIDCA 83102 presentando una caída del número de microorganismos viables inferior a 3 órdenes logarítmicos.

- Las propiedades de adhesión a células epiteliales y mucina aumentaron luego del tratamiento que simula las condiciones gastrointestinales (estrés ácido y sales biliares), respecto a los lactobacilos no tratados. Este efecto dependió de la cepa de lactobacilo estudiado.
- El perfil de proteínas de célula entera de *L. paracasei* CIDCA 83123 después del estrés ácido y de bilis analizado por electroforesis bidimensional resultó diferente al del control sin tratamiento. Después del pasaje por el tracto gastrointestinal se regularon positivamente 6 péptidos/proteínas, mientras que 5 disminuyeron su intensidad respecto a los lactobacilos control.
- La mayoría de las proteínas que fueron reguladas positivamente corresponden a enzimas de la vía glicolítica, siendo un efecto general del estrés activar la fuente de energía.
- El pasaje por el tracto gastrointestinal *in vitro* aumentó la expresión de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Dicha enzima podría estar involucrada en el aumento de la adhesión de *L. paracasei* 83123 a mucus o células epiteliales después del tratamiento.

ACTIVIDAD ANTAGÓNICA CON *SALMONELLA* ENTERITIDIS

- Solamente *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 y *Lactobacillus kefir* CIDCA 83102 fueron capaces de autoagregar y son los que interaccionan con *Salmonella entérica* serovar Enteritidis CIDCA 101. Es probable que el mismo factor que produce la autoagregación de las bacterias sea el responsable de la coagregación con el microorganismo patógeno.
- *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83120, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 y *Lactobacillus kefir* CIDCA 83102 al ser preincubados con *Salmonella entérica*



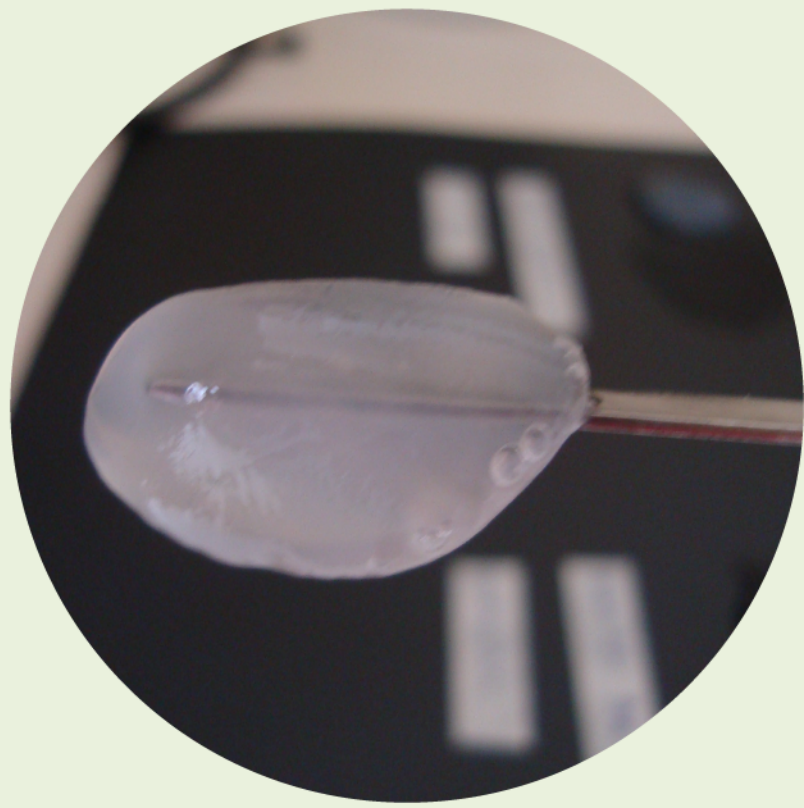
serovar Enteritidis CIDCA 101 redujeron la capacidad del patógeno de internalizarse en las células epiteliales Caco-2/TC-7 respecto al control.

- La preincubación de todos los lactobacilos estudiados con células epiteliales Caco-2/TC-7 redujo el daño producido por *Salmonella entérica* serovar Enteritidis CIDCA 101 sobre las células epiteliales, evidenciado por una reducción de la capacidad de internalización y mantenimiento de la integridad del citoesqueleto. Este efecto se debe principalmente a una disminución de la capacidad de asociación de *Salmonella* al epitelio.
- Los sobrenadantes de cultivo de todos los lactobacilos mostraron un marcado efecto bactericida. Este efecto bactericida fue revertido cuando todos los sobrenadantes son llevados a pH 4,5.
- Los sobrenadantes de todos los lactobacilos al ser preincubados con *Salmonella entérica* serovar Enteritidis CIDCA 101 inhibieron su asociación e internalización a células epiteliales Caco-2/TC-7. La relación entre *Salmonella* internalizada con respecto a *Salmonella* asociada a la célula epitelial fue inferior a los controles, indicando que los sobrenadantes de los lactobacilos afectarían la capacidad de *Salmonella* de asociarse a epitelio así como también la expresión del factor de virulencia disminuyendo la capacidad invasiva.
- En función de esos resultados se seleccionaron *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 y *Lactobacillus kefiri* CIDCA 83102 para evaluar su posible inclusión en geles a base de polisacáridos bacterianos.



CAPÍTULO 2

GELES DE KEFIRAN COMO VEHÍCULO DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS





INTRODUCCIÓN

Geles en los alimentos

Los geles juegan un rol esencial en la textura de los alimentos. Pueden ser empleados para mejorar la calidad, aceptabilidad y seguridad de los alimentos a los cuales se incorporan (Dolz *et al.* 2006; Laurienzo *et al.* 2006; Huang *et al.* 2007). Un gel es un sistema cuya matriz está formada por macromoléculas que se encuentran interconectadas formando una red tridimensional. Estas macromoléculas retienen e inmovilizan una gran cantidad de solvente. Por lo tanto, se trata de un sistema sustancialmente diluido, pero incapaz de fluir (Ferry 1980; Clark 1992). Los geles poseen algunas propiedades que son características del estado sólido pese a ser un sistema en el cual se encuentra presente una gran cantidad de solvente. La red continua de macromoléculas que constituyen el “armazón” que se extiende en el espacio otorga la resistencia que exhiben los geles cuando son sometidos a un esfuerzo y les confiere el carácter elástico. Desde el punto de vista reológico, los geles son materiales viscoelásticos que poseen tanto características de líquidos como de sólidos. Desde un enfoque termodinámico, se encuentran en estado metaestable, y pueden modificarse con el tiempo, ya sea espontáneamente o como consecuencia de la aplicación de fuerzas externas. El carácter dinámico de las uniones que los constituyen puede llevar a cambios graduales en la estructura, que a su vez originan modificaciones en las características reológicas de los geles (Mellema *et al.* 2002).

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 sustancias capaces de formar redes estructurales en los alimentos son principalmente polisacáridos y proteínas (Chen *et al.* 2006; Cheftel & Lorient, 1982;



Dumay 1988). En muchos casos, las propiedades de los alimentos dependen de dicha gelificación, ya que contribuye a la textura de los productos alimenticios finales.

Geles alimentarios de naturaleza glucídica.

Entre los polisacáridos, el almidón probablemente sea el más utilizado para la obtención de geles debido a su alta disponibilidad y bajo costo. Otros polisacáridos neutros empleados son los galactomananos tales como la goma guar (provenientes de leguminosas), la goma garrofín (proveniente del algarrobo), y los β -glucanos obtenidos a partir de semillas de cereales. Los polisacáridos cargados que se emplean comúnmente en la formación de geles en alimentos son los xantanos, producidos por *Xantomona campestris*, los gelanos provenientes de cultivos de *Pseudomonas elodea*, los alginatos y carragenanos, producidos por algas, y las pectinas, polisacáridos estructurales de origen vegetal (Morris 1986; Doublier *et al.* 2000).

Las bacterias lácticas son generalmente reconocidas como seguras y representan una fuente de polisacáridos natural que se puede utilizar en diversos productos, ya sea incluyendo el microorganismo productor en el fermento o utilizando los exopolisacáridos (EPS) que producen como aditivo (Jolly *et al.* 2002; Ruas-Madiedo *et al.* 2005; Piermaría *et al.* 2008), ofreciendo una amplia alternativa de polisacáridos microbianos para el uso en formulaciones alimentarias (Laws & Marshall, 2001b). Los exopolisacáridos provenientes de bacterias lácticas difieren en composición de azúcares, tipo de unión glicosídica, presencia de cadenas laterales y/o la presencia de grupos sustituyentes (Laws & Marshall 2001a). El peso molecular varía desde $1 \cdot 10^4$ - $2 \cdot 10^5$ Da hasta valores que superan los 10^6 Da (De Vuyst & F. Vaningelgem 2004). Además, pueden variar en carga, configuración espacial, rigidez y habilidad para interactuar con proteínas (Duboc & Mollet, 2001).

Estos polisacáridos cobran importancia, pues no sólo contribuyen a la textura de los alimentos mediante la reducción de sinéresis como en *yogurth* o la mejora en la consistencia como por ejemplo en quesos maduros con bajo contenido de grasa, sino que además confieren efectos benéficos para la salud (Mazeau & Rinaudo, 2004). Entre los efectos benéficos atribuidos, se puede mencionar la capacidad de reducir el



colesterol, la capacidad inmunomoduladora, la protección al epitelio intestinal de la acción de microorganismos patógenos o la capacidad de modulación de la microbiota fecal (Nicolic *et al.* 2012; Ruas-Madiedo *et al.* 2008; Salazar *et al.* 2012). Por lo tanto, la utilización de polisacáridos provenientes de bacterias lácticas posibilitaría el desarrollo de alimentos prebióticos o simbióticos, con características funcionales deseables tanto desde el punto de vista tecnológico como desde la óptica del efecto benéfico para la salud que ellos son capaces de ejercer (Ruas-Madiedo *et al.* 2002a, 2002b).

A pesar de estas propiedades interesantes, el uso de EPS a partir de bacterias lácticas en la industria como aditivos alimentarios es aún limitada debido a los bajos niveles de producción en comparación a la goma xántica producida por microorganismos Gram (-). Una alternativa interesante es el uso de kefirán, el polisacárido producido por las bacterias lácticas de los gránulos de kefir. El kefirán, puede ser aislado con buenos rendimientos y elevado grado de pureza a partir del propio gránulo utilizando metodologías compatibles con la industria alimentaria. El uso de este polisacárido como aditivo alimentario podría presentar una ventaja ya que posee efectos benéficos para la salud, frente al uso de otros polímeros que no poseen dichos beneficios.

Pintado *et al.* (1996) demostraron que el kefirán forma geles en solución acuosa conteniendo etanol. La fuerza de los geles preparados con 3 % de kefirán en 8 % de etanol son equivalentes a las obtenidas en los geles formados con 3 % de gelatina (Mukai *et al.* 1990).

Cuando soluciones de kefirán 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 el módulo 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 kefirán a 37 °C determina su habilidad para fundirse a la temperatura de la boca; esta propiedad resulta relevante para su aplicación en alimentos (Piermaría *et al.* 2008).



Geles de proteínas.

La gelificación de proteínas globulares inducida por tratamiento térmico fue ampliamente estudiada (Clark *et al.* 2001). Entre los sistemas proteicos más estudiados en lo referente a la capacidad de gelificación se pueden mencionar las proteínas de suero y las proteínas vegetales (soja, amaranto) (Puppo *et al.* 1995).

Las principales proteínas de suero de leche son la β -lactoglobulina (β -Lg) y la α -lactoalbúmina (α -La), que presentan una estructura tridimensional compacta, mantenida por muchos enlaces no covalentes débiles y algunos enlaces disulfuro (Steventon *et al.* 1991). La β -Lg existe como un dímero de 36,7 kDa en soluciones por encima de su pI de 5,2, pero por debajo de pH 3,5 y por encima de pH 7,5, el dímero se disocia a un monómero expandido, y entre pH 3,5 y 5,2 el dímero polimeriza a un 147 kDa (Morr & Ha, 1993; Fox & McSweeney, 2003). El mecanismo molecular de desnaturalización térmica de β -Lg a pH neutro incluye la disociación del dímero y la pérdida de la estabilidad de la hélice a unos 77 °C (Holt 2000). La reactividad de los grupos tiol disminuye significativamente bajo condiciones ácidas y, por lo tanto, principalmente las interacciones no covalentes están involucrados en la estructura de los geles ácidos, mientras que a pH neutro las reacciones de intercambio intermolecular como puentes disulfuro-sulfidrilo libre son favorecidas (Shimada & Cheftel, 1988). Además, cuando el pH se aproxima al pI, la carga de las proteínas se neutraliza progresivamente, favoreciendo la agregación de proteínas. Así, la estructura de geles depende del pH en el que se preparan (Lupano *et al.* 1992, 1996).

La segunda proteína del suero de la leche es la α -lactoalbúmina (α -La), una proteína globular más pequeña, con 4 puentes disulfuro, que es estructuralmente homóloga a la lisozima y requiere calcio para asumir su pliegue funcional. Es una proteína reguladora de la enzima lactosa sintasa en la glándula mamaria (Fox & McSweeney, 2003).

La albúmina de suero bovino (BSA) se encuentra tanto en el suero sanguíneo como en la leche. Es una proteína globular más grande, con una estructura principalmente alfa-helicoidal, con 17 puentes disulfuro y un grupo tiol libre.



La lactoferrina es una glicoproteína monomérica globular, que pertenece a la familia de la transferrina, y presenta actividad anti microbiana (Fox & McSweeney, 2003, Edwards *et al.* 2009).

El proceso de gelificación en sistemas alimentarios es normalmente llevado a cabo incluyendo cambios conformacionales de las moléculas de proteínas, su agregación, y la formación de la red tridimensional del gel. La gelificación inducida por el calor en soluciones acuosas de proteína de suero de leche ha sido descrita como un proceso de dos etapas, la desnaturalización de la proteína nativa seguida por la posterior agregación. En la gelificación de las proteínas globulares, la desnaturalización térmica es crítica (Tolstoguzov 1991). La formación de un gel depende de diversos factores tales como la concentración de proteínas, el pH, la fuerza iónica, y la presencia de otros componentes de los alimentos (Gault & Fauquant, 1992; Tolstoguzov 1993).

Las proteínas de suero son proteínas de alto valor nutricional y debido a sus características estructurales presentan interesantes propiedades funcionales (de Wit 1998; Turgeon & Beaulieu, 2001; Ha & Zemel, 2003). En consecuencia, son muy adecuadas para la construcción de vehículos para la entrega de diversos compuestos bioactivos o microorganismos probióticos (Livney 2010) permitiendo su aplicación en la industria alimentaria (Morr 1984, 1992).

Geles mixtos.

En los alimentos, las proteínas y los polisacáridos son los ingredientes más importantes responsables en la formación de la estructura (Tolstoguzov 1991) y su uso en los sistemas mixtos pueden mejorar o modificar su comportamiento funcional (Dickinson & Galazka, 1991; Dickinson & Izgi, 1996; Gurov & Nuss, 1986; Turgeon & Beaulieu, 2001).

Los sistemas mixtos más estudiados son los geles de gelatina-agar (Boral & Bohidar, 2010; Singh *et al.* 2007, 2011). Sin embargo, existen algunos trabajos relacionados a la formación de geles de proteína de suero y polisacáridos tales como pectina o goma xántica. Krzeminski *et al.* (2014a) estudiaron la formación de complejos de pectina y proteínas de suero en la elaboración del *yogurth* con bajo contenido en



grasa, obteniéndose un producto de igual firmeza y propiedades de flujo similares a las de un *yogurth* con contenido normal de grasa (Jones *et al.* 2009). También, los complejos de goma xántica y proteínas de suero han sido usados exitosamente para reemplazar las grasas a pH neutro en tortas heladas (Laneuville *et al.* 2005) y en queso *Petit-Suisse* (Ramírez-Santiago *et al.* 2012).

Además, los complejos de polisacáridos-proteínas son utilizados debido a su capacidad emulsificante, o estabilizante de emulsiones evitando la coalescencia (Dickinson 2008), y a las propiedades texturales que aportan a los productos con bajo contenido en grasa (Jones *et al.* 2010b).

Inclusión de microorganismos probióticos en los geles

La amplia variedad de usos de los geles ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas, en cuanto a materiales y metodologías de obtención, capaces de satisfacer los diversos requerimientos planteados. La industria de alimentos está particularmente interesada en encontrar nuevos componentes naturales que aporten a la textura pero que además de satisfacer los requerimientos nutricionales y sensoriales, ofrezcan algunos beneficios adicionales promotores de la salud a quienes los consumen. La revalorización de aquellas moléculas que poseen estas características ha llevado a profundizar las investigaciones en lo referido a la funcionalidad biológica de los componentes alimentarios así como a la capacidad de aportar características reológicas particulares (Laws *et al.* 2001b; Warrand 2006).

En los recientes años ha crecido el interés por lograr matrices capaces de transportar medicamentos, nutrientes o microorganismos próbióticos y protegerlos durante su pasaje a través del tracto gastrointestinal. Una alternativa es la microencapsulación, definida como la tecnología del empaquetamiento en un material sólido, líquido o gaseoso en cápsulas que liberan sus contenidos a velocidades controladas, durante períodos prolongados de tiempo (Vandamme *et al.* 2002; Mainville *et al.* 2005; Crittenden *et al.* 2006). Estas tecnologías son de gran interés en el sector farmacéutico, pero también tienen relevancia en la industria de alimentos ya que proporcionan protección a los microorganismos al encontrarse dentro de una matriz



polimérica de calidad alimentaria (Heidebach *et al.* 2009), de manera que la selección apropiada de la matriz del alimento es de vital importancia durante el desarrollo de alimentos funcionales probióticos (Doherty *et al.* 2010).

Las proteínas de suero de leche también se han considerado como una alternativa potencial para incluir bacterias probióticas o sustancias bioactivas. Beaulieu *et al.* (2001) utilizaron un método de gelificación para la formación de perlas de proteína que atrapan el retinol. Ellos encontraron que la proteína de suero de leche formó geles que no eran susceptibles al ataque enzimático durante el pasaje por el tracto gastrointestinal proporcionando una liberación lenta y progresiva del retinol en los sitios de absorción intestinal y la protección contra la oxidación. Hébrard *et al.* (2006) inmovilizaron *Saccharomyces cerevisiae* en aislados de proteína de suero mediante la gelificación inducida por frío. La matriz de proteína crea un microambiente que favorece la actividad de las levaduras en las condiciones gástricas severas. Doherty *et al.* (2010) inmovilizaron *Lactobacillus rhamnosus* GG en aislado de proteína de suero de leche nativa, desnaturalizada y hidrolizada. Estas bacterias inmovilizadas aumentaron la supervivencia durante 14 días de almacenamiento a 37 °C en las matrices de proteína de suero de leche (WPI) desnaturalizada y/o hidrolizada, obteniéndose también una protección mayor durante el pasaje por el tracto gastrointestinal *in vitro*. En este aspecto, la inclusión de microorganismos en matrices alimentarias a base de proteínas de suero sería una alternativa para el desarrollo de nuevos alimentos conteniendo probióticos.



CAPÍTULO 2

Geles de kefirán como vehículo de microorganismos probióticos.





OBJETIVOS PARCIALES

Los microorganismos probióticos generalmente son incorporados a productos lácteos o jugo de frutas. Una alternativa para aumentar la eficiencia de estos microorganismos sería utilizar una matriz alimentaria que contenga naturalmente algún ingrediente con propiedades protectoras. Teniendo en cuenta las características fisicoquímicas del kefirán y conociendo su capacidad de formar criogeles, se planteó como objetivo analizar su interacción con otros macrocomponentes y su capacidad para formar geles mixtos a fin de utilizarlos como vehículo de microorganismos probióticos.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar las condiciones de formación de geles mixtos de kefirán con azúcares tales como sacarosa y fructosa.
- Evaluar las condiciones de formación de geles mixtos de kefirán con proteínas de suero de leche (WPI) y caracterizar los geles mixtos obtenidos.
- Realizar la inclusión de microorganismos potencialmente probióticos en los geles mixtos obtenidos y estudiar la viabilidad de los mismos durante el proceso de elaboración.
- Evaluar la resistencia de los microorganismos incluidos en los geles durante el pasaje por el tracto gastrointestinal y su capacidad de adhesión a epitelio.



CAPÍTULO 2

Geles de kefirán como vehículo de microorganismos probióticos.





MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de kefirán

La obtención y purificación de kefirán se realizó según Rimada & Abraham (2006). Una cantidad pesada de granos de kefir CIDCA AGK1 obtenidos por subcultivos sucesivos en leche descremada fue tratado en agua hirviendo [1:10 (p/v)] durante 30 minutos con agitación discontinua. La mezcla se centrifugó (Avanti J25 de Beckman Coulter Inc. centrífuga, Palo Alto, CA, EE.UU.) a 10.000 g durante 20 minutos a 20 °C y el polisacárido en el sobrenadante se precipitó mediante la adición de dos volúmenes de etanol y se dejó reposar a -20 °C durante la noche. Posteriormente se centrifugó a 10.000 g durante 20 minutos a 4 °C. El precipitado se disolvió en agua caliente y el proceso de precipitación y centrifugación se repitió dos veces. El precipitado final se disolvió en agua destilada caliente (Rimada & Abraham, 2001). La concentración de polisacárido se determinó por el método de Antrona, con soluciones de glucosa como estándares. Todas las muestras fueron analizadas para corroborar ausencia de otros azúcares por cromatografía en capa fina cualitativa. La concentración de proteínas en la solución de kefirán se determinó por el método de Bradford (Bradford 1976). La solución de kefirán se liofilizó en un Heto FD4 (Equipo de Laboratorio, Dinamarca) y el polisacárido obtenido se almacenó a 4 °C en botellas herméticas hasta su uso.

Preparación de geles de kefirán con azúcares y/o proteínas

Geles mixtos de kefirán y azúcares.

Se prepararon dispersiones en agua destilada conteniendo 2,0 % (p/p) de kefirán y 0; 5,88; 10; 17,64; 30 y 50 % (p/p) de fructosa o sacarosa. Las mismas fueron calentadas a 70 °C con agitación continua hasta completa solubilización. Alícuotas de



cada una de las diferentes soluciones fueron colocadas en recipientes plásticos cilíndricos de 35 mm de diámetro interno y cubiertas con film. Un grupo de estas alícuotas fue colocado inmediatamente en freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un período de 24 horas. Estas alícuotas fueron luego transferidas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por el mismo tiempo. El otro grupo de alícuotas, empleadas para estudios comparativos, no fueron congeladas y se colocaron directamente durante 48 horas en heladera a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de su utilización.

Geles de proteínas.

Se utilizó aislado de proteína de suero de leche (WPI) comercial (Arla Foods Ingredients, Ambh, Dinamarca). Según lo especificado por el fabricante, el aislado contiene un mínimo de 92 % de proteínas, siendo los principales constituyentes proteicos: β - lactoglobulina (74 %), α -lactoalbúmina (18 %) y albúmina de suero bovino (6 %). El aislado contiene lactosa y grasa (cada uno a un contenido máximo de 0,2 %), y minerales: sodio (0,5 %), potasio (1,3 %), y calcio (0,1 %).

La concentración final de proteína en *buffer* fosfato pH 7 de las soluciones para formar geles se ajustó a concentraciones que van de 2,0 a 10,0 % (p/p) (Puyol *et al.* 2001). Para la formación de los geles de proteínas, las soluciones fueron calentadas a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos para desnaturalizar las proteínas, e inmediatamente enfriadas en baño de agua fría hasta temperatura ambiente. Se colocaron en heladera a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Geles mixtos de kefirán y proteínas.

La concentración final del aislado de proteína de suero (WPI) en *buffer* fosfato pH 7 de las muestras se ajustó a concentraciones que van de 3,0 a 8,0 % (p/p) y la concentración de kefirán utilizada fue de 1,0 % (p/p). Para la formación de los geles mixtos de kefirán con proteínas, las soluciones fueron calentadas a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos e inmediatamente enfriadas en baño de agua fría hasta temperatura ambiente, proceso que llamamos ETAPA 1. Luego fueron colocadas inmediatamente en freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un período de 24 horas correspondiente a las condiciones de gelificación del



kefirán, y luego fueron transferidas a 4 °C por el mismo tiempo, proceso que llamamos ETAPA 2. Estas muestras fueron almacenadas a 4 °C al menos 24 horas hasta su utilización.

Caracterización de las soluciones

Se evaluó el comportamiento de las soluciones utilizando un reómetro ReoStress 600 (Termo Haake, Alemania) en modo rotacional con un sistema sensor plato-plato paralelo, de superficie rugosa y 1 mm de separación entre platos. Las soluciones se termostataron a 20 °C utilizando un baño de agua (Circulator DC50, Thermo Haake). Se registró el esfuerzo de corte (τ) en función del gradiente de velocidad ($\dot{\gamma}$). Se utilizó una aceleración de $4,17 \text{ s}^{-2}$ para alcanzar en 2 minutos un gradiente de velocidad de 500 s^{-1} , se mantuvo el mismo durante 1 minuto y luego se procedió al descenso de dicho gradiente hasta 0 s^{-1} utilizando una aceleración igual a la antes mencionada pero de signo negativo. A partir de las gráficas correspondientes al comportamiento de flujo se obtuvo la viscosidad aparente (η_{ap}) a 300 s^{-1} y se ajustaron los resultados al modelo de Ostwald de Waele ($\tau = K \cdot (\dot{\gamma})^n$) para obtener el índice de consistencia (K) y el índice de comportamiento de flujo (n).

Caracterización de los geles

Actividad Acuosa.

La determinación de la actividad acuosa se realizó en el equipo Aqua Lab (Decagon Devices, Inc., Washington). Las muestras fueron colocadas en los recipientes del equipo de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se esperó la llegada al equilibrio. El equipo fue calibrado con agua bidestilada y solución de ClK saturada. Las determinaciones se efectuaron por triplicado.



Capacidad de retención de agua (WHC).

Se efectuó una centrifugación de los geles a 3.000 g durante 5 minutos a 20 °C. Los sobrenadantes fueron eliminados mediante pipeta e inversión de los *eppendorf*. Se determinaron los pesos antes y después de la centrifugación. WHC (%) se calculó como el porcentaje de agua retenido en relación al peso inicial del gel (Wu *et al.* 2009). Asimismo, se determinó el contenido de azúcares en el exudado durante la centrifugación mediante el método de Antrona. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Reometría oscilatoria de baja amplitud de deformación.

Las medidas fueron llevadas a cabo en un reómetro RheoStress 600 (Haake) empleando una geometría de platos paralelos de superficie rugosa de 35 mm de diámetro y 1 mm de separación entre los platos. Las muestras fueron cuidadosamente removidas del recipiente y colocadas en el plato inferior del reómetro. La temperatura fue mantenida a 20 °C mediante un baño de agua circulante (DC50, Haake). La región de viscoelasticidad lineal fue determinada mediante la realización de barridos de esfuerzo de corte a frecuencia fija (1 Hz) a 5, 20 y 40 °C.

Dentro de dicho rango lineal de viscoelasticidad se evaluaron G' (módulo elástico) y G'' (módulo viscoso) en función de la frecuencia (0,1 - 10 Hz). El módulo elástico (G'), el módulo viscoso (G'') y la tangente del ángulo de desfase ($\tan(\delta)$) fueron evaluados como función de la frecuencia (entre 0,1 y 10,0 Hz). El módulo elástico (G') describe, como su nombre lo indica, el comportamiento elástico del sistema, se encuentra vinculado a la energía que se almacena en el mismo y que puede ser recuperada cuando el esfuerzo aplicado es removido. Por esta particularidad a G' también se lo denomina módulo de almacenamiento. El módulo viscoso (G'') es una medida de la energía perdida en forma de calor, asociada al comportamiento viscoso. El módulo G'' es llamado también módulo de pérdida, en contraposición con la denominación módulo de almacenamiento, utilizada para G' .

La tangente del ángulo de desfase $\tan(\delta)$ es definida como:



$$\tan(\delta) = G'' / G'$$

y está directamente relacionada con la energía perdida con respecto a la energía recuperada en cada ciclo. Puede variar entre 0 e infinito y cuanto menor es su valor indica un mayor carácter elástico.

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

Se colocaron las muestras en cápsulas de aluminio previamente pesadas y selladas. El barrido de temperatura fue de 4 - 100 °C y la velocidad de calentamiento fue de 10 °C/min. Una cápsula vacía fue utilizada como referencia para todas las medidas. Luego del barrido de todas las muestras, las cápsulas fueron perforadas y secadas a peso constante en estufa a 105 °C para obtención de peso seco. Los termogramas de temperaturas de transición y entalpías de transición (ΔH) fueron obtenidos mediante el software 2000 de Análisis TA Universal.

Análisis de perfil de textura.

Los geles fueron evaluados utilizando un texturómetro TA.XT2i Texture Analyser (Stable Micro-Systems Ltd, Inglaterra) en el modo de análisis de perfil de textura, realizando dos ciclos de compresión uniaxiales. Se utilizó una sonda de 75 mm de diámetro a una velocidad de 0,5 mm/s y los geles se comprimieron hasta el 30 % de su altura original. La evaluación se realizó a temperatura ambiente registrándose la fuerza en función del tiempo (Figura 29).

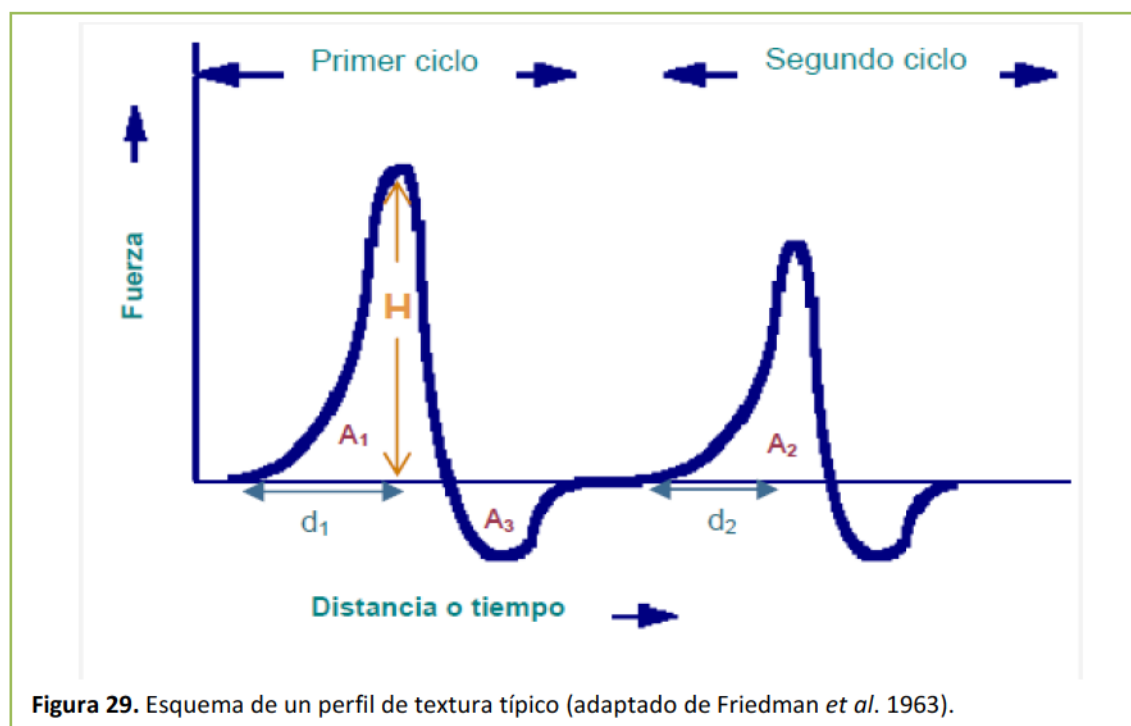


Figura 29. Esquema de un perfil de textura típico (adaptado de Friedman *et al.* 1963).

