

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE
BACTERIAS LÁCTICAS DE KEFIR”**

TESIS



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

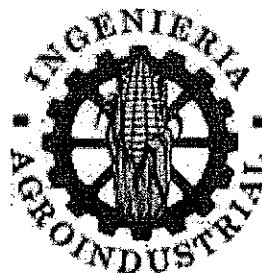
QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA**

PRESENTA:

MARÍA LILIANA BOLAÑOS CARRILLO

Chapingo, Estado de México, Septiembre de 2004



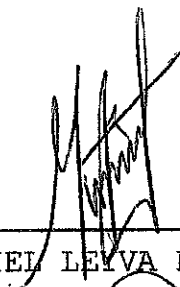
"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS DE KEFIR"

Tesis realizada por **MARIA LILIANA BOLAÑOS CARRILLO** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

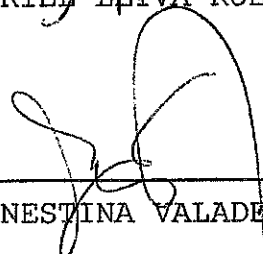
AGROALIMENTARIA

DIRECTOR:



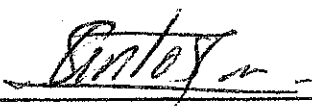
DR. GABRIEL LEIVA RUELAS

ASESORA:



DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR:



M.C. ARMANDO SANTOS MORENO

DEDICATORIA

A DIOS, A ÉL MI VIDA Y MIS LOGROS

A MI MAMÁ:

EULALIA CARRILLO GARCÍA

A MI HERMANO:

MARIO AUGUSTO B. C.

A MI PAPÁ:

MARIO BOLAÑOS LEAL

A MI FAMILIA Y A MIS AMIGOS

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por regalarme la oportunidad de la vida y la capacidad para aprender de ella.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Departamento de Ingeniería Agroindustrial por mi formación y por la ayuda económica recibida durante mis estudios de posgrado.

Al Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia por todos los conocimientos prácticos adquiridos.

A la Dra Ernestina Valadez Moctezuma, por su invaluable apoyo, sus acertados consejos, su experiencia, por motivarme a la investigación y por su confianza en mí.

Al M. C. Alberto J. Valencia B, por su ayuda incondicional, por todo lo que aprendí gracias a él, a quien jamás dejaré de agradecer todas sus atenciones hacia mí.

A la Dra. Hilda Silva por su interés en la tesis y sus valiosas contribuciones.

Al Dr. Gabriel Leyva por su apoyo constante, su paciencia y entusiasmo en mis estudios y tesis.

Al M.C. Armando Santos Moreno, por la alegría y entusiasmo en la conclusión de este trabajo.

Al M.C. David Rubio, Dr. Arturo Hernández Montes y M.C. Abraham Villegas por su comprensión y disposición en el logro de esta meta.

A mis amigos: Juan, Thalía, Rosendo, Lily, Carlos, Oscar, Mónica, Martha, Guadalupe, Jesús, Uriel y Oswaldo, gracias por compartir conmigo incontables momentos de alegría.

A Carmina, Chuy y Doris por su valiosa colaboración en el trabajo y en mis estudios.

DATOS BIOGRÁFICOS

María Lilitiana Bolaños Carrillo nació el 27 de Noviembre de 1979 en México D.F. Su formación académica inició con sus estudios básicos en Texcoco, Estado de México. Posteriormente realizó sus estudios de Nivel Medio Básico en Texcoco y Chiautla, Estado de México, su formación de Nivel Medio Superior la llevó a cabo en la Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Su educación superior la realizó en la misma Universidad, donde obtuvo el título de Ingeniero Agroindustrial. Trabajó como jefe de turno en la Cadena de Restaurantes Kentucky Fried Chicken en Ecatepec y Texcoco, Estado de México.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS DE KEFIR

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM KEFIR

María Lilliana Bolaños Carrillo¹ y Gabriel Leyva Ruelas²

RESUMEN

Con el objetivo de caracterizar bacterias lácticas, se aislaron 7 cepas de kefir, leche fermentada tradicional que contiene microflora diversa; compuesta principalmente de bacterias lácticas y levaduras. Los aislamientos se caracterizaron e identificaron a nivel morfológico y a nivel molecular usando PCR-RAPD. Los 7 aislamientos resultaron ser bacterias de forma bacilar, Gram positivas, catalasa negativas, no esporuladas; similares al género *Lactobacillus*. El análisis del dendrograma construido con las huellas genómicas de las cepas en estudio, mostró que con un coeficiente de similitud de 0.75, se definieron 3 grupos diferentes. El primero formado por los aislamientos K-004, K-08B y K-001, el segundo comprende la cepa K-06C y el tercero lo forman las cepas K-080, K-002 y K-08C. Las cepas K-004, K-08B y K-001 tuvieron mayor similitud con *Lactobacillus casei* que las bacterias K-06C, K-080, K-002 y K-08C. Todas las cepas mostraron alta capacidad acidificante en leche, con una reducción de pH hasta niveles de 2.5-4.8, incubando a 37°C por 24 horas.

Palabras Clave: kefir, bacterias lácticas, leches fermentadas, PCR-RAPD, *Lactobacillus casei*.

¹Tesista
²Director

ABSTRACT

With the aim of characterizing lactic acid bacteria, 7 strains were isolated from kefir, a traditional fermented milk that contains diverse microflora consisting mainly of lactic acid bacteria and yeasts. The isolated bacteria were characterized morphologically and with the aid of PCR-RAPD, a molecular technique. The seven isolates were Gram positive, catalase negative, non-sporulated and rod shaped, thus corresponding to the genus *Lactobacillus*. The dendrogram analysis obtained through genomic fingerprints from the strains studied, showed that with a similarity coefficient of 0.75, 3 different groups could be determined. The first group is made up of K-004, K-08B and K-001 strains, the second only contains the K-06C strain, and the third one is made up of the K-080, K-002 and K-08C strains. K-004, K-08B and K-001 strains are more similar to *Lactobacillus casei* than K-06C, K-080, K-002 and K-08C bacteria are. The isolated bacteria showed high acidifying activity when inoculated into milk and decreased pH values to 2.5-4.8 after 24 hours of incubation at 37°C.

Keywords: kefir, lactic acid bacteria, fermented milk, PCR-RAPD, *Lactobacillus casei*.

Thesis author
Thesis director

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO I .Introducción	1
CAPITULO II . Revisión de literatura	3
II.1 Leches Fermentadas	3
II. 1.1. Diversidad de leches fermentadas	4
II. 1.2. Beneficios nutricionales y terapéuticos	5
II. 2. El kéfir	11
II. 2.1.Composición química y microbiológica del kéfir	11
II. 3. Las bacterias lácticas	14
II. 3.1. Importancia de las bacterias lácticas	18
II. 3.2. Identificación de bacterias lácticas en productos lácteos	19
II. 3.3. Caracterización de las bacterias lácticas	21

CAPITULO III. Aislamiento y caracterización por medio de 23
PCR-RAPD de siete bacterias lácticas del kéfir.

III. 1. Resumen	23
III. 2. Abstract	24
III. 3. Introducción	25
III. 4. Materiales y Métodos	27
III. 4.1. Aislamiento de las bacterias del Kéfir	27
III. 4.2. Selección y purificación de las colonias bacterianas seleccionadas	27
III. 4.3. Identificación morfológica de las bacterias aisladas.	29
III. 4.4. Extracción del DNA total	29
III. 4.5. Selección de iniciadores Carl Roth Serie K y Serie G y amplificación por medio de RAPD-PCR	31
III. 4.6. Análisis del perfil electroforético generado con RAPD	34
III. 4.7. Elaboración del dendrograma	34

III. 5. Resultados y discusión	35
III. 5.1. Aislamiento e identificación de las bacterias lácticas	35
III. 5.2. Extracción, cuantificación y calidad del DNA	44
III. 5.3. Selección de iniciadores Carl Roth Serie K y Serie G	45
III. 5.4. Productos de amplificación con la técnica RAPD.	48
III. 5.5. Análisis estadístico del dendrograma	52
III. 6. Conclusiones	54
III. 7. Literatura citada	56
CAPITULO IV Literatura	57

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Algunos productos lácteos fermentados que se consumen en diferentes regiones del mundo	5
Cuadro 2. Especies bacterianas usadas como cultivos probióticos en leches fermentadas.	8
Cuadro 3. Composición química de los granos de kéfir	14
Cuadro 4. Principales bacterias lácticas utilizadas en los productos lácteos.	15
Cuadro 5. Mezcla de reacción, concentración y volumen para la selección de iniciadores Carl Roth Series K y G.	32
Cuadro 6. Programa del termociclador para la reacción PCR-RAPD.	33
Cuadro 7. Resultados de la siembra de diluciones en medio MRS agar	37
Cuadro 8. pH en leche después de la fermentación por las bacterias aisladas	40
Cuadro 9. Cuantificación de DNA por medio del Espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda Bio.	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rutas principales de metabolismo de lactosa por bacterias ácido-lácticas usadas en la fermentación de la leche	17
Figura 2. Representación esquemática del crecimiento de las bacterias en medio MRS sólido y líquido en tubo.	38
Figura 3. Contaminantes del género <i>Streptococcus</i>	38
Figura 4. Aislamiento K-001 y K-002	42
Figura 5. Aislamiento K-004, K-060 y K-06C	42
Figura 6. Aislamiento K-080 y K-08B	43
Figura 7. Aislamiento K-08C	43
Figura 8. Gel de calidad del DNA obtenido	45
Figura 9. Productos de amplificación de los iniciadores G1-G9 de la Serie Roth G con el aislamiento K-002.	46
Figura 10. Productos de amplificación de los iniciadores G11-G20 de la Serie Roth G con el aislamiento K-002.	46
Figura 11. Productos de amplificación de los iniciadores de la Serie Roth K con el aislamiento K-002	47
Figura 12. Perfil electroforético de la amplificación de las cepas bacterianas utilizando los iniciadores Roth G17 y Roth K17.	49
Figura 13. Agrupamiento de las 7 cepas aisladas del kéfir	53

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Las leches fermentadas forman parte de la dieta de los seres humanos desde la antigüedad. Con el paso del tiempo el consumo de estos productos se ha modificado, ya que su elaboración era principalmente artesanal. En la actualidad, numerosos productos comerciales han salido al mercado modificando los artesanales que ya existían. Tal es el caso de las bebidas probióticas, cuya producción y consumo van en aumento constante; aunque gran parte de los microorganismos empleados para su producción son parte de la microflora natural de leches fermentadas artesanales.

El principio de obtención de las leches fermentadas es la selección de las bacterias lácticas que se inocularan al medio de fermentación. Si bien en la actualidad se ha incrementado la aplicación de técnicas de ingeniería genética para la modificación de los microorganismos, aun se realiza investigación de bacterias, hongos y levaduras en productos artesanales, con la intención de encontrar microorganismos innovadores, que mejoren las características sensoriales de los productos fermentados.

Los fermentados artesanales son fuente de una gran diversidad microbiológica, ya que está en función del origen geográfico, las formas de producción, el inóculo y los medios de fermentación, entre otros factores; lo cual hace que cada producto sea un microecosistema único.

En México, se elaboran productos fermentados artesanales diversos, entre los cuales las bebidas alcohólicas son las que ocupan el lugar más importante. Sin embargo, regionalmente se elaboran otros productos que también forman parte de la cultura y tradición mexicanas. Así, es posible encontrar quesos o leches fermentadas con características únicas, y diferentes entre las distintas zonas del país, aun tratándose del mismo producto.