A partir del análisis de las curvas fuerza-tiempo (o fuerza-distancia) obtenidas, se determinaron los parámetros como dureza, cohesividad, adhesividad y elasticidad.

La *dureza* corresponde a la fuerza máxima registrada, altura del primer pico (H), y se vincula con la resistencia a la compresión. Es la fuerza necesaria para lograr la deformación predeterminada.

La *cohesividad* es la relación entre las áreas del segundo y primer pico (A_2/A_1) del perfil y está vinculada con el trabajo necesario para vencer las uniones internas del material.

La *adhesividad* es el valor absoluto del área del pico negativo (A_3) que aparece después del primer pico, corresponde al trabajo necesario para vencer las fuerzas atractivas entre la superficie del material y otros materiales, en este caso el sensor del texturómetro. Es mayormente una característica de superficie que depende de la combinación de los efectos de las fuerzas adhesivas y cohesivas, así como de la viscoelasticidad del material (Adhikari *et al.* 2001).

La *elasticidad* está definida como la relación (d_2/d_1) y se relaciona con la recuperación del material entre el final de la primera compresión y el comienzo de la segunda. La elasticidad es la percepción de la “gomosidad” del gel en la boca, y es una



medida de la cantidad de estructura del gel que se pierde en la compresión inicial (Sanderson 1990).

Microscopía electrónica (SEM).

Los geles fueron fijados utilizando nitrógeno líquido (-196 °C) e inmediatamente liofilizados en un liofilizador Heto FD4 (Lab Equipment, Dinamarca). Las muestras fueron luego cubiertas con una capa de oro de 20 nm de espesor utilizando un equipo Balzers SCD 030 (Balzers, Liechtenstein). Finalmente fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido Philips 505 (Holanda), el cual fue operado con un voltaje de 20 kV. La microscopía fue realizada en la División de Microscopía de Exploración del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas (CINDECA - CONICET/UNLP, La Plata, Argentina). El diámetro de poro fue calculado por análisis de las fotografías mediante el programa ImageJ (Schneider *et al.* 2012).

Inclusión de microorganismos en geles mixtos

Obtención de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 y *Lactobacillus kefir* CIDCA 83102.

Lactobacillus paracasei y *Lactobacillus kefir* fueron activados mediante dos repiques consecutivos y cultivados en MRS a 30 °C durante 48 horas y 72 horas, respectivamente. Luego de la incubación, las células fueron concentradas mediante centrifugación a 5000 g por 10 minutos y el pellet obtenido fue resuspendido en *buffer* fosfato pH 7 (ver Apéndice).

Obtención de geles de kefirán, proteínas y fructosa con microorganismos.

Se prepararon dispersiones en *buffer* fosfato pH 7 conteniendo 1,0 % (p/p) de kefirán, 3,0 % (p/p) de proteínas de suero de leche (WPI) y 12,0 % (p/p) de fructosa. Las



mismas fueron previamente homogeneizadas y calentadas a 90 °C durante 10 minutos e inmediatamente enfriadas en baño de agua fría a 4 °C hasta alcanzar temperatura ambiente. Una vez templada la solución preparada se adicionó *L. paracasei* 8339 o *L. kefir* 83102 a una concentración final de 1.10^8 UFC/ml. Se agitó suavemente hasta completa homogeneización y se tomaron alícuotas de cada una de las diferentes soluciones para ser colocadas en *ependorf* estériles e inmediatamente enfriadas en freezer a -20 °C por un período de 24 horas. Estas alícuotas fueron luego transferidas a 4 °C hasta su utilización.

Se realizaron los siguientes controles:

- Los lactobacilos se resuspendieron en *buffer* fosfato pH 7 y se mantuvieron a 4 °C durante 48 horas (Control₀).
- *L. paracasei* CIDCA 8339 y *L. kefir* CIDCA 83102 fueron resuspendidos en 1,0 % (p/p) de kefirán, 3,0 % (p/p) de proteínas de suero de leche (WPI) y 12,0 % (p/p) de fructosa y almacenados en heladera durante 48 horas (Control₅).

Se cuantificó el número de microorganismos viables incluidos en los geles, así como también en los controles correspondientes, mediante diluciones seriadas en triptona 0,1 % (p/v) y recuento en agar MRS. Las placas fueron incubadas a 30 °C en aerobiosis durante 48 horas. Los resultados se presentaron como UFC/ml. Los ensayos se realizaron al menos tres veces.

Resistencia al pasaje gastrointestinal *in vitro* de los microorganismos incluidos en el gel.

Para evaluar la resistencia de *L. paracasei* CIDCA 8339 y *L. kefir* CIDCA 83102 incluidos en los geles los mismos fueron sometidos a las condiciones gastrointestinales simuladas como se describió en el Capítulo I, Materiales y Métodos, basado en el protocolo de Grimoud *et al.* (2010).



El mismo ensayo se realizó con los lactobacilos resuspendidos en *buffer* fosfato pH 7 y en la suspensión de 1,0 % (p/p) de kefirán, 3,0 % (p/p) de proteínas de suero de leche (WPI) y 12,0 % (p/p) fructosa, previo a la formación del gel. Los ensayos se realizaron al menos tres veces.

Capacidad de adhesión de los microorganismos incluidos en el gel.

La capacidad de adhesión a células epiteliales (Caco-2/TC-7) de los lactobacilos antes y después del estrés ácido y de bilis, se realizó de acuerdo al protocolo detallado en el Capítulo I, Materiales y Métodos. Para la condición Gel, los geles fueron tratados con solución ácida y de bilis a una temperatura de 37 °C. El mismo ensayo se realizó con los lactobacilos resuspendidos en *buffer* fosfato pH 7 y en la suspensión conteniendo 1,0 % (p/p) de kefirán, 3,0 % (p/p) de proteínas de suero de leche (WPI) y 12,0 % (p/p) fructosa, previo a la formación del gel.

Análisis estadístico

El estudio estadístico se realizó con el programa GRAPHPAD Prism version 5.0 para Windows (San Diego, CA). Se efectuó un análisis de varianza simple (ANOVA) para determinar la diferencia entre medias. Las diferencias significativas entre los valores medios de cada experimento fueron determinadas por el test Tukey (intervalo de confianza del 95 %). Todos los experimentos fueron realizados al menos por triplicado.



CAPÍTULO 2

Geles de kefirán como vehículo de microorganismos probióticos.





RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Geles de kefirán con azúcares

Los azúcares de bajo peso molecular son aditivos o ingredientes comunes en una amplia variedad de alimentos procesados. Junto con sus efectos edulcorantes, estos azúcares modifican las propiedades físicas del sistema alimentario. Los edulcorantes más comunes utilizados en los alimentos, sacarosa y fructosa, contribuyen a las características físicas y funcionales de los alimentos y bebidas, tales como la mejora del sabor, color, punto de congelación, estabilidad osmótica, además del propio dulzor (Davis 1995).

Debido a las propiedades saludables del kefirán y la capacidad del polisacárido para formar criogeles, el kefirán se convierte en una matriz prometedora para el desarrollo de alimentos con valor nutricional agregado debido a las propiedades promotoras de la salud asociadas a este polisacárido. La presencia de mono y disacáridos como cosolutos en soluciones gelificantes puede promover la asociación intermolecular de biopolímeros, aunque la inclusión de pequeñas moléculas no siempre conduce a un refuerzo de la red (Evageliou *et al.* 2000a), por ello se evaluó el efecto de la presencia de edulcorantes como sacarosa y fructosa en la capacidad de formar geles del kefirán.

Comportamiento reológico de soluciones de kefirán con sacarosa y fructosa.

En una primera etapa, se analizó el efecto del agregado de azúcares en el comportamiento de flujo y viscosidad aparente de las soluciones del kefirán ya que las propiedades fisicoquímicas pueden incidir en las interacciones que se forman al someter las soluciones al proceso de congelación-descongelación requerido para la formación de los geles.



En la Tabla 8 se presenta el comportamiento de flujo de las soluciones obtenidas de kefirán con fructosa y sacarosa. Las soluciones de kefirán mostraron curvas de flujo que corresponden a un comportamiento pseudoplástico sin área de histéresis. Se ajustó el modelo de Ostwald de Waele a los datos experimentales obtenidos con un coeficiente de correlación de 0,999 en todos los ensayos. Los índices de flujo (n) fueron todos menores a 1. La solución de kefirán sin azúcares presentó un valor de (n) de 0,6818 y este valor disminuyó con el aumento de la concentración de azúcar siendo de 0,4595 y 0,4797 para las soluciones de kefirán con 50,0 % (p/p) de sacarosa o fructosa, respectivamente. La viscosidad aparente a 300 s^{-1} ($\eta_{\text{ap}} 300 \text{ s}^{-1}$) de la solución de kefirán fue de 46,59 mPa.s y este valor aumentó con el aumento de las concentraciones de azúcares alcanzando un valor de 612,85 mPa.s en la solución conteniendo 50 % de sacarosa y de 249,30 mPa.s en la solución conteniendo la misma concentración de fructosa.

Tabla 8. Viscosidades aparentes a 300 s^{-1} ($\eta_{\text{ap}} 300 \text{ s}^{-1}$), índice de consistencia (K), índice de flujo (n) y coeficiente de correlación (r^2), obtenidos ajustando los datos experimentales al modelo de Ostwald de Waele, en función de las concentraciones de azúcar (sacarosa o fructosa) en las soluciones de kefirán. Los resultados fueron obtenidos a $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Azúcar	Concentración % (p/p)	K^* (Pa.s-n)	n^*	r^2	$\eta_{\text{ap}} 300\text{s}^{-1}^*$ (mPa.s)
	0	$0,2845 \pm 0,0221^a$	$0,6818 \pm 0,0110^a$	0,9996	$46,59 \pm 0,62^a$
sacarosa	5,9	$0,4745 \pm 0,0351^a$	$0,6268 \pm 0,0048^{a,b,c}$	0,9994	$56,96 \pm 5,81^{a,b}$
	10,0	$0,5711 \pm 0,0171^a$	$0,6188 \pm 0,0017^{a,b}$	0,9995	$65,40 \pm 1,30^{b,c}$
	17,6	$0,7541 \pm 0,1003^a$	$0,5967 \pm 0,0055^{b,c,d}$	0,9995	$75,96 \pm 7,81^{c,d}$
	30,0	$1,5615 \pm 0,1874^a$	$0,5439 \pm 0,0018^{d,e}$	0,9996	$116,10 \pm 12,87^e$
	50,0	$9,0800 \pm 2,9400^b$	$0,4595 \pm 0,1318^{e,f}$	0,9993	$612,85 \pm 38,82^g$
fructosa	5,9	$0,4875 \pm 0,0025^a$	$0,6325 \pm 0,0018^{a,b}$	0,9995	$60,34 \pm 0,27^{a,b,c}$
	10,0	$0,5155 \pm 0,0369^a$	$0,6245 \pm 0,0088^{b,c}$	0,9995	$60,91 \pm 1,21^{a,b,c}$
	17,6	$0,6882 \pm 0,0195^a$	$0,6134 \pm 0,0049^{b,c}$	0,9995	$76,46 \pm 4,35^{c,d}$
	30,0	$1,0260 \pm 0,0198^a$	$0,5741 \pm 0,0088^{c,d}$	0,9996	$90,74 \pm 2,64^d$
	50,0	$4,9235 \pm 0,9991^a$	$0,4797 \pm 0,0474^f$	0,9994	$249,30 \pm 16,97^f$

* Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Obtención de los geles y caracterización fisicoquímica.

Estas soluciones fueron sometidas a un ciclo de congelación-descongelación para evaluar si las soluciones eran capaces de formar geles. La inclusión de sacarosa o fructosa en las soluciones de kefirán no impidió la formación de gel, por el contrario, después de un ciclo de congelación-descongelación, se obtuvieron geles translúcidos y autoportantes con todas las soluciones analizadas. La a_w a 20 °C de los geles fue cercana a 1 para los geles de kefirán y de $0,9465 \pm 0,0025$ y $0,9245 \pm 0,0005$ para las concentraciones más altas utilizadas de sacarosa y fructosa respectivamente, sin observarse diferencias significativas respecto a los geles de kefirán sin azúcares.

Tabla 9. Valores de actividad acuosa obtenidos para los geles mixtos de kefirán a las concentraciones de sacarosa y fructosa estudiadas.

% (p/p)	Sacarosa	Fructosa
0,0 %	$1,0015 \pm 0,0005$	$1,0015 \pm 0,0005$
5,9 %	$1,0000 \pm 0,0020$	$0,9995 \pm 0,0015$
10,0 %	$0,9965 \pm 0,0005$	$0,9890 \pm 0,0002$
17,6 %	$0,9915 \pm 0,0015$	$0,9800 \pm 0,0030$
30,0 %	$0,9775 \pm 0,0025$	$0,9590 \pm 0,0020$
50,0 %	$0,9465 \pm 0,0025$	$0,9245 \pm 0,0005$

La microestructura de los geles con sacarosa y fructosa se evaluó mediante **microscopía electrónica de barrido** con una ampliación de 600 X (Figura 30).

Los geles mostraron una estructura tridimensional altamente porosa excepto aquéllos conteniendo las concentraciones más altas de sacarosa y fructosa, cuya microestructura tenía la apariencia de láminas superpuestas de polisacárido. El tamaño de poro de los geles que contenían bajas concentraciones de azúcar fue mayor que la de los geles de kefirán. Los geles preparados con concentraciones mayores de 30,0 % (p/p) de sacarosa y mayores de 17,6 % (p/p) de fructosa presentaron tamaños de poro significativamente menores a los encontrados para los geles de kefirán sin azúcares.

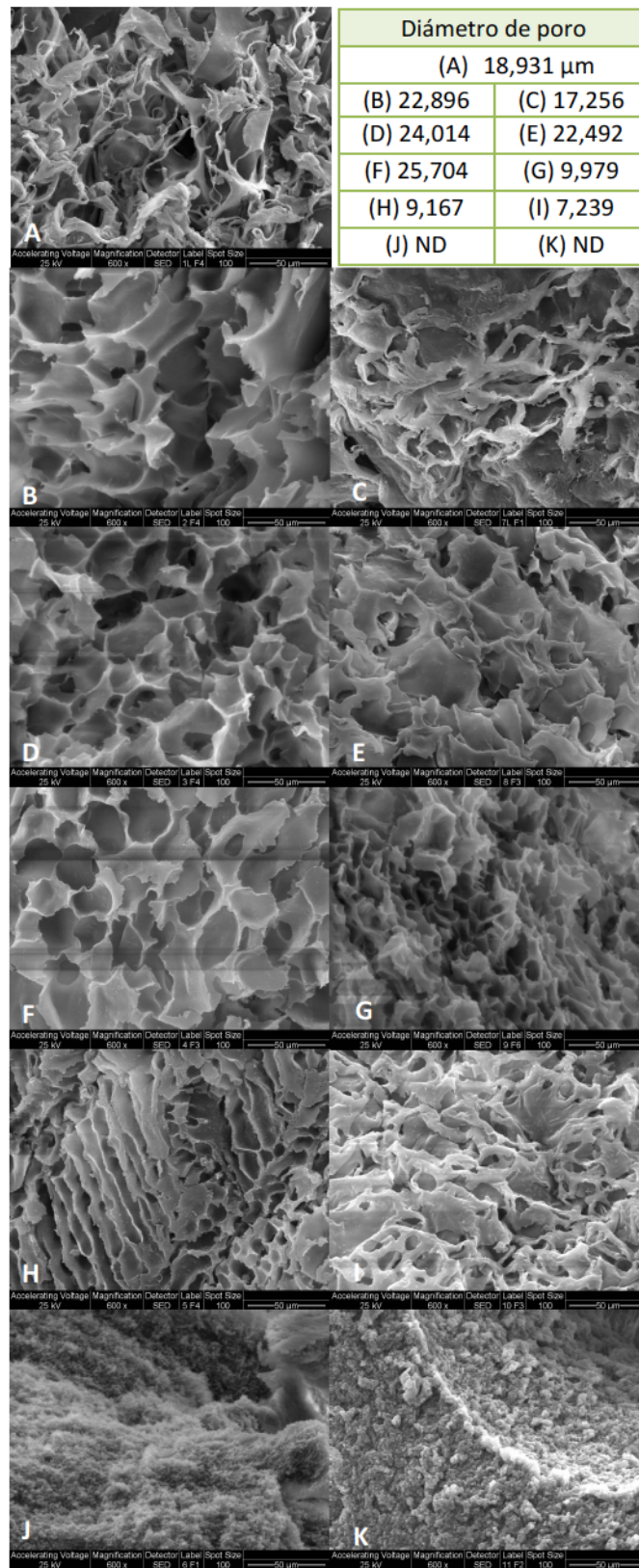
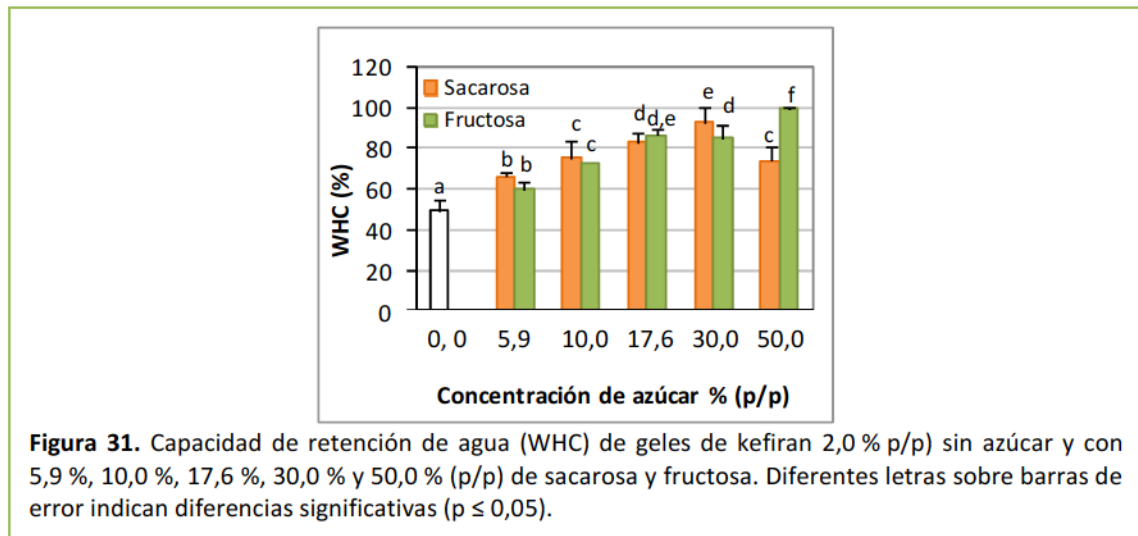


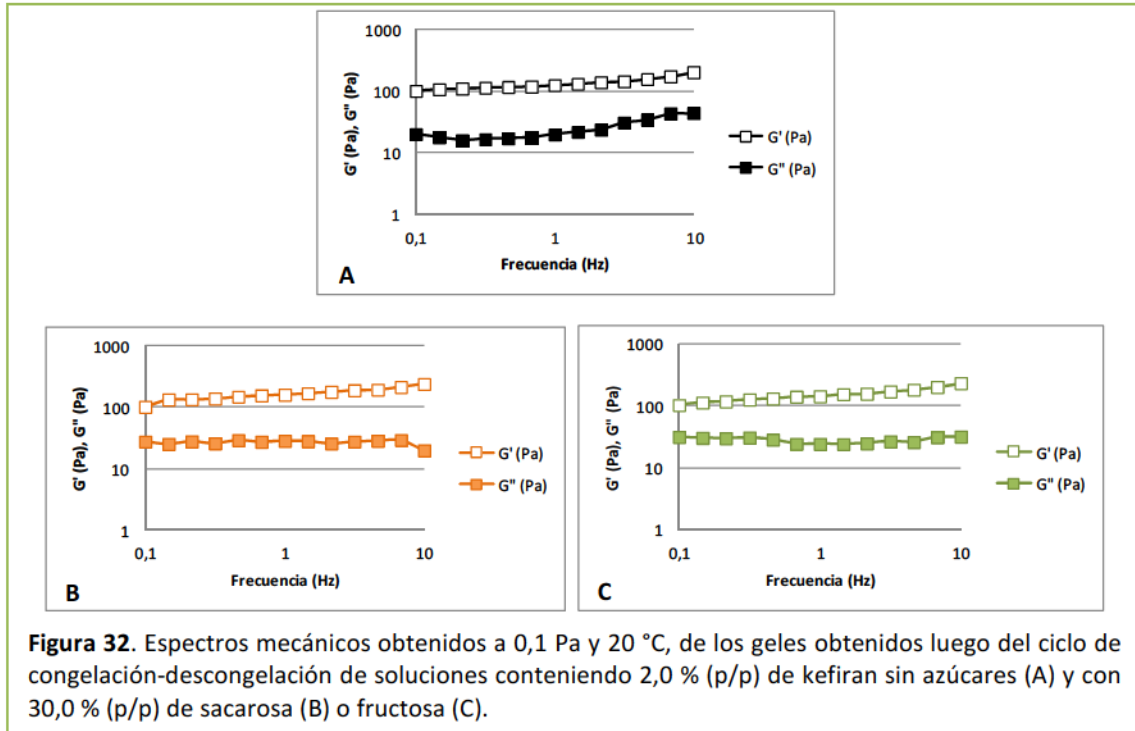
Figura 30. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido de geles de kefirán 2,0 % (p/p) (A) sin azúcar y con sacarosa y fructosa respectivamente. Aumento 600 X. (B y C) 5,9 % (p/p), (D y E) 10,0 % (p/p), (F y G) 17,6 % (p/p), (H e I) 30,0 % (p/p), (J y K) 50,0 % (p/p).

Se determinó la **capacidad de retención de agua (WHC)** de los geles como fue explicado en Materiales y Métodos página 118. Los resultados se presentan en la Figura 31.



La capacidad de retención de agua de los geles de kefirán fue mayor a medida que aumentó la concentración de azúcar, alcanzando un valor cercano a 100 % para los geles de kefirán con 50,0 % (p/p) de fructosa (Figura 31). Los geles de kefirán con sacarosa aumentaron su WHC con el aumento de la concentración de sacarosa hasta una concentración de 30,0 % (p/p) correspondiendo a un valor de 92,5 % que luego disminuyó a 73,0 % al aumentar la concentración de este azúcar hasta 50,0 % indicando que cada azúcar ejerce un efecto diferente sobre las propiedades del gel.

Se determinó el espectro mecánico de los geles obtenidos mediante **reometría oscilatoria de baja amplitud de deformación**. El espectro mecánico de un gel/solución proporciona información sobre el comportamiento frente a una deformación sinusoidal de los geles obtenidos dentro de la región de viscoelasticidad lineal. A modo de ejemplo, en la Figura 32 se muestran los espectros mecánicos de los geles de kefirán, y los geles de kefirán con 30 % (p/p) de sacarosa y fructosa. El módulo elástico (G') de los geles de kefirán con y sin azúcares, fue mayor que el módulo viscoso (G'') a todas las frecuencias estudiadas, y ambos módulos fueron prácticamente independientes de la frecuencia indicando un comportamiento de gel (Biliadieris 1992; Peressini *et al.* 2003; Ross-Murphy 1995).



Para comparar los parámetros viscoelásticos entre los distintos geles, el módulo elástico (G'), el módulo viscoso (G'') y la tangente del ángulo de desfase ($\tan(\delta)$) fueron evaluados a la frecuencia de 1 Hz (Figura 33).

La incorporación de sacarosa en concentraciones de 5,9 % a 30,0 % (p/p) a los geles de kefirán, aumentó el módulo elástico y el módulo viscoso. Cuando la concentración de sacarosa fue 50,0 % (p/p), los valores obtenidos de ambos módulos fueron iguales al del gel de kefirán (Figura 33 A).

El agregado de bajas concentraciones de fructosa (5,9 % y 10,0 % (p/p)) disminuyó el módulo elástico de los geles, sin embargo, el agregado de mayores concentraciones de este azúcar dio como resultado geles con mayor carácter elástico. El módulo viscoso G'' aumentó con la concentración de fructosa hasta 30,0 % y luego disminuyó a un valor comparable a la del gel de kefirán con 5,9 % del mismo azúcar (Figura 33 B).

La Figura 33 C muestra la tangente del ángulo de desfase ($\tan(\delta)$) de los geles de kefirán con distintas concentraciones de los azúcares estudiados. La inclusión de hasta 30,0 % (p/p) de sacarosa y fructosa produjo geles con mayores valores de $\tan(\delta)$. Los geles preparados con 50,0 % (p/p) de azúcar presentaron el mismo valor de $\tan(\delta)$ que los geles de kefirán. Aunque ambos azúcares tuvieron el mismo efecto cualitativo



sobre la $\tan(\delta)$, el grado en que fueron afectadas las propiedades viscoelásticas del gel dependió del tipo de azúcar, ya que los geles de kefirán que contenían fructosa mostraron mayores valores de $\tan(\delta)$ que los suplementados con sacarosa a la misma concentración. Sin embargo, a la concentración de azúcar más alta evaluada, se observó una disminución en $\tan(\delta)$ en los geles de kefirán con fructosa debido a un incremento en el módulo elástico; mientras que la disminución observada en $\tan(\delta)$ para los geles de kefirán con sacarosa se produjo debido a una mayor disminución en el módulo viscoso con respecto a la observada con el módulo elástico.

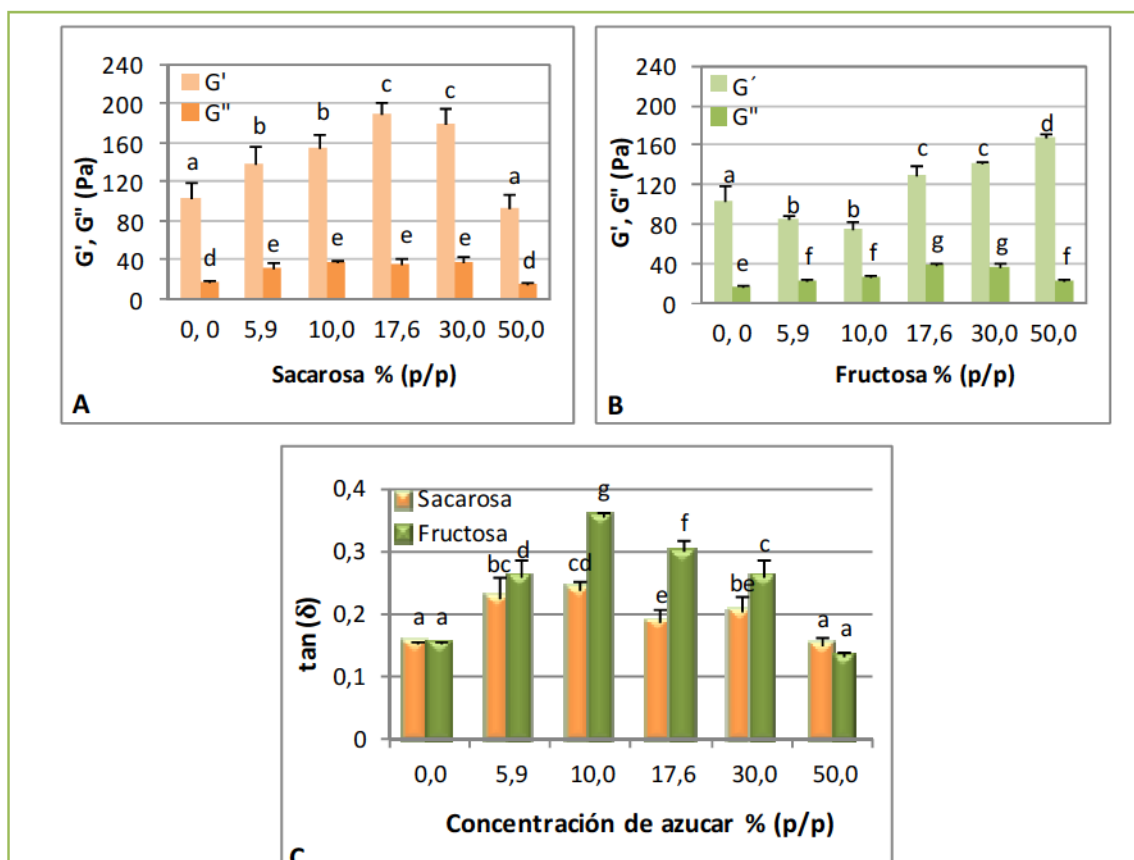


Figura 33. Módulo elástico (G') y viscoso (G'') de geles de kefirán 2 % (p/p) con 5,9 %, 10,0 %, 17,6 %, 30,0 % y 50,0 % (p/p) de sacarosa (A) y fructosa (B), y la tangente del ángulo de desfase ($\tan(\delta)$) a las mismas concentraciones de ambos azúcares (C) (todas las medidas fueron evaluadas a 1 Hz de frecuencia y a 20 °C). Dentro del mismo gráfico, las letras sobre las barras de error indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

El aumento del módulo elástico con la concentración de azúcar podría explicarse porque los hidratos de carbono de bajo peso molecular podrían interactuar con los hidrocoloides a través de enlaces de hidrógeno, aumentando la rigidez de las cadenas de



los polisacáridos. Cadenas más rígidas podrían producir un mayor módulo elástico (G'), ya que se necesitarían fuerzas de flexión adicionales para deformar las redes (Maurer *et al.* 2012). Además, la introducción de grandes cantidades de monosacáridos o disacáridos en sistemas acuosos competiría con el polímero por su interacción con el agua, con la consiguiente disminución en la eficacia de las interacciones polímero-solvente, favoreciendo una auto-asociación de las cadenas de polímero. Este proceso resulta en un aumento en el módulo G' con el aumento de la concentración de sacarosa. El agregado de 50,0 % de sacarosa a la solución de kefirán, produjo una disminución pronunciada en el módulo G' resultando en geles de kefirán con menor carácter elástico. Según los resultados presentados, con el aumento de la concentración de sacarosa, las interacciones polímero-polímero se hacen más fuertes, sin embargo, a mayores concentraciones de sacarosa, se produciría una inhibición uniéndose a las cadenas del polímero y bloqueando las interacciones de las cadenas requeridas para formar las uniones de la red del gel. Este mismo efecto se observó para criogeles de sacarosa-agarosa (Maurer *et al.* 2012) y para geles de galactomanano con sacarosa, fructosa y glucosa (Doyle *et al.* 2006).