Dentro de las leches fermentadas producidas artesanalmente en México se encuentra el kéfir, conocido también como leche de búlgaros. Este producto se elabora a nivel casero y forma parte de la alimentación diaria de muchas familias.

En este trabajo se aislaron siete bacterias del género *Lactobacillus* sp. a partir del kéfir regional y se caracterizaron por medio de la técnica RAPD-PCR. Los resultados se analizaron con la finalidad de explicar una

parte de la diversidad microbiológica que se encuentra en este producto lácteo fermentado.

CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA

II.1. Leches fermentadas

De Soroa (1974), define a las leches fermentadas o acidificadas como "Las leches modificadas por la acción microbiana o fermentos lácticos que son específicos para cada uno de estos tipos de leches". El mismo autor clasifica estos productos en dos grupos:

A. Leches fermentadas ácidas.

La fermentación láctica es el principal proceso de transformación de la leche. Se encuentran en este grupo las siguientes leches fermentadas: yogur, leche acidófila de Norteamérica y Alemania, leben de Egipto y Arabia, mazum de Armenia, kaimak de Bosnia, Herzegovina y Montenegro, entre otras.

B. Leches fermentadas ácido-alcohólicas.

La fermentación láctica se presenta acompañada de la fermentación alcohólica en la leche. En este grupo están el kéfir y el koumiss de Rusia.

II.1.1. Diversidad de leches fermentadas

Chandan (2002), atribuye la diversidad de las leches fermentadas a los siguientes factores:

- a. El uso de leche de diferentes especies animales, tales como vaca, búfalo, oveja, yak, cabra y camello.
- b. La aplicación de microflora diversa.
- c. La adición de azúcar, condimentos, granos. frutas. etc. para crear una variedad de sabores y texturas.
- d. La aplicación de métodos adicionales de conservación como por ejemplo: congelación, concentración y secado.

Lo anterior da como resultado el consumo de una gran cantidad de leches fermentadas en el mundo, algunas de ellas se mencionan en el Cuadro 1.

La diversidad microbiológica de las leches fermentadas, se debe a que la leche es el hábitat natural de un número considerable de bacterias lácticas que, al modificar sus condiciones y el medio de fermentación, generan una gran variedad en aromas, sabores y texturas en los productos finales (Chandan, 2002)

Cuadro 1. Algunos productos lácteos fermentados que se consumen en diferentes regiones del mundo.

Nombre del producto	País o Región
Leche acidófila	Estados Unidos, Rusia
Ayran/eyran/jugurt	Turquía
Cieddu	Italia
Dahi	India y alrededores
Dough/abdoogh/mast	Afghanistan, Irán
Ergo	Etiopía
Gruzovina	Yugoslavia
Katyk	Transcaucasia
CEFIR	Rusia y Asia Central
Leben/labán/labán rayeb	Líbano, Siria
Mazun/matzoón/matsun	Armenia
Shosim	Nepal
Shrikhand	India
Tarho	Hungría
Yakult	Japón
Ymer	Dinamarca
Zabady	Egipto, Sudán

Fuente: Chandan, 2002

II.1.2. Beneficios nutricionales y terapéuticos.

Las leches fermentadas no son solamente importantes por sus características de aromas, sabores o texturas únicas y especiales; sino también son parte de las tradiciones culturales y religiosas de muchos pueblos en el mundo y su consumo regular contribuye a una dieta saludable.

La fermentación láctica mejora la digestibilidad y el contenido nutricional de las proteínas y carbohidratos de la leche. La actividad proteolítica de las bacterias de las leches fermentadas resulta en que éstos productos tienen un mayor contenido de péptidos y aminoácidos libres que la leche, especialmente de valina, histidina, serina y prolina (Symons, 1993). Por lo anterior, las moléculas producto de la digestión de las proteínas de las leches fermentadas en el estómago, son notablemente menores que las formadas después de la ingestión de la leche por si misma (Kalantzopoulos, 1997).

Las bacterias lácticas fermentan entre 20 y 30 % de la lactosa en leche, a través de diferentes rutas metabólicas hasta la producción de ácido láctico. La reducción de la concentración de lactosa en la leche, junto con la presencia de un alto número de bacterias que contienen a la enzima β -galactosidasa, explica porqué los individuos intolerantes a la lactosa pueden consumir leches fermentadas (Symons, 1993).

Los beneficios a la salud, que aportan las leches fermentadas a los seres humanos, se han reportado desde principios del siglo XX, cuando el científico ruso Elie

Metchnikoff sugería que la vida, larga y saludable de los campesinos búlgaros se debía al consumo de productos fermentados. Él creía que cuando se consumía a los bacilos fermentadores, se favorecía a la microflora del colon, disminuyendo la actividad microbiana tóxica (Bibel, 1988).

A pesar de que los productos fermentados se han consumido por miles de años, la investigación que se ha llevado a cabo, para determinar los efectos benéficos en los seres humanos, cobró interés entre los científicos solo hasta los años 1970's. Los principales efectos benéficos se han atribuido al consumo de productos fermentados que contienen microorganismos probióticos.

Los microorganismos probióticos se definen como preparaciones celulares o componentes de las células microbianas que tienen un efecto benéfico en la salud y bienestar del huésped (Salminen et al., 1999).

Las bacterias ácido lácticas que se usan para la elaboración de las leches fermentadas, a pesar de aportar algunos efectos benéficos a la salud, no sobreviven en el tracto intestinal; por lo que la tendencia es a la incorporación de bacterias probióticas como *Lactobacillus*

acidophillus y Bifidobacterias a las leches fermentadas. (Shah, 2001). Los principales microorganismos probióticos que se utilizan mundialmente se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Especies bacterianas usadas como cultivos probióticos en leches fermentadas.

Especie	Cepa
<i>Lactobacillus acidophillus</i>	La2, La5, Johnsonii, NCFM, DDS-1, SBT-2062
<i>L.bulgaricus</i>	Lb12
<i>L.lactis</i>	La1
<i>L.plantarum</i>	299v, Lp01
<i>L.rhamnosus</i>	GG, GR-1, 271, LB21
<i>L.reuteri</i>	SD2112
<i>L.casei</i>	Shirota, Immunitass, 744, 01
<i>L.paracasei</i>	CRL 431
<i>L. fermentum</i>	RC-14
<i>L.helveticus</i>	B02
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	---
<i>B.longum</i>	B536, SBT-2928
<i>B. breve</i>	Yakult
<i>B. bifidus</i>	Bb-11
<i>B. essensis</i>	Danone (Bio Activia)
<i>B.lactis</i>	Bb-02
<i>B. infantis</i>	Shirota, immunitass, 744, 01
<i>B. laterosporus</i>	CRL 431
<i>B. subtilis</i>	---

Fuente: Shah, 2001

La investigación en el área de los probióticos durante las décadas pasadas, se ha conducido desde el aislamiento de bacterias de productos lácteos fermentados, hasta aislamientos de bacterias de origen intestinal (Sanders, 1999). Además se han efectuado numerosos estudios para comprobar los beneficios que se han supuesto hacia la salud del ser humano.

Uno de los beneficios comprobados hasta el momento es el antagonismo entre bacterias probióticas y patógenos. Las bacterias probióticas, como *Lactobacillus acidophilus* y *L. casei*, producen ácido láctico como principal producto final de la fermentación. Las bifidobacterias producen ácido acético y láctico. Además los organismos probióticos producen ácido cítrico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas como sustancias antimicrobianas. Todas estas sustancias inhibitorias crean ambientes hostiles para los patógenos del alimento, así como para los organismos que lo degradan.

La adherencia de los probióticos es un tema que también se ha investigado. Se busca que las bacterias tengan la capacidad de adherirse, multiplicarse y colonizar el intestino del ser humano, de este modo, las bacterias

patógenas tendrían que competir con las probióticas para ocupar los "nichos" intestinales. Para asegurar la adherencia de los probióticos a las paredes intestinales, se han realizado estudios simulando las condiciones del proceso del alimento, sometiendo a las bacterias a la acción de ácidos y pepsina, sin embargo, aunque no se observe la adherencia *in vitro*, no se excluye necesariamente la ausencia de un efecto *in vivo* (Shah, 2001; Ouwehand *et al.*, 2001).

El consumo de productos probióticos también se han asociado a la inhibición de carcinógenos por los microorganismos colonizadores, al fortalecimiento de las defensas contra infecciones y tumores, reducción de las concentraciones de colesterol en la sangre, efectos antihipertensivos, prevención de alergias, entre otros (Kalantzopoulou, 1997; Sanders, 1999; St-Onge *et al.*, 2000; Shah, 2001).

Para asegurar los beneficios del consumo de leches fermentadas con microorganismos probióticos, es necesario realizar estudios más profundos, sobre todo en los efectos directos en el ser humano, ya que la mayor parte de las investigaciones se realizan en animales. Además es necesario encontrar soluciones para los problemas de

estabilidad y viabilidad de los probióticos en los alimentos, investigar sobre tecnologías de microencapsulado de las bacterias, mantenimiento de bajos costos y aprovechamiento de materias primas nativas (Mattila-Sandholm et al., 2002).

II.2. El kéfir

El kéfir es una leche fermentada, ácida, ligeramente alcohólica y efervescente, el probable origen y principal lugar de consumo son las Montañas Caucásicas de Rusia. Su elaboración es principalmente artesanal y puede obtenerse a partir de leche de cabra, oveja o vaca. Los granos del kéfir, son el inóculo, por medio del cual se obtiene el producto final (Steinkraus, 1996).

II.2.1. Composición química y microbiológica del kéfir.

El kéfir se obtiene gracias a la fermentación de la leche por la microflora simbiótica de levaduras y bacterias. Los géneros más frecuentes de bacterias son: *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*; en las levaduras son *Saccharomyces* y *Torula* (Prescott y Dunn, 1983).

Dado que el kéfir se elabora mundialmente, en su mayoría como un producto artesanal, la microflora es diversa y depende del lugar de origen.

Numerosos estudios han aislado e identificado a los microorganismos presentes tanto en los granos del kéfir como en los productos fermentados. Algunas especies reportadas de bacterias en el kéfir son: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diaceylactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus kéfir*, *Lactobacillus parakéfir*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplanarum*, *Lactobacillus casei* subsp. *tolerans*, *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus viridiscens*, *Lactobacillus fermentum* y *Leuconostoc mesenteroides*.

Las especies de levaduras reportadas son: *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Candida inconspicua*, *Candida maris*, *Torulaspora delbrueckii*, *Debaromyces hansenii*,

Zygosacharomyces rouxii y *Pichia fermentans* (Angulo et al., 1993; Chin-Wen et al., 1999; Garrote et al., 2001; Loretan et al., 2003; Simova et al., 2002).

Dentro de la microflora contaminante se han encontrado bacterias como *Bacillus*, *Micrococcus* y *Pediococcus*, que provienen posiblemente de la leche no tratada térmicamente. Además se han encontrado también especies de *Acetobacter* y *Enterobacteriaceae*, que son resultado de la falta de higiene durante la preparación del kéfir (Angulo et al., 1993).

Los granos del kéfir están compuestos principalmente de proteínas y polisacáridos dentro de los cuales se encuentra la microflora (Garrote et al., 1997). Las bacterias ácido lácticas se encuentran localizadas principalmente en la capa superficial y las levaduras se encuentran al centro de los granos (Chin-Wen et al., 1999).