La presencia de fructosa o sacarosa afectó de manera diferente las características de los geles de kefirán indicando que diferentes azúcares, pueden promover la asociación de los biopolímeros de manera diferente. Resultados similares fueron descritos por Evageliou *et al.* (2000a, 2000b); quienes trabajaron con geles de pectina de alto metoxilo y observaron diferencias sustanciales en la fuerza del gel dependiendo del tipo de azúcar utilizado en concentraciones equivalentes de sacarosa, glucosa o fructosa. La presencia de los azúcares produjo un aumento en la fuerza del gel de pectina, siendo más débiles los geles obtenidos con fructosa. Del mismo modo, Doyle *et al.* (2006) estudiaron el efecto de la inclusión de diferentes azúcares en la textura de los geles de galactomanano, y encontraron que la fuerza del gel y el módulo de Young dependían del azúcar presente.

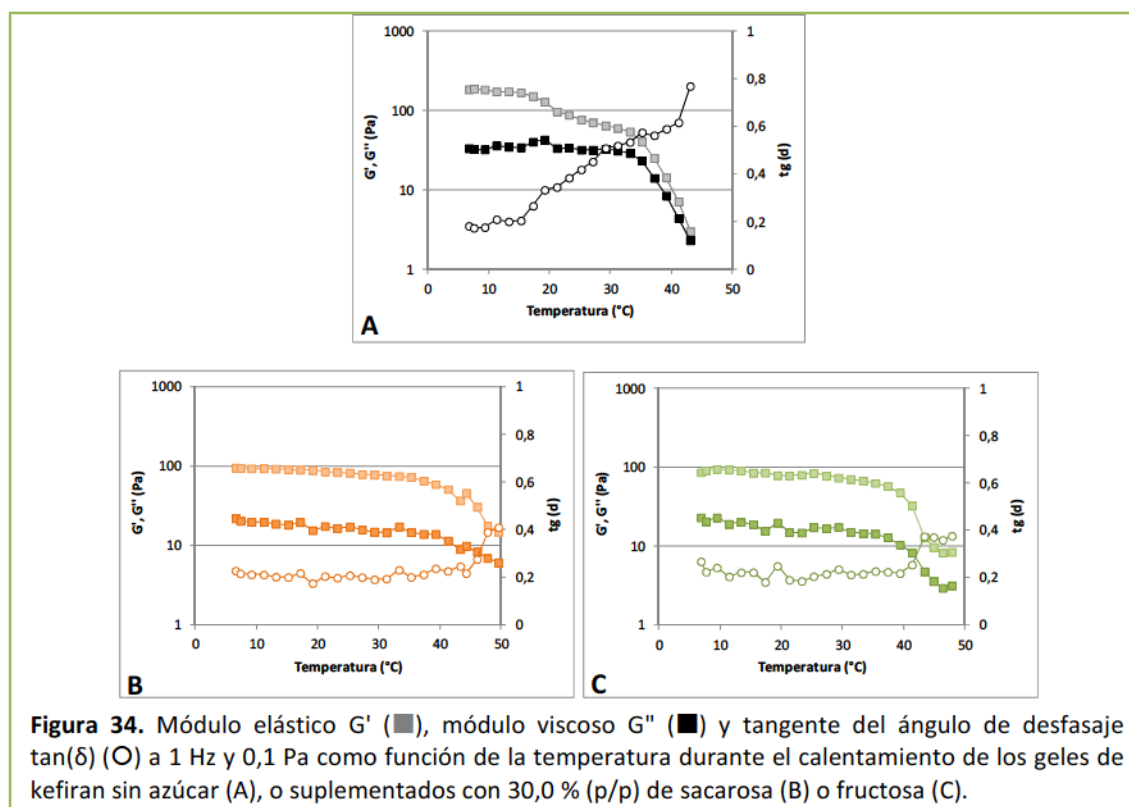
La adición de 0 a 30,0 % de sacarosa en geles de kefirán produjo geles con módulos elásticos más altos que los geles adicionados con fructosa a las mismas concentraciones, y esta diferencia se hizo más pronunciada cuando la adición de sacarosa y fructosa se aproximó al 50,0 %, ya que en presencia de fructosa se reforzó la



estructura aumentándose el valor de G' , mientras que la inclusión de sacarosa interfirió en la formación de la red del gel como se evidenció al obtener un módulo elástico similar al del gel de kefirán. Puesto que los grupos hidroxilos primarios pueden formar puentes de hidrógeno fuertes, la inhibición de la asociación intermolecular dependería del número de esos grupos por monosacárido y podría explicar el diferente efecto de cada azúcar estudiado (Doyle *et al.* 2006).

Las diferencias en las características de los geles obtenidos con altas concentraciones de ambos azúcares podría ser el resultado, entre otros parámetros, de las diferencias en la viscosidad de la solución. Aunque dos azúcares pueden compartir una composición química idéntica, la orientación de los grupos hidroxilo puede influir en la organización de las moléculas de agua en la primera capa de solvatación (Dashnau *et al.* 2005). Lazaridou *et al.* (2008) informaron que la adición de azúcares a soluciones de β -glucano retardó la crioestructuración. Geles de β -glucano de alto peso molecular exhibieron espectros mecánicos de geles fuertes y elásticos que luego cambiaron a geles débiles con la inclusión de 15 % de sacarosa en la formulación, o soluciones líquidas con la inclusión de 15 % de fructosa.

La Figura 34 muestra los módulos elásticos G' y viscosos G'' y la tangente del ángulo de desfasaje $\tan(\delta)$ como función de la temperatura para los geles de kefirán tanto en ausencia como en presencia de 30,0 % de sacarosa o fructosa, evaluados a 1 Hz. Cuando se evaluaron los parámetros reológicos de los geles durante el calentamiento, en los geles con azúcares se observó una modificación en cuanto a la temperatura y magnitud de los cambios observados, respecto a los geles sin azúcares.



En los geles de kefirán (Figura 34 A) se observó que los módulos elástico y viscoso (G' y G''), durante el calentamiento decaen suave y progresivamente con el aumento de la temperatura, pero a una temperatura determinada (umbral), descienden abruptamente. Cuando la sacarosa (Figura 34 B) o fructosa (Figura 34 C) fueron incluidos en los geles de kefirán, la caída fue menos pronunciada que la observada en los geles sin azúcares, y la temperatura a la que comenzó el descenso en G' se desplazó a la derecha indicando que esto ocurría a valores más altos de temperatura. A fin de una comparación, se determinó la temperatura a la que el valor de G' se redujo a 1/5 de su valor a 20 °C para cada gel. Esta temperatura se desplazó de 38 °C para el gel de kefirán sin azúcar, a 47 °C y 42 °C cuando el gel contenía 30,0 % de sacarosa o fructosa, respectivamente. Los termogramas correspondientes de los geles de kefirán sin azúcar indican una transición endotérmica en $39,7 \pm 6,6$ °C. La entalpía de este proceso fue de $32,5 \pm 7,5$ kJ/mg. No se observó transición endotérmica en los termogramas correspondientes a los geles con azúcar.



De acuerdo a estos resultados, se puede concluir que luego de un ciclo de congelación-descongelación, las soluciones de kefirán con sacarosa o fructosa forman criogeles. El comportamiento de los geles obtenidos depende del azúcar y concentración utilizada. Las moléculas de sacarosa y fructosa contribuyen a la retención de agua y a un aumento en los módulos de G' y G'' a causa de un mayor número de moléculas presentes. Las interacciones entre estos azúcares con el polisacárido podrían interferir/favorecer la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas del polisacárido, modificando así la viscoelasticidad del gel.

Desde el punto de vista sensorial, los geles que contienen fructosa son más dulces que los obtenidos con la misma cantidad de sacarosa. Además, los geles de kefirán con el mismo grado de dulzor como los que contienen 17,6 % de fructosa y 30,0 % (p/p) de sacarosa, presentan diferentes características fisicoquímicas, lo que permite la posibilidad de elegir la formulación adecuada para elaborar criogeles para un propósito comercial en particular.



Formación de geles de kefirán y proteínas de suero de leche

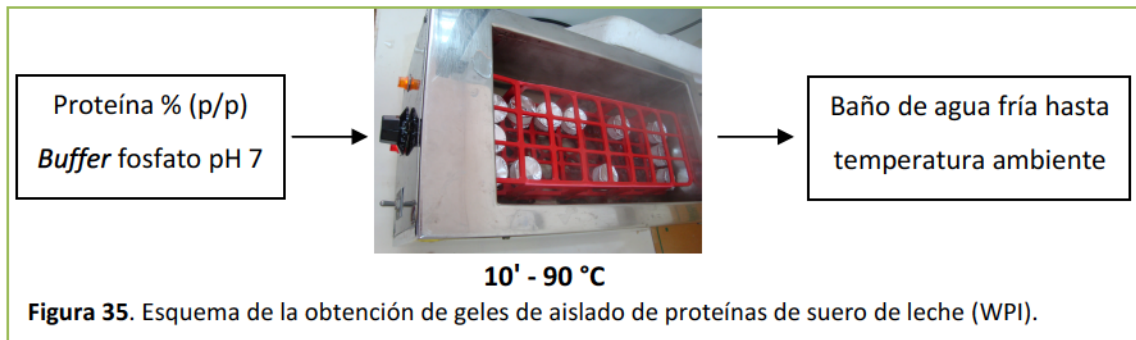
La manipulación inteligente de mezclas de biopolímeros, proteínas y polisacáridos, es una vía promisoría para la generación de nuevas estructuras y texturas en los alimentos así como para la obtención de micro y nanoestructuras con diferentes aplicaciones. Los polisacáridos contribuyen a importantes características estructurales en numerosos sistemas alimentarios (Walter 1998), entre las más importantes se encuentra su capacidad gelificante (Morris & Rees, 1978; Morris 1998) y su capacidad para estabilizar espumas y emulsiones (Carp *et al.* 2001; Dickinson 1998). Los sistemas mixtos proteína-polisacárido suelen conceder al alimento propiedades mejoradas respecto a las que proporcionan ambos componentes en forma individual (Dickinson 1993).

La capacidad de las proteínas de suero de leche para formar geles bajo condiciones específicas es una propiedad funcional importante para obtener varios productos alimenticios de textura y características sensoriales deseables (Barbut 1993; Foegeding *et al.* 2002; Kinsella & Whitehead, 1989; Langton & Hermansson, 1992).

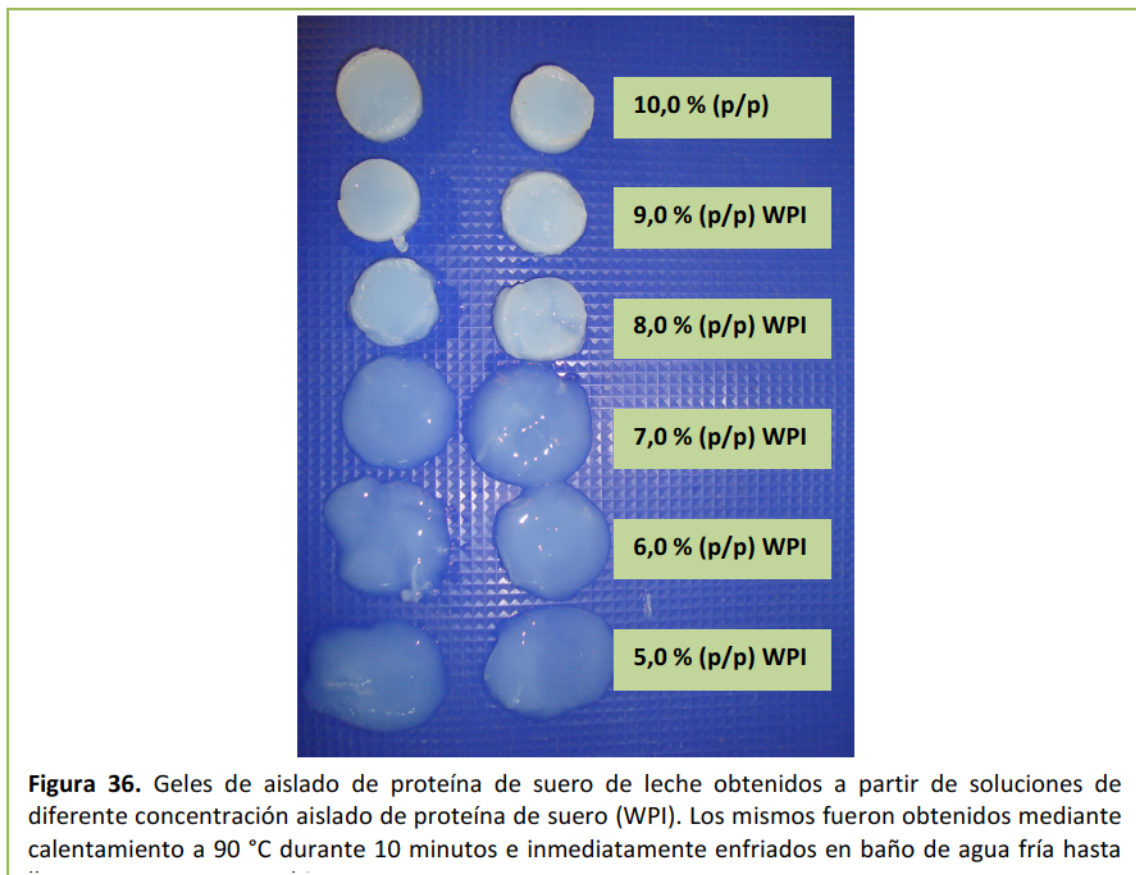
En esta parte del capítulo se estudió la formación de geles mixtos de kefirán y proteínas de suero de leche (WPI) con la finalidad de utilizarlos como vehículo de microorganismos probióticos. Para ello, se analizaron previamente las características del aislado de proteínas de suero de leche en lo referente a su capacidad de formar geles.

Geles de aislado de proteína de suero: Selección de las concentraciones de proteína capaces de formar geles.

En una primera etapa se analizó el efecto de la concentración de proteínas en la obtención de geles, y las condiciones de proceso para su obtención. Se realizaron geles de aislado de proteína de suero de leche (WPI) a concentraciones de 2,0 % a 10,0 % (p/p) de WPI en *buffer* fosfato pH 7. Las soluciones fueron calentadas durante 10 minutos a 90 °C, para permitir la desnaturalización de las proteínas de suero de leche (Figura 35) y luego enfriadas inmediatamente en baño de agua fría hasta llegar a temperatura ambiente.



Se evaluaron macroscópicamente los geles obtenidos y se presentan en la Figura 36. Los geles obtenidos a partir de soluciones 8,0 %; 9,0 % y 10,0 % (p/p) de WPI resultaron duros y firmes, y se formaron durante el calentamiento, mientras que los geles obtenidos a partir de soluciones 5,0 %; 6,0 % y 7,0 % (p/p) de WPI resultaron geles débiles y frágiles. Las concentraciones 2,0 % y 4,0 % (p/p) de WPI no permitieron la formación de un gel verdadero dando soluciones viscosas.





La gelificación implica la formación de una estructura tridimensional mediante una agregación progresiva de macromoléculas o partículas a través de uniones químicas o interacciones físicas bajo determinadas condiciones (Clark 1992; Renard & Lefebvre 1992; Tobitani & Ross-Murphy, 1977; Verheul & Roefs, 1998a). Las propiedades fisicoquímicas de los geles de proteína de suero de leche quedan definidas principalmente por las interacciones moleculares que definen la microestructura de los geles, las cuales dependen de la concentración de proteína, pH y la fuerza iónica de la solución (Barbut 1993; Foegeding *et al.* 1995; Langton & Hermansson, 1992; Shimada & Cheftel, 1988; Verheul & Roefs, 1998a, 1998b). Los resultados presentados en este trabajo permiten concluir que a partir de 8 % (p/p) de WPI se formaron geles duros, mientras que a concentraciones menores se obtuvieron soluciones y geles frágiles, indicando que la concentración de proteína juega un papel clave en la formación del gel. Trabajos previos demostraron que geles obtenidos con concentración de proteínas de suero entre 7 % y 20 % (p/p) presentan diferentes características de textura, mientras que a concentraciones superiores a 20 % (p/p) es difícil obtener una dispersión homogénea adecuada para la gelificación. Por otro lado, a concentraciones más bajas (< 7 % (p/p)) no se observa la formación de gel (Huffman 1996; Tang *et al.* 1995), coincidiendo con los resultados presentados en este trabajo.

La gelificación inducida por calor provoca la desnaturalización de las proteínas y la generación de nuevas interacciones hidrofóbicas entre las proteínas desplegadas (Dissanayake *et al.* 2013). Además, a pH 7, la gelificación se podría reforzar por el intercambio entre enlaces disulfuro-sulfhidrilo que se ven favorecidos a pH neutro (Lupano *et al.* 1992; Shimada & Cheftel, 1988; Yamul & Lupano, 2003), que pueden ser iniciados por β -lactoglobulina o α -lactoalbúmina, que tienen grupos SH libres (Lupano *et al.* 1992, 1996; Shimada & Cheftel, 1988).

Efecto del tratamiento a -20 °C en la formación de geles de proteína de suero de leche.

Para evaluar el efecto del proceso de congelación- descongelación utilizado para elaborar los geles de kefirán, en la preparación de los geles de proteínas de suero, se



procedió a realizar la preparación de los geles mediante la combinación de dos etapas. Una, correspondiente al proceso de desnaturalización y gelificación de las proteínas, que consiste en un calentamiento durante 10 minutos a 90 °C y luego enfriamiento en baño de agua fría hasta llegar a temperatura ambiente (ETAPA 1). Y otra, en la cual los geles obtenidos en el paso anterior fueron llevados a -20 °C durante 24 horas y otras 24 horas a 4 °C, lo que llamamos ETAPA 2. Las concentraciones de WPI utilizadas fueron 3,0; 4,0; 6,0; 7,0 y 8,0 % (p/p) a fin de ver el efecto de la Etapa 2 en geles débiles, como en geles más duros y consistentes. Los geles obtenidos se presentan en la Figura 37.

Los geles obtenidos en ambas condiciones mostraron diferencias en cuanto a textura y consistencia. El tratamiento de congelación-descongelación (enfriamiento a -20 °C durante 24 horas y luego almacenamiento a 4 °C - Etapa 2) utilizado en la elaboración de los geles, permitió la formación de nuevas interacciones entre los macrocomponentes ya que se observaron geles duros y firmes a partir de soluciones con 6,0 %; 7,0 % y 8,0 % (p/p) de WPI, a diferencia de los obtenidos solamente con la Etapa 1 donde se obtuvieron geles débiles (Figura 37 A). Los geles obtenidos utilizando ambas etapas a partir de soluciones con 3,0 % y 4,0 % (p/p) de WPI, resultaron ser geles autoportantes pero menos firmes que los obtenidos a concentraciones mayores (Figura 37 B). Sin embargo, a estas concentraciones no se formó gel en ausencia de este tratamiento (Figura 37 A).

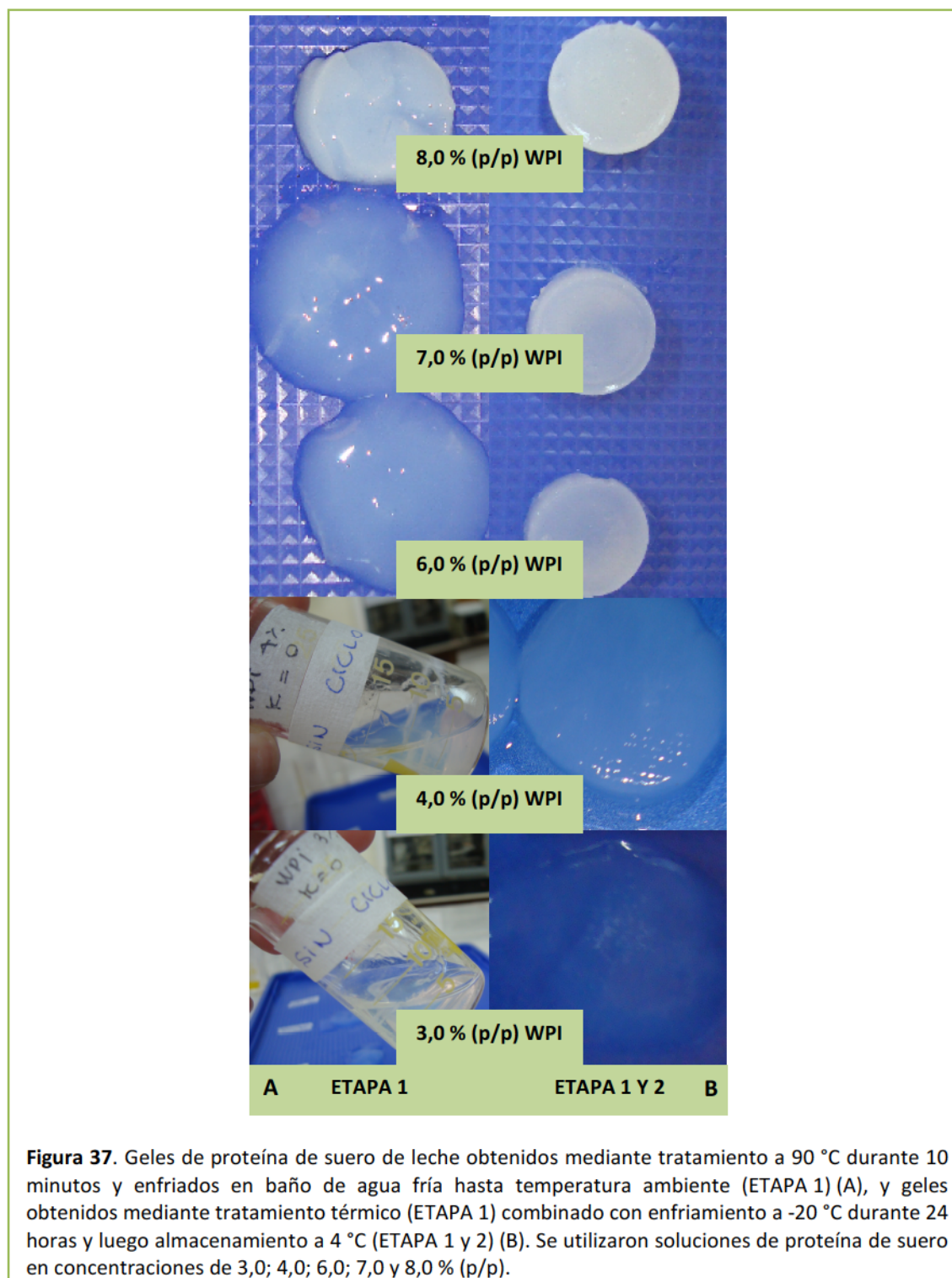


Figura 37. Geles de proteína de suero de leche obtenidos mediante tratamiento a 90 °C durante 10 minutos y enfriados en baño de agua fría hasta temperatura ambiente (ETAPA 1) (A), y geles obtenidos mediante tratamiento térmico (ETAPA 1) combinado con enfriamiento a -20 °C durante 24 horas y luego almacenamiento a 4 °C (ETAPA 1 y 2) (B). Se utilizaron soluciones de proteína de suero en concentraciones de 3,0; 4,0; 6,0; 7,0 y 8,0 % (p/p).

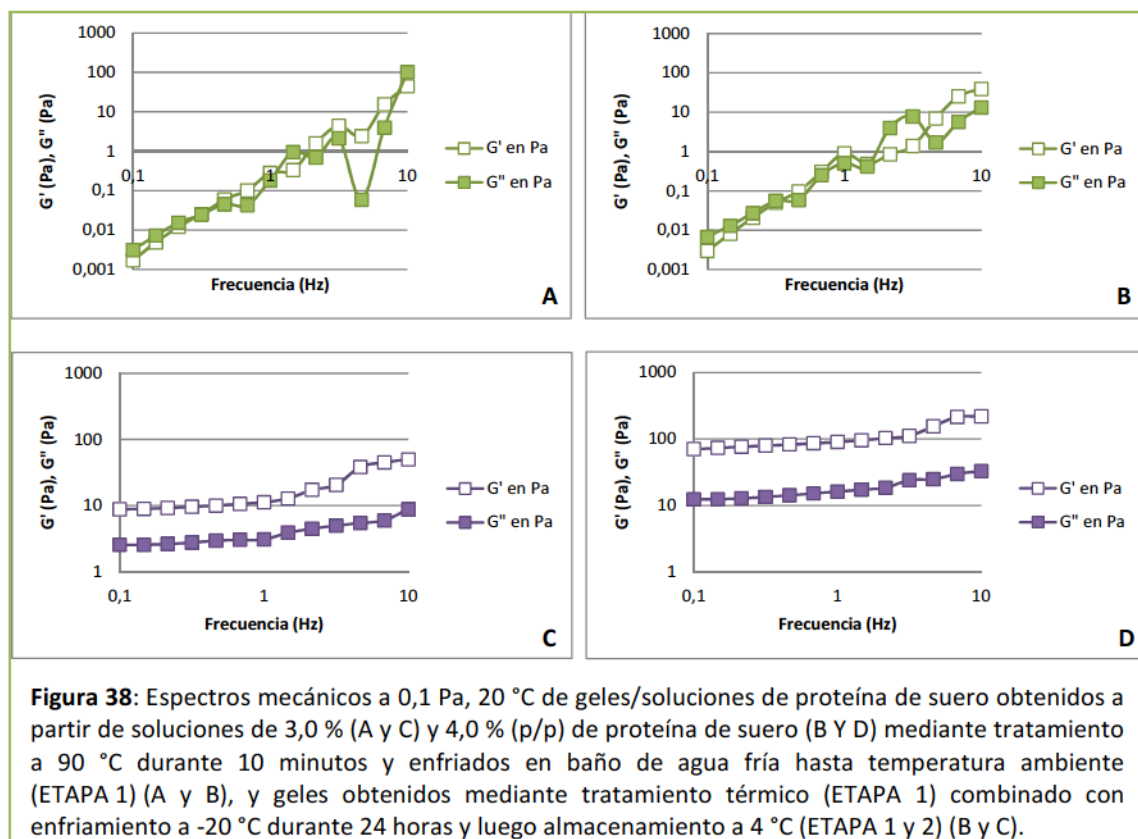
La gelificación en frío de soluciones de proteínas desnaturadas por calor ha sido previamente informada para β -lactoglobulina, concentrados de proteínas de suero de leche, y aislados de suero de leche (Vreeker *et al.* 1992; Barbut y Foegeding, 1993; Sato *et al.* 1995; Elofsson *et al.* 1997; Ju y Kilara, 1998a, b). Al enfriarse una solución de proteína de suero de leche precalentada se produce la desnaturación térmica de la



β -lactoglobulina que incluye la disociación del dímero, la pérdida de la estabilidad de la hélice a 65 °C aproximadamente y la formación de enlaces disulfuro (Holt 2000). La formación de estos enlaces disulfuro en geles obtenidos mediante tratamiento térmico a 90 °C está bien establecida (Hoffmann & van Mil. 1997). Estas uniones dan fuerza al gel y mejoran la estabilidad del mismo (Alting *et al.* 2000).

Debido a que la gelificación en frío puede ocurrir después de la adición de dicho componente a una matriz alimentaria, tiene un potencial considerable en la industria para la elaboración de productos congelados con texturas definidas (Bryant & McClements, 1998).

Se analizó el espectro mecánico de los geles obtenidos a partir de soluciones 3,0 % y 4,0 % (p/p) de WPI y de las soluciones mediante **reometría oscilatoria de baja amplitud de deformación**. El espectro mecánico proporciona información sobre el comportamiento de las muestras obtenidas dentro de la región de viscoelasticidad lineal.



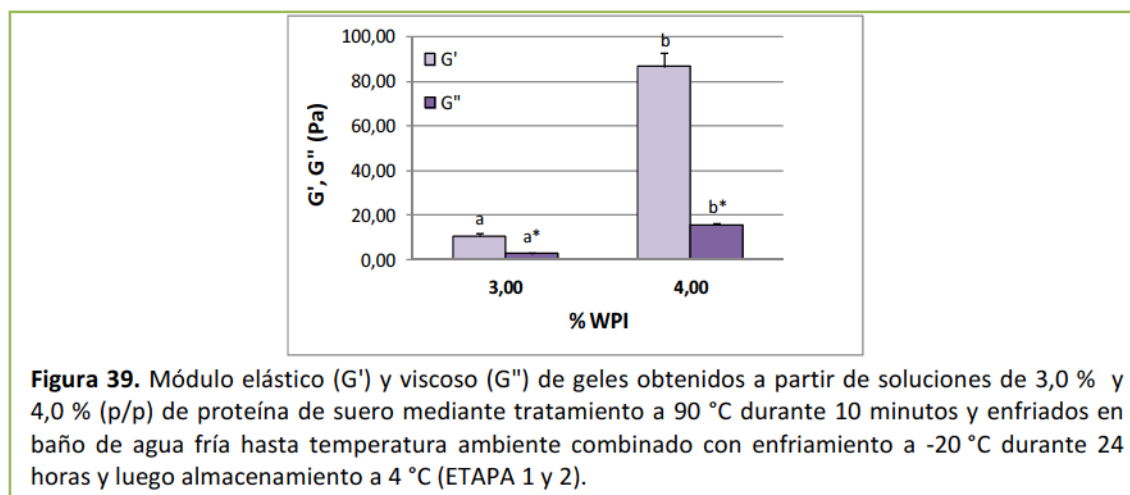
En la Figura 38 A y B se muestran los espectros correspondientes a las soluciones de proteína de suero de leche 3,0 % y 4,0 % (p/p) obtenidas mediante la Etapa 1. En



estas condiciones no se obtuvieron geles verdaderos sino que el comportamiento reológico fue el de una solución. La Figura 38 C y D muestra los resultados obtenidos cuando a las soluciones de proteína de suero de leche 3,0 % y 4,0 % (p/p) se les realizó además el proceso de congelación-descongelación (Etapa 1 y 2).

Se analizó la tangente del ángulo de desfase ($\tan(\delta)$) a 1 Hz de frecuencia. Los valores de $\tan(\delta)$ indicaron que solo estamos en presencia de geles cuando se realizaron ambas etapas para la obtención del gel ya que se obtuvieron valores de 0,27 y 0,18 de $\tan(\delta)$ para 3,0 % y 4,0 % (p/p) de WPI, respectivamente, mientras que en ausencia del proceso de congelación-descongelación los valores obtenidos fueron 0,60 y 0,56 respectivamente, indicando ausencia de gel.

En aquellas condiciones donde se obtuvo un comportamiento reológico de gel se evaluó el módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G'') a 1 Hz de frecuencia (Figura 39). Se observó que ambos módulos aumentan con la concentración de proteína siendo el valor de G' de 10,47 Pa y 86,51 Pa y el de G'' de 2,81 Pa y 15,71 Pa para los geles preparados con 3,0 % y 4,0 % (p/p) de WPI, respectivamente.