La composición química de los granos del kéfir depende de la especie de la cual se obtenga la leche, de la región y forma de producción, además de otros factores, sin embargo la composición promedio de los granos del kéfir muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Composición química de los granos del kéfir.

Elementos	Cantidad
Agua	890-900 g·kg ⁻¹
Lípidos	2 g·kg ⁻¹
Proteínas	30 g·kg ⁻¹
Azúcares	60 g·kg ⁻¹
Cenizas	7 g·kg ⁻¹

Fuente: Garrote et al., 1997

II.3. Las bacterias lácticas

Las bacterias lácticas (LAB) son un conjunto de microorganismos dispersos en la naturaleza, se encuentran principalmente en el suelo y donde existan altas concentraciones de carbohidratos, productos de hidrólisis de proteínas, vitaminas y poco oxígeno. Muchas de ellas se encuentran normalmente en la leche, así como en carne y vegetales; algunas bacterias lácticas son habitantes normales del cuerpo humano. Las LAB se clasifican juntas porque su producto final de fermentación, el ácido láctico; es común en todas ellas. Pueden tolerar condiciones muy ácidas (alrededor de pH 4) son Gram positivas y anaerobias pero aerotolerantes. Su morfología es cocos, bastones, ovoides e incluso de "Y" si se consideran a las bifidobacterias dentro de este grupo (Saloff-Coste, 1994).

Las principales bacterias lácticas para la obtención de productos lácteos se presentan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Principales bacterias lácticas utilizadas en productos lácteos.

Género	Forma	Temperatura óptima	Especies
<i>Streptococcus</i>	cocos	40-44 °C	<i>Str. thermophilus</i>
			<i>Lb. bulgaricus</i>
	bastones	40-44 °C	<i>Lb. helveticus</i>
			<i>Lb. lactis</i> <i>Lb. acidophilus</i>
<i>Lactobacillus</i>		25-30 °C	<i>Lb. casei</i>
			<i>Lb. kéfir</i>
<i>Lactococcus</i>	cocos	25-30 °C	<i>Lc. lactis</i>
			<i>Lc. cremoris</i>
<i>Pediococcus</i>	cocos	25-30 °C	<i>Lc. diacetylactis</i>
			<i>P. acidolactici</i>
			<i>Ln. cremoris</i> <i>Ln. dextranicum</i>
<i>Leuconostoc</i>	ovoides	25-30 °C	<i>Ln. lactis</i>
			<i>B. brevis</i>
<i>Bifidobacterium</i>	Bastones	36-38 °C	<i>B. bifidum</i>
	c		<i>B. longum</i>
	bífidos		<i>B. infantis</i>

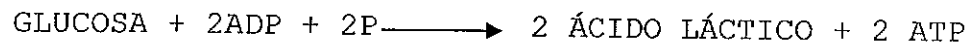
Fuente: Saloff-Coste, 1994

La fermentación láctica es el proceso mediante el cual se produce ácido láctico a partir de glucosa. Durante la

glicólisis, que es la fase inicial de la fermentación, una molécula de glucosa se oxida hasta obtener dos moléculas de ácido pirúvico. Esta oxidación genera la energía que se utiliza para formar dos moléculas de ATP. En el siguiente paso, las dos moléculas de ácido pirúvico se reducen para formar dos moléculas de NADH que a su vez forman dos moléculas de ácido láctico. (Ver Figura 1)

Debido a que el ácido láctico es producto final de la reacción, no continúa a ninguna oxidación, y la mayoría de la energía producida por la reacción permanece almacenada en el ácido láctico, por lo que esta fermentación rinde solo una baja cantidad de energía.

La reacción general es:



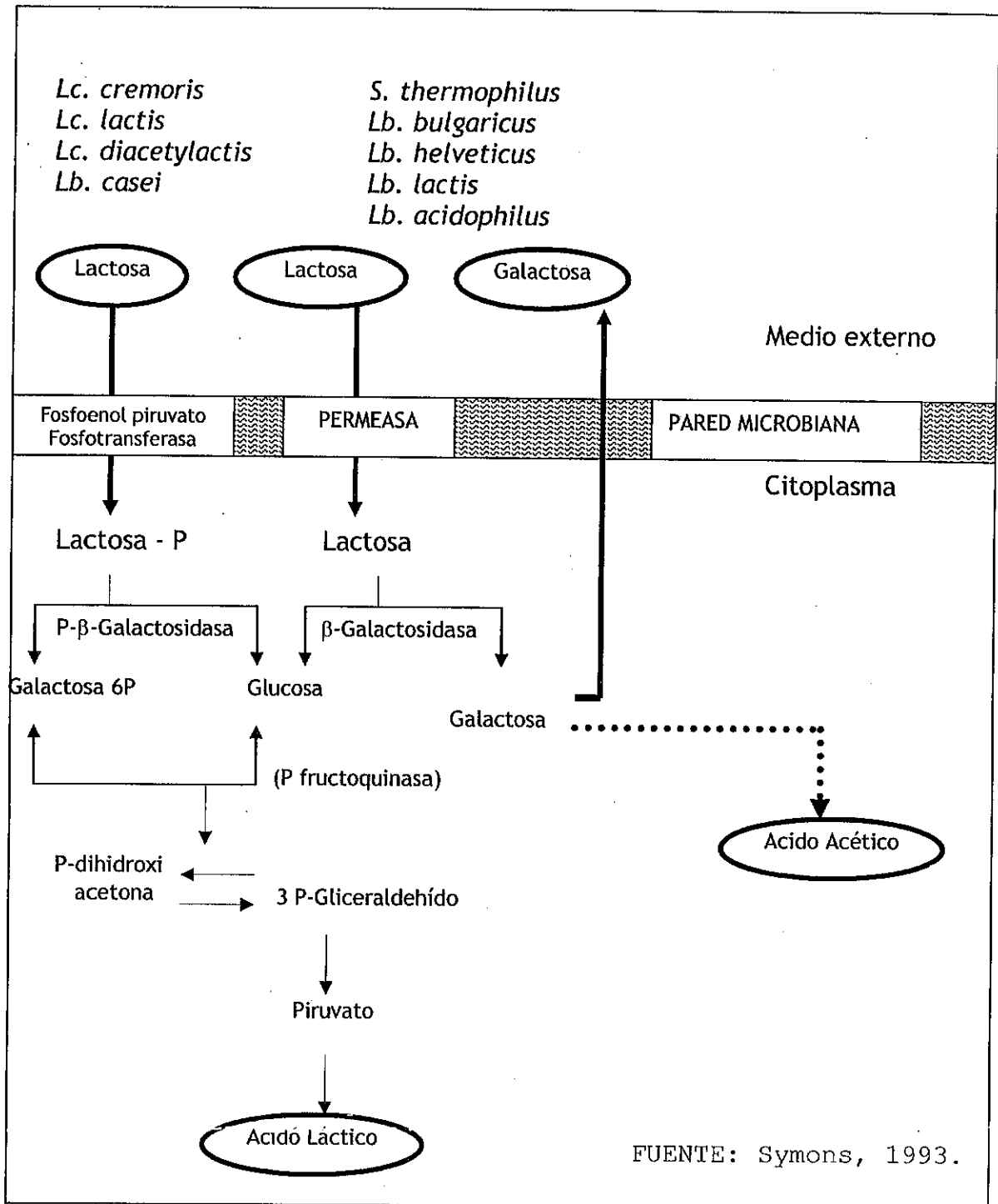


Figura 1. Rutas principales de metabolismo de lactosa por bacterias ácido-lácticas usadas en la fermentación de la leche (*Lc*= *Lactococcus* *Lb*= *Lactobacillus* *S*= *Streptococcus*)

De acuerdo a los productos finales de su metabolismo, las bacterias ácido lácticas pueden dividirse en homofermentativas y heterofermentativas.

Son homofermentativas si entre 70 y 80% del producto final es ácido láctico, y heterofermentativas cuando se produce al menos 50% de ácido láctico más otros compuestos como ácido acético, CO₂ y etanol (Tortora et al., 1995).

II.3.1. Importancia de las bacterias lácticas

La fermentación de los alimentos se ha utilizado por siglos como un método para conservar productos alimenticios perecederos, las bacterias lácticas (LAB) son ampliamente usadas en la producción de alimentos fermentados. Las LAB intervienen en la transformación la leche generando nuevos aromas, sabores y texturas en el producto final. La temperatura, pH, presencia de oxígeno y la composición de la leche, contribuyen con los atributos finales del producto específico (Hansen, 2002).

Existen bacterias específicas para desarrollar atributos en los productos fermentados finales. *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus cremoris* y algunas especies de

Leuconostoc producen exopolisacáridos estructurales que modifican la textura, incrementando la viscosidad. En el sabor y el aroma de las leches fermentadas están involucradas las bacterias *Lactococcus diacetylactis* y *Leuconostoc cremoris*, que imparten sabor a mantequilla en las leches fermentadas. Las levaduras y los mohos también pueden incluirse a la fermentación para obtener sabores distintivos (Saloff-Coste, 1994).

II.3.2. Identificación de bacterias lácticas en productos lácteos.

La identificación de un microorganismo se realiza tradicionalmente, por medio de un esquema de clasificación. Desde su primera edición en 1923, el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ha sido la referencia más utilizada para identificar bacterias, por medio de criterios como composición de la pared celular, morfología, tinción diferencial, requerimientos de oxígeno y pruebas bioquímicas. Los microorganismos son muy similares morfológicamente para poderlos clasificar por su estructura, por lo cual al observar al microscopio a los microorganismos, poco sabemos de las relaciones filogenéticas y evolutivas que existen entre ellas; sin embargo es un paso inicial en la identificación y

caracterización de las bacterias. La tinción diferencial, permite hacer una clasificación de las bacterias en función de los componentes de la pared celular, es una herramienta más para el acercamiento a la especie a la que pertenece el microorganismo. Las pruebas bioquímicas, se basan en la actividad enzimática de las bacterias, por lo que aun los microorganismos más relacionados pueden diferenciarse en distintas especies (Tortora et al., 1995).

A través del tiempo las formas de identificación de los microorganismos han evolucionado de tal manera que el desarrollo de nuevos métodos permita obtener mayor precisión en la identificación, en menor tiempo y a menor costo.

Los métodos convencionales de detección y determinación de las especies de lactobacilos en productos lácteos son largos y a veces ambiguos. En la actualidad, la investigación se ha enfocado en la aplicación de técnicas de biología molecular para la detección y diferenciación rápida de las bacterias lácticas. En particular, el uso de iniciadores y sondas para la codificación de genes del ácido ribonucleico ribosomal (rRNA) ofrece un gran potencial. Estas secuencias de genes contienen regiones

altamente conservadas comunes a todas las eubacterias así como regiones altamente variables únicas a especies particulares. Las sondas universales o iniciadores que se alinearán a los genes que codifican para el rRNA de todas las eubacterias pueden diseñarse a partir de las regiones conservadas de los genes para el 16S rRNA e iniciadores específicos para especies de las regiones altamente variables de los genes para el 16S rRNA (Drake et al., 1996).

II.3.3. Caracterización de las bacterias lácticas

Las bacterias lácticas, en su mayoría, tienen requerimientos nutricionales muy similares y crecen en condiciones parecidas, por ello puede ser muy difícil una diferenciación clara entre especies. Recientemente la investigación se ha enfocado a la aplicación de técnicas de huellas genético-moleculares para la diferenciación confiable de las bacterias (Giraffa et al., 1998). Se han desarrollado métodos fenotípicos como es el análisis de las proteínas de la célula completa por medio de geles de SDS-poliacrilamida. Con respecto a las técnicas genotípicas, se han utilizado métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa o polymerase chain reaction (PCR). Dentro de las técnicas moleculares que se utilizan para caracterizar

e identificar bacterias lácticas está el método de polimorfismos aleatorios de DNA o Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) que se ha demostrado rápido y sensible en su aplicación (Schleifer *et al.*, 1995).

Entre las variantes de la PCR están también el análisis de restricción del DNA amplificado (PCR-ARDRA), la PCR basada en secuencias repetidas (rep-PCR), Restriction Fragment Length Polymorfism (RFLP), y el análisis de la secuencia del 16S rDNA, siendo éstas últimas y RAPD-PCR las técnicas que más se emplean para la identificación y caracterización de las bacterias lácticas (Giraffa *et al.*, 1998; Drake *et al.*, 1996; Coventry *et al.*, 1997; Cocconcelli *et al.*, 1997; Pu *et al.*, 1998; Moschetti *et al.*, 1998; Morea *et al.*, 1999; Fitzsimons *et al.*, 1999; Gaya *et al.*, 1999; Tynkkynen *et al.*, 1999; Ward y Timmins, 1999; Sánchez *et al.*, 2000; Cocolin *et al.*, 2000; De Urraza *et al.*, 2000; De Angelis *et al.*, 2001, Mannu *et al.*, 2002; Lombardi *et al.*, 2002; Ogier *et al.*, 2002; Yeung *et al.*, 2002).

CAPÍTULO III. Aislamiento y caracterización por medio de PCR-RAPD de siete bacterias lácticas del kéfir ¹

María Lilitana Bolaños Carrillo ², Gabriel Leyva Ruelas ³,

Ernestina Valadez Moctezuma ⁴, Armando Santos Moreno ³

III.1. Resumen

Con el objetivo de caracterizar bacterias lácticas, se aislaron 7 cepas de kéfir, leche fermentada tradicional que contiene microflora diversa; compuesta principalmente de bacterias lácticas y levaduras. Los aislamientos se caracterizaron e identificaron a nivel morfológico y a nivel molecular usando PCR-RAPD. Los 7 aislamientos resultaron ser bacterias de forma bacilar, Gram positivas, catalasa negativas, no esporuladas; similares al género *Lactobacillus*. El análisis del dendrograma construido con las huellas genómicas de las cepas en estudio, mostró que con un coeficiente de similitud de 0.8, se definieron 3 grupos diferentes. En el primero se agruparon los aislamientos K-004, K-08B y K-001, el segundo comprende la cepa K-06C y el tercero lo forman las cepas K-080, K-002 y K-08C. Las cepas K-004, K-08B y K-001 tuvieron mayor similitud con *Lactobacillus casei* que las bacterias K-06C, K-080, K-002 y K-08C. Todas las cepas mostraron alta capacidad acidificante en leche, con una reducción de pH hasta niveles de 2.5-4.8, incubando a 37°C por 24 horas.

Palabras Clave: kéfir, bacterias lácticas, leches fermentadas, PCR-RAPD, *Lactobacillus casei*.

²Estudiante de la Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria ³Profesor investigador de la Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria. ⁴Profesor investigador de la Maestría en Protección Vegetal. Universidad Autónoma Chapingo.

¹ Para su posible publicación en la Revista Biotecnología, de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.

III.2. Abstract

With the aim of characterizing lactic acid bacteria, 7 strains were isolated from kefir, a traditional fermented milk that contains diverse microflora consisting mainly of lactic acid bacteria and yeasts. The isolated bacteria were characterized morphologically and with the aid of PCR-RAPD, a molecular technique. The seven isolates were Gram positive, catalase negative, non-sporulated and rod shaped, thus corresponding to the genus *Lactobacillus*. The dendrogram analysis obtained through genomic fingerprints from the strains studied, showed that with a similarity coefficient of 0.75, 3 different groups could be determined. The first group is made up of K-004, K-08B and K-001 strains, the second only contains the K-06C strain, and the third one is made up of the K-080, K-002 and K-08C strains. K-004, K-08B and K-001 strains are more similar to *Lactobacillus casei* than K-06C, K-080, K-002 and K-08C bacterias are. The isolated bacteria showed high acidifying activity when inoculated into milk and decreased pH values to 2.5-4.8 after 24 hours of incubation at 37°C.

Keywords: kefir, lactic acid bacteria, fermented milk, PCR-RAPD, *Lactobacillus casei*.

III.3. Introducción

Las leches fermentadas artesanales se han caracterizado en su composición microbiológica, encontrándose diversas especies, incluso se han encontrado microorganismos desconocidos hasta el momento. Existen alrededor de 400 productos lácteos fermentados en el mundo, el más conocido es el yogur, que se obtiene por la fermentación de dos especies bacterianas. Sin embargo, en muchos países se producen de manera artesanal otras leches fermentadas que se obtienen por la acción de más de dos especies. Es este el caso del kéfir o leche de búlgaros. El kéfir se obtiene gracias a la fermentación de la leche por la microflora simbiótica de levaduras y bacterias. Los géneros más frecuentes de bacterias son: *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*; en las levaduras son *Saccharomyces* y *Torula*. (Prescott y Dunn, 1983). Algunas especies reportadas de bacterias en el kéfir son: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diaceylactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus kéfir*, *Lactobacillus parakéfir*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* subsp. *pseudopantarum*, *Lactobacillus casei* subsp. *tolerans*,

Lactobacillus casei subsp. *rhannosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus viridiscens*, *Lactobacillus fermentum* y *Leuconostoc mesenteroides* (Angulo et al., 1983; Chin-Wen et al., 1999; Garrote et al., 2001; Loretan et al., 2003; Simova et al., 2002). Recientemente la investigación se ha enfocado a la aplicación de técnicas de huellas moleculares para la diferenciación confiable de las bacterias (Giraffa et al., 1998). Con respecto a las técnicas genotípicas, se han utilizado métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa o polymerase chain reaction (PCR). Dentro de las técnicas moleculares que se utilizan para caracterizar e identificar bacterias lácticas está el método de polimorfismos de DNA o Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) que se ha demostrado rápido y sensible en su aplicación (Schleifer et al., 1995).

En este trabajo se aislaron y caracterizaron bacterias a partir del kéfir regional utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por medio de la técnica Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD) para explicar una parte de la diversidad microbiológica que se encuentra en este producto lácteo fermentado, así como definir las especies que se encuentran en el kéfir regional.

III.4. Materiales y métodos

III.4.1. Aislamiento de las bacterias del kéfir.

Los granos de kéfir que se utilizaron como inóculo fueron obtenidos de la región de Texcoco, Estado de México. Se inocularon al 10% en 250 mL de leche entera (3.5% de grasa) y leche descremada ultrapasteurizada (0.5% de grasa) de la marca comercial Alpura. El kéfir se incubó a 30° C por 48 h. Se realizaron tres resiembras en leche para obtener el producto fermentado para los aislamientos. Del kéfir obtenido, se realizaron cuatro diluciones en Solución de Ringer: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} .

Las diluciones se sembraron por triplicado en medio De Man Rogosa Sharpe (MRS) (DIFCO, BD, New Jersey, USA) para aislamiento y cultivo de lactobacilos, utilizando la técnica de vaciado en placa en cajas de Petri. La incubación se llevó a cabo a 37°C por 72 h.

III.4.2. Selección y purificación de las colonias bacterianas seleccionadas

Se observó la morfología de las colonias crecidas en las placas y se observaron al microscopio por medio de tinción de Gram. La reacción de Gram se confirmó por medio de la

prueba de hidróxido de potasio al 3%, las bacterias que formaron hilo se consideraron como Gram negativas mientras que las que no lo formaron fueron Gram positivas. La prueba de la catalasa se realizó agregando 2 gotas de peróxido de hidrógeno al cultivo bacteriano, al no formar burbujas se consideraron catalasa negativas. Se seleccionaron las colonias bacterianas de color blanco, con diámetro menor a 1 mm; Gram positivas, en forma de bastón y con agrupación en cadenas. Las colonias seleccionadas se sembraron en medio MRS líquido, el cual se incubó por 72 h a 37 °C. Los aislamientos se resembraron por medio de vaciado en placa en agar MRS. Las colonias obtenidas se sembraron nuevamente en medio MRS líquido y se observaron al microscopio para evaluar la pureza. El procedimiento se repitió hasta que los aislamientos no mostraron bacterias contaminantes. La selección final se realizó en base a la capacidad acidificante de las bacterias, para lo cual se inoculó cada una de las bacterias purificadas al 1% en leche descremada ultrapasteurizada marca Alpura. Se incubó a 37° C por 24 h y después se midió el pH con un potenciómetro marca Conductronic pH 120.

III.4.3. Identificación morfológica de las bacterias aisladas.

Una vez que se determinó la pureza de las bacterias, se realizó la identificación a nivel de género de acuerdo Beukes et al., (2001). Las bacterias se sembraron en medio MRS líquido con glicerol al 15%, a -10 °C para su conservación.

III.4.4. Extracción del DNA total

La extracción del DNA total se realizó de acuerdo a Gómez et al., (2000) y Sambrook et al., (1989) con algunas modificaciones. Las células bacterianas se centrifugaron a 4 000 x g durante 5 min, se lavaron con 100 µL de agua destilada deionizada y se resuspendieron en 200 µL de buffer TES [50 mM Tris-HCl (pH=8.0) 5 mM EDTA, 5% p/v de sacarosa]. Se agregaron 100 µl de lisozima (20 mg·mL⁻¹; Sigma Chemical, Co) y la mezcla resultante se incubó a 37 °C durante 40 min. La lisis se realizó agregando 250 µL de SDS 1%, se adicionaron 4 µL de RNasa A (10 mg·mL⁻¹) y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Después se agregaron 10 µL de proteinasa K (10 mg/mL; Sigma Chemical, Co) y se incubó a 37 °C por 40 min. Posteriormente, se agregaron 400 µL de fenol saturado con Tris-HCl 100 mM; se

mezcló fuertemente y se centrifugó por 25 minutos a 14 000 x g.

La capa acuosa se transfirió a otro tubo, donde previamente se agregó un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, se agitó y se centrifugó durante 5 min a 14 000 x g.

La capa superior se transfirió nuevamente a otro tubo donde se agregaron 200 µL de acetato de amonio 7.5 M, los tubos se colocaron en hielo por 10 min y posteriormente se centrifugaron a 14 000 x g durante 5 min. La capa superior se transfirió a otro tubo donde se precipitó con 500 µL de isopropanol, se centrifugó y se lavó con etanol absoluto.

Finalmente el DNA se resuspendió en 30 µL de buffer TE pH 8.0 (10mM Tris-HCl pH 7.6, 1mM EDTA pH 8.0). La cuantificación del DNA se hizo a partir de una dilución 1:20, tomando 1 µL de DNA y 19 µL de agua destilada. La lectura se realizó por espectrofotometría UV a 260 nm (Perkin Elmer UV/VIS Lambda Bio), con un volumen total de la celda de 120 µL. La concentración se calculó con base en la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de DNA } \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1} = \frac{\text{Absorbancia} \times 50 \times 20}{1000}$$

La calidad del DNA se determinó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, cargando 10 µL a una concentración

de $0.1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ y $2 \mu\text{L}$ de amortiguador de carga 10X (Tris base 50 mM pH 8.0, azul de bromofenol $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, xilencianol $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, glicerol 25%, EDTA 5 mM pH 8.0 y agua doble destilada) en una cámara de electroforesis marca GIBCO BRL. La electroforesis se llevó a cabo por 2 h a 90 volts. Después, el gel se tiñó con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) para su tinción, se visualizó y se fotodocumentó con un transiluminador marca Dual Intensity UVP de luz ultravioleta modelo TS-20 y el software Kodak Digital Science 1D V.2.0.3.