Diferentes tipos de interacciones intervienen en la formación del gel proteico, tales como interacciones de van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas y enlaces covalentes (por ejemplo, puentes disulfuro) (Kinsella & Whitehead, 1989; Ziegler & Foegeding, 1990). La gelificación inducida por calor de β -Lactoglobulina (β -Lg) ha sido estudiada a diferentes pH (Clark *et al.* 2001; Langton & Hermansson, 1992; Relkin 1996; Stading & Hermansson, 1991,



1992). A pH neutro, la β -Lg tiene una carga negativa muy alta, la cual resulta en interacciones repulsivas y buena interacción con el solvente facilitando su desnaturalización. Durante la transición conformacional de β -Lg en el rango de pH 6 - 9 ocurre un aumento de la actividad del grupo tiol, debido a que el pK de este grupo es ~ 8 (Dunnill & Green, 1966); por lo tanto, las reacciones de intercambio tiol-disulfuro son más probables en este rango de pH. A valores de pH mayores a 6, la molécula de β -Lg nativa se desnaturaliza por calor y luego la molécula desnaturalizada se agrega por medio de uniones disulfuro. Si la concentración es suficientemente alta estos agregados interaccionan formando la estructura del gel. Es factible pensar que en los geles obtenidos en este trabajo elaborados a pH 7, exista un importante intercambio entre grupos tiol-disulfuro que contribuyan a la estructura del gel.

Geles mixtos de proteína de suero de leche y kefirán.

Tal como se dijo anteriormente, las proteínas de suero de leche se utilizan cada vez más para la formación de geles en diversos alimentos, incluyendo productos lácteos y postres, bebidas, productos de confitería y productos cárnicos (de Wit 1998). Por otra parte, en presencia de polisacáridos, forman una amplia gama de geles con diferentes propiedades físicas (Tolstoguzov 1986). Geles mixtos de proteína de suero de leche y polisacárido se utilizan para elaborar alimentos tanto naturales como industriales. La presencia de diversos polisacáridos modifica la microestructura y las propiedades mecánicas de los geles mixtos.

Se evaluó el agregado de 1,0 % (p/p) de kefirán sobre geles obtenidos a partir de soluciones de 3,0; 4,0; 6,0; 7,0 y 8,0 % (p/p) de WPI. Al desconocer la interacción de las proteínas de suero de leche con el kefirán, se estudió el agregado del mismo en geles proteicos débiles (3,0 % y 4,0 %), como en geles proteicos firmes (6,0 %; 7,0 % y 8,0 %) para indagar el efecto del kefirán sobre los mismos, a fin de obtener geles autoportantes capaces de funcionar como vehículo de microorganismos probióticos.

Como la elaboración de los geles conlleva una etapa de calentamiento, los microorganismos deben ser adicionados luego de ésta, a fin de conservar su viabilidad, Es por ello que en esta etapa (Etapa 1) se necesita obtener una solución que luego de



someterla al proceso de congelación-descongelación (Etapa 2) dará lugar a la formación del gel. A modo de ejemplo, en la Figura 40 se muestra el aspecto de las soluciones de WPI luego del calentamiento a 90 °C durante 10 minutos y enfriados inmediatamente en baño de agua fría hasta alcanzar temperatura ambiente (Etapa 1).

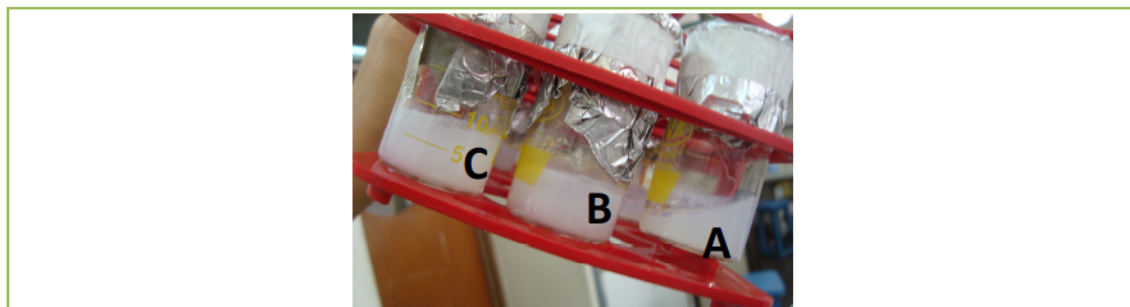


Figura 40. Aspecto de las soluciones/geles de proteínas de suero de leche (WPI) y kefirán 1,0 % (p/p) después del calentamiento en baño de agua a 90 °C durante 10 minutos e inmediatamente enfriados en baño de agua fría hasta temperatura ambiente (Etapa 1). A - 4,0 % (p/p); B - 6,0 % (p/p); C - 7,0 % (p/p) de aislado de proteína de suero de leche.

Cuando las soluciones de kefirán y WPI fueron calentadas durante 10 minutos a 90 °C, y luego enfriadas inmediatamente en baño de agua fría hasta llegar a temperatura ambiente (Etapa 1), sólo las muestras correspondientes a una concentración de WPI 3,0 % y 4,0 % (p/p) se mantuvieron líquidas al alcanzar temperatura ambiente, tal como se observa en la Figura 40 A. Mientras que soluciones con concentraciones mayores a éstas (6,0 %; 7,0 % y 8,0 %), gelificaron durante el calentamiento a 90 °C y enfriamiento en baño de agua fría (Figura 40 B y C).

Para continuar con el análisis, se seleccionaron los geles mixtos obtenidos a partir de soluciones 3,0 % y 4,0 % (p/p) de WPI y 1,0 % (p/p) de kefirán utilizando para su elaboración el proceso completo combinando ambas etapas. Estas condiciones de elaboración de los geles son compatibles para su uso como vehículos de microorganismos. Llamaremos **3WPI-K** a los geles mixtos obtenidos a partir de 3,0 % (p/p) de WPI y 1,0 % (p/p) de kefirán, y **4WPI-K** a los geles obtenidos a partir de 4,0 % (p/p) de WPI y 1,0 % (p/p) de kefirán, obtenidos mediante ambas etapas. En concentraciones superiores de WPI en presencia del polisacárido la gelificación ocurrió durante la Etapa 1, descartando esta condición ya que no era apta para la inclusión de microorganismos. En la Figura 41 se muestran los geles de kefirán y WPI obtenidos.

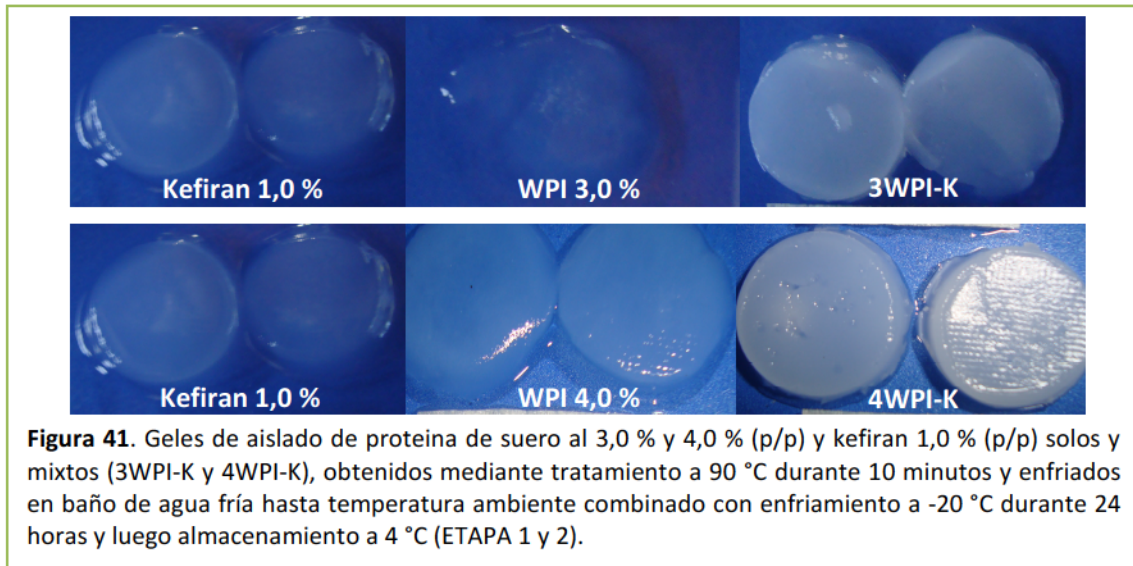


Figura 41. Geles de aislado de proteína de suero al 3,0 % y 4,0 % (p/p) y kefiran 1,0 % (p/p) solos y mixtos (3WPI-K y 4WPI-K), obtenidos mediante tratamiento a 90 °C durante 10 minutos y enfriados en baño de agua fría hasta temperatura ambiente combinado con enfriamiento a -20 °C durante 24 horas y luego almacenamiento a 4 °C (ETAPA 1 y 2).

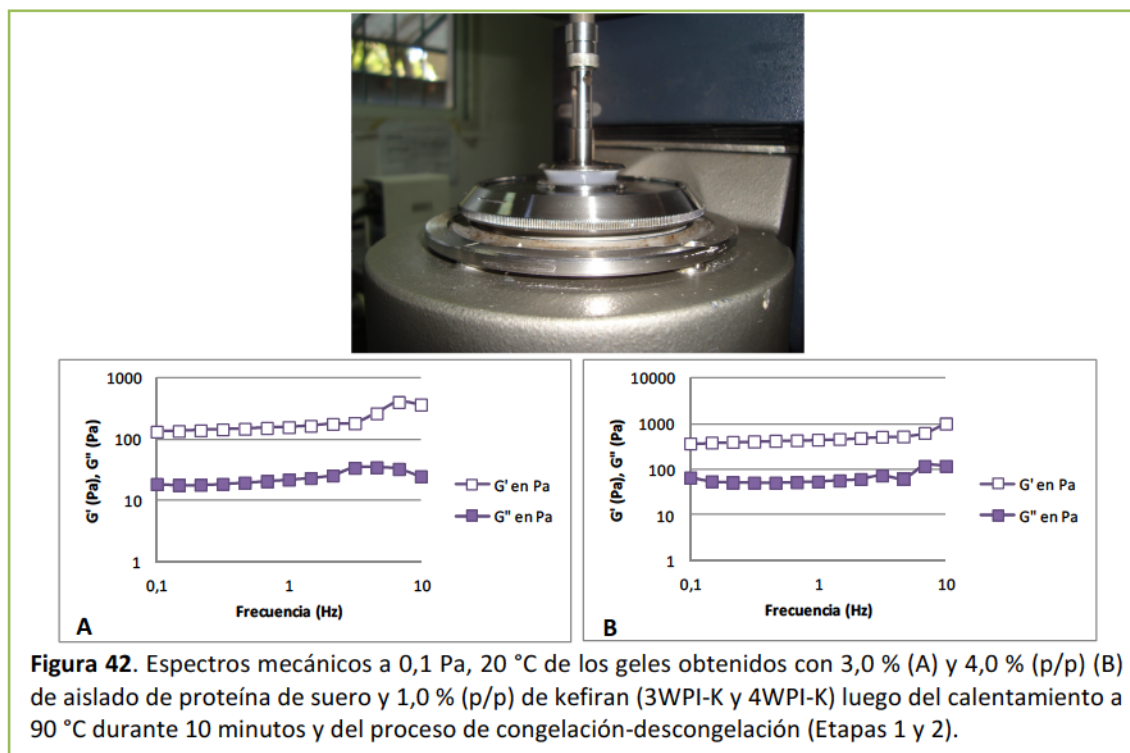
Analizando el aspecto macroscópico de los geles mixtos se pudo concluir que el kefiran tuvo un efecto positivo reforzando la estructura de los geles de proteína de suero de leche (WPI) respecto a los geles elaborados en ausencia del polisacárido. El mismo resultado fue descrito previamente por Spotti *et al.* (2014) para geles de WPI donde la adición de dextrano produjo un aumento en la rigidez del gel y una mejora del carácter elástico.

Desde el punto de vista de los consumidores, la firmeza y la cremosidad son las principales características sensoriales más importantes en quesos untables y postres lácteos. Estas características son muy complejas y no pueden definirse con una sola propiedad física medida. Varias metodologías fisicoquímicas pueden predecir la formación de las estructuras de los geles en soluciones de más de un componente. En lo que respecta a las propiedades reológicas, dos características son importantes, la viscosidad y la elasticidad que se reflejan en la calidad organoléptica del producto y su apariencia. La viscosidad es la propiedad de un material para resistir a la deformación y se relaciona directamente con la fluidez, mientras que la elasticidad representa la propiedad de un material para recuperarse después de una deformación (Renard *et al.* 2006).

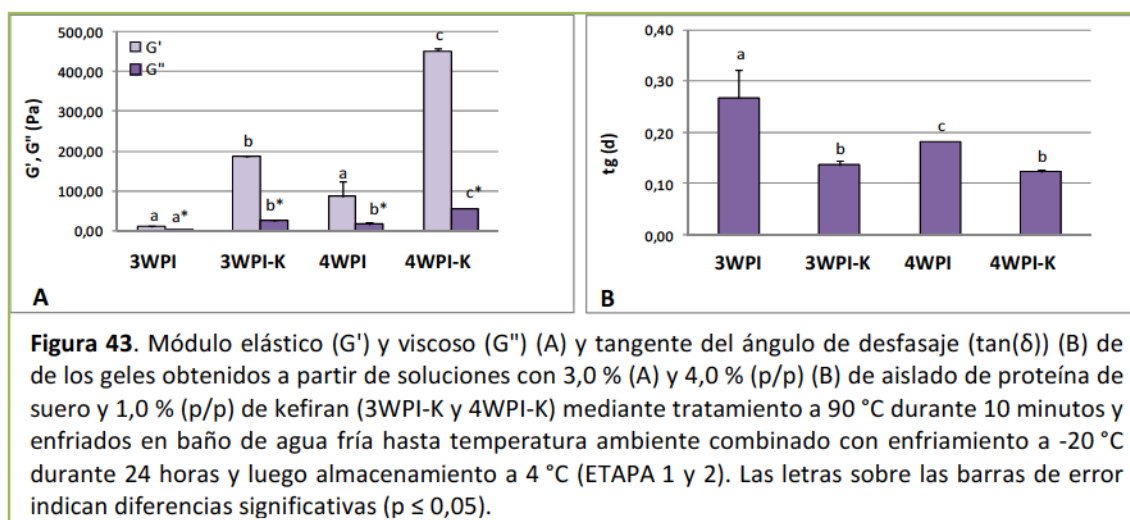
Para caracterizar los geles mixtos obtenidos con 1,0 % (p/p) de kefiran y 3,0 % y 4 % (p/p) de WPI (3WPI-K y 4WPI-K) se utilizó **reometría oscilatoria de baja amplitud de deformación**. Se analizó el espectro mecánico de los geles (esfuerzo 0,1 Pa) dentro del



rango de viscoelasticidad lineal. El módulo elástico (G') de los geles de kefiran con proteínas fue mayor que el módulo viscoso (G'') a todas las frecuencias estudiadas y ambos módulos fueron prácticamente independientes de la frecuencia lo que indica un comportamiento de gel (Figura 42) (Picout & Ross-Murphy, 2001).



El módulo elástico (G'), el módulo viscoso (G'') y la tangente del ángulo de desfase $\tan(\delta)$ fueron evaluados a 1 Hz de frecuencia (Figura 43).





Al incorporar kefirán a las soluciones de WPI, aumentó el módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G'') de los geles obtenidos, y disminuyó la tangente del ángulo de desfase $\tan(\delta)$ a ambas concentraciones de proteínas estudiadas. El efecto del kefirán fue más pronunciado en los geles preparados con mayor concentración de proteína hecho que puede observarse en un mayor incremento porcentual en ambos módulos. Estos resultados indicarían que el kefirán influye en la estructura del gel favoreciendo uniones que refuerzan la estructura.

Comparando los geles mixtos de proteína de suero y kefirán (3WPI-K y 4WPI-K), se pudo observar que tanto el módulo elástico como el módulo viscoso fueron significativamente mayores al aumentar la concentración de proteína. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los valores de la $\tan(\delta)$ de ambos geles mixtos.

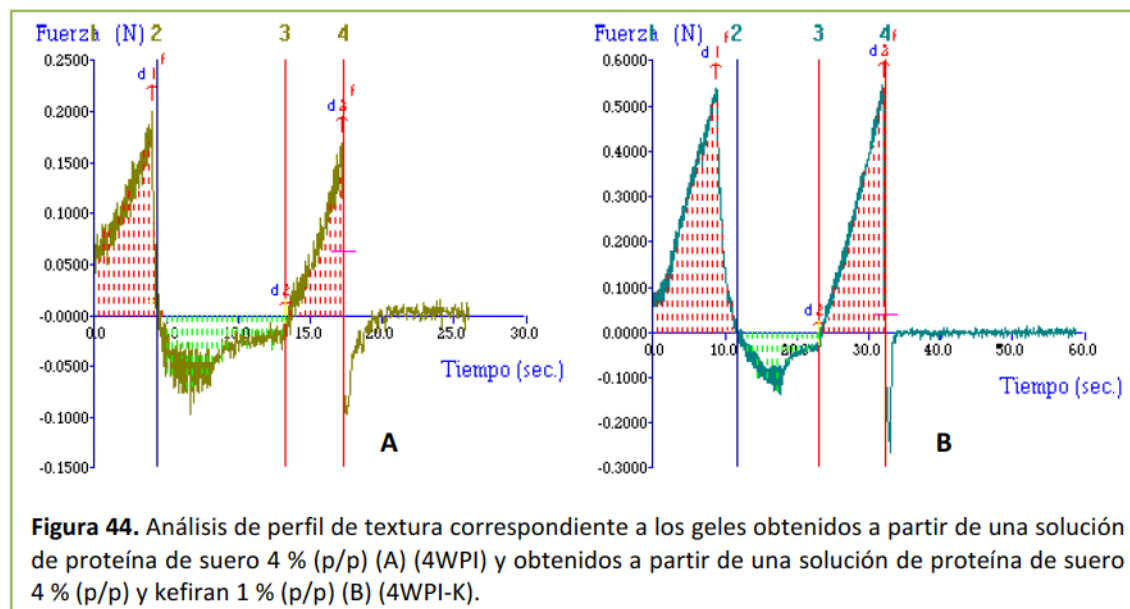
Fitzsimons *et al.* (2008) estudiaron el comportamiento de sistemas mixtos de WPI y goma guar con concentraciones de proteína del 3 % (p/p) y encontraron que el agregado de bajas concentraciones de goma guar aumentaba el valor del módulo elástico del gel, sin embargo concentraciones mayores provocaban una disminución de este valor, lo que fue atribuido a una excesiva agregación de la proteína, con una precipitación incipiente, con lo cual el gel finalmente colapsaba. Estos resultados difieren de los encontrados en el presente trabajo, indicando que cada sistema polisacárido-proteína es específico.

Durante la masticación el alimento experimenta cambios debido a que se modifica la temperatura, la humedad y se somete a esfuerzos y deformaciones que son percibidos antes de tragar (van Vliet 2002). El análisis de **perfil de textura** es una evaluación que en cierto modo imita el proceso de masticación (Szczesniak 2002).

Cuando los geles de kefirán fueron evaluados mediante análisis de perfil de textura se obtuvieron curvas de fuerza-tiempo. A modo de ejemplo, en la Figura 44 se presentan los perfiles correspondientes a dos de los geles analizados, geles de WPI al 4,0 % (p/p) (**4WPI**) y geles mixtos de WPI 4,0 % (p/p) y kefirán 1,0 % (p/p) (**4WPI-K**).



En los perfiles de textura de los geles, pudieron observarse claramente los picos correspondientes a cada uno de los ciclos de compresión efectuados y la aparición del pico negativo que representa la adhesividad.



A partir de los gráficos de perfil de textura se calculó la dureza ($F_{m\acute{a}x}$) de los geles, la cohesividad (A_2/A_1), la adhesividad ($|A_3|$), y el parámetro elasticidad (d_2/d_1) (Tabla 10).

Tabla 10. Valores de dureza ($F_{m\acute{a}x}$), cohesividad (A_2/A_1), adhesividad ($|A_3|$), y elasticidad (d_2/d_1) de los geles proteicos y mixtos obtenidos. Las letras presentan diferencias significativas para cada parámetro

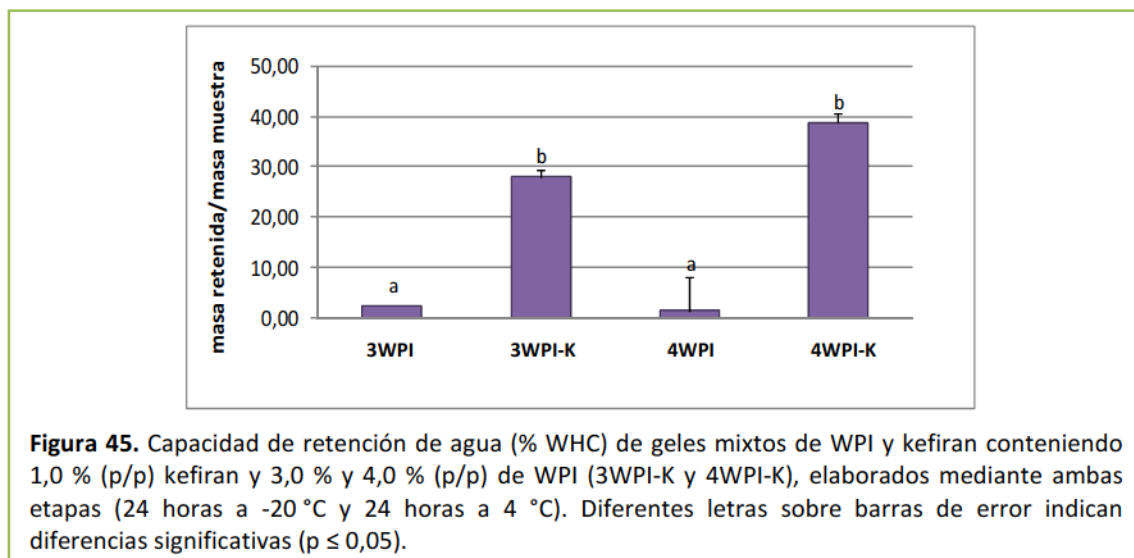
	WPI		WPI-K	
	3,0 %	4,0 %	3,0 %	4,0 %
Dureza (N)	0,140 ± 0,007 ^a	0,211 ± 0,004 ^{ab}	0,231 ± 0,050 ^b	0,574 ± 0,031 ^c
Cohesividad (%)	ND	48,42 ± 9,39 ^a	64,82 ± 3,86 ^a	74,44 ± 3,86 ^a
Adhesividad (N.s)	1,54 ± 0,14 ^a	0,37 ± 0,08 ^{bc}	0,18 ± 0,08 ^b	0,67 ± 0,02 ^c
Elasticidad (%) d_3/d_1	ND	99,63 ± 11,43 ^a	102,57 ± 3,20 ^a	101,03 ± 0,91 ^a

Los geles preparados con 3,0 % (p/p) de WPI resultaron ser débiles y en consecuencia no pudo determinarse la cohesividad ni la elasticidad en las condiciones del ensayo. Sin embargo, el agregado de kefirán aumentó la dureza y permitió la determinación de estos parámetros.

El agregado de kefirán a los geles elaborados con 4,0 % (p/p) de WPI aumentó la dureza y no se obtuvieron diferencias significativas en los otros parámetros.

Al comparar los parámetros obtenidos en los geles mixtos, al aumentar la concentración de WPI se observó un aumento de la dureza y la adhesividad, no encontrándose diferencias significativas en los otros parámetros. Los geles con WPI 4,0 % (p/p) y kefirán presentaron el mayor valor de dureza de $0,574 \pm 0,003$ N. Este valor fue similar al valor de dureza encontrado por Salvador & Fiszman (1998) al caracterizar geles obtenidos a partir de leche acidificada con δ -gluconolactona adicionada de gelatina al 3 %. Estos autores, trabajando con el mismo equipo utilizado en este trabajo y en similares condiciones de ensayo, encontraron valores de dureza entre 0,57 N y 0,94 N. Yamul & Lupano (2005) estudiaron geles mixtos de proteínas de suero de leche con harina de trigo y observaron un aumento en la firmeza, elasticidad y adhesividad de los geles mixtos respecto a los geles de proteína de suero. El agregado de kefirán, al igual que el agregado de la harina de trigo, produjo un aumento en la firmeza de los geles. Las modificaciones inducidas por el kefirán en los otros parámetros dependieron de la concentración de proteína de suero estudiada.

Por último, se procedió a la determinación de la **capacidad de retención de agua (WHC)**. Para ello los geles fueron sometidos a una fuerza centrífuga, como se indicó en Materiales y Métodos y los resultados obtenidos se presentan en la Figura 45.

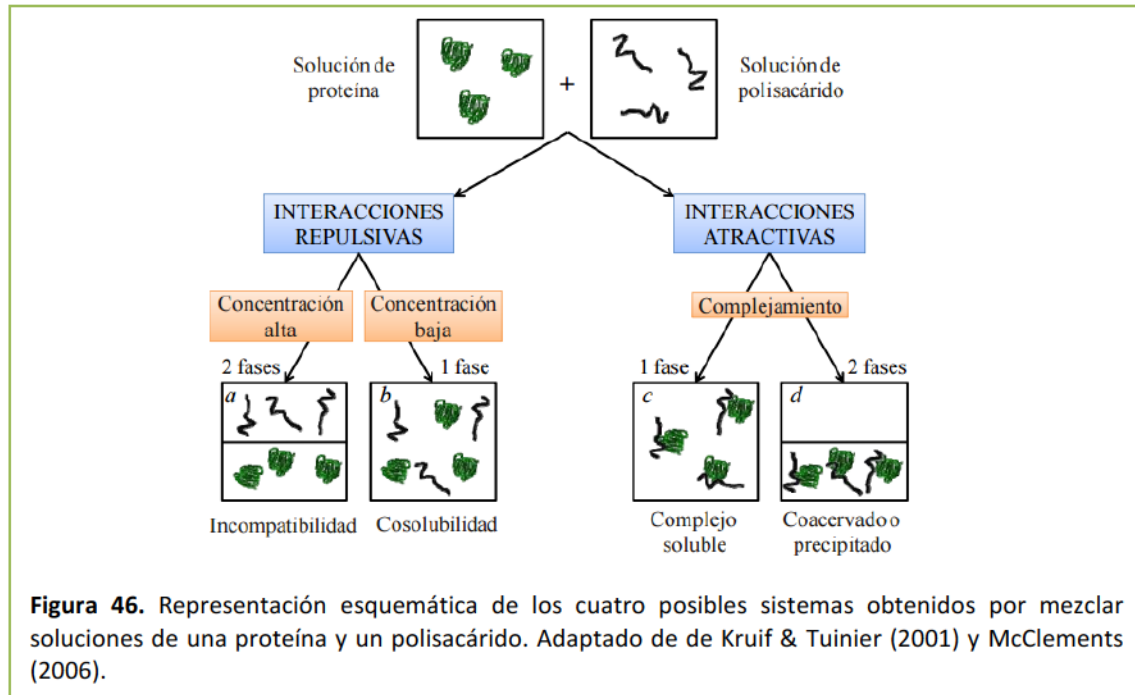




Los valores de WHC de los geles obtenidos a ambas concentraciones de WPI no mostraron diferencias significativas entre ellos, tanto en los geles proteicos, como en los geles mixtos ($p > 0,05$). Sin embargo, se observó un aumento significativo en la capacidad de retención de agua de los geles mixtos respecto a los geles proteicos, posiblemente debido a que el kefirán posee una alta capacidad de interactuar con las moléculas de agua por su naturaleza glucídica. La capacidad de retención de agua de los geles mixtos de proteína y kefirán fue menor a la de los geles de kefirán con azúcares analizados previamente, demostrando la importancia de las moléculas glucídicas en este parámetro.

Muchas mezclas de agentes gelificantes son utilizadas en alimentos procesados y productos alimenticios destinados a la confitería y productos de panadería (Tolstoguzov 1995). En la industria alimentaria, se han utilizado geles de gelatina adicionados con diferentes polisacáridos para el desarrollo de un caviar analógico (Tolstoguzov 1978, 1979, 1995; Braudo *et al.* 1986; Tolstoguzov *et al.* 1973). Además, geles de alginato de calcio con almidón y proteínas también fueron descritos previamente para el uso de productos en la elaboración de pasta no tradicional (Tolstoguzov *et al.* 1975, 1976, 1978; Tolstoguzov 1979). Otra aplicación que está cobrando interés es la utilización de componentes capaces de formar geles como sustitutos de grasa para la producción de alimentos con bajo contenido graso (Zasytkin *et al.* 1997).

Las interacciones entre proteínas y polisacáridos se pueden dividir en dos grupos: interacciones atractivas o interacciones repulsivas, y pueden estar dadas por diferentes tipos de fuerzas (Figura 46).



La interacción de los dos biopolímeros puede ser segregativa (los biopolímeros se repelen unos a otros y entonces se definen como incompatibles) o asociativa (los biopolímeros se atraen unos a otros) (de Kruif & Tuinier, 2001; McClements 2006; Tolstoguzov 1986; Tolstoguzov 2003).

Cuando predominan las fuerzas de repulsión entre los biopolímeros (por ejemplo si ambos poseen la misma carga neta), puede obtenerse un sistema de dos fases donde cada componente se encuentra en fases diferentes (a). En soluciones diluidas la mezcla es estable debido al efecto predominante de la entropía de mezclado y la proteína y el polisacárido son cosolubles: sistema (b).

En condiciones en las que existe atracción entre las moléculas de los distintos biopolímeros (los biopolímeros poseen carga neta opuesta) puede producirse la formación de complejos no solubles que precipitan, obteniéndose dos fases separadas: una fase “coacervada” que contiene a los complejos y otra fase diluida, con baja concentración de ambos biopolímeros (“coacervación compleja”: sistema (d)). En ciertos casos las atracciones electrostáticas pueden llevar a la formación de complejos solubles, obteniéndose un sistema de una sola fase. En este caso estamos en presencia del efecto de solubilidad por complejamiento: sistema (c) (Tolstoguzov 1986, 1990, 1991; Tolstoguzov *et al.* 1985). Teniendo en cuenta los resultados presentados, el kefirán y las proteínas de suero podrían interactuar mediante la formación de complejos solubles,



ya que el kefirán neutro podría interactuar con las proteínas de suero a partir de interacciones no iónicas o bien que no interaccionen pero permanezcan ambos solubles (cosolubilidad).

En la Tabla 11 se presenta a modo de resumen el efecto ejercido por el kefirán a los geles de proteína de suero. El agregado de kefirán a los geles de proteína de suero aumentó la opacidad de los geles, a su vez, se observó una disminución de la tangente del ángulo de desfase ($\tan(\delta)$) debido a que el aumento del módulo elástico (G') fue mayor al aumento del módulo viscoso (G''), hecho que indica un aumento del carácter sólido de los geles. Asimismo, la capacidad de retención de agua (WHC) de los geles aumentó en presencia del kefirán respecto a los geles proteicos debido a la capacidad del polisacárido de interactuar con las moléculas de agua. Se observó también un aumento en la dureza de los geles mixtos respecto de los geles proteicos, sin observarse diferencias en la cohesividad y elasticidad con el agregado de kefirán.