III.4.5. Selección de iniciadores Carl Roth Serie K y Serie G y amplificación por medio de RAPD-PCR

Para la prueba de selección de iniciadores Carl Roth serie K se utilizó el aislamiento K-002. El parámetro de selección fue la producción de mayor número de bandas definidas. La mezcla de reacción para la evaluación de iniciadores se presenta en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Mezcla de reacción, concentración y volumen para la selección de iniciadores Carl Roth Series K y G.

Componente	Concentración	Volumen por reacción μL
DNA	20 ng·μL ⁻¹	5
Iniciadores ¹	20 pmol	2
dNTP's	500 μM	10
Amortiguador	10x	2.5
Cloruro de magnesio	1.0 mM	2
Taq DNA Polimerasa	1.5 U	0.4
Agua		3.1
Total		25

¹Los iniciadores se colocaron uno a uno en los tubos correspondientes depositando 2 μL por tubo.

Una vez que se colocó la reacción en cada tubo, se agregaron 25 μL de aceite mineral y los tubos se centrifugaron para meterlos al termociclador. La reacción de PCR se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente programa (Cuadro 6):

Cuadro 6. Programa del termociclador para la reacción de PCR-RAPD.

Programa	Temperatura °C	Ciclos	Tiempo
23	94	1	1'
24	94 desnaturalización		30"
	40 alineamiento	38	30"
	72 extensión		1' 30"
25	72 extensión	1	2' 30"
10	4 enfriamiento	α	α

Los productos de amplificación se colocaron en un gel de agarosa al 1.5%, se cargó también un marcador de peso molecular de 1000 pb marca GIBCO. Los productos se sometieron a electroforesis por 2 h a 90 volts. El gel fue teñido con bromuro de etidio ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) y fotodocumentado como se explicó anteriormente. La selección de los iniciadores que se utilizarían para caracterizar a las bacterias lácticas se realizó en función del número de bandas obtenidas con cada iniciador. La amplificación con la técnica RAPD se realizó con el mismo procedimiento que para la selección de los iniciadores. Una primera reacción se corrió utilizando el iniciador K17 y una segunda con el

iniciador G17, por medio de las cantidades que se indican en el Cuadro 6.

La separación de los productos amplificados se realizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, cargando 10 µL de los productos amplificados junto con 2 µL de amortiguador de carga.

III.4.6. Análisis del perfil electroforético generado con RAPD

El gel obtenido se analizó asignándoles pesos moleculares a cada banda amplificada, con base en las bandas del marcador de peso molecular. De los datos generados se obtuvo una matriz binaria de datos codificando con 1 a las bandas presentes y 0 a las bandas ausentes.

III.4.7. Elaboración del dendrograma con RAPD.

La elaboración del dendrograma se realizó con base en la matriz de datos, utilizando el programa para análisis multivariado de taxonomía numérica (NTSYS-pc v.2.0). Además se calcularon los agrupamientos consenso, utilizando el programa Winboot con 4 000 repeticiones.

III.5. Resultados y discusión

III.5.1. Aislamiento e identificación de las bacterias lácticas.

Con la siembra en placa de las diluciones del kéfir, se obtuvieron colonias diferentes, los resultados por dilución se muestran en el Cuadro 7.

Las bacterias obtenidas se caracterizaron como Gram positivas, catalasa negativas después de su evaluación microscópica y por medio de la prueba de la catalasa y el hidróxido de potasio. De acuerdo con Holt et al., (1994), éstas características correspondieron al género *Lactobacillus*.

Las cuentas totales que se presentan en el Cuadro 7, corresponden al número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro, de bacterias del género *Lactobacillus* en el kéfir. Se han reportado cuentas mayores dependiendo de la región de producción del kéfir, en Sudáfrica se tienen cuentas de 1.28×10^9 que corresponden al 23% de la microflora del kéfir, en Bulgaria el porcentaje es del 24 al 33% con cuentas de 2×10^6 a 3.0×10^8 ; mientras que en

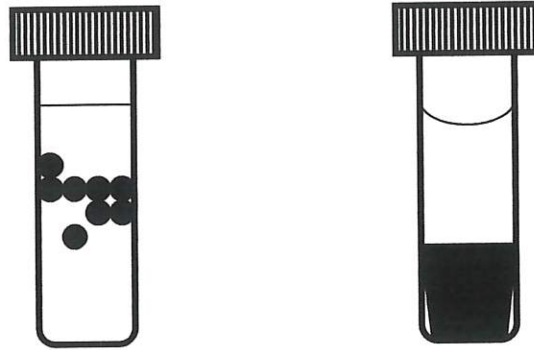
Taiwan se reportan cuentas de hasta 8.3×10^9 . En Europa, el promedio en la cuenta de lactobacilos del kéfir está en el orden de 10^2 a 10^3 UFC·mL⁻¹ (Loretan et al., 2003; Simova et al., 2002; Ching-Yun y Chin Wen, 1999 y Beukes et al., 2001). Las cuentas de lactobacilos obtenidas en este trabajo fueron de alrededor de 10^4 UFC·mL⁻¹, valor un poco más alto a las cuentas reportadas en Europa pero menor a las cuentas encontradas en el kéfir de Taiwan o Sudáfrica.

El crecimiento de las bacterias en medio MRS líquido y sólido en tubo, se representa en la Figura 2, donde se observa que su crecimiento ocurre cuando existen bajas concentraciones de oxígeno. Por ello, las bacterias aisladas se consideran microaerofílicas. Además se trata de bacterias mesófilas debido a que la temperatura de incubación fue 37 °C.

El medio MRS es selectivo para aislamiento y cultivo de lactobacilos, sin embargo, mediante la observación microscópica se encontraron también algunas bacterias del género *Streptococcus* como contaminantes de los cultivos de *Lactobacillus* (Figura 3).

Cuadro 7. Resultados de la siembra de las diluciones en medio MRS agar.

Dilución	Leche baja en grasa	Leche entera
10 ⁻¹	Colonias blancas, menores de 1 mm. de diámetro y colonias amarillas mayores de 1 mm de diámetro. Cuenta total promedio : 2.8x10 ⁴ UFC· mL ⁻¹ .	Colonias blancas, menores de 1 mm. de diámetro y colonias amarillas mayores de 1 mm de diámetro. Cuenta total promedio: 1.9 x 10 ⁴ UFC·mL ⁻¹
10 ⁻²	Colonias blancas menores de 1 mm de diámetro, colonias amarillas mayores de 1 mm. de diámetro y colonias blancas, mayores de 1 mm de diámetro. Cuenta total: 1.7x10 ⁴ a 2.5x10 ⁴ UFC·mL ⁻¹ .	No hay crecimiento
10 ⁻³	No hay crecimiento	No hay crecimiento
10 ⁻⁴	No hay crecimiento	No hay crecimiento



MEDIO SÓLIDO

MEDIO LÍQUIDO

Figura 2. Representación esquemática del crecimiento de las bacterias en medio MRS sólido y líquido en tubo.

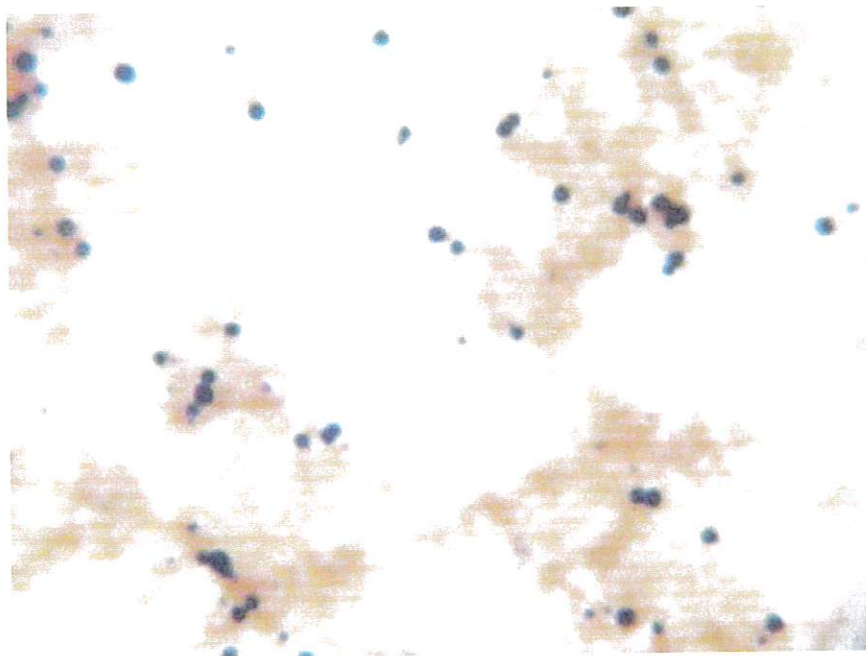


Figura 3. Contaminantes del género *Streptococcus*

El aislamiento de los lactobacilos del kéfir, se vio influenciado por la cantidad de grasa presente en la leche que sirvió de medio de fermentación. En el Cuadro 7, se observa que la leche baja en grasa presentó mayor número de aislamientos que la leche completa en grasa, en las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} . De estas diluciones, así como de la dilución 10^{-1} de leche entera, se tomaron 20 colonias de manera aleatoria, que se sembraron en medio MRS líquido para su purificación. La selección de las bacterias de estudio se realizó con base a dos parámetros principales:

A. Las características del género *Lactobacillus*.

Bacterias Gram positivas, catalasa negativas, en forma de bastones y agrupadas en cadenas.

B. La capacidad acidificante, evaluada en función de la disminución del pH al incubar por 24 horas a 37°C.

De los 60 aislamientos, se seleccionaron los que no presentaron contaminantes, con lo que se llegó a 24 aislamientos.

Los 24 aislamientos se inocularon en leche descremada para evaluar su capacidad acidificante, los resultados se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Acidificación de la leche por bacterias aisladas de kéfir.

Aislamiento	pH
K-001	4.57*
K-002	3.24*
K-003	3.24
K-030	3.24
K-004	2.43*
K-05A	2.43
K-05B	2.43
K-060	4.94*
K-06A	4.94
K-06B	4.94
K-06C	4.80*
K-007	4.80
K-07A	4.80
K-07B	4.80
K-080	5.22*
K-08A	5.22
K-08B	4.20*
K-08C	4.83*
K-009	4.83
K-090	4.83
K-09A	4.83
K-09B	4.83
K-09C	4.83

* Aislamientos seleccionados para su caracterización ¹El pH inicial en la leche evaluada fue 5.88

Algunas bacterias diferencias en su capacidad acidificante y otras cepas presentaron similitud en la acidificación de la leche, como se muestra en el Cuadro 8; por lo que se seleccionó un aislamiento de cada pH diferente. Los aislamientos seleccionados fueron: K-001, K-002, K-004, K-060, K-06C, K- 080, K-08B y K-08C.

En las figuras 4 a 8, se muestran las características morfológicas de las bacterias aisladas. Puede observarse claramente la reacción de Gram, la forma de bastones y la agrupación en cadenas. Las moléculas que se distinguen en color morado al fondo de las bacterias son moléculas de caseína de la leche; las más grandes son agregados y parte de la red que se forma por la acción de la acidificación de las bacterias.

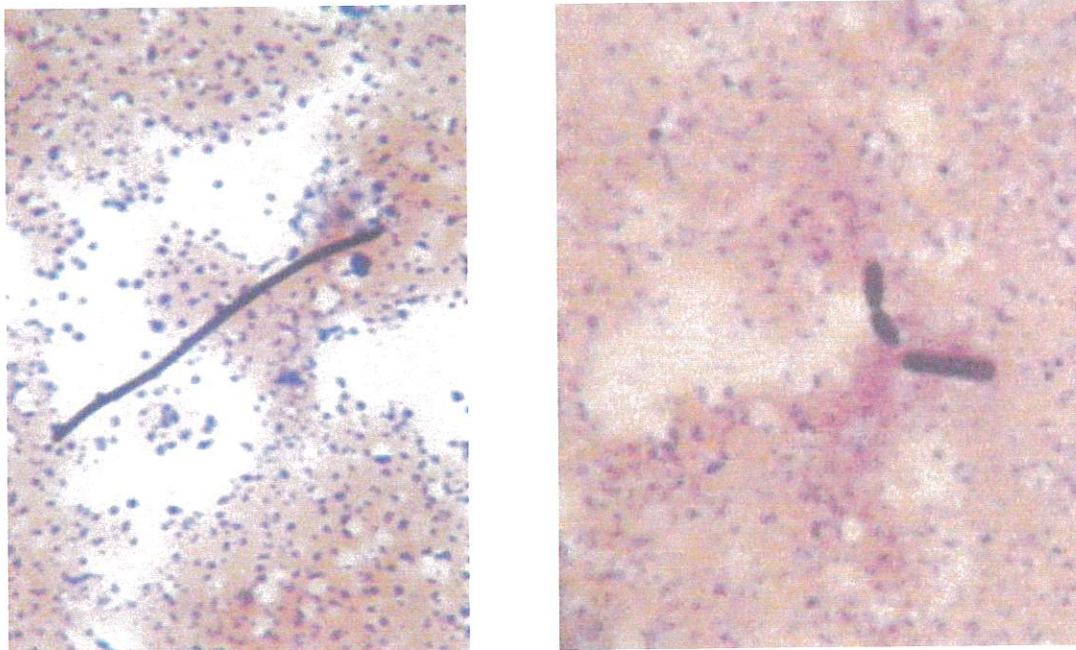


Figura 4. Aislamientos K-001 y K-002, citados de izquierda a derecha.

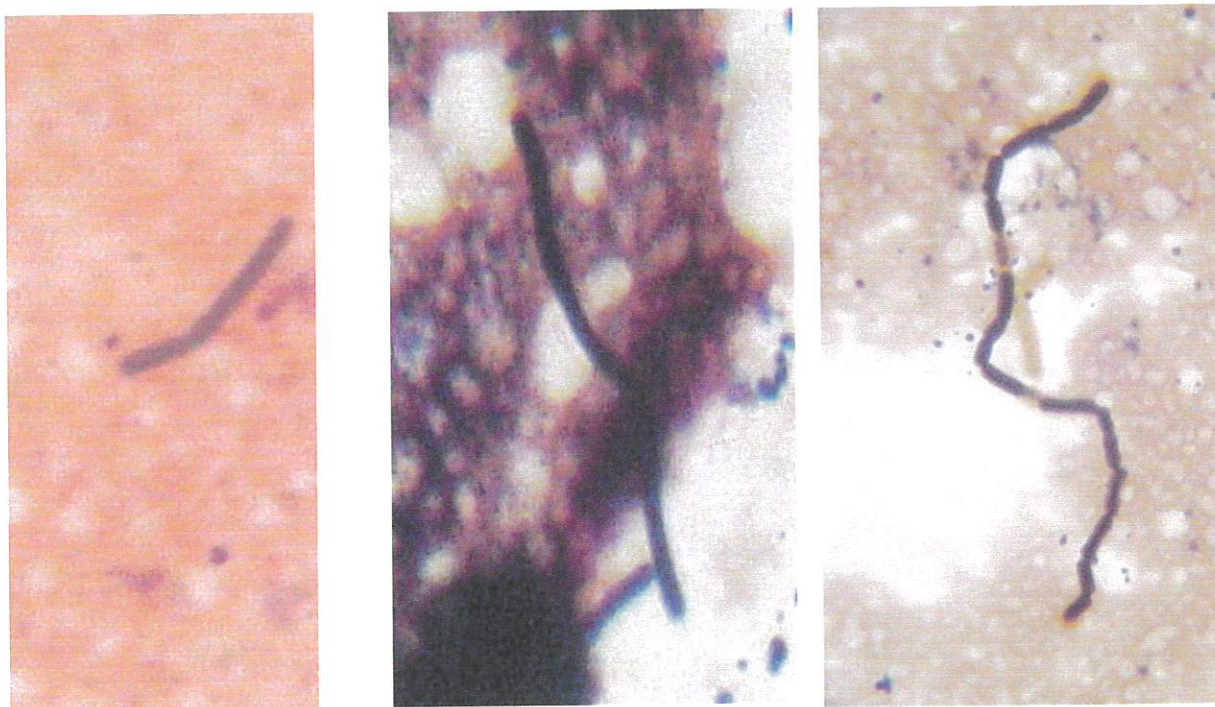


Figura 5. Aislamientos K-004, K-060 y K-06C

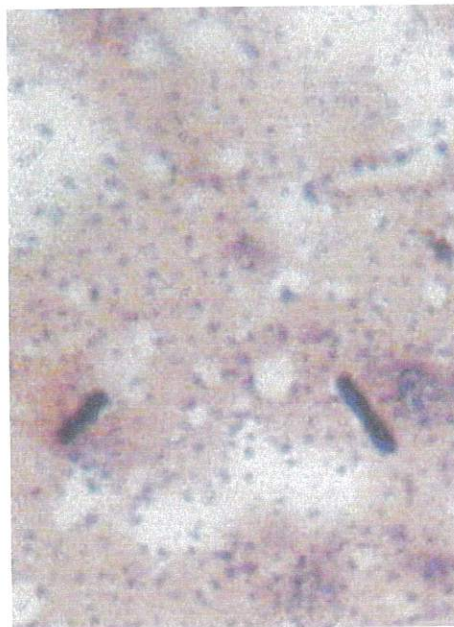


Figura 6. Aislamientos K-080 y K-08B.

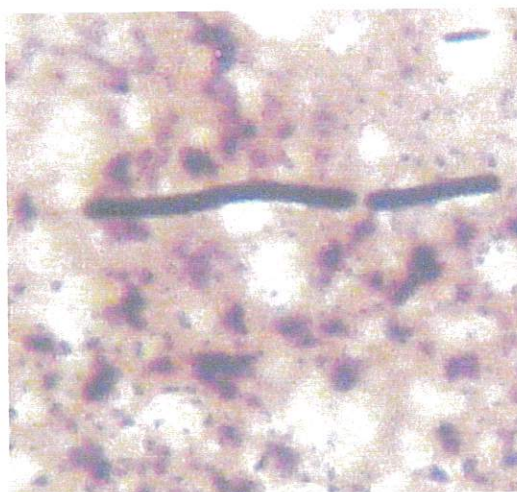


Figura 7. Aislamiento K-08C

III.5.2. Extracción, cuantificación y calidad del DNA

El protocolo empleado permitió obtener cantidades suficientes de DNA, mientras que el protocolo universal propuesto por Sambrook et al., (1989), es útil siempre y cuando se considere un tratamiento con lisozima, ya que por lo general las bacterias Gram positivas son más resistentes a la lisis celular que las bacterias Gram negativas. En la bacteria K-060, la extracción no produjo DNA, según lo muestra el Cuadro 9, por medio de la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro. La Figura 9 muestra la calidad de los DNA obtenidos.

Cuadro 9. Cuantificación de DNA por medio del Espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda Bio.

Aislamiento	Concentración de DNA ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
K-001	9.715
K-002	17.548
K-004	27.113
K-060	0.0000
K-06C	4.031
K-080	6.089
K-08B	16.334
K-08C	1.533

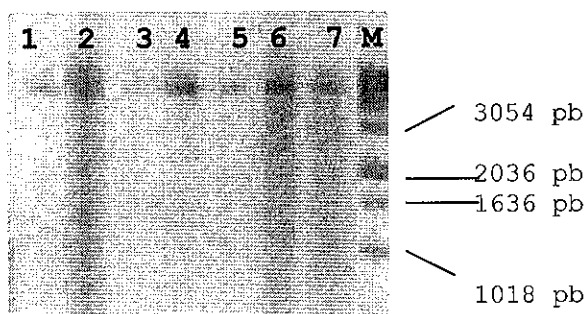


Figura 8. Gel de calidad del DNA obtenido. Carril 1: K-08C, carril 2: K-08B, carril 3: K-080, carril 4: K-004, carril 5: K-06C, carril 6: K-002, carril 7: K-001, M: Marcador de peso molecular de 1000 pares de bases (GIBCO)

III.5.3. Selección de iniciadores Carl Roth Serie K y Serie G.

Los DNA's obtenidos se evaluaron utilizando 20 iniciadores de la serie K y 18 iniciadores de la Serie G (Carl Roth. En las figuras 10 y 11 se muestran los productos de la amplificación de los iniciadores 1-7 y 11-20 de la Serie G.

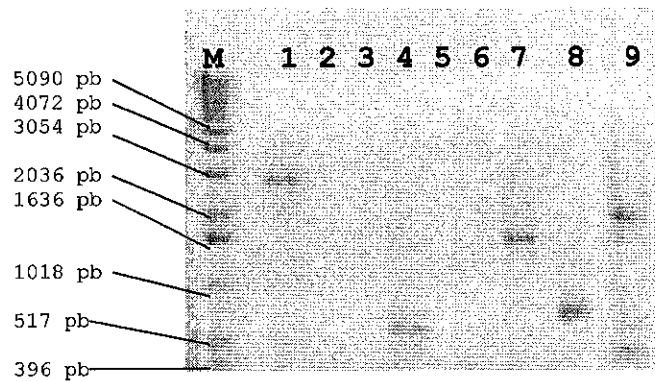


Figura 9. Productos de amplificación de los iniciadores de la Serie Roth G con el aislamiento K-002. M: Marcador de peso molecular de 1000 pares de bases (pb) (GIBCO), carriles 1-9: Iniciadores G1 a G9

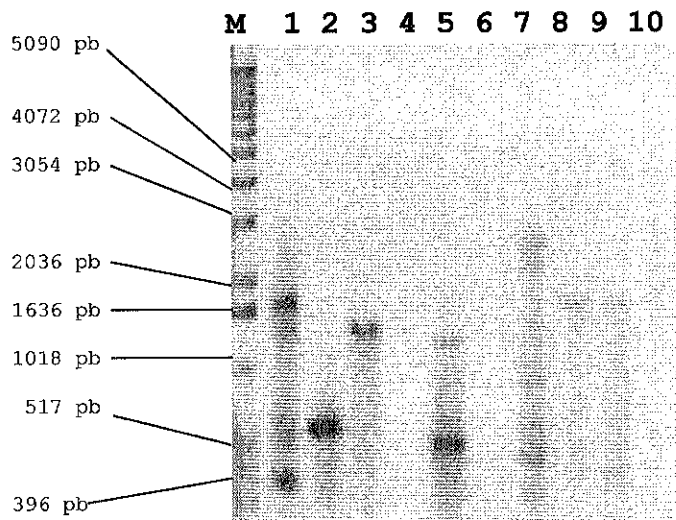


Figura 10. Productos de amplificación de los iniciadores de la Serie Roth G con el aislamiento K-002. M: Marcador de peso molecular de 1000 pares de bases (GIBCO), carriles 1-9: Iniciadores G11 a G20.