Tabla 11. Efecto del agregado de kefirán en el aspecto macroscópico y caracterización fisicoquímica de geles de aislado de proteína de suero de leche.

Efecto kefirán	
Opalescencia	↑
G'	↑
G''	↑
$\tan(\delta)$	↓
WHC	↑
Dureza	↑
Cohesividad	=
Elasticidad	=

Fitzsimons *et al.* (2008) encontraron que las interacciones segregativas en sistemas mixtos de WPI y goma guar (una fase única) promovieron la agregación de las proteínas del suero desnaturalizadas y que la velocidad y la agregación aumentó con el aumento de la concentración de goma guar. Después del calentamiento de sistemas mixtos de pectina y proteínas del suero también se observaron diferentes distribuciones de peso molecular y un aumento en el tamaño promedio de los agregados (Beaulieu *et al.* 2005).

La incompatibilidad de los polisacáridos con las proteínas (interacción segregativa) disminuye en el siguiente orden: polisacáridos con grupos carboxilo >



polisacáridos neutros > polisacáridos con grupos sulfato; además, los polisacáridos lineales son más incompatibles con proteínas que los polisacáridos ramificados (Grinberg & Tolstoguzov, 1997). Capron *et al.* (1999) investigaron la agregación térmica de β -Lg en presencia de κ -carragenano (polisacárido con grupos sulfato). La agregación térmica de β -Lg a pH 7 sigue un mecanismo de dos etapas: primero la formación de agregados globulares pequeños y segundo la asociación de estos pequeños glóbulos en agregados más grandes. Aymard *et al.* (1996), demostraron que el polisacárido acelera la agregación (segunda etapa) y al formar los geles mixtos observaron una separación de microfases entre los grandes agregados de β -Lg y κ -carragenano, lo que aumenta la concentración local de la proteína y por lo tanto su cinética de agregación. Sugirieron que probablemente otros polisacáridos podrían provocar el mismo efecto.

Los resultados de este trabajo mostraron que la asociación entre WPI y kefirán en solución acuosa tiene un fuerte impacto sobre las propiedades funcionales. El hecho de que el aislado proteico gelifique en presencia de kefirán, en concentraciones donde observamos que la proteína sola no gelificaba, demuestra que existe un efecto sinérgico en estos sistemas mixtos. Este efecto sinérgico se puede atribuir principalmente al fenómeno de “volúmenes de exclusión”. El kefirán es un polisacárido neutro y podría capturar moléculas de agua promoviendo las interacciones proteína-proteína que aumentarían la dureza del gel (Tabla 10). Sin embargo, no se puede descartar que el kefirán interactúe con las proteínas y forme parte de la matriz gel (efecto asociativo).

Estos dos efectos pueden resultar en cambios específicos sobre las propiedades funcionales (Carp *et al.* 2001; Tolstoguzov 1997b) y en la posibilidad de controlar y mejorar las propiedades de los geles, pudiendo ser explotado para el diseño de alimentos con una textura deseada conteniendo kefirán como un ingrediente bioactivo.

De esta manera, el conocimiento y la caracterización de las interacciones entre proteínas y polisacáridos permitirán la manipulación de propiedades macroscópicas de productos alimenticios, controlando las interacciones de un modo deseable, y logrando así la optimización en el uso de los ingredientes alimentarios.

Teniendo en cuenta los resultados presentados se seleccionaron los geles obtenidos a partir de kefirán 1,0 % (p/p) y 3,0 % (p/p) de proteína de suero (WPI) como vehículo para los microorganismos probióticos, condición donde después del



calentamiento y enfriamiento hasta temperatura ambiente se mantienen los componentes en solución y después del ciclo de congelación - descongelación se forman geles autoportantes. La Figura 47 muestra el aspecto de los geles obtenidos en dicha condición.

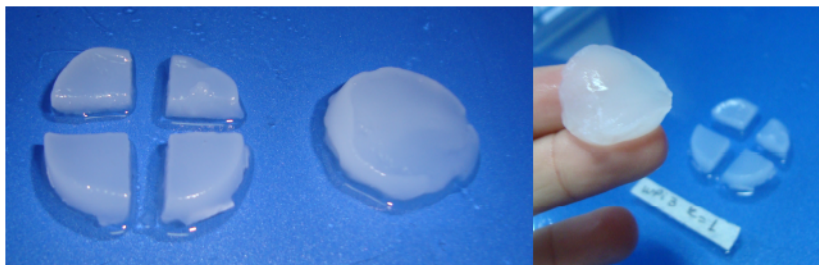


Figura 47. Aspecto de los geles obtenidos a partir de suspensiones de 3,0 % (p/p) de aislado de proteína de suero (WPI) y 1,0 % (p/p) de kefirán, elaborados mediante tratamiento a 90 °C durante 10 minutos, enfriados en baño de agua hasta temperatura ambiente, congelados a -20 °C durante 24 horas y almacenados a 4 °C (Etapas 1 y 2).

Inclusión de microorganismos en geles

En base a los resultados obtenidos en el Capítulo I se seleccionaron *L. kefir* CIDCA 83102 y *L. paracasei* CIDCA 8339 para su inclusión en los geles combinados de kefirán y WPI. Estos lactobacilos resistieron las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, aumentaron significativamente la adhesión a epitelio luego de someterse al estrés ácido y de bilis, y presentaron actividad antagonica frente a *Salmonella* Enteritidis.

En función de los resultados obtenidos se seleccionó como vehículo de los microorganismos los geles obtenidos a partir de soluciones de kefirán 1,0 % (p/p) y proteínas de suero de leche (WPI) 3,0 % (p/p). A los mismos se les adicionó fructosa 12,0 % (p/p) como responsable del dulzor. La concentración de fructosa fue estimada a partir de la concentración de sacarosa presente en gelatina comercial en base a su poder edulcorante equivalente.

Los geles combinados de kefirán, WPI y fructosa utilizados como vehículos de microorganismos se muestran en la Figura 48.

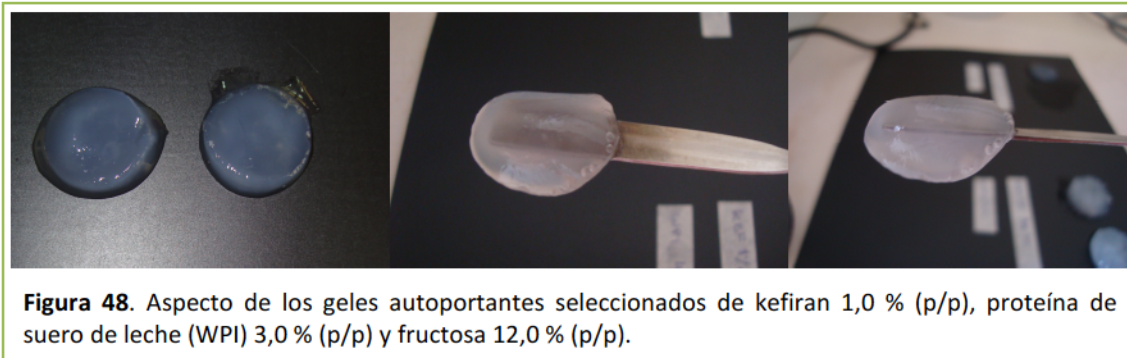


Figura 48. Aspecto de los geles autoportantes seleccionados de kefirán 1,0 % (p/p), proteína de suero de leche (WPI) 3,0 % (p/p) y fructosa 12,0 % (p/p).

Resistencia de *L. paracasei* 8339 y *L. kefiri* 83102 al proceso de formación del gel.

Para la elaboración de los geles mixtos con microorganismos (condición Gel) los mismos fueron adicionados a la solución de kefirán (1,0 % (p/p)), proteínas de suero de leche (WPI 3,0 % (p/p)) y fructosa (12,0 % (p/p)) luego del tratamiento térmico a 90 °C y enfriamiento a temperatura ambiente (Etapa 1) en una condición donde todavía los componentes de la matriz se encuentran en solución para lograr una adecuada distribución de los microorganismos. Posteriormente se realizó el ciclo de congelación-descongelación correspondiente a la última etapa de formación del gel (Etapa 2). Se analizó la supervivencia de los microorganismos al proceso de elaboración de los geles.

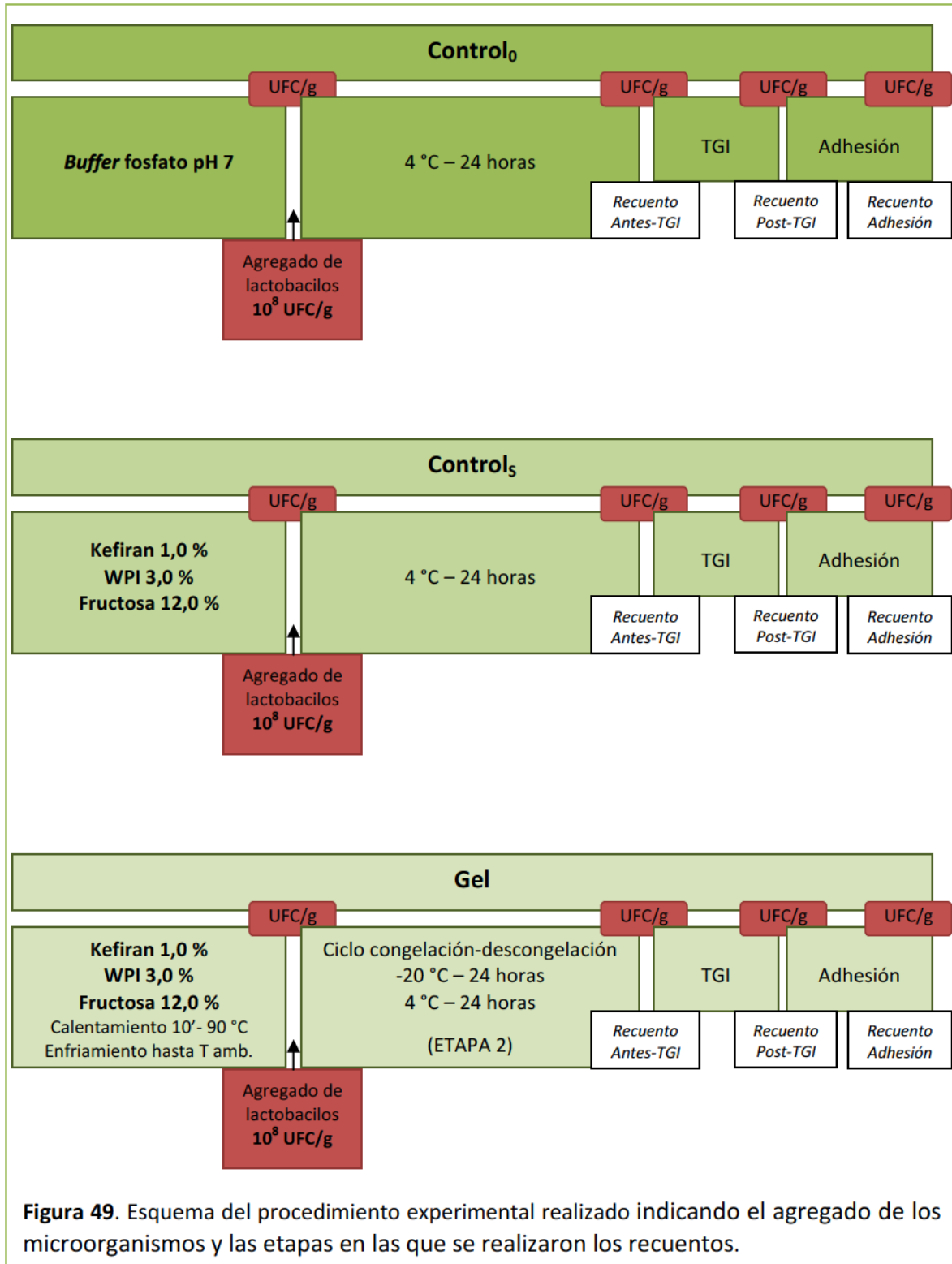
Se realizaron dos controles:

Control cepa (Control₀): donde los microorganismos (10^8 UFC/g) se resuspendieron en *buffer* fosfato pH 7.

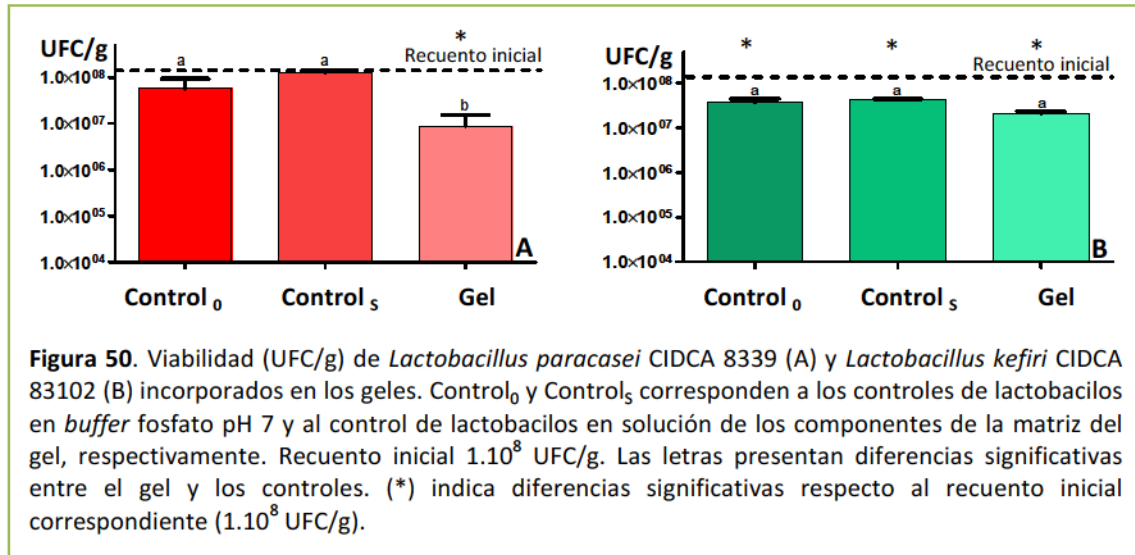
Control Solución (Control_S): donde los microorganismos (10^8 UFC/g) se incluyeron en una solución de kefirán 1,0 % (p/p), proteínas de suero de leche (WPI) 3,0 % (p/p) y fructosa 12,0 % (p/p).

Las soluciones (Control₀ y Control_S) se mantuvieron durante 48 horas a 4 °C.

En la Figura 49 se muestra el esquema experimental indicando el agregado de los microorganismos y las etapas en las que se realizaron los recuentos.



Estos ensayos se realizaron incorporando en los geles *L. paracasei* CIDCA 8339 y *L. kefir* CIDCA 83102. Los resultados obtenidos en cada condición se muestran en la Figura 50.



En la Figura 50 A se muestran los resultados obtenidos cuando se incorporó al gel *L. paracasei* CIDCA 8339. Se puede observar que el proceso de congelación-descongelación correspondiente a la formación del gel afectó significativamente la viabilidad de *L. paracasei* CIDCA 8339, respecto a los controles que no fueron sometidos a la congelación-descongelación. Esto podría indicar que la congelación afecta la viabilidad de este microorganismo o bien, parte de los mismos quedarían adheridos a la matriz del gel dificultando el recuento posterior.

Sin embargo, al analizar los resultados obtenidos al incorporar *L. kefir* CIDCA 83102, todos los recuentos fueron significativamente diferentes respecto al recuento inicial (1.10^8 UFC/g). Esto indicaría que tanto el almacenamiento a 4 °C durante 48 horas como el proceso de congelación-descongelación, afectaron la viabilidad de este lactobacilo, que disminuyó su viabilidad en medio ciclo logarítmico, no encontrándose diferencias significativas en la viabilidad de los lactobacilos incluidos en los geles con respecto a los controles (Figura 50 B).

Se han desarrollado posibles vehículos para microorganismos probióticos con incorporación de ingredientes prebióticos, como un queso crema con incorporación de *Bifidobacterium animalis* Bb-12 y *Lactobacillus acidophilus* con inulina como agente prebiótico (Alves *et al.* 2013), o una mousse de chocolate con *L. paracasei* LBC 82 e inulina (Aragon-Alegro *et al.* 2007). En ambos trabajos describen que los



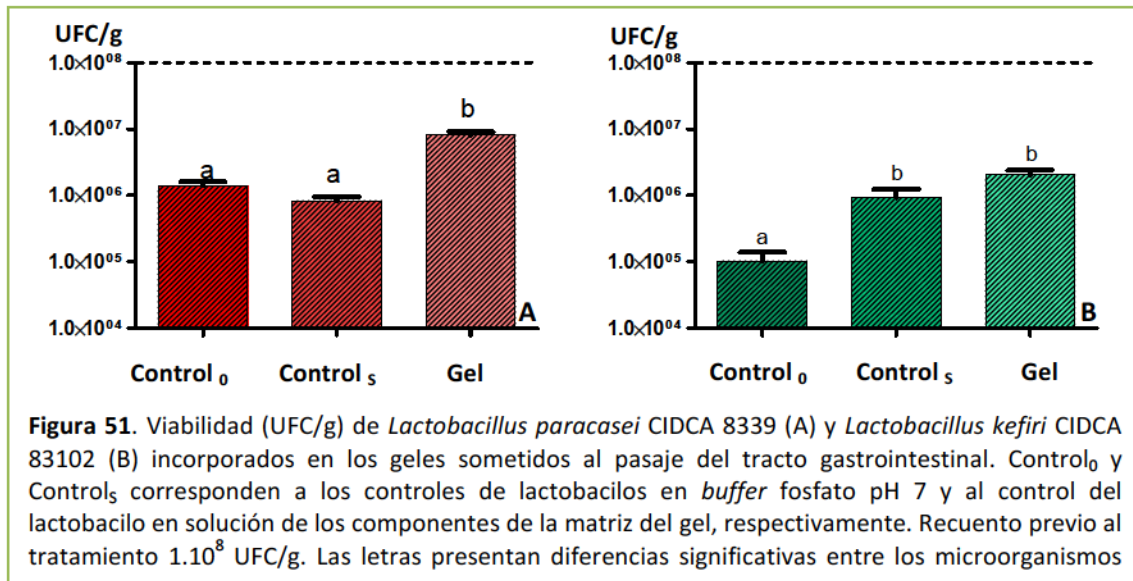
microorganismos se mantienen viables en el producto luego de un mes de almacenamiento.

Boylston *et al.* (2004) recomiendan el nivel de 10^6 UFC/g al momento de consumir un alimento con *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacterias y otros microorganismos probióticos. En nuestro producto se cumpliría tal condición ya que el número de lactobacilos viables luego del proceso de elaboración del gel fue de 10^7 UFC/g.

Resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal *in vitro* de *Lactobacillus paracasei* 8339 y *Lactobacillus kefir* 83102 incluidos en los geles mixtos.

Si bien la tolerancia al ácido y a la bilis y la capacidad de adhesión de los microorganismos son esenciales en la evaluación de un microorganismo probiótico, generalmente son estudiadas antes de la incorporación en los alimentos portadores (Schillinger *et al.* 2005). Sin embargo, es conocido que *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* presentan una pobre capacidad de supervivencia cuando se someten a la acidez gástrica *in vitro*, y se ha demostrado que la misma es protegida cuando se utiliza *yogurth* como portador de estos microorganismos (Lick *et al.* 2001). En consecuencia, es de importancia evaluar la tolerancia gastrointestinal de microorganismos probióticos en la matriz del alimento (Schillinger *et al.* 2005). Las propiedades funcionales de los probióticos pueden variar debido a diversos factores asociados con los alimentos portadores, incluyendo los ingredientes utilizados, el procedimiento de fabricación, las propiedades físicoquímicas del producto y las condiciones de almacenamiento.

Por lo tanto, se evaluó la resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal *in vitro* de *L. paracasei* CIDCA 8339 y *L. kefir* CIDCA 83102 incluidos en el gel y los respectivos controles. Los resultados se muestran en la Figura 51 y fueron expresados como lactobacilos que permanecieron viables cada 10^8 UFC/g de lactobacilos iniciales.



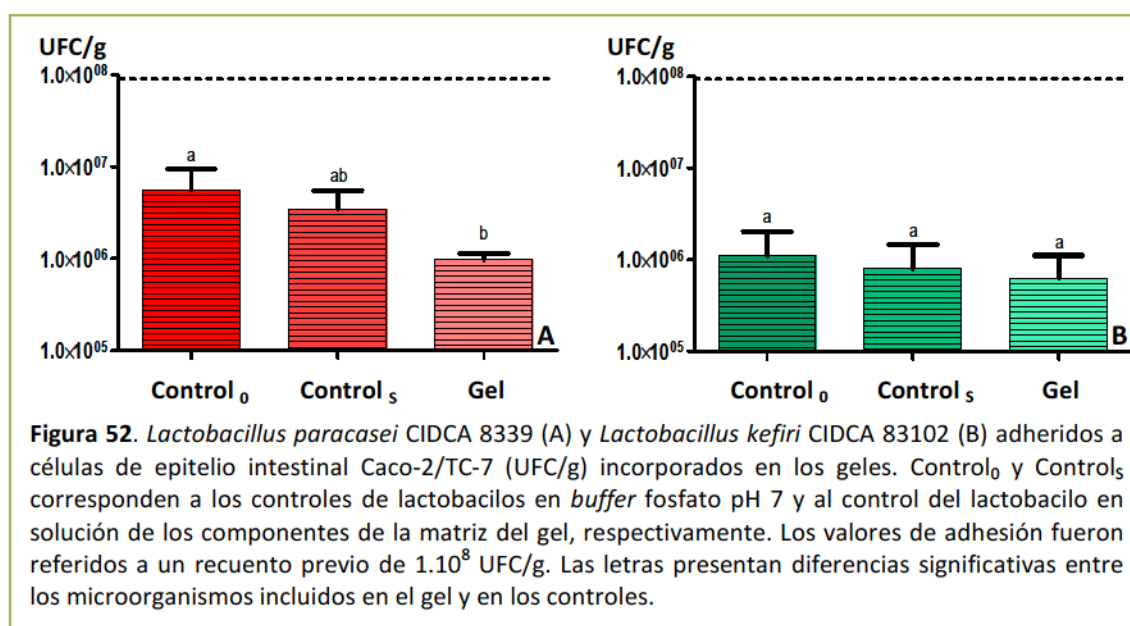
Analizando la Figura 51 A, donde se presentan los resultados obtenidos con *L. paracasei* CIDCA 8339, se pudo observar que este lactobacilo en *buffer* fosfato como en la solución conteniendo los componentes de la matriz del gel se ve afectado por el estrés ácido y de bilis, disminuyendo el número de microorganismos viables en dos ciclos logarítmicos. Sin embargo, se observó protección cuando los lactobacilos se encontraban incluidos en la matriz del gel ya que el número de microorganismos viables disminuyó sólo un ciclo logarítmico. Esto indicaría que el efecto protector del gel se debe a la propia estructura del gel más que a la presencia de los componentes que lo integran.

Cuando *L. kefir* CIDCA 83102 fue sometido a las mismas condiciones, los lactobacilos incluidos en el gel fueron protegidos del estrés ácido y de bilis en comparación con la resistencia de los microorganismos en *buffer* fosfato, sin embargo, no se observaron diferencias significativas respecto a la resistencia de los microorganismos en la solución con los componentes que forman el gel (Control₅). Esto indicaría que los propios componentes de la matriz estarían ejerciendo el efecto protector.



Adhesión a células Caco-2/TC-7 de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 y *Lactobacillus kefir* CIDCA 83102 incluidos en la matriz alimentaria (gel).

Por último, se evaluó la adhesión de los lactobacilos incluidos en la matriz del gel a células de epitelio intestinal Caco-2/TC-7 luego del paso por el tracto gastrointestinal *in vitro*. En la Figura 52 se muestra el número de microorganismos viables incluidos en la matriz del gel que fueron capaces de adherirse a las células epiteliales previo al estrés ácido y de bilis. Además, se muestra la adhesión de los microorganismos después de la simulación por el tracto gastrointestinal en *buffer* fosfato pH 7 y en la solución con los componentes de la matriz del gel. Los resultados fueron expresados como lactobacilos adheridos cada 10^8 UFC/g de lactobacilos que resistieron el proceso del tracto gastrointestinal *in vitro*.



La Figura 52 A muestra la adhesión de *L. paracasei* 8339 a células de epitelio intestinal luego del estrés ácido y de bilis. Se observó una mayor capacidad de adhesión de *L. paracasei* CIDCA 8339 cuando se encontraba en *buffer* fosfato pH 7 respecto a los lactobacilos incluidos en el gel. De todas formas, esta diferencia no superó el orden logarítmico, adhiriéndose $1,2.10^6$ UFC de lactobacilos a células epiteliales encontrándose incluidos en el Gel, respecto a $8,5.10^6$ UFC de lactobacilos adheridos a células encontrándose en la solución control (Control₀). Esto podría deberse a una pobre

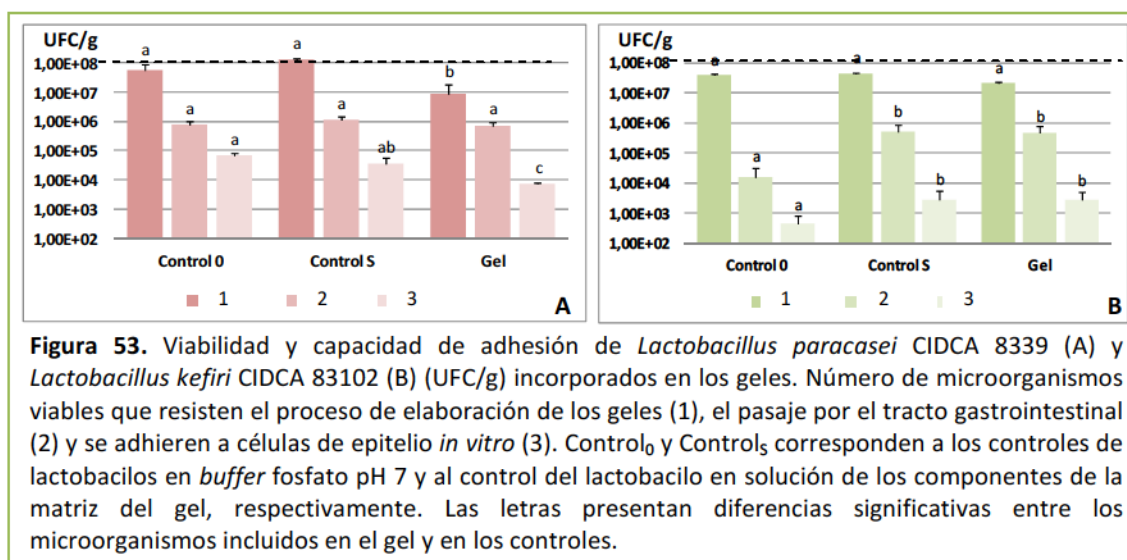


liberación del lactobacilo del gel, por lo que sería conveniente profundizar estos estudios mediante ensayos *in vivo*. Sin embargo, la presencia de los componentes de la matriz del gel en estado solución no afectaron la capacidad de adhesión de *L. paracasei* CIDCA 8339 ya que no fue significativamente diferente del control en *buffer* fosfato (Control₃: $3,5 \cdot 10^6$ UFC) (Figura 52 A). La disminución en la capacidad de adhesión de este lactobacilo cuando está incluido en el gel podría deberse a que estos lactobacilos producen exopolisacáridos que estarían interactuando con la matriz del gel dificultando su liberación y posterior contacto con la célula epitelial.

La Figura 52 B muestra la capacidad de *L. kefiri* CIDCA 83102 incluidos en el gel de adherirse a células de epitelio intestinal. Para este lactobacilo, no se observaron diferencias significativas en la capacidad de adhesión a las células de epitelio intestinal respecto a los lactobacilos libres, indicando que ni la matriz del gel ni los componentes en solución ejercerían algún tipo de impedimento que dificulte la interacción del lactobacilo con las células, adhiriéndose del orden de 10^6 UFC/g lactobacilos.

Hasta el momento, se analizó el efecto de la matriz alimentaria elegida sobre los lactobacilos durante la formación del gel, la resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal y la capacidad de adherirse a epitelio, en comparación con los controles.

Teniendo en cuenta lo que ocurre al ingerir un alimento, es de interés analizar la sobrevivencia de los microorganismos desde la ingesta del alimento con los lactobacilos incorporados en la matriz del gel hasta que los mismos se adhieren a las células de epitelio. En la Figura 53 se presentan los resultados obtenidos de un alimento a base de un gel de kefirán, proteínas de suero y fructosa, con una carga microbiana inicial de $1 \cdot 10^8$ UFC/g.



Al analizar la capacidad de adhesión a células de epitelio intestinal de *L. paracasei* CIDCA 8339 incluidos en el gel respecto a los controles (Figura 53 A) se observó que luego del proceso de formación del gel el número de células viables disminuyó en un ciclo logarítmico y después de las condiciones de estrés ácido y de bilis el número de lactobacilos viables resultó igual que en los controles. En esta condición, la pérdida de viabilidad en la formación del gel se vio contrarrestada por la protección otorgada por la matriz del gel frente a las condiciones gastrointestinales. Finalmente lograron adherirse alrededor de 10^4 UFC/g de *L. paracasei* a células de epitelio intestinal Caco-2/TC-7.

Como la etapa crítica de *L. paracasei* en solución tanto en *buffer* fosfato como en la solución con los componentes de la matriz del gel fue el estrés ácido y de bilis, es clave destacar la protección otorgada dada por el gel en esta etapa. Estos resultados son prometedores ya que desde la ingesta del alimento con lactobacilos hasta la llegada al intestino se observó una pérdida de viabilidad de 2 órdenes logarítmicos, con lo cual, podrían obtenerse mejores resultados al aumentar el número inicial de lactobacilos incluidos en el gel, ya conociendo el comportamiento de los mismos en la matriz del alimento en cada etapa.

Por otro lado, *L. kefiri* CIDCA 83102 (Figura 53 B) en todas las etapas se vio beneficiado al estar incluido en la matriz del gel o en solución con los componentes de la matriz, tanto en la protección frente al estrés ácido y de bilis, como en la adhesión al epitelio intestinal ya que la capacidad de adhesión de los lactobacilos incluidos en el gel



luego del estrés ácido y de bilis fue significativamente superior al control en *buffer* fosfato.

Hasta la fecha son muy pocos los trabajos sobre el efecto de las diferentes matrices alimentarias portadoras de probióticos en la tolerancia a la digestión y a la capacidad de adhesión de bacterias probióticas. Bove *et al.* (2013) estudiaron la supervivencia de *Lactobacillus plantarum* WCFS1, en un sistema humano oro-gástrico-intestinal (OGI) *in vitro*. Utilizaron diferentes matrices como leche reconstituida al 10 %, caldo SRA, solución salina (0,85 % ClNa), y pasta enriquecida con β -glucano para comparar las propiedades de protección y almacenamiento, observando la mayor supervivencia en las matrices complejas y ricas en nutrientes. Saxelin *et al.* (2010) realizaron estudios *in vivo* donde evaluaron la recuperación fecal después de la administración de cápsulas de celulosa, *yogurth* o queso conteniendo una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* GG y LC705, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS, y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12. Los participantes consumieron 10^{10} UFC/día de la combinación de probióticos. Al final de la intervención, observaron una alta recuperación de *L. rhamnosus* GG y LC705 en todos los grupos sin observar efecto de la matriz utilizada. Sin embargo, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* JS y *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12, se recuperaron mejor al ser administrados en el *yogurth*.

En conclusión, *L. paracasei* CIDCA 8339 se vio afectado por el proceso de congelación-descongelación y su inclusión en el gel protegió a esta cepa del estrés ácido y de bilis. No obstante, el número de lactobacilos que se adhiere a las células epiteliales respecto a los ingeridos fue menor en comparación a los lactobacilos libres, indicando que podría dificultarse la liberación de este microorganismo del gel. *L. kefiri* CIDCA 83102 se vio protegido por los componentes de la matriz del gel más que por la propia estructura del gel durante el paso por las condiciones gastrointestinales, y el número de microorganismos adheridos a células epiteliales respecto a los ingeridos fue mayor que cuando se encontraban en *buffer* fosfato.

Estos resultados, sugieren que el estudio de cada cepa probiótica debe ser probado adecuadamente en los alimentos portadores, y que la simple extrapolación de productos o variedades similares no necesariamente debe ser aceptada.



CAPÍTULO 2

Geles de kefirán como vehículo de microorganismos probióticos.





CONCLUSIONES PARCIALES

GELES DE KEFIRAN CON AZÚCARES

- Las soluciones de sacarosa-kefirán o fructosa-kefirán fueron capaces de formar geles después de un ciclo de congelación-descongelación.
- El agregado de sacarosa o fructosa a las soluciones de kefirán aumentó la viscosidad aparente y modificó el comportamiento de flujo. Los cambios en las soluciones se evidenciaron en propiedades fisicoquímicas diferentes en los geles obtenidos.
- Las moléculas de sacarosa y fructosa contribuyeron al aumento de la capacidad de retención de agua.
- Todos los geles mostraron estructura tridimensional altamente porosa excepto los que contenían alta concentración de sacarosa y fructosa.
- El agregado de sacarosa y fructosa a los geles de kefirán aumentó el módulo viscoso y el módulo elástico (G' y G''). El aumento del módulo elástico podría deberse a que el azúcar en sistemas acuosos competiría con el polímero por su interacción con el agua, esto favorecería la auto-asociación de las cadenas de kefirán.
- La adición de 0 a 30,0 % (p/p) de sacarosa a geles de kefirán produjo módulos elásticos más altos que los adicionados con fructosa a las mismas concentraciones.
- A temperaturas superiores a 37 °C se produjo un descenso abrupto del módulo viscoso y el módulo elástico de los geles de kefirán. El agregado de azúcares desplazó esta temperatura a valores mayores.



- Geles de kefirán con el mismo grado de dulzor, tales como los que contienen 17,6 % (p/p) de fructosa y 30,0 % (p/p) de sacarosa, presentaron diferentes características físicoquímicas, permitiendo así la posibilidad de elegir la formulación adecuada para la producción de un criogel con las características deseadas.

FORMACIÓN DE GELES DE KEFIRAN Y PROTEÍNAS DE SUERO DE LECHE

- La elaboración de los geles combinados requirió un proceso en dos etapas. Una etapa de calentamiento durante 10 minutos a 90 °C (ETAPA 1), y otra etapa que consistió en un ciclo de congelación-descongelación a -20 °C y almacenamiento a 4 °C (ETAPA 2).
- El ciclo de congelación-descongelación reforzó la estructura de los geles proteicos, en comparación a los geles sin dicho ciclo.
- El agregado de kefirán a soluciones de proteína de suero de leche permitió la formación de geles mixtos autoportantes a concentraciones de proteína más bajas.
- Los geles mixtos obtenidos a partir de proteína de suero de leche 3,0 % y 4,0 % (p/p) y kefirán 1,0 % (p/p) resultaron más opacos que los geles proteicos.
- La capacidad de retención de agua de los geles mixtos fue mayor a la de los geles proteicos debido a la capacidad del polisacárido de interactuar con las moléculas de agua.
- La inclusión de kefirán en la formulación de los geles disminuyó la tangente del ángulo de desfase $\tan(\delta)$ debido a que el aumento del módulo elástico (G') fue mayor al aumento del módulo viscoso (G''), indicando que el kefirán favorece uniones que refuerzan la estructura del gel.



- En el análisis de perfil de textura se observó un aumento en la dureza de los geles mixtos respecto de los geles proteicos, sin observarse diferencias en la cohesividad y elasticidad.
- La mínima concentración de proteínas de suero que gelificó en presencia de kefirán 1,0 % (p/p) fue 3,0 % (p/p). Por ello fue la combinación seleccionada como matriz alimentaria para incluir los microorganismos probióticos.

INCLUSIÓN DE MICROORGANISMOS EN GELES

- El proceso de elaboración de los geles como matriz alimentaria portadora de microorganismos afectó la viabilidad de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 en comparación con los lactobacilos libres. *Lactobacillus kefir* CIDCA 83102 se vio afectado por el proceso de congelación-descongelación de igual manera que el almacenamiento a 4 °C durante 48 horas.
- El gel de kefirán, proteína de suero y fructosa protegió a *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 y *Lactobacillus kefir* CIDCA 83102 frente a las condiciones gastrointestinales *in vitro* respecto a los microorganismos libres.
- La capacidad de adhesión de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 se vio afectada al estar incluido en el gel, mientras que no se observó lo mismo para *Lactobacillus kefir* CIDCA 83102.
- La resistencia al pasaje gastrointestinal simulado y la capacidad de adhesión a células epiteliales *in vitro* dependió de la cepa y la matriz utilizada.
- El gel seleccionado resultó ser una matriz adecuada para ser utilizada como vehículo de microorganismos probióticos ya que su proceso de elaboración fue sencillo y aplicable a gran escala.



CAPÍTULO 2

Geles de kefirán como vehículo de microorganismos probióticos.



CONCLUSIONES GENERALES





CONCLUSIÓN GENERAL

Atendiendo a la inquietud de desarrollar nuevos alimentos funcionales que contribuyan de manera natural al buen estado de salud y/o eviten contraer enfermedades, se planteó en el presente trabajo la elaboración de geles de kefiran como vehículo de microorganismos probióticos aislados de kefir. Este producto no sólo tendría las propiedades otorgadas por los microorganismos sino también las propiedades promotoras de salud asociadas al kefiran, otorgándole mayor valor agregado a los productos en los que se utilice.

El kefiran, polisacárido obtenido mediante una metodología simple a partir de los gránulos de kefir de leche, tiene la ventaja de ser producido por microorganismos con status GRAS (generalmente reconocidos como seguros). Tiene efectos promotores de la salud como propiedades antiinflamatorias, antitumoral, inmunomoduladora e hipocolesterolémica, hecho que lo hace un ingrediente o aditivo de interés para su uso en la industria de alimentos. En este trabajo, se demostró que este polisacárido es capaz de formar geles en presencia de azúcares que se utilizan como endulzantes (sacarosa y fructosa) mediante un proceso de congelación-descongelación, por ello, se los llama criogeles. Los geles de kefiran y azúcares fueron translúcidos, presentaron una elevada capacidad de retención de agua y habilidad de fundirse a la temperatura de la boca, características que los hacen interesantes para ser aplicados en la industria de alimentos.

El agregado de kefiran reforzó la estructura de los geles de proteínas de suero de leche. La incorporación de este polisacárido ejerció un sinergismo con las proteínas de suero ya que se obtuvieron geles con buenas propiedades reológicas, a muy bajas concentraciones de proteína, que en ausencia del polisacárido no gelifican. Estos geles además resultaron ser autoportantes.

En virtud de los resultados obtenidos se seleccionó una concentración de proteínas de 3,0 % (p/p) y de kefiran de 1,0 % (p/p) para la elaboración de los geles a fin



de contener los microorganismos probióticos y se les adicionó fructosa para contribuir al dulzor.

Se optimizó el procedimiento de elaboración de los geles de kefirán y proteínas de suero. El proceso de elaboración involucró una etapa de calentamiento durante 10 minutos a 90 °C, correspondiente al proceso de desnaturalización de las proteínas, y otra, en la cual los geles obtenidos en el paso anterior fueron llevados a -20 °C durante 24 horas y otras 24 horas a 4 °C, correspondiente al ciclo de congelación-descongelación necesario para la gelificación del kefirán. Ciertos geles de proteína de suero gelifican en caliente, en la primer etapa, dependiendo de la concentración de proteína utilizada, imposibilitando la adición de microorganismos probióticos. En este caso, fue primordial optimizar el proceso de elaboración del gel para permitir la incorporación de los microorganismos en la solución con los componentes que darán lugar a la formación del gel, posterior a la etapa de calentamiento, a fin de conservar su viabilidad. Por ello, luego del calentamiento, las muestras fueron enfriadas en baño de agua fría hasta temperatura ambiente para la incorporación de los microorganismos. De esta manera, al ser llevados a -20 °C, la solución gelifica atrapando los microorganismos en ella.

A fin de seleccionar los microorganismos a incluir en los geles y dado que en el CIDCA se contaba con 20 nuevos aislados cuya potencialidad probiótica se desconocía, se analizaron los mismos en lo referente a su capacidad de resistir el pasaje por el tracto gastrointestinal, su capacidad de adhesión a epitelio y su capacidad de inhibir *in vitro* a *Salmonella entérica* serovar Enteritidis CIDCA 101, dada la relevancia de este patógeno como causante de enfermedades de transmisión alimentaria.

Utilizando el modelo de epitelio intestinal Caco-2/TC-7, se demostró que *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339, CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123, CIDCA 83124 y *Lactobacillus kefiri* CIDCA 83102 fueron capaces de adherirse a las células de epitelio intestinal *in vitro*, y aumentar dicha capacidad luego de ser tratadas con soluciones que simulan el pasaje por el tracto gastrointestinal. Esto indica que estos lactobacilos una vez ingeridos son capaces de aumentar su tiempo de residencia en el intestino. Los lactobacilos presentaron valores de adhesión entre 10^5 y 10^6 UFC/ml que aumentaron luego del tratamiento que simula las condiciones gastrointestinales (estrés ácido y de bilis). El estrés ácido y de bilis indujo en *L. paracasei* CIDCA 8339 la regulación positiva de proteínas de la vía glicolítica, siendo un efecto general del estrés activar la



fuente de energía, o de proteínas de superficie que pudieran estar asociadas a la adhesión a mucus o a células de epitelio intestinal después del tratamiento.

Además, la preincubación de todos los lactobacilos estudiados con células epiteliales Caco-2/TC-7 redujo el daño producido por *Salmonella entérica* serovar Enteritidis CIDCA 101 sobre las células epiteliales. Por un lado, la preincubación de cada lactobacilo con *Salmonella*, como el efecto barrera otorgado por los lactobacilos sobre las células, redujo la capacidad del patógeno de internalizarse en las células epiteliales Caco-2/TC-7 respecto al control. Por otro lado, se observó un efecto bactericida de todos los sobrenadantes estudiados, siendo el mismo revertido a pH 4,5. La preincubación de *Salmonella* con estos sobrenadantes parcialmente neutralizados inhibieron su asociación e internalización a células epiteliales Caco-2/TC-7.

En virtud de los resultados obtenidos se seleccionaron *Lactobacillus kefir* CIDCA 83102 y *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 para su inclusión en los geles.

El proceso de elaboración de los geles afectó la viabilidad de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 en comparación con los lactobacilos libres. *Lactobacillus kefir* CIDCA 83102 se vio afectado por el proceso de congelación-descongelación de igual manera que el almacenamiento a 4 °C durante 48 horas. A su vez, el gel protegió a ambos lactobacilos frente al estrés ácido y de bilis respecto a los microorganismos libres. La capacidad de adhesión a células epiteliales se vio afectada al estar incluido *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 en el gel, mientras que no se observó lo mismo para *Lactobacillus kefir* CIDCA 83102. Estos resultados resaltan la importancia del estudio de los microorganismos dentro de las matrices correspondientes, ya que no pueden predecirse comportamientos a partir de los resultados de los microorganismos en solución.

Se pudo concluir que el producto obtenido a base de geles de kefiran 1,0 % (p/p) y proteínas de suero 3,0 % (p/p) con adición de fructosa 12,0 % (p/p) resultaron adecuados para la inclusión de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 y *Lactobacillus kefir* CIDCA 83102, con un proceso de elaboración sencillo, aplicable a gran escala y manteniendo las condiciones de viabilidad de los lactobacilos durante el proceso de elaboración. Asimismo, los microorganismos incluidos en el gel también resistieron el pasaje por tracto gastrointestinal y son capaces de adherirse al epitelio intestinal.



De este modo, los resultados aquí presentados son los primeros donde se evalúa la posibilidad de utilizar los geles de kefirán como vehículo de microorganismos probióticos y el estudio de los mismos durante el proceso digestivo, desde su consumo, hasta su adhesión a epitelio, dentro de la matriz del alimento.

Estos resultados son prometedores ya que las cepas seleccionadas son de interés para el desarrollo de nuevos alimentos con probióticos. Sin embargo, se necesitan estudios *in vivo* para la aplicación de estas cepas para la formulación de los alimentos funcionales a base de geles de kefirán conteniendo probióticos.

APÉNDICE





APÉNDICE

Medios de cultivos

- Caldo MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) (De Man, Rogosa, Sharpe , 1960), Difco, Detroit, USA.

Peptona universal	10 g/l
Extracto de carne	10 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 = 6,5 ± 0,2	

- Agar MRS

Caldo MRS adicionado con agar en concentración 1,5 g/l.

- Caldo nutritivo

Extracto de carne	3 g/l
Peptona de carne	5 g/l
pH = 7 ± 0,2	



- Agar Nutritivo (Parafarm, Argentina)

Peptona de carne	5 g/l
Extracto de carne	3 g/l
Agar - agar	12 g/l
Agua bidestilada c.s.p.	1 l

Peptona y extracto de carne: BLOKAR, Francia

- Triptona

Triptona	1 g/l
----------	-------

- *Buffer* Fosfato Salino (PBS)

NaCl	9 g/l
Na ₂ HPO ₄	0,795 g/L
KH ₂ PO ₄	0,144 g/l
Agua bidestilada c.s.p.	1 l
pH = 7-7,4	

Los medios de cultivos y buffers listados anteriormente, fueron preparados con agua bidestilada. La esterilización se realizó por autoclave a 121 °C durante 15-20 min.

- *Buffer* Fosfato

OHNa (0,1M)	29,1 ml
KH ₂ PO ₄ (0,1M)	50 ml
Volúmen final	100 ml
pH = 7 ± 0,2	



Coloraciones

- Tinción de Gram

Cristal violeta	10 g/l en agua destilada
Safranina (solución madre)	25 g/l en etanol
Safranina (solución de trabajo)	solución madre diluida 1/10
Lugol	10 g I ₂ + 20 g KI en 1 litro de agua destilada
Decolorante	etanol-acetona 4:1

Las soluciones se filtran antes de utilizarlas.

Protocolo	Tiempo de exposición (seg)
Cristal violeta	120
Lugol	30
Lugol	30
Lavar con agua	
Decolorante	10
Lavar con agua	
Safranina	120

Medios de cultivo para células eucariotas

- DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium), (GIBCO, EEUU)

DMEM Completo

DMEM	1 sobre/l
Penicilina/estreptomicina (1000 IU, 1000 µg/ml)	13 ml/l
Suero Fetal Bovino (inactivado 30 min a 58 °C)	180 ml/l



Aminoácidos no esenciales 100X	13 ml/l
Gentamicina (50 mg/ml)	10ml/l
NaHCO ₃	2 g/l
Agua de irrigación quirúrgica	1l
pH = 7,00 ± 0,2	

DMEM adhesión (DMEM sin suplementar)

DMEM	1 sobre/l
NaHCO ₃	2 g/l
Agua de irrigación quirúrgica	1l
pH = 7,00 ± 0,2	

Los medios para las células eucariotas, se prepararon utilizando agua de irrigación quirúrgica (Droguería Lino, Argentina). Los medios se esterilizaron por membrana de filtración estéril de 0,22 µm.

Los aminoácidos no esenciales 100X, fueron provistos por GIBCO-Invitrogen Corporation.

Cultivo de células intestinales y preparación de placas

Se utilizaron células de la línea Caco-2/TC-7. Las células se mantienen congeladas en nitrógeno líquido en viales de 1 ml de medio DMEM completo con 5 % de dimetilsulfóxido (Riedel-de Haën AG, D-3016 Seelze, Alemania) como crioprotector. Para reactivarlas se descongeló un vial a 37 °C, se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos para retirar el crioprotector, se resuspendieron las células en 1 ml de medio de cultivo fresco, y se cultivaron en una botella de 25 cm² (Corning Costar Co., Cambridge, MA, USA) con 4 ml de medio DMEM completo. El cultivo se mantuvo a 37 °C en estufa con atmósfera controlada (5 % CO₂ – 95 % aire) cambiando el medio cada 2 días. A los 5-7 días se obtuvo una monocapa confluyente y se repicó a una botella de 75 cm². En cada repique la monocapa se observó en un microscopio invertido para verificar la



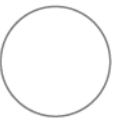
uniformidad y continuidad de la monocapa. Los repiques se realizaron de la siguiente manera: se descartó el medio ya agotado y se lavó la monocapa tres veces con PBS estéril, luego se colocó 10 ml de solución de tripsina (Tripsina 0,75 g/l; EDTA 0,2 g/l) y se llevó a la estufa a 37 °C durante 5 minutos. Cuando se observaron los primeros indicios de desprendimiento celular, se levantó la monocapa y se diluyó en 10 ml de DMEM para inactivar la enzima. Se centrifugó a baja velocidad durante 5 minutos, se descartó el medio y se reemplazó por medio DMEM fresco. Se tomaron 50 µl de la suspensión de células y se mezclaron con igual volumen de una solución de azul tripán (al 10 % en PBS). Se realizó el recuento de células en una cámara de Neubauer contando sólo aquellas células que se veían brillantes (es decir, que estaban viables). Se realizó la dilución apropiada para cada línea celular y se procedió a preparar las placas para los ensayos. Para las células Caco-2/TC-7 se agregaron $2,5 \cdot 10^5$ células/fosa.

Para los ensayos, las células fueron sembradas en placas de 24 fosas (Corning Costar Co., Cambridge, MA, USA). A cada fosa se le agregó 0,5 ml de la suspensión de células correspondiente para cada línea. Las placas con células Caco-2/TC-7 se incubaron 7 días (células en confluencia) a 37 °C en una estufa de atmósfera controlada (5 % CO₂ - 95 % aire) cambiando el medio cada 2 días. Para los ensayos en donde se realizó una observación microscópica, las células se crecieron sobre un vidrio de 12 mm de diámetro colocado dentro de la fosa. Estos vidrios fueron previamente lavados con agua y detergente no iónico (Extran MAO2 neutro, Merck, Darmstadt, Alemania) y luego de un enjuague exhaustivo con agua destilada, se colocaron en cajas de Petri y se esterilizaron en autoclave.



BIBLIOGRAFÍA





BIBLIOGRAFÍA

Abraham, A.G. & De Antoni, G.L. (1999). Characterization of kefir grains grown in cows' milk and in soya milk. *The Journal of dairy research*. 66, 327-333.

Abrams, S.A., Griffin, I.J., Hawthorne, K.M., Liang, L., Gunn, S.K., Darlington, G., Ellis, K.J. (2005). A combination of prebiotic short- and long- chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. *American Journal of Clinical Nutrition*. 82, 471-476.

Adhikari, B., Howes, T., Bhandari, B.R. & Truong, V. (2001). Stickiness in foods: mechanisms and test methods- a review. *International Journal of Food Properties*. 4, 1-33.

Adlerberth, I., Ahrne, S., Johansson, M.L., Molin, G., Hanson, L.A. & Wold, A.E. (1996). A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. *Applied Environmental Microbiology*. 62, 2244-2251.

Agarwal, K.N. & Bhasin, S.K. (2002). Feasibility studies to control diarrhea in children by feeding fermented milk preparations Actimel and Indian Dahi. *Europe Journal Clinical Nutrition*. 56, 56-59.

Agarwal, K.N., Bhasin, S.K., Faridi, M.M.A., Mathur, M. & Gupta, S. (2001). *Lactobacillus casei* in the control of acute diarrhea. A pilot study. *Indian Pediatrics*. 38, 905-910.

Alakomi, H.L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K. & Helander, I.M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 2001-2005.

Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T., Mattila-Sandholm, T. & von Wright, A. (1999). Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 351-354.

Altier, C. (2005). Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *Journal of Microbiology*. 43, 85-92.

Alting, A.C., Hamer, R.J., de Kruif, C.G. & Visschers, R.W. (2000). Formation of disulfide bonds in acid-induced gels of preheated whey protein isolate. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 48, 5001-5007.

Alves, L.L., Richards N.S.P.S., Mattanna, P., Andrade, D.F., Rezer, A.P.S., Milani, L.I.G., Cruz, A.G. & Faria, J.A.F. (2013). Cream cheese as a symbiotic food carrier using



Bifidobacterium animalis Bb-12 and *Lactobacillus acidophilus* La-5 and inulin. *International Journal of Dairy Technology*. 66, 63-69.

Anal, A.K. & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*. 18, 240-251.

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.

Antonie, J.M., Meance, S., Cayuela, C., Turchet, P., Raimondi, A., Lucas, C. (2000). Effect of a specific probiotic (*Bifidobacterium* sp. DN 173010) on gut transit time in elderly. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 14, 160-11.

Apostolou, E., Kirjavainen, P.V., Saxelin, M., Rautelin, H., Valtonen, V., Salminen, S.J. & Ouwehand, A.C. (2001). Good adhesion properties of probiotics: A potential risk for bacteremia? *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 31, 35-39.

Aragon-Alegro, L.C., Alarcon, J.H., Cardarellib, H.R., Chih Chiu, M. & Isay Saad, S.M. (2007). Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *Food Science and Technology*. 40, 669-675.

Arai, S. (1996). Studies of functional foods in Japan - State of the art. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 60, 9-15.

Araújo, E. A., de Carvalho, A.F., Leandro, E.S., Furtado, M.M., de Moraes, C.A. (2010). Development of a symbiotic cottage cheese added with *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 and inulin. *Journal of Functional Foods*. 2, 85-89.

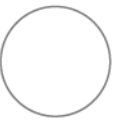
Aymard, P., Gimel, J. C., Nicolai, T. & Durand, D. (1996). Experimental evidence for a twostep process in the aggregation of β -lactoglobulin at pH 7. *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*. 93, 987-997.

Banerjee, P., Merkel, G.J. & Bhunia, A.K. (2009). *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B-30892 can inhibit cytotoxic effects and adhesion of pathogenic *Clostridium difficile* to Caco-2 cells. *Gut Pathogens*. 1, 8.

Barbut, S. & Foegeding, E. A. (1993). Ca^{+2} induced gelation of preheated whey protein isolate. *Journal of Food Science*. 58, 867-871.

Barthel, M., Hapfelmeier, S., Quintanilla-Martinez, L., Kremer, M., Rohde, M., Hogardt, M., Pfeffer, K., Russmann, H., Hardt, W-D. (2003). Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infection and Immunity*. 71, 2839-58.

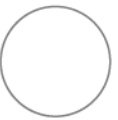
Beaulieu, M., Corredig, M., Turgeon, S. L., Wicker, L. & Doublier, J.L. (2005). The formation of heat-induced protein aggregates in whey protein/pectin mixtures studied by size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering detection. *Food Hydrocolloids*. 19, 803-812.



- Beaulieu, M., Turgeon, S.L. & Doublier, J.L. (2001). Rheology, texture and microstructure of whey proteins/low methoxyl pectins mixed gels with added calcium. *International Dairy Journal*. 11, 961-967.
- Beebe, J.A. & Frey, P.A. (1998). Galactose mutarotase: purification, characterization, and investigations of two important histidine residues. *Biochemistry*. 37, 14989–14997.
- Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R. & Servin, A.L. (1994). *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*. 35, 483-489.
- Bernet-Camard, M.F., Lievin, V., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L. & Hudault, S. (1997). The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active *in vitro* and *in vivo*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 2747-2753.
- Biliadieris, C.G. (1992). Structures and phase transitions of starch in food systems. *Food Technology*. 46, 98-109.
- Blomberg, L., Henriksson, A. & Conway, P.L. (1993). Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 59, 34-39.
- Blum, S., Reniero, R., Schiffrin, E.J., Crittenden, R., Mattila-Sandholm, T., Ouwehand, A.C., Salminen, S., Von Wright, A., Saarela, M., Saxelin, M., Collins, K. & Morelli, L. (1999). Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends in Food Science & Technology*. 10, 405-410.
- Bolla, P.A., Carasi, P., Bolla, Mde los A., De Antoni G. L., Serradel, M. de los A. (2013). Protective effect of a mixture of kefir-isolated lactic acid bacteria and yeasts in a hamster model of *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe*. 21, 28-33.
- Boris, S., Suarez, J.E., Vazquez, F. & Barbes, C. (1998). Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infection and Immunity*. 66, 1985-1989.
- Botes, M., Loos, B., van Reenen, C.A., Dicks, L.M. (2008). Adhesion of the probiotic strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. *Archives of Microbiology*. 190, 573-584.
- Bottazzi, V., Zacconi, C., Sarra, P. G., Dallavalle, P. & Parisi, M. G. (1994). Kefir: Microbiologia, Chimica e Tecnologia. *Industria del Latte*. 30, 41-62.
- Bove, P., Russo, P., Capozzi, V., Gallone, A. & Spanob, G.D. (2013). *Lactobacillus plantarum* passage through an oro-gastro-intestinal tract simulator: Carrier matrix effect and transcriptional analysis of genes associated to stress and probiosis. *Microbiological Research*. 168, 351-9.



- Boylston, T.D., Vinderola, C.G., Ghodduji, H.B. & Reinheimer, J.A. (2004). Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal*. 14, 375-387.
- 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.
- Brialy, C., Rivalland, P., Coiffard, L. & De Roeck Holtzhauer, Y. (1995). Microbiological study of lyophilized dairy kefir. *Folia Microbiologica*. 40, 198-200.
- Bron, P.A., Grangette, C., Mercenier, A., de Vos, W.M. & Kleerebezem, M. (2004). Identification of *Lactobacillus plantarum* genes that are induced in the gastrointestinal tract of mice. *Journal of bacteriology*. 186, 5721-5729.
- Bryant, C. M.; McClements, D. J. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends Food Sci. Technol.* 1998, 9, 143-151.
- Capron, I., Nicolai, T. & Durand, D. (1999). Heat induced aggregation and gelation of β -lactoglobulin in the presence of κ -carrageenan. *Food Hydrocolloids*. 13, 1-5.
- Carasi, P., Ambrosis, N., De Antoni, G. L., Bressollier, P., Urdaci, M. C. & Serradell, M.D.L.A. (2013). Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus. *Journal of Dairy Research*. 81, 16-23.
- Carp, D.J., Barholomai, G.B., Relkin, P. & Pilosof, A.M.R. (2001). Effects of denaturation on soy protein-xanthan interactions: comparison of a whipping-rheological and a bubbling method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 21, 163-171.
- Casey, P.G., Casey, G.D., Gardiner, G.E., Tangney, M., Stanton, C., Ross, R.P., Hill C. & Fitzgerald, G.F. (2004). Isolation and characterization of anti -*Salmonella* lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract. *Letter and Applied Microbiology*. 39, 431-438.
- Castro, L.A. & De Robetto, C. 2006. Probióticos: utilidad clínica. *Colombia médica*. 37, 308-314.
- Cats, A., Kuipers, E., Bosschaert, M., Post, R., Vanderbroucke-Grauls, C. & Kusters, J. (2003). Effect of frequent consumption of a *Lactobacillus casei*-containing milk drink in *Helicobacter pylori* colonized subjects. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 17, 429.
- Cebrián, R., Baños, A., Valdivia, E., Pérez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M. & Maqueda, M. (2012). Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiology*. 30, 59-67.
- Cevikbas, A., Yemni, E., Ezzedenn, F.W., Yardimici, T., Cevikbas, U. & Stohs, S.J. (1994). Antitumoural antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. *Phytotherapy Research*. 8, 78-82.



Chaila, Z., Ortiz Zavalla, J., Alarcón, O., Gusils, C., Gauffin Cano, P., Moreno, R., Oliver, G. & Gonzalez, S. (2005). Relation between probiotic milk administration and some bone turnover markers. *Journal Food Technology*. 3, 135-142.

Chateau, N., Castellanos, I. & Deschamps, A. (1993). Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of a commercial probiotic consortium. *Journal Applied Bacteriology*. 74, 36-40.

Cheftel, J. C. & Lorient, D. (1982). Les propriétés fonctionnelles des protéines laitières et leur amélioration. *Lait*. 62, 436-483.

Chen, H., Wang, S. & Chen, M. (2008). Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*. 25, 492-501.

Chen, H.H., Xu, S.Y., Wang, Z. (2006). Gelation properties of flaxseed gum. *Journal of Food Engineering*. 77, 295-303.

Chimalizeni, Y., Kawaza, K. & Molyneux, E. (2010). The epidemiology and management of non typhoidal salmonella infections. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 659, 33-46.

Clark, A. H. (1992). Gels and gelling. En: H. G. Schwartzberg, & R. W. Hartel, Physical chemistry of foods (pp. 263-305). New York: Marcel Dekker.

Clark, A. H., Kavanagh, G. M. & Ross-Murphy, S. B. (2001). Globular protein gelation theory and experiment. *Food Hydrocolloids*. 15, 383-400.

Clark, A.H. & Ross-Murphy, S.B. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advances in Polymer Science*. 83, 57-192.

Cobo Sanz, J.M., Mateos, J.A. & Muñoz Conejo, A. (2006). Effect of *Lactobacillus casei* on the incidence of infectious conditions in children. *Nutrition Hospital*. 21, 547-51.

Cóccaro, G.C. (2010). Desarrollo de nuevos productos. Alimentos funcionales y novel food. Alternativas para el diseño de alimentos y su marco legal.

Coconnier, M.H., Bernet M.F., Kerneis S., Chauviere, G., Fourniat J. & Servin, A.L. (1993a). Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* LB strain decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiology*. 110, 299-306.

Coconnier, M.H., Bernet, M.F., Chauviere, G., Servin, A.L. (1993b). Adhering heat-killed human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. *Journal of Diarrhoeal Disease Research*. 11, 235-242.

Coconnier, M.H., Lievin, V., Bernet-Camard, M.F., Hudault, S. & Servin, A.L. (1997). Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Antimicrobiology Agents and Chemotherapy*. 41, 1046-1052.