Al observar las figuras anteriores, se observa que utilizando los iniciadores G1 a G9, se obtiene menor número de bandas que utilizando los iniciadores G11 a G20. En estos últimos se observa que el 11, el 15 y el 17 amplifican mayor número de bandas. De ellos tres, el iniciador K17 permite diferenciar el mayor número de bandas. La secuencia es: 5' ACGACCGACA 3'.

Se siguió el mismo procedimiento para la evaluación de los iniciadores de la serie K. La figura 12 presenta los perfiles electroforéticos de la amplificación del DNA de la bacteria K-002.

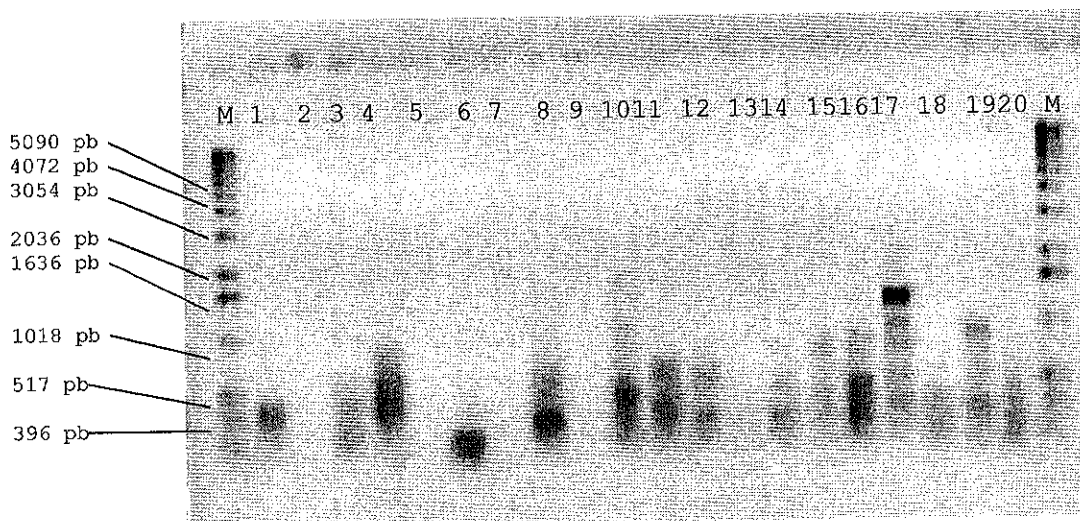


Figura 11. Productos de amplificación de los iniciadores de la Serie Roth K con el aislamiento K-002. M: Marcador de peso molecular de 1000 pares de bases (GIBCO), carriles 1-9: Iniciadores G11 a G20.

A partir de la Figura 12 se puede observar que, si bien los iniciadores amplificaron varias bandas, es difícil definirlas adecuadamente, el iniciador que separó mayor cantidad de bandas bien definidas fue el K17, cuya secuencia es: 5' CCCAGCTGTG 3', por lo que se eligió para la amplificación con RAPDS.

III.5.4. Productos de amplificación con la técnica RAPD.

La Figura 13 presenta la amplificación de los DNA's bacterianos, junto con una bacteria fuera del grupo (testigo negativo) que fue *Escherichia coli*; y otra bacteria de la especie *Lactobacillus casei*, considerada como dentro del grupo (testigo positivo). Además se incluyó una reacción testigo, sin DNA, para comprobar la amplificación de los RAPDS en las bacterias aisladas.

Las bandas generadas mediante la técnica de PCR-RAPDS presentaron diferencias entre las cepas y entre las bacterias que se usaron. Puede notarse que con el iniciador K17, *E. coli* se obtuvieron dos bandas bien definidas, de 900 y 850 pb que no presentó ningún otro aislamiento, ni el testigo positivo de *Lactobacillus*.

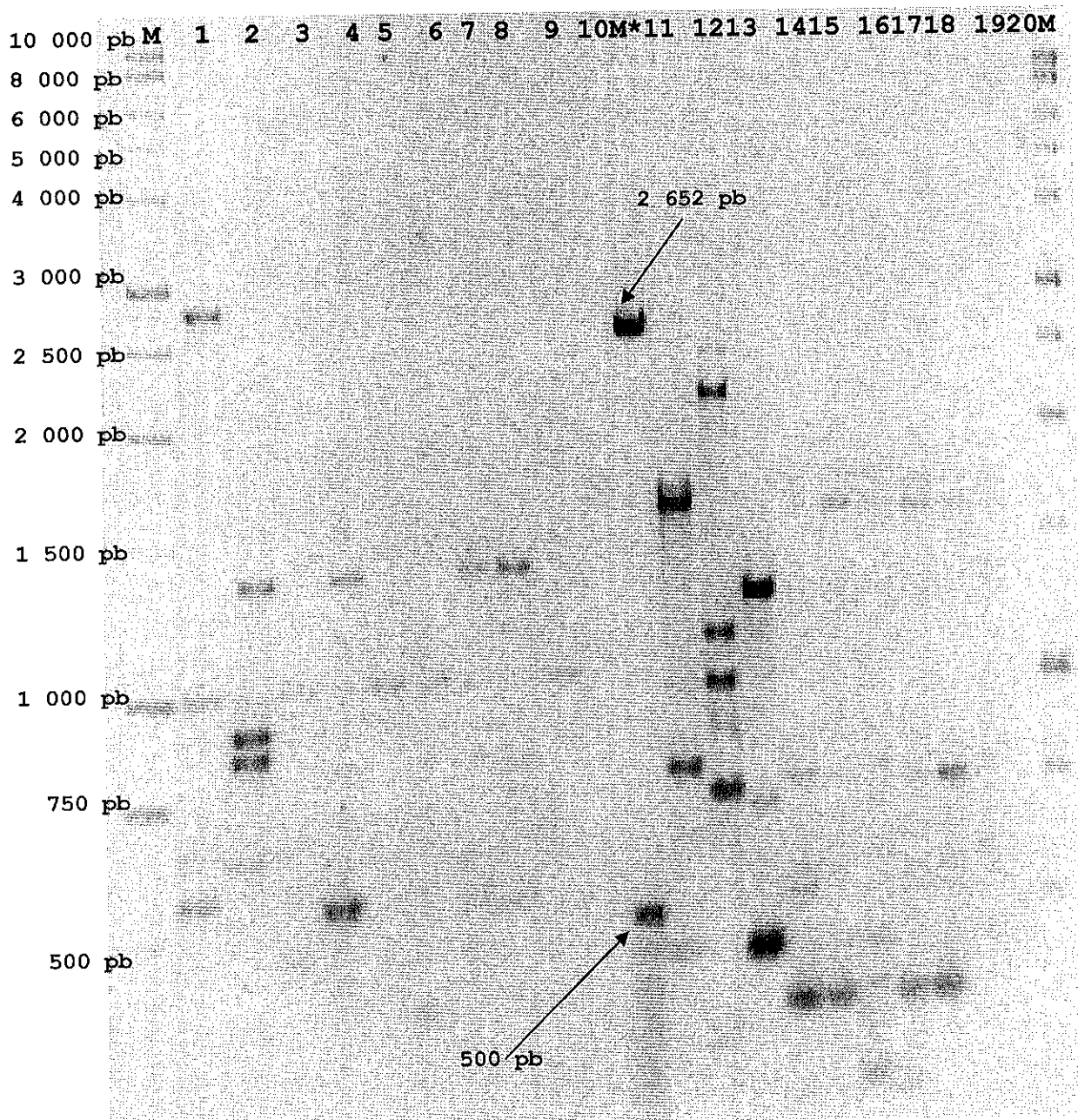


Figura 12. Perfil electroforético de la amplificación de las cepas bacterianas utilizando los iniciadores Roth G17 y Roth K17. M: Marcador de peso molecular 1000 pares de bases (PROMEGA), M*: Marcador de peso molecular 25 pares de bases (GIBCO). Carriles 1-9 iniciador K17; 1:*Lactobacillus casei*, 2:*Escherichia coli*, 3:K-06C, 4:K-080, 5:K-004, 6:K-001, 7:K-08C, 8:K-002, 9:K-08B, 10:Testigo negativo. Carriles 11-20 iniciador G17; 11- *Lactobacillus casei*, 12:*Escherichia coli*, 13:K-06C, 14:K-080, 15:K-004, 16:K-001, 17:K-08C, 18:K-002, 19:K-08B, 20:Testigo negativo.

casei, igualmente, con el iniciador G17. *E. coli* presenta bandas muy diferentes a las demás bacterias, de 2500, 2300, 1300, 1000, 900 y 780 pares de bases.

Al analizar el perfil obtenido con el iniciador K17, se observa que las bacterias K-08C, K-002 presentan una banda común, de 1500 pares de bases y otra banda tenue a 600 pares de bases, esto indica que podría tratarse de la misma bacteria. A su vez, las cepas K-001 y K-004 presentan un fragmento en común de 1000 pares de bases, por lo que podrían estar muy relacionadas. Las bacterias K-004, K-001 y K-08B se relacionan con *Lactobacillus casei* ya que las tres poseen un fragmento de 1000 pares de bases.

El iniciador G17 amplifica fragmentos mejor definidos que K17, como puede observarse en la Figura 13, en las bandas de las bacterias *L. casei*, *E. coli* y K-06C. La cepa K-06C presenta bandas diferentes a las demás bacterias, a 1400 y 500 pares de bases; por el contrario, las cepas K-004, K-001, K-08C y K-002 tienen bandas comunes; a 1800, 900 y 500 pares de bases.

La identificación a partir de RAPDS puede hacerse solo con el perfil electroforético de las bandas, la inferencia se realiza tomando como base el número de pares de bases, sin embargo, para lograr resultados más confiables, es necesario realizar el análisis estadístico o bien complementar el método con otro adicional, como la amplificación del gen 16S rRNA (Ward et al., 1999).

Son numerosos los estudios que existen sobre la caracterización de bacterias lácticas con PCR-RAPDS, generalmente, esta técnica se emplea para agrupar microorganismos de una población numerosa. Kwon (2000), caracterizó especies de *Lactobacillus* a partir de leches fermentadas por medio de PCR-RAPD, y encontró resultados similares a los obtenidos en este trabajo. Agrupó a las bacterias en tres grupos, utilizando un programa UPGMA; y demostró que aun tratándose de especies iguales, mediante PCR-RAPD es posible detectar diferencias.

Las diferencias entre especies se han encontrado también en otros productos artesanales, como son los quesos italianos Peccorino, Fossa y Canestrato, las variaciones interespecíficas se encontraron a tal grado que el método de PCR-RAPD fue insuficiente para la clasificación de las

bacterias, resultando más eficiente el uso de perfiles de proteínas de la pared celular (De Angelis et al., 2001).

III.5.5. Análisis estadístico del dendrograma.

Por medio del análisis de bandas, se produjo matriz de datos, a partir de la cual se construyó un dendrograma, con el programa NTSYS. El dendrograma se muestra en la Figura 14.

Como se esperaba, *E. coli*, se sale completamente de la agrupación de las bacterias, el coeficiente de similitud es de 0.40 con respecto a las bacterias caracterizadas.