Coconnier, M.H., Lievin, V., Lorrot, M. & Servin, A.L. (1999). Antagonistic Activity of *Lactobacillus acidophilus* LB against Intracellular *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infecting Human Enterocyte-Like Caco-2/TC-7 Cells. *Applied and environmental microbiology*. 66, 1152-1157.

Código Alimentario Argentino. Capítulo VIII. Alimentos Lácteos, Art 576.

Código Alimentario Argentino. Capítulo VXII. Alimentos de Régimen o Dietéticos, Artículo 1389 (Resolución Conjunta SPRel N° 261/2011 y SAGyP N° 22/2011).

Código Alimentario Argentino. Capítulo VXII. Alimentos de Régimen o Dietéticos, Artículo 1390 (Resolución Conjunta SPRel N° 229/2011 y SAGyP N° 731/2011)

Collado, M.C., Gueimonde, M., Hernandez, M., Sanz, Y. & Salminen, S. (2005). Adhesion of Selected *Bifidobacterium* Strains to Human Intestinal Mucus and the Role of Adhesion in Enteropathogen Exclusion. *Journal of Food Protection*. 68, 2672-2678.

Collado, M.C., Meriluoto, J. & Salminen, S. (2007). Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*. 45, 454-460.

Coudray, C., Bellanger, J. & Catilglia-Delavaud, C. (1997). Effect of soluble and partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. *European Journal of Clinical Nutrition*. 51, 375-80.

Crittenden, R., Weerakkody, R., Sanguansri, L. & Augustin, M.A. (2006). Synbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated storage and gastrointestinal transit. *Applied and Environmental Microbiology*. 72, 2280-2282.

Darwin, K.H. & Miller, V.L. (1999) Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. *Clinical Microbiology Reviews*. 12, 405-428.

Das, J.K., Mishra, D., Ray, P., Tripathy, P., Beuria, T.K., Singh, N. & Suar, M. (2013). *In vitro* evaluation of anti-infective activity of a *Lactobacillus plantarum* strain against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Gut Pathogens*. 5, artículo 11.

Dashnau, J.L., Sharp, K.A., & Vanderkooi, J.M. (2005). Carbohydrate intramolecular hydrogen bonding cooperativity and its effect on water structure *Journal of Physical Chemistry*. 109, 24152-24159.

Davidson, M.H., Maki, K.C. & Synecki, C. (1998). Evaluation of the influence of dietary inulin on serum lipids in adults with hypercholesterolemia. *Journal of Nutrition*. 18, 503-17.

Davis, E.A. (1995). Functionality of sugars: physicochemical interactions in foods. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 62, 170-177.

De Kruif, C.G. & Tuinier, R. (2001). Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*. 15, 555-563.



- De Leeuw, E., Li, X.Q., Lu & W.Y. (2006). Binding characteristics of the *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 surface layer to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol Letters*. 260, 210-215.
- 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 Simone, C. (2005). Impact of prebiotics and probiotics on enteric flora. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 40, 1-40.
- 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. & F. Vaningelgem. (2004). Developing new polysaccharides from lactic acid bacteria. 275-320. In B. M. McKenna (ed.), *Texture in food*, vol. 2. Semi-solid foods. *Woodhead Publishing Ltd.*, Cambridge, United Kingdom.
- De Wit, J. N. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*. 81, 597-608.
- Deepika, G. & Charalampopoulos, D. (2010). Surface and adhesion properties of lactobacilli. *Advances in Applied Microbiology*. 70, 127-152.
- Deepika, G., Green, R.J., Frazier, R.A., Charalampopoulos, D. (2009). Effect of growth time on the surface and adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Applied Microbiology*. 107, 1230-1240.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M. & Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*. 31, 438-442.
- Delzenne, N.M., Neyrinck, A.M. & Cani, P.D. (2011). Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome. *Microbial Cell Factories*. 10, 1-10.
- Dickinson, E. & Galazka, Y. B. (1991). Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of beta-lactoglobulin with polysaccharides. *Food Hydrocolloids*. 5, 281-296.
- Dickinson, E. & Izgi, E. (1996). Foam stabilization by protein-polysaccharide complexes. *Colloids and Surfaces. Physicochemical and Engineering Aspects*. 113, 191-201.
- Dickinson, E. (1993). Protein-polysaccharide interactions in food colloids. En: E. Dickinson, & P. Walstra, *Food Colloids and polymers: stability and mechanical properties* (77- 93). Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.
- Dickinson, E. (1998). Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions. *Trend in Food Science and Technology*. 9, 347-354.



Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B., Roberfroid, M. (1996). Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*. 81, 1- 27.

Dissanayake, M., Ramchandran, L., Piyadasa, C. & Vasiljevic, T. (2013). Influence of heat and pH on structure and conformation of whey proteins. *International Dairy Journal* 28, 56-61.

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.

Doherty, S.B., Gee, V.L., Ross, R.P., Stanton, C., Fitzgerald, G.F. & Brodkorb, A. (2011). Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocolloids*. 25, 1604-1617.

Doherty, S.B., Gee, V.L., Ross, R.P., Stanton, C., Fitzgerald, G.F. & Brodkorb, A. (2010). Efficacy of whey protein gel networks as potential viability-enhancing scaffolds for cell immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Microbiological*. 80, 231-241.

Dolz, M., Hernandez, M. J. & Delegido, J. (2006). Oscillatory Measurements for Salad Dressings Stabilized with Modified Starch, Xanthan Gum and Locust Bean Gum. *Journal of Applied Polymer Science*. 102, 897-903.

Doublier, J.L., Garnier, C., Renard, D. & Sanchez, C. (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 5, 184-196.

Dousset, X. & Caillet, F. (1993). Aspects microbiologiques et biochimiques de la fermentation du kefir. *Microbiologie Aliments Nutrition*. 11, 463-470.

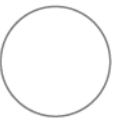
Doyle, J.P., Giannouli, P., Martin, E.J., Brooks, M. & Morris, E.R. (2006). Effect of sugars, galactose content and chainlengthon freeze-thaw gelation of galactomannans. *Carbohydrate Polymers*. 64, 391-401.

Doyle, R.J. & Rosenberg, M. (1990). Microbial cell surface hidrophobicity. *American Society for Microbiology*, American Society of Microbiology, Washington. D.C. 1-38.

Duboc, P. & Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*. 11, 759-768.

Dumay, E. (1988). Dénaturation thermique de la b-lactoglobuline et proprietes gelifiantes des concentrés protéiques de lactosérum. In D. Lorient, B. Colas, & M. Le Meste (Eds.), Proprietes fonctionnelles des macromolecules alimentaires (pp. 67–87). Paris: *Technique et Documentation*.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F. & Collins, J.K. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73, 386-392.



Dunnill, P. & Green, D.W. (1966). Sulphydryl groups and the N ↔ R conformational change in β-lactoglobulin. *Journal of Molecular Biology*. 15, 147-151.

Durant, J.A., Corrier, D.E., Byrd, J.A., Stanker, L.H. & Ricke, S.C. (1999). Feed deprivation affects crop environment and modulates *Salmonella* enteritidis colonization and invasion of leghorn hens. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 1919-1923.

Durant, J.A., Lowry, V.K., Nisbet, D.J., Stanker, L.H., Corrier, D. E. & Ricke, S. C. (2000). Late logarithmic *Salmonella* typhimurium HEp-2 cell association and invasion response to short-chain fatty acid addition. *Journal of Food Safety*. 20, 1-11.

Edwards, P.B., Creamer, L.K. & Jameson, G.B. Structure and stability of whey proteins. (2009) In Milk Proteins, from Expression to Food, 1 edn. Edited by Thompson A, Boland, M.J., Singh, H., Amsterdam: Elsevier, Academic Press. 161-203. Taylor SL (Series Editor): *Food Science and Technology*, International Series.

Ehrmann M.A., Kurzak P., Bauer J. & Vogel R.F. (2002). Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *Journal of Applied Microbiology*. 92, 966-975.

Elofsson, C., Dejmek, P., Paulsson, M. & Burling, H. (1997) Characterization of a cold-gelling whey protein concentrate. *International Dairy Journal*. 7, 601-608.

Evageliou, V., Richardson, R. K. & Morris, E.R. (2000b). Effect of pH, sugar type and thermal annealing on high-methoxy pectin gels. *Carbohydrates Polymers*, 42, 245-259.

Evageliou, V., Richardson, R.K. & Morris, E.R. (2000a). Effect of sucrose, glucose and fructose on gelation of oxidised starch. *Carbohydrate Polymers*, 42, 261-272.

Fábrega, A. & Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*. 26, 308-341.

FAO/WHO (2002). Joint FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint working group report on drafting. London, Ontario, 2002: 1–11.

Farnworth, E.R. (2005). Kefir: a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*. 2, 1-17.

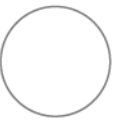
Fayol-Messaoudi, D., Berger, C., Coconnier-Polter, M-H., Lievin-Le Moal, V. & Servin, A. (2005). pH, lactic acid, and non lactic acid dependent activities of probiotic lactobacilli against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 6008-6013.

Fernandez, M., Boris, S. & Barbes, C. (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*. 94, 449-455.

Ferry, J. D. (1980). Viscoelastic properties of polymers. 486-544, John Wiley & sons, New York.



- Finlay, B. B., Ruschkowski, S. & Dedhar, S. (1991). Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. *Journal of Cell Science*. 99, 283-296.
- Fitzsimons, S.M., Mulvihill, D.M. & Morris, E.R. (2008). Large enhancements in thermogelation of whey protein isolate by incorporation of very low concentrations of guar gum. *Food Hydrocolloids*. 22, 576-586.
- Foegeding, E.A., Bowland, E.L. & Hardin, C.C. (1995). Factors that determine the fracture properties and microstructure of globular protein gels. *Food Hydrocolloids*. 9, 237-249.
- Foegeding, E.A., Davis, J.P., Doucet, D. & McGuffey, M. K. (2002). Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*. 13, 151-159.
- Fontenla de Petrino, S., Bibas Bonet, M.E., Mesón, O. & Perdigón, G. (2002). The effect of *Lactobacillus casei* on an experimental model of atopy. *Food and Agricultural Immunology*. 14, 181-189.
- Fooks, L.J. & Gibson, G.R. (2002a). In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiology Ecology*. 39, 67-75.
- Fooks, L.J. & Gibson, G.R. (2002b). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*. 88, 39-49.
- Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C. & Joly, B. (2001). Probiotic activities of *Lactobacillus casei* rhamnosus: *in vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Research in Microbiology*. 152, 167-173.
- Forrest, S.A., Yada, R.Y. & Rousseau, D. (2005). Interactions of vitamin D3 with bovine β -lactoglobulin and casein. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 53, 8003-9.
- Fox, P.F. & McSweeney, P.L.H. (2003). *Advanced Dairy Chemistry, Proteins Part A*, vol. 1, 3 edn. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Friedman, H.H., Whitney, J.E. & Szczesniak, A.S. (1963) The Texturometer-A New Instrument for Objective Texture Measurement. *Journal of Food Science*. 28, 390-396.
- Fuente: Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos [SIRVETA].
- 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.
- Fuller, R. (1997). Introduction. In: *Probiotics 2, Applications and practical aspects*, Chapman and Hall. London. New York, 1-9.
- Funmilola, A.A., Sánchez, B., Adeniyi, B.A., de los Reyes-Gavilán C.G., Margolles, A. & Ruas-Madiedo, P. (2011). Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine. *International Journal of Food Microbiology*. 147, 97-104.



Furtado Martins, E.M., Mota Ramos, A., Lago Vanzela, E.S., Stringheta, P.C., de Oliveira Pinto, C.L. & Martins, J.M. (2013). Review -Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*. 51, 764-770.

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.

Gaon, D., Doweck, Y., Zavaglia, A., Holgado, A. & Oliver, G. (1995). Lactose digestion by milk fermented with human strains of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. *Medicina*. 55, 237-242.

Gaon, D., Garcia, H., Winter, L., Rodriguez, N., Quintas, R., Gonzalez, S.N. & Oliver, G. (2003). Effect of *Lactobacillus strains* and *Saccharomyces boulardii* on persistent diarrhea in children. *Medicina*; 63:293-298. Trabajo de actualización diaeta. (B.Aires). 25, 121.

Gaon, D., Garmendia, C., Murrielo, N.O., de Cucco Games, A., Cerchio, A., Quintas, R., Gonzalez, S.N. & Oliver, G. (2002). Effect of *Lactobacillus strains* (*L. casei* and *L. acidophilus Cerela*) on bacterial overgrowth-related chronic diarrhea. *Medicina*. 62, 159-163.

Garbers, I., Britz, T.J., Witthuhn, R. C. (2004). PCR-based denaturing gradient gel electrophoretic typification and identification of the microbial consortium present in kefir grains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20, 687-693.

Gardiner, G.E., Casey, P.G., Casey, G., Lynch, B., Lawlor, P.G., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Ross, R.P. (2004). Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 1895-1906.

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.

Garrote, G.L., Abraham, A.G. & De Antoni G.L. (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*. 68, 639-652.

Garrote, G.L., Abraham, A.G. & De Antoni, G.L. (1997). Preservation of kefir grain, a comparative study. *Lebensmittel, Wissenschaft u Technologie*. 30, 77-84.

Garrote, G.L., Abraham, A.G. & De Antoni, G.L. (2000). Inhibitory power of kefir: The role of organic acids. *Journal of Food Protection*. 63, 364-369.

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.

Gault, P. & Fauquant, J. (1992). Heat-induced gelation of β -lactoglobulin-Influence of pH, ionic-strength and presence of other whey proteins. *Dairy Science Technology*. 72, 491-510.



Gawkowski, D. & Chikindas, M.L. (2013). Non-dairy probiotic beverages: the next step into human health. *Beneficial Microbes*. 4: 127-42.

Gibson, G.R., Beatty, E.B., Wang, X. & Cummings, J.H. (1995). Selective stimulation of bifidobacteria in human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*. 108, 975-82.

Gill, H. S. & Rutherford, K. J. (2001). Immune enhancement conferred by oral delivery of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 in different milk-based substrates. *Journal of Dairy Research*. 68, 611-616.

Global Industry Analysts, Inc., 2012

Golowczyc, M.A. (2008). Tesis doctoral: Caracterización taxonómica, probiótica y tecnológica de lactobacilos aislados de kefir. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

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.

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., Mobili, P., Garrote, G.L., De Los Angeles Serradell, M., Abraham, A.G., De Antoni, G.L. (2009). Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains: Evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins. *Journal of Dairy Research*. 76, 111-116.

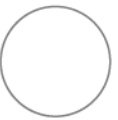
Gonzalez, S., Albarracin, G., Locascio de Ruiz Pesce, M., Male, M., Apella, M.C., Pesce de Ruiz Holgado, A. & Oliver, G. (1990). Prevention of infantile diarrhea by fermented milk. *Microbiologie-Aliments Nutrition*. 8, 349-354.

González-Rodríguez, I., Sánchez, B., Ruiz, L., Turróni, F., Ventura, M, Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M. & Margolles, A. (2012). Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation. *Applied and Environmental Microbiology*. 78, 3992–3998.

Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J. & Gill, H.S. (2001). *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal Food Microbiology*. 67, 207-216.

Grimoud, J., Durand, H., Courtin, C., Monsan, P., Ouarné, F., Theodorou, V., Roques, C. (2010). *In vitro* screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe*. 16, 493-500.

Grinberg, V.Y. & Tolstoguzov, V.B. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*. 11, 145-158.



Grupo de trabajo Alimentos Funcionales INAL - ANMAT. Los alimentos y las enfermedades, Boletín para consumidores N° 18 y 19, mayo 2003.

Guarner, F., Perdigon, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B. & Morelli L. (2005). Should yoghurt cultures be considered probiotic? *British Journal of Nutrition*. 93, 783-786.

Guerin-Danan, C., Chabanet, C., Pedone, C., Popot, F., Vaissade, P., Bouley, C., Szylit, O. & Andrieux, C. (1998). Milk fermented with yogurt and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants. *American Journal of Clinical Nutrition*. 67, 111-117.

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 pre-fermentation contaminant. *Journal of Applied Microbiology*. 95, 631-636.

Gurov, A.N., & Nuss, P.V. (1986). Protein-polysaccharide complexes as surfactants. *Nahrung Food*. 30, 349-353.

Ha, E. & Zemel, M. B. (2003). Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 14, 251-258.

Haeri, A., Khodaii, Z., Ghaderian, S.M.H., Panah, A.S.T. & Najar, R.A. (2012). Comparison of adherence patterns of a selection of probiotic bacteria to Caco-2, HEp-2, and T84 cell lines. *Annals of Microbiology*. 62, 339-344.

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.

Hamet, M. F., Londero, A., Medrano, M., Vercammen, E., Van Hoorde, K., Garrote, G. L., Geert Huys, Vandamme, P. & Abraham, A. G. (2013). Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefirifaciens* in microbial consortia present in kefir grains. *Food Microbiology*. 36, 327-334.

Hébrard, G., Blanquet, S., Beyssac, E., Remondetto, G., Subirade, M. & Alric, M. (2006). Use of whey protein beads as a new carrier system for recombinant yeasts in human digestive tract. *Journal of Biotechnology*. 15, 151-60.

Heenan, C.N., Adams, M.C., Hosken, R.W. & Fleet, G.H. (2004). Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a non-fermented frozen vegetarian dessert. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie*. 37, 461-466.

Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U. (2009). Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*. 23, 1670-1677.

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.



Higashi, S. & Micato-Ku. (2006). *Lactobacilos casei Shirota y Virus de la Influenza, Boletín Probiótico N° 11 Yakult, Argentina*. 14, 37-0300.

Hoffmann, M.A.M. & Van Mil, P.J.J.M. (1997). Heat-induced aggregation of α -lactoglobulin: role of the free thiol group and disulphide bonds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 45, 2942-2948.

Hoffmann, M.A.M., Roefs, S.P.F.M., Verheul, M., van Mil, P.J.J.M. & de Kruif, K.G. (1996). Aggregation of β -lactoglobulin studied by in situ light scattering. *Journal of Dairy Research*. 63, 423-440.

Holt, C. (2000). Molecular basis of whey protein food functionalities. *Australian Journal of Food Science and Technology*. 55, 53-55.

Huang, Y., Wang, X., Wang, J., Wu, F., Sui, Y., Yang, L., Wang, Z. (2013a). *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotic cultures with cholesterol-lowering activity. *Journal of Dairy Science*. 96, 2746-2753.

Huang, Y., Wu, F., Wang, X., Sui, Y., Yang, L., Wang, J. (2013b). Characterization of *Lactobacillus plantarum* Lp27 isolated from Tibetan kefir grains: A potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Journal of Dairy Science*. 96, 2816-2825.

Huang, Y.B., Wang, R.J., Chang, J.S., Tsai, Y.H. & Wu, P.C. (2007). Evaluation of ketoprofen formulations via penetration rate and irritation in vivo study. *International Journal of Pharmaceutics*. 339, 47-51.

Hudault, S., Lievin, V., Bernet-Camard, M.F. & Servin, A.L. (1997). Antagonistic activity exerted *in vitro* and *in vivo* by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 513-518.

Huffman, L.M. (1996). Processing whey protein for use as food ingredient. *Food Technology*. 51, 89-93.

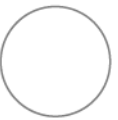
Hugo, A., Kakisu, E., De Antoni, G. & Pérez, P.F. (2008). Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* *in vitro*. *Letter in Applied Microbiology*. 46, 613-619.

Ismail, A.A., Ghaly, M.F. & El-Naggar, A.K. (2011). Milk kefir: Ultrastructure, antimicrobial activity and efficacy on aflatoxin b1 production by *Aspergillus flavus*. *Current Microbiology*. 62, 1602-1609.

Isolauri, E., Salminen, S. & Ouwehand, A.C. (2004). Probiotic. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 18, 299-313.

Isolauri, E., Juntunen, M. & Rautanen, T. (1991). A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics*. 88, 90-7.

Jacobsen, C.N., Nielsen, V.R., Hayford, A.E., Moller, P.L., Michaelsen, K.F., Paerregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M. & Jakobsen, M. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the



colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 4949-4956.

Jacson, T.G., Taylor, G.R.J. & Clohessy, A.M. (1999). The effects of the daily intake of inulin on fasting lipid, insulin and glucose concentration in middle-aged men and women. *British Journal of Nutrition*. 89, 23-30.

Jianzhong, Z., Xiaoli, L. B., Hanhu, J. & Mingsheng, D. (2009). Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*. 26, 770-775.

Jin, L.Z., Ho, Y.W., Ali, M.A., Abdullah, N., Jalaludin S. (1996). Effect of adherent *Lactobacillus spp.* on *in vitro* adherence of *Salmonella* to the intestinal epithelial cells of chicken. *Journal of Applied Bacteriology*. 81, 201-206.

Jolly, L., Vincent, S., Duboc, P. & Neeser, J. R. (2002). Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 82,367-374.

Jones, O.G., Decker, E.A. & McClements, D.J. (2009). Formation of biopolymer particles by thermal treatment of b-lactoglobulin-pectin complexes. *Food Hydrocolloids*. 23, 1312-1321.

Jones, O.G., Lesmes, U., Dubin, P. & McClements, D.J. (2010). Effect of polysaccharide charge on formation and properties of biopolymer nanoparticles created by heat treatment of β -lactoglobulin-pectin complexes. *Food Hydrocolloids*. 24, 374-383.

Ju, Z. Y. & Kilara, A. (1998). Effects of preheating on properties of aggregates and of cold-set gels of whey protein isolate. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 46, 3604-3608.

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.

Kalliomaki M., Salminen S. & Isolauri E. (2008). Positive interactions with the microbiota: probiotics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 635, 57-66.

Kandler, O. & Kunath, P. (1983). *Lactobacillus kefir* sp. nov., a component of the microflora of kefir. *Systematic and Applied Microbiology*. 4, 286-294.

Kinsella, J.E., & Whitehead, D.M. (1989). Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. In E. K. John (Ed.), *Advances in food and nutrition research*. 33, 343-438. Academic Press.

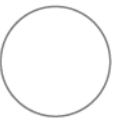
Kociubinski, G., Pérez, P. & De Antoni, G.L. (1999). Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Food Protection*. 62, 905-912.

Kolenbrander, P. E. (1991). *Microbial Cell-Cell interactions*, Dworkin M. (ed.), American Society for Microbiology, Washington D. C., 303.

Kooiman P. (1968). The chemical structure of kefirin, the water-soluble polysaccharide of kefir grain. *Carbohydrate Research*. 7, 200-211.



- 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. *Elsevier Applied Sciences Publishers*. 159-179.
- Krzeminski, A., Prell, K.A., Busch-Stockfisch, M., Weiss, J., Hinrichs, J. (2014). Whey protein-pectin complexes as new texturising elements in fat-reduced *yoghurt* systems. *International Dairy Journal*. 36, 118-127.
- Kurmann, J.A. & Rasic, J.L. (1991). The health potential of products containing bifidobacteria. In: Robinson, R.K. (Ed.), *Therapeutic properties of fermented milks*. *Elsevier*. 117-158.
- La Rivière 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. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laiho, K., Ouwehand, A., Salminen, S. & Isolauri, E. (2002). Inventing probiotic functional foods for patients with allergic disease. *Ann Allergy Asthma Immunology*. 89, 75-82.
- Lajolo, F. M. (2002). Functional foods: Latin American perspectives. *British Journal of Nutrition*. 88 145-150.
- Laneuville, S.I., Paquin, P. & Turgeon, S.L. (2005). Formula optimization of a low-fat food system containing whey protein isolate-xanthan gum complexes as fat replacer. *Journal of Food Science*. 70, 513-519.
- Langton, M. & Hermansson, A.M. (1992). Fine-stranded and particulate gels of β -lactoglobulin and whey protein at varying pH. *Food Hydrocolloids*. 5, 523-539.
- Latorre García, L., Del Castillo-Agudo, L. & Polaina, J. (2007). Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23, 785-791.
- Laurienzo, P., Malinconico, M., Pizzano, R., Manzo, C., Piciocchi, N., Sorrentino, A. & Volpe, M.G. (2006). Natural polysaccharide-based gels for dairy food preservation. *Journal Dairy Science*. 89, 2856-64.
- Lawhon, S.D., Maurer, R., Suyemoto, M. & Altier, C. (2002). Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Molecular Microbiology*. 46, 1451-1464.
- Laws, A. & Marshall, V. (2001b). The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 11, 709-721.
- Laws, A., Gu, Y. & Marshall, V. (2001a) Biosynthesis, characterization, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*. 19, 597-625.



- Lazaridou, A., Vaikousi, H. & Biliaderis, C.G. (2008). Effects of polyols on cryostructurization of barley β -glucans. *Food Hydrocolloids*. 22, 263-277.
- 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.
- Lee, Y.K. & Puong, K.Y. (2002). Competition for adhesion between probiotics and human gastrointestinal pathogens in the presence of carbohydrate. *British Journal of Nutrition*. 88, 101-108.
- Lee, Y.K., Lim, C.Y., Teng, W.L., Ouwehand, A.C., Tuomola, E.M. & Salminen, S. (2000). Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 3692-3697.
- Lee, Y.K., Puong, K.Y., Ouwehand, A.C. & Salminen, S. (2003). Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *Journal of Medical Microbiology*. 52, 925-930.
- Lick, S., Drescher, K. & Heller, K.J. (2001). Survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus and *Streptococcus thermophilus* in the terminal ileum of fistulated Gottingen minipigs. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 4137-4143.
- Lin, C.-K., Tsai, H.-C., Lin, P.-P., Tsen, H.-Y. & Tsai, C.-C. (2008). *Lactobacillus acidophilus* LAP5 able to inhibit the *Salmonella choleraesuis* invasion to the human Caco-2 epithelial cell. *Anaerobe*. 14, 251-255.
- Liong, M.T., Shah, N.P. (2005). Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal of Dairy Science*. 88, 55-66.
- 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.
- Liu, J-R., Wang, S-Y., Chen, M., Chen, H., Yueh, P., Lin, C-W. (2006). Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soyamilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. *British Journal of Nutrition*. 95, 939-946.
- Livney, Y.D. (2010). Milk Proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloids and Surface Science*. 15, 73-83.
- Lombardi, A.M., Bevilaqua, A.E. & Califano, A.N. (1994). Variation in organic acids content during ripening of Reggianito cheese in air-tight sealed bags. *Food Chemistry*. 51, 221-226.
- Londero, A. (2012). Tesis doctoral: Alimentos funcionales: Obtención de un producto probiótico para aves a partir de suero de quesería fermentado con microorganismos de kefir. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.



- 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*. 79, 262-271.
- Londero, A., León Peláez, M.A., Diosma, G., De Antoni, G.L., Abraham, A.G. & Garrote, G.L. (2014). Fermented whey as poultry feed additive to prevent fungal contamination. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94, 3189-3194
- 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.
- Lorca, G., Torino, M.I., Font de Valdez, G. & Ljungh, A.A. 2002. Lactobacilli express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. *FEMS Microbiology Letters*. 206, 31-37.
- Lozinsky, V., Galaev, I.Y., Plieva, F.M., Savina, I.M., Jungvid, H., & Mattiasson, B. (2003). Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends in Biotechnology*. 21, 445-451.
- Lupano, C.E., Dumay, E. & Cheftel, J.C. (1992). Gelling properties of whey protein isolate: influence of calcium removal by dialysis or diafiltration at acid or neutral pH. *International Journal of Food Science and Technology*. 27, 615-628.
- Lupano, C.E., Renzi, L.A. & Romera, V. (1996). Gelation of whey protein concentrate in acidic conditions: effect of pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44, 3010-3014.
- Macfarlane, G. & Cummings, J. (1999). Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *British Medical Journal*. 318, 999-1003.
- Maciel, B.M., Sriranganathan, N., Romano, C.C., dos Santos, T.F., Dias, J.C.T., Gross, E. & Rezende, R.P. (2012). Infection cycle of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in latent carrier mice. *Canadian Journal of Microbiology*. 58, 1389-1395.
- Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S. & Kitamura, S. (2004a). Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B(T). *Journal of Agricultural and 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* (Oxford, England). 22, 197-200.
- Magalhães, K.T., Pereira, M.A., Nicolau, A., Dragone, G., Domingues, L. & Teixeira, J.A. (2010). Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: Evaluation of morphological and microbial variations. *Bioresource Technology*. 101, 8843-8850.



Magra, T.I., Antoniou, K.D. & Psomas, E.I. (2012). Effect of milk fat, kefir grain inoculum and storage time on the flow properties and microbiological characteristics of kefir. *Journal of Texture Studies*. 43, 299-308.

Mainville, I., Arcand, Y. & Farnworth, E. R. (2005) A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 287-296.

Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpopoulou, G. & Tsakalidou, E. (2006). Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in Microbiology*. 157, 241-247.

Maldonado Galdeano, C. & Perdigón, G. (2004). Role of viability of probiotics strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *Journal Applied Microbiology*. 97,673-681.

Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou G., Miaris C., Kalantzopoulos G., Pot B. & Tsakalidou E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*. 16, 189-199.

Marco Trade News, 2012

Marcos, A., Wärnberg, J., Nova, E., Gómez, S., Alvarez, A., Alvarez, R., Mateos, J.A., Cobo, J.M. (2004). The effect of milk fermented by yogurt cultures plus *Lactobacillus casei* DN-114001 on the immune response of subjects under academic examination stress. *Europe Journal of Nutrition*. 6, 381-389.

Margulis, L. (1996). From kefir to death. In: How things are. 69-78. William Morrow and 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.

Marteau, P., Cuillerier, E., Meance, S., Gerhardt, M.F., Myara, A., Bouvier, M., Bouley, C., Tondou, F., Bommelaer, G. & Grimaud, J.C. (2002). *Bifidobacterium animalis* strain DN-173-010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomized, controlled study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 16, 587-593.

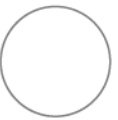
Marteau, P., Pochart, P., Bouhnik, Y. & Rambaud, J.C. (1993). The fate and effects of transiting nonpathogenic microorganisms in the human intestine. *World Review Nutrition and Dietetics*. 74, 1-21.

Marteau, P., Vesa, T. & Rambaud, J.C. (1997). Lactose malabsorption. In: Fuller R, ed. *Probiotics 2: applications and practical aspects*. London: Chapman & Hall. 65-88.

Martins, F.S., Dalmaso, G., Arantes, R.M.E., Doye, A., Lemichez, E., Lagadec, P., Imbert, V., Peyron, J.F., Rampal, P., Nicoli, J.R. & Czerucka, D. (2010). Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection. *PLoS ONE*, 5 art. N°. e8925 5, 1-12.



- Matsumoto, M., Tani, H., Ono, H., Ohishi, H. & Benno, Y. (2002). Adhesive property of *Bifidobacterium lactis* LKM512 and predominant bacteria of intestinal microflora to human intestinal mucin. *Current Microbiology*. 44, 212-215.
- Maurer, S., Junghans, A. & Vilgis, T.A. (2012). Impact of xanthan gum, sucrose and fructose on the viscoelastic properties of agarose hydrogels. *Food Hydrocolloids*. 29, 298-307.
- Mazeau, K. & Rinaudo, M. (2004). The prediction of the characteristics of some polysaccharides from molecular modelling. Comparison with effective behaviour. *Food Hydrocolloids*. 18, 885-898.
- McClements, D.J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances*. 24, 621-625.
- Meance, S., Cayuela, C., Raimondi, A., Turchet, P., Lucas, C. & Antoine, J.M. (2003). Recent advances in the use of Functional Foods: effects of the commercial fermented milk with *Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 and yoghurt strains on gut transit time in the elderly. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 15, 15-22.
- Meance, S., Cayuela, C., Turchet, P., Raimondi, A., Lucas, C. & Antoine, J.M. (2001). A fermented milk with a *Bifidobacterium Probiotic* Strain DN- 173 010 shortened oro-fecal gut transit time in elderly. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 13, 217-222.
- Medici, M., Vinderola, C.G. & Perdigón, G. (2004). Gut mucosal immunostimulation by probiotic fresh cheese. *International Dairy Journal*. 14, 611-618.
- 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. *Journal Antonie van Leeuwenhoek*. 96, 505-505.
- Medrano, M., Pérez, 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., Racedo, S.M., Rolny, I.S., Abraham, A.G. & Pérez, P.F. (2011). Oral administration of kefirin induces changes in the balance of immune cells in a murine model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 5299-5304.
- Mellema, M., van Opheusden, J.H.J. & van Vliet, T. (2002). Categorization of rheological scaling models for particle gels applied to casein gels. *Journal of Rheology*. 46, 11.
- Michelli, L., Uccelletti, D., Palleschi, C. & Crescenzi, V. (1999). Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefirin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53, 69-74.
- Minelli, E.B., Benini A., Marzotto, M., Sbarbati, A., Ruzzenente, O., Ferrario, R., Hendriks, H. & Dellaglio, F. (2004). Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. *International Dairy Journal*. 14, 723-736.



Mobili, P., Londero, A., Maria, T.M.R., Eusébio, M.E.S., De Antoni, G.L., Fausto, R. & Gómez-Zavaglia, A. (2009). Characterization of S-layer proteins of *Lactobacillus* by FTIR spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Vibrational Spectroscopy*. 50, 68-77.

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.

Morr, C.V. & Ha, E.Y.W. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 33, 431-436.

Morr, C.V. (1984). Production and use of milk proteins in foods. *Food Technology*. 38, 39-48.

Morr, C.V. (1992). Improving the texture and functionality of whey protein concentrate. *Food Technology*. 1, 110-113.

Morris V. (1986). Multicomponent gels. In: Gums and Stabilizers for Food Industry (eds), Philips, G.O., Wedlock, D.J. & Williams, P.A., 3rd ed., Elsevier, London. 87-99.

Morris, E.R. & Rees, D.A. (1978). Principles of biopolymer gelation: possible models for mucus gel structure. *British Medical Bulletin*. 34, 49-53.

Morris, V.J. (1998). Gelation of polysaccharides. *Functional properties of food macromolecules*. 143-226.

Mukai, T., Toba, T. & Adachi, S. (1990) Structural investigation of the capsular polysaccharide from *Lactobacillus kefirianofaciens* K1. *Carbohydrate Research*. 204, 227-232.

Mukai, T., Toba, T., Itoh, T. & Adachi, S. (1988). Structural Microheterogeneity of Kefiran from Kefir Graiss. *Japanese Journal of Zootechnical Science*, 59,167-176.

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.

Mynott, T.L., Crossett, B. & Prathalingam, S.R. (2002). Proteolytic inhibition of *Salmonella enterica* serovar typhimurium-induced activation of the mitogen-activated protein kinases ERK and JNK in cultured human intestinal cells. *Infection and Immunity*. 70, 86-95.

Nikolíc D., Mureşan, R.C., Feng, W. & Singer, W. (2012). Scaled correlation analysis: A better way to compute a cross-correlogram. *European Journal of Neuroscience*. 35, 742-62.

Ofek, I. & Doyle, R.J. (1994). Bacterial adhesion to cells and tissues. Chapman & Hall (Eds.), New York, London.

Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Tanak, R., Hamabata, T., Yamasaki, S. & Takeda, Y. (2001). Inhibition of *in vitro* growth of Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 by



probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *International Journal of Food Microbiology*. 68, 135-140.

Ojeda, J.J., Romero-Gonzalez, M.E., Bachmann, R.T., Edyvean, R.G.J. & Banwart, S.A. (2008). Characterization of the cell surface and cell wall chemistry of drinking water bacteria by combining XPS, FTIR spectroscopy, modeling, and potentiometric titrations. *Langmuir*. 24, 4032-4040.

Olagnero, G., Genevois, C., Irei, V., Marcenado, J. & Bendersky, S. (2007). Functional foods: Concepts, Definitions and Global Legal Frame. *DIAETA*. 25, 31-39.

OMS/FAO. Probiotics in foods. (2006). Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation, *FAO Food and Nutrition Paper*. 92-5-105513-0, 85.

Ottogalli, G., Galli, A., Resmini, P. & Volonterio, G. (1973). Composizione microbiologica, chimica ed ultrastruttura dei granuli di kefir. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*. 23, 109-121.

Ouwehand, A.C. & Conway, P.L. (1996). Specificity of spent culture fluids of *Lactobacillus spp.* to inhibit adhesion of enteropathogenic fimbriated *Escherichia coli* cells. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 9, 239-246.

Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Gronlund, M.M., Isolauri, E. & Salminen, S.J. (1999a). Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal*. 9, 623-630.

Ouwehand, A.C., Niemi, P. & Salminen, S.J. (1999b). The normal faecal microbiota does not affect the adhesion of probiotic bacteria in vitro. *FEMS Microbiol Letters*. 177, 35-38.

Palou, A., Serra, F. & Pico, C. (2003). General aspects on the assessment of functional foods in the European Union. *European Journal of Clinical Nutrition*. 57, 12-17.

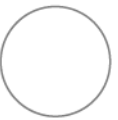
Parra M.D., Martinez de Moretín, B.E., Cobo, J.M., Mateos, J.A. & Martínez, J.A. (2004a). Monocyte function in healthy middle aged people receiving fermented milk containing *Lactobacillus casei*. *Journal of Nutrition Health and Ageing*. 8, 208-211.

Parra, M.D., Martinez de Moretín, B.E., Cobo, J.M., Mateos, J.A. & Martínez, J.A. (2004b). Daily ingestion of fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN114001 improves innate defense capacity in healthy middle aged people. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 60, 85-92.

Patrick, M.E., Adcock, P.M., Gomez, T.M., Altekruze, S.F., Holland, B.H., Tauxe, R.V. & Swerdlow, D.L. (2004). *Salmonella* Enteritidis Infections, United States, 1985-1999. *Emerging Infectious Diseases*. 10, 1-7.

Pedone, C.A., Arnaud, C.C., Postaire, E.R., Bouley, C.F. & Reinert, P. (2000). Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhoea. *International Journal of Clinical Practice*. 54, 568-571.

Pedone, C.A., Bernabeu, A.O., Postaire, E.R., Bouley, C.F. & Reinert, P. (1999). The effect of supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei* (strain DN-114 001) on



acute diarrhoea in children attending day care centers. *International Journal of Clinical Practice*. 53, 179-184.

Perdigon, G., Fuller, R. & Raya, R. (2001). Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 2, 27-42.

Perdigon, G., Maldonado Galdeano, C., Valdez, J.C., Medici, M. (2002). Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *European Journal of Clinical Nutrition*. 56, 21-26.

Pereg, D., Kimhi, O., Tirosh, A., Orr, N., Kayouf, R. & Lishner, M. (2005). The effect of fermented yogurt on prevention of diarrhea in a healthy adult population. *American Journal Infect Control*. 33, 2, 122-5.

Peressini, D., Bravin, B., Lapasin, R., Rizzotti, C. & Sensidoni, A. (2003). Starchmethylcellulose based edible film: rheological properties of film-forming dispersions. *Journal of Food Engineering*. 59, 25-32.

Perez, P.F., Minnaard, Y., Disalvo, E.A., De Antoni, G.L. (1998). Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 21-26.

Piątek, J., Gibas-Dorna, M., Olejnik, A., Krauss, H., Wierzbicki, K., Żukiewicz-Sobczak, W. & Głowacki, M. (2012). The viability and intestinal epithelial cell adhesion of probiotic strain combination--in vitro study. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 19, 99-102.

Picout, D.R. & Ross-Murphy, S.B. (2001). Thermoreversible and irreversible physical gels from biopolymers. In *Polymer Gels and Networks*. Osada, Y. & Khokhlov, A.R., Eds. Marcel Dekker, New York. pp. 27-46.

Piermaria, J., Bosch, A., Pinotti, A., Garcia, 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.

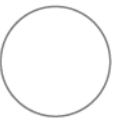
Piermaria, J., de la Canal, M. & Abraham, A.G. (2008). Gelling properties of kefiran, a food grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids*. 22, 1520-1527.

Pintado, M.E., Lopes Da Silva, J.A., Fernandes, P.B., Xavier Malcata, F. & Hogg, T.A. (1996). Microbiological and rheological studies on portuguese kefir grains. *International Journal of Food Science and Technology*. 31, 15-26.

Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, D., Keding, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J., Zweibaum, A. (1983). Enterocyte -like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biological Chemistry*. 47, 323-330.



- Possemiers, S., Marzorati, M., Verstraete, W., Van de Wiele, T. (2010). Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. *International Journal of Food Microbiology*. 141, 97-103.
- 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.
- Pujol, P., Huguet, J., Drobnic, F., Banquells, M., Ruiz, O., Galilea, P., Segarra, N., Aguilera, S., Burnat, A., Mateos, J.A. & Postaire, E. (2000). The effect of fermented milk containing *Lactobacillus casei* on the immune response to exercise. *Sports Medicine, Training and Rehabilitation*. 9, 209-223.
- Puppo, M.C., Lupano, C.E., Añon, M.C. (1995). Gelation of soybean protein isolates in acidic conditions. Effect of pH and protein concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43, 2356-2361.
- Puyol, P., Pérez, M.D. & Horne, D.S. (2001). Heat-induced gelation of whey protein isolates (WPI): effect of NaCl and protein concentration. *Food Hydrocolloids*. 15, 233-237.
- Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L. & Recio, I. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *Journal of Dairy Science*. 88, 3480-3487.
- Ramírez-Santiago, C., Lobato-Calleros, C., Espinosa-Andrews, H. & Vernon-Carter, E. (2012). Viscoelastic properties and overall sensory acceptability of reduced-fat Petit-Suisse cheese made by replacing milk fat with complex coacervate. *Dairy Science and Technology*. 92, 383-398.
- Rammelsberg, M. & Radler, F. (1990). Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. *Journal Applied Bacteriology*. 69, 177-184.
- Reddy, B.S. (1999). Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. *Journal of Nutrition*. 129, 1478-1482.
- Reid, G. & Burton, J. (2002). Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbiology Infection*. 4, 319-324.
- Reid, G., McGroarty, J.A., Angotti, R. & Cook, R. L. (1988). *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia Coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Canadian Journal of Microbiology*. 34, 344-351.
- Relkin, P. (1996). Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 36, 565-601.
- Renard, D. & Lefebvre, J. (1992). Gelation of globular proteins: Effect of pH and ionic strength on the critical concentration for gel formation. A simple model and its application to β -lactoglobulin heat-induced gelation. *International Journal of Biological macromolecules*. 14, 287-291.



- 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. (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. (2001). Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *Journal of Dairy Research*. 68, 653-661.
- 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.
- Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S. & Ouwehand, A.C. (2003). Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: A risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization? *Veterinary Microbiology*. 92, 111-119.
- Río, M.E., Zago, L.B., García, H. & Winter, L. (2002). El estado nutricional modifica la efectividad de un suplemento dietario de bacterias lácticas sobre la aparición de patologías de vías respiratorias en niños. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 52, 29-35.
- Río, M.E., Zago, L.B., García, H. & Winter, L. (2004). El estado nutricional modifica la efectividad de un suplemento dietario de bacterias lácticas sobre la aparición, prevención y cura de diarrea infantiles. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 54, 287-294.
- Rishi, P., Mavi, S.K., Bharrhan, S., Shukla, G., Tewari, R. (2009). Protective efficacy of probiotic alone or in conjunction with a prebiotic in *Salmonella*-induced liver damage. *FEMS Microbiol Ecology*. 69, 222-230.
- Roberfroid, M.B. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. *American Journal of Clinical Nutrition*. 71, 1682-1687.
- Roberfroid, M.B. (2002). Global view on functional foods: European perspectives. *British Journal of Nutrition*. 88, 133-138.
- Rodríguez, K.L., Gaudino Caputo, L.R., Tavares Carvalho, J.C., Evangelista, J. & Schneedorf, J.M. (2005). Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 25, 404-408.
- Roos, S., Aleljung, P., Normand, R., Lee, B., Wadström, T., Lindberg, M. & Jonsson, H. (1996). A collagen binding protein from *Lactobacillus reuteri* is part of an ABC transporter? *FEMS Microbiology Letters*. 144, 33-38.
- Rosi, J. & Rossi, J. (1978). I microorganismi del kefir: I fermenti lattici. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*. 29, 291-305.



- Ross-Murphy, S.B. (1995). Rheology of Biopolymer Solutions and gels. En *New Physico-Chemical Techniques for the Characterization of Complex Food Systems*. Ed.: Dickinson, E. *Blackie Academic & Professional*, Glasgow. 130-156.
- 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*.
- 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., Gueimonde, M., Arigoni, F., de los Reyes-Gavilán, C.G. & Margolles, A. (2009). Bile affects the synthesis of exopolysaccharides by *Bifidobacterium animalis*. *Applied and environmental microbiology*. 75, 1204-1207.
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C.G. & Salminen, S. (2006). Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *Journal of Food Protection*. 69, 2011-2019.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. & Zoon, P. (2002a). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 12, 163-171.
- 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.
- Ruiz, L., Margolles, A. & Sánchez, B. (2013). Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Frontiers in microbiology*. 4, 1-8.
- 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.
- Rychlick, I. & Barrow, P.A. (2005). *Salmonella* stress management and its relevance to behavior during intestinal colonization and infection. *FEMS Microbiology Reviews*. 29, 1021-1040.
- Turgeon, S.L. & Beaulieu, M. (2001). Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides. *Food Hydrocolloids*. 15, 583-591.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Matto, J. & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technology properties. *Journal Biotechnology*. 84, 197-215.
- Saavedra, J.M., Bauman, N.A. & Oung, I. (1994), Feeding *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infant in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet*. 344, 1046-1049.



Sabir, F., Beyatli, Y., Cokmus, C., Onal-Darilmaz, D. (2010). Assessment of Potential Probiotic Properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. Strains Isolated from Kefir. *Journal of Food Science*. 75, 568-573.

Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., Prieto, A., Calle, L.P. & de los Reyes-Gavilan, C.G. (2012). Characterization of exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* NB667 and Its cholate-resistant derivative strain IPLA B667dCo. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 60, 1028-1035.

Salvador, A. & Fiszman, S.M. (1998). Textural Characteristics and Dynamic Oscillatory Rheology of Maturation of Milk Gelatin Gels with Low Acidity. *Journal of Dairy Science*. 81, 1525-1531.

Salyers, A. & Whit, D. (2002) *Salmonella* species. En: Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach. Second edition. Ed. ASM Press, Washington DC, USA.

Sambrook, J. & D. W. Russell. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sánchez, B., Ruiz, L., de los Reyes-Gavilán, C.G., Margolles, A. (2008). Proteomics of stress response in *Bifidobacterium*. *Frontiers in Bioscience*. 13, 6905-6919.

Sanderson, G.R. (1990). Gellan gum. En Food gels. Ed.: P. Harris, Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York. 201-232.

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.

Sato, K., Nakamura, M., Nishiya, T., Kawanari, M. & Nakajima, I. (1995). Preparation of a gel of partially heat-denatured whey protein by proteolytic digestion. *Milchwissenschaft*. 50, 389-392.

Saxelin, M., Lassig, A., Karjalainen, H., Tynkkynen, S., Surakka, A., Vapaatalo, H., et al. (2010). Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 144, 293-300.

Schar-Zammaretti, P., Dillmann, M.L., D'Amico, N., Affolter, M. & Ubbink, J. (2005). Influence of fermentation medium composition on physicochemical surface properties of *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 8165-8173.

Schillinger, U., Guigas, C. & Heinrich Holzapfel, W. (2005). In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal*. 15, 1289-1297.

Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 9, 671-675.

Servin, A.L & Coconnier, M.H. (2003). Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and the interaction with pathogens. *Best practice & Research Clinical Gastroenterology*. 17, 741-754.



- Servin, A.L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*. 28, 405-440.
- Shah, D. H., Zhou, X., Addwebi, T., Davis, M. A., Orfe, L. & Call, D. R. (2011). Cell invasion of poultry-associated salmonella enterica serovar enteritidis isolates is associated with pathogenicity, motility and proteins secreted by the type III secretion system. *Microbiology*. 157, 1428-1445.
- Shimada, K. & Cheftel, J.C. (1988). Texture characteristics, protein solubility, and sulfhydryl group/disulfide bond contents of heat-induced gels of whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 36, 1018-1025.
- Shimizu, M. (2014). History and Current Status of Functional Food Regulations in Japan. *Nutraceutical and Functional Food Regulations in the United States and Around the World: Second Edition*. 257-263.
- 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.
- Sillanpaa, J., Martinez, B., Antikainen, J., Toba, T., Kalkkinen, N., Tankka, S., Lounatmaa, K. & Keranen, J. (2000). Characterization of the collagen-binding S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus*. *Journal Bacteriology*. 182, 6440-6450.
- 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.
- Silva, M., Jacobus, N. V., Deneke, C. & Gorbach, S. L. (1987). Antimicrobial substance from a human Lactobacillus strain. *Antimicrobiology Agents Chemother*. 31, 1231-1233.
- Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G. & Spasov, Z. (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 28, 1-6.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B. & Lugasi, A. Functional food. (2008). Product development, marketing and consumer acceptance. A review. *Appetite*. 51, 456-467.
- Sloan, E. (1999). The new market: foods for the not-so-healthy. *Food Technology*. 53, 54-60.
- Spotti, M.J., Martinez, M.J., Pilosof, A.M.R., Candiotti, M., Rubiolo, A.C. & Carrara, C.R. (2014). Rheological properties of whey protein and dextran conjugates at different reaction times. *Food Hydrocolloids*. 38, 76-84.
- Stading, M. & Hermansson, A.M. (1991). Large deformation properties of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*. 5, 339-352.
- Stading, M. & Hermansson, A.M. (1992). Inhomogeneous fine-stranded β -lactoglobulin gels. *Food Hydrocolloids*. 5, 455-470.



- Steventon, A.J., Gladden, L.F. & Fryer, P.J. (1991). A percolation analysis of the concentration dependence of the gelation of whey protein concentrates. *Journal of Texture Studies*. 22, 201-218.
- St-Onge, M.P., Farnworth, E.R., Savard, T., Chabot, D., Mafu, A. & Jones, P.J.H. (2002). Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: A randomized controlled trial. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, art. N° 1.
- Suzuki, T. & Hara, H. (2004). Various nondigestible saccharides open a paracellular calcium transport pathway with the induction of intracellular calcium in human intestinal Caco-2 Cells. *Journal of Nutrition*. 134, 1935-1941.
- Szczesniak, A.S. (2002). Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*. 13, 215-225.
- Takase, S., Goda, T. & Watanabe, M. (1994). Monostearylglycerol-starch complex: its digestability and effects on glycemic and lipogenic responses. *Journal of Nutrition*. 40, 23-36.
- 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.
- Tallon, R., Arias, S., Bressollier, P. & Urdaci, M.C. (2007). Strain- and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds. *Journal of applied microbiology*. 102, 442-51.
- Tanaka, R. (1997). *Lactobacillus*, *bifidobacterium* and intestinal infections diarrhea. Japan: *Special Anniversary Edition of Healthist, Gra-met*. 121-28.
- Tang, Q., McCarthy, O. & Munro, P. (1995). Oscillatory rheological study of the gelation mechanism of whey protein concentrate solutions: effect of physicochemical variables on gel formation. *Journal of Dairy Research* 60, 543-555.
- 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.
- Tobitani, A. & Ross-Murphy, S.B. (1997). Heat-induced gelation of globular proteins. 1. Model for the effects of time and temperature on the gelation time of bsa gels. *Macromolecules*. 30, 4845-4854.
- Tolstoguzov, V.B., Tschimirow, Y.I., Suchanow, B.P., Braudo, E.E. & Kosmina, E.P. (1976). *Nahrung*. 20, 329-338.



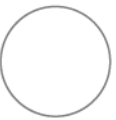
- Tolstoguzov, V. (1986). Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. En: J. R. Mitchell, & D. A. Ledward, *Functional properties of food macromolecules* (385-411). London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Tolstoguzov, V. (1990). Interactions of gelatin with polysaccharides. En: G. O. Phillips, P. A. Williams, & D. J. Wedlock, *Gums and stabilisers for the food industry* (pp. 157-175). Oxford: IRL Press.
- Tolstoguzov, V. (1991). Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*. 4, 429-468.
- Tolstoguzov, V. (1997). Protein-polysaccharide interactions. En: S. Damodaran & A. Paraf. *Food proteins and their applications* (171-198). New York: Marcel Dekker.
- Tolstoguzov, V. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food hydrocolloids*. 17, 1-23.
- Tolstoguzov, V., Grinberg, V., & Gulov, A. (1985). Some physicochemical approaches to the problem of protein texturisation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 151- 159.
- Tolstoguzov, V.B. (1993). Functional properties of food proteins. Role of interactions in protein systems. In K.D. Schwenke & R. Mothes (Eds.), *Food proteins. Structure and functionality* (pp. 203–209). *Weinheim: VHC*.
- Tolstoguzov, V.B., Ershova, E.A. & Braudo, E.E. (1973) *Zh. Prikl. Khim.* 46, 25-34 (in Russian).
- Tolstoguzov, V.B., Tschimirow, Y.I., Braudo, E.E., Wainerman, E.S. & Kosmina, E.P. (1975). *Nahrung*. 19, 33-43.
- Tolstoguzov, V.B. (1979) *Nahrung*. 23, 649-654.
- Tolstoguzov, V.B. (1978). *Artificial Foodstuffs. Nauka, Moscow* (in Russian).
- Tolstoguzov, V.B. (1995). Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels. *Food Hydrocolloids*. 9, 317-332.
- Tuomola, E.M. & Salminen S.J. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology*. 41, 45-51.
- Tuomola, E.M., Ouwehand, A.C. & Salminen, S.J. (1999). Human ileostomy glycoproteins as a model for small intestinal mucus to investigate adhesion of probiotics. *Letter in Applied Microbiology*. 28, 159-163.
- Tuomola, E.M., Ouwehand, A.C. and Salminen, S.J. (2000). Chemical, physical and enzymatic pre-treatments of probiotic lactobacilli alter their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins. *International Journal of Food Microbiology*. 60, 75-81.



- Turchet, P., Laurenzano, M., Auboiron, S. & Antoine, J.M. (2003). Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomised, controlled pilot study. *Journal of Nutrition Health and Ageing*. 7, 75-77.
- Urdaneta, E., Barrenetxe, J., Aranguren, P., Irigoyen, A., Marzo, F. & Ibáñez, F.C. (2007). Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats. *Nutrition Research*. 27, 653-658.
- Valeur, N., Engel, P., Carbajal, N., Connolly, E., Ladefoged, K. (2004). Colonization and Immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the Human Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 1176-1181.
- Van Der Mei, H.C., Van de Belt Gritter, B., Pouwels, P.H., Martinez, B. & Busscher, H. J. (2003). Cell surface hydrophobicity is conveyed by S-layer proteins - a study in recombinant lactobacilli. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 28, 127-134.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Velge, P., Bottreau, E., Fievez, V., et al. (2003). Invasion of *Salmonella* Enteritidis in avian intestinal epithelial cells *in vitro* is influenced by short-chain fatty acids. *International Journal of Food Microbiology*. 85, 237-248.
- Van Immerseel, F., Fievez, V., De Buck, J., Pasmans, F., Martel, A. & Haesebrouck, F. (2004). Microencapsulated short-chain fatty acids in feed modify colonization and invasion early after infection with *Salmonella* Enteritidis in young chickens. *Poultry Science*. 83, 69-74.
- Van Immerseel, F., Russell, J. B., Flythe, M. D., Gantois, I., Timbermont, L. & Pasmans, F. (2006). The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: A mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathology*. 35, 182-188.
- Van Loo, J., Cummings, J. & Delzene, N. (1999). Functional Food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO projects (DGXII IRII-CT94-1095). *British Journal Nutrition*. 81, 121-32.
- Van Vliet, T. (2002). On the relation between texture perception and fundamental mechanical parameters for liquids and time dependent solids. *Food Quality Preferences*. 13, 227-236.
- 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 kefirnofaciens* subsp. *kefirgranum* subsp. nov. and emended description of *L. kefirnofaciens* Fujisawa *et al.* 1988. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54, 551-556.
- Vandamme, T.F., Lenourry, A., Charreau, C. & Chaumeil, J. C. (2002) The use of polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydrate Polymers*, 48, 219-231.
- Vaquero, A.O, Fernández, A.R. & Dünner, A.P. (2011). *Salmonella* Enteritidis. Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud.



- Vedamuthu, E.R. (1982). Fermented milks. *In Economic Microbiology*. 7, 199-226.
- Velge, P., Cloeckert, A. & Barrow, P. (2005). Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistances in other major serotypes. *Veterinary Research*. 36, 267-288.
- Verheul, M. & Roefs, S.P.F.M. (1998a). Structure of particulate whey protein gels: effect of NaCl concentration, pH, heating temperature, and protein composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 4909-4916.
- Verheul, M. & Roefs, S.P.F.M. (1998b). Structure of whey protein gels, studied by permeability, scanning electron microscopy and rheology. *Food Hydrocolloids*. 12, 17-24.
- Vinderola, C.G., Medici, M. & Perdigon G. (2004). Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 96, 230-243.
- Vinderola, C., Perdigón, G., Reinheimer, J., Medici, M., Prosello, W. & Ghiberto, D. (2003). Bioqueso Iloay Vita: un nuevo queso probiótico con alta respuesta sobre el sistema inmune. *Industria Láctea Española*. 34-48.
- 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.
- Vitiñi, E., Alvarez, S., Medina, M., Medici, M., de Buduguer, M.V. & Perdigón, G. (2000). Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *Biocell* 24, 223-232.
- Vreeker, R., Hoekstra, L.L., den Boer, D.C. & Agterof, W.G.M. (1992). Fractal aggregation of whey proteins. *Food Hydrocolloids*. 5, 423-435.
- Vujicic, I.F., Vulic, M., Konyves, T. (1992). Assimilation of cholesterol in milk by kefir cultures. *Biotechnology Letters*. 14, 847-850.
- Wadstrom, T., Andersson, K., Sydow, M., Axelsson, L., Lindgren, S. & Gullmar, B. (1987). Surface properties of lactobacilli from the small intestine of pigs. *Journal of Applied Bacteriology*. 62, 513-520.
- Walter, R.H. (1998). Origin and characteristics of polysaccharides. *Polysaccharide Dispersions*. 1-28. San Diego: Academic Press.
- Wang, H.F., Tseng, C.Y., Chang, M.H., Lin, J.A., Tsai, F.J., Tsai, C.H., Lu, Y.C., Lai, C.H., Huang, C.Y., Tsai, C.C. (2012a). Anti-inflammatory effects of probiotic *Lactobacillus paracasei* on ventricles of BALB/C mice treated with ovalbumin. *The Chinese journal of physiology*. 55, 37-46.
- Wang, S.Y., Chen, K.N., Lo, Y.M., Chiang, M.L., Chen, H.C., Liu, J.R. & Chen, M.J. (2012b). Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. *Food Microbiology*. 32, 274-285.



Warrand, J. (2006). Healthy Polysaccharides. The Next Chapter in Food Products. *Food Technology and Biotechnology*. 44, 355-370.

Watson, R.D. Sleator, C. Hill, C.G.M. Gahan. (2008). Enhancing bile tolerance improves survival and persistence of *Bifidobacterium* and *actococcus* in the murine gastrointestinal tract. *BMC Microbiology*. Article number 176.

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.

Wu, C., He, G. & Zhang, J. (2014). Physiological and proteomic analysis of *Lactobacillus casei* in response to acid adaptation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 41, 1533-1540.

Wu, M., Xiong, Y. L., Chen, J, Tang, X. & Zhou, G. (2009). Rheological and Microstructural Properties of Porcine Myofibrillar Protein–Lipid Emulsion Composite Gels. *Journal of Food Science*. 74, 207-217.

www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/article13.htm

Yamul, D.K. & Lupano C.E. (2005). Whey protein concentrate gels with honey and wheat flour. *Food Research International*. 38, 511-522.

Yamul, D.K. & Lupano, C.E. (2003). Properties of gels from whey protein concentrate and honey at different pHs. *Food Research International*. 36, 25-33.

Yokoi, H., Watanabe, T. & Fujii, Y. (1990). Isolation and Characterization of Polysaccharide-Producing Bacteria from Kefir Grains. *Journal of Dairy Science*, 73, 1684-1689.

Yoon, Y.H., Cho, J.K., Baek, Y.J. & Huh, C.S. (1999). Antimutagenic activity of *Lactobacillus spp.* isolated from kefir and yoghurt and non-starter strains. *Korean Journal of Animal Science*. 41, 39-44.

Yoshida, T. & Toyoshima, K. (1994). Lactic acid bacteria and yeast from kefir. *Japan Society of Nutrition and Food Science*. 47, 55-59.

Yoshida, Y., Yokoi, W., Ohishi, K., Ito, M., Naito, E. & Sawada, H. (2005). Effects of the cell wall of *kluveromyces marxianus* YIT 8292 on the plasma cholesterol and fecal sterol excretion in rats fed on a high-cholesterol diet. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 69, 714-723.

Yüksekdağ, Z.N., Beyatlı, Y. & Aslım, B. (2004). Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from turkish kefir with natural probiotic. *Food Science and Technology*. 37, 663-667.

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.

Zasytkin, D.Y., Braudo, E.E. & Iolstoguzev, Y.B. (1997). Multicomponent biopolymer gels. *Food Hydrocolloids*. 11, 159-170.



Ziegler, G.R. & Foegeding, E.A. (1990). The gelation of proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*. 34, 203-298.

Zihler, A., Gagnon, M., Chassard, C. & Lacroix C. (2011). Protective effect of probiotics on Salmonella infectivity assessed with combined in vitro gut fermentation-cellular models. *BMC Microbiology*. 11, 264.

Zimet, P. & Livney, Y.D. (2009). Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids*. 23, 1120-6.

Zoetendal, E.G., Akkermans, A.D.L. & De Vos, W. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 3854-3859.

Zourari, A. & Anifantakis, E.M. (1988). Le kefir caracteres physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. *Technologie de Production*. 68, 373-392.