En las cepas de estudio, considerando un coeficiente de similitud de 0.75, se pudo diferenciar tres grupos. El primero comprende a las bacterias *L. casei*, K-004, K-08B y K-001. La segunda agrupación comprende solo a la bacteria K-06C y el tercer grupo está conformado por las bacterias K-080, K-002 y K-08C. La agrupación observada en el dendrograma coincide parcialmente con las similitudes encontradas en el perfil de electroforesis analizado anteriormente.

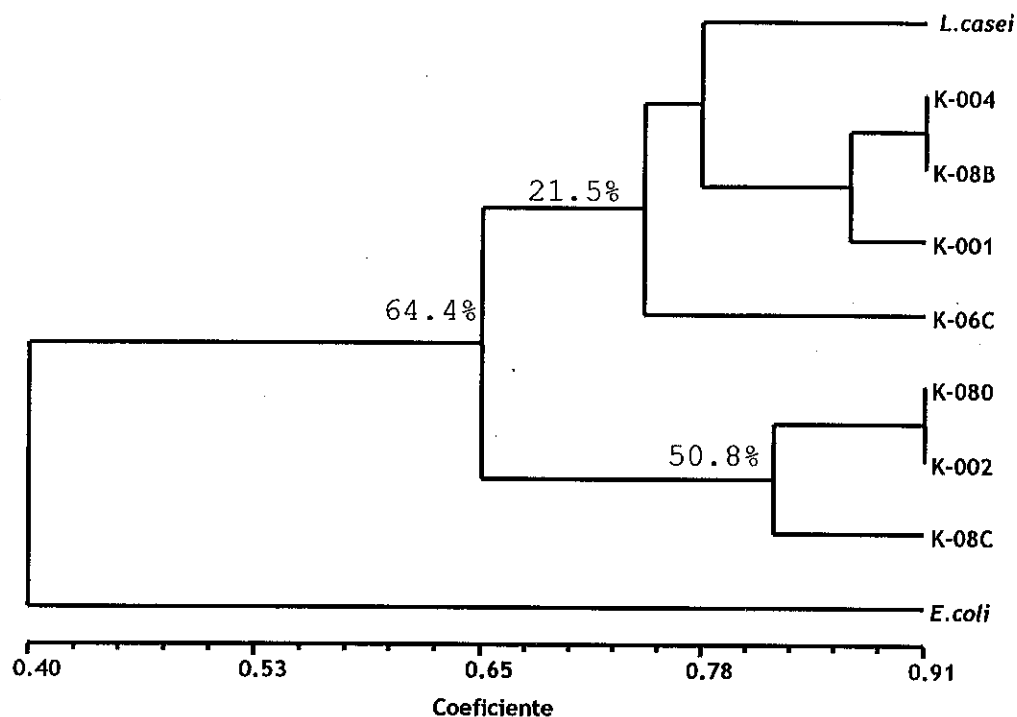


Figura 13. Agrupamiento de las 7 cepas aisladas del kéfir

A su vez, los agrupamientos se separan en subgrupos; en el iniciador grupo, las cepas K-004 y K-08B son similares (coeficiente de 0.91) y la cepa K-001 es diferente a las dos anteriores, sin embargo, las 3 podrían identificarse como *Lactobacillus casei*. Las cepas K-080 y K-002, son muy similares y podrían considerarse como la misma cepa por presentar un coeficiente de 0.91.

El procedimiento Bootstrap mediante un método iterativo, con un número determinado de repeticiones; determina el porcentaje de veces que un mismo agrupamiento ocurre. En el

dendrograma anterior, el grupo de las bacterias identificadas como *Lactobacillus casei* presenta un 21.5% de agrupamientos; cuando el porcentaje es menor de 75-80% se considera que podría tratarse de una especie diferente, aunque probablemente sería del género *Lactobacillus*. El grupo de las bacterias K-080, K-002 y K-08C, podría ser otra especie de *Lactobacillus* o incluso podría ser otro género ya que el porcentaje de agrupamientos es de 64.4%.

Para decir con certeza, si el grupo es otra especie o es otro género sería necesario llevar a cabo un análisis de la región 16S rDNA de las bacterias en estudio.

III.6. Conclusiones

Por medio del presente trabajo, se obtuvieron 7 cepas de bacterias en forma bacilar, mesófilas Gram positivas, catalasa negativas y microaerofílicas; que se identificaron a nivel de género como *Lactobacillus*.

Las cuentas están en el orden de 10^4 UFC·mL⁻¹, cercanas a las reportadas en el kéfir europeo, pero bajas en comparación con otras regiones del mundo como Taiwan, Rusia y Sudáfrica. Con esto se observa que la composición microbiológica depende de la región del producto

fermentado. La diferencia en cuentas de microorganismos genera la diversidad de sabores y aromas en los productos fermentados artesanales alrededor del mundo.

La caracterización molecular realizada por PCR-RAPD, se llevó a cabo con 2 iniciadores, Roth K17 y Roth G17; seleccionados con base al número de bandas amplificadas.

En el perfil electroforético se encontraron diferencias evidentes en las huellas genómicas, éstas diferencias se confirmaron por medio del dendrograma obtenido.

Las bacterias se conjuntaron en 3 grupos: El primer grupo está conformado por bacterias similares a la especie *Lactobacillus casei*, K-004, K-08B y K-001; el segundo está conformado solamente por la cepa K-060 y al tercero lo forman las cepas K-080, K-002 y K-08C. Para determinar con precisión de que especie y género se trata, es necesario el empleo de otras técnicas moleculares y bioquímicas.

III.7. Literatura citada

- Angulo L., Lopez E. and Lema C. "Microflora present in kefir grains of the Galician region (North-West of Spain)", *Journal of Dairy Research* 60, 1993, 263-267.
- Beukes E.M., Bester B.H. and Mostert, J.F. "The microbiology of South African traditional fermented milks", *International Journal of Food Microbiology* 63, 2001, Pág. 189-197.
- Chin-Yun K. and Chin-Wen L. "Taiwanese kefir grains: their growth, microbial and chemical composition of fermented milk", *Australian Journal of Dairy Technology* 54, 1999, Pág. 19-23.
- Chin-Wen L., Hsiao-Ling C, and Je-Ruei L. "Identification and characterization of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan", *Australian Journal of Dairy Technology* 54, 1999, Pág. 14-18.
- De Angelis M., Corsetti A., Tosti N., Rossi J., Corbo M.R. and Gobetti M. "Characterization of non-starter acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses", *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2001, Pág. 2011-2020.

- Garrote G.L., Abraham A.G. and De Antoni G.L. "Chemical and microbiological characterisation of kefir grains", *Journal of Dairy Research* 68, 2001, Pág. 639-652.
- Giraffa G., De Vecchi P. and Rossetti L. "Note: Identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* isolates by amplified rDNA restriction analysis", *Journal of Applied Microbiology* 85, 1998, Pág. 918-924.
- Gómez-Zavaglia, A., De Urraza y De Antoni, G., "Characterization of *Bifidobacterium* strains using box primers", *Anaerobe*, 6, 2000. Pág.169-177.
- Holt J.G., Krieg N. R, Sneath P.H. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", Lippincott Williams & Wilkins. USA. 1994.
- Kwon O. "Characterization of isolated *Lactobacillus* spp. and classification by RAPD-PCR analysis", *The Journal of Microbiology* 38, 2000, Pág. 137-144.
- Loretan T., Mostert J.F. and Vijoën B.C. "Microbial flora associated with South African household kefir", *South African Journal of Science* 99, 2003, Pág. 92-94.
- Prescott S. y Dunn C.G. "Industrial Microbiology", Avi Publishing Company, Conneticut, USA. 1983.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

Schleiffer K. Ehrman, M., Beimfohr, C. Brockman, E., Ludwig, W. and Ammann R. "Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria", *International Dairy Journal* 5, 1995. Pág. 1081-1094.

Simova E., Beshkova D., Angelov A., Hristozova Ts., Frengova G. and Spasov Z. "Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them", *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 28, 2002, Pág. 1-6.

Ward L.J.H. and Timmins M.J. "Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction", *Letters in Applied Microbiology* 29, 1999, Pág. 90-92.

CAPÍTULO IV. LITERATURA

Angulo L., Lopez E. and Lema C. "Microflora present in kefir grains of the Galician region (North-West of Spain)", *Journal of Dairy Research* 60, 1993, 263-267.

- Bibel D.J. "Elie Metchnikoff's bacillus of long life", *ASM News*, 54, 1988. Pág. 661-665
- Chandan R.C. "Benefits of live fermented milks: Present diversity of products." In *Congrès International de laiterie*, Paris, France, 2002.
- Chin-Wen L., Hsiao-Ling C, and Je-Ruei L. "Identification and characterization of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan", *Australian Journal of Dairy Technology* 54, 1999, Pág. 14-18.
- Chin-Yun K. and Chin-Wen L. "Taiwanese kefir grains: their growth, microbial and chemical composition of fermented milk", *Australian Journal of Dairy Techonology* 54, 1999, Pág. 19-23.
- Cocconelli P.S., Parisi M.G., Senini M.G., Senini L. and Botazzi V. "Use of RAPD and 16S rDNA sequencing for the study of *Lactobacillus* populations dynamics in natural whey culture", *Letters in Applied Microbiology* 25, 1997, Pág. 8-12.
- Coventry M.J., Gordon J.B., Wilcock A., Hamark K., Davidson B.E., Hickey M.W., Hillier A.J. and Wan J. "Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin", *Journal of Applied Microbiology* 83, 1997, Pág. 248-258.

- De Angelis M., Corsetti A., Tosti N., Rossi J., Corbo M.R. and Gobetti M. "Characterization of non-starter acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses", *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2001, Pág. 2011-2020.
- De Soria y Pineda J.M. "Industrias Lácteas", Ed. Aedos, Barcelona España, 1974.
- De Urraza P.J., De Urraza J., Gomez-Zavaglia A., Lozano M.E., Romanowsky V. and De Antoni. G.L. "DNA fingerprinting of thermophilic lactic acid bacteria using repetitive séquence-based polymerase chain reaction", *Journal of Dairy Research* 67, 2000, Pág. 381-392.g
- Drake M., Small C.L., Spence K.D. and Swanson B.G. "Rapid detection and identification of *Lactobacillus* spp. in dairy products by using the polymerase chain reaction", *Journal of Food Protection* 59, 1996, Pág. 1031-1036.
- Fitzsimons N.A., Cogan T.M., Condon S. and Beresford T. "Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese", *Applied and Environmental Microbiology* 65, 1999, Pág. 3418-3426.

- Garrote G.L., Abraham A.G. and De Antoni G.L. "Chemical and microbiological characterisation of kefir grains", *Journal of Dairy Research* 68, 2001, Pág. 639-652.
- Garrote G.L., Abraham A.G. and De Antoni G.L. "Preservation of kefir grains, a comparative study", *Lebensm.-Wiss. u. Technology* 30, 1997, Pág. 77-84.
- Gaya P., Babín M., Medina M. and Núñez M. "Diversity among lactococci isolated from ewes' raw milk and cheese", *Journal of Applied Microbiology* 87, 1999, Pág. 849-855.
- Giraffa G., De Vecchi P. and Rossetti L. "Note: Identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* isolates by amplified rDNA restriction analysis", *Journal of Applied Microbiology* 85, 1998, Pág. 918-924.
- Gómez-Zavaglia, A., De Urraza y De Antoni, G., "Characterization of *Bifidobacterium* strains using box primers", *Anaerobe*, 6, 2000. Pág.169-177.
- Hansen E.B. "Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future", *International Journal of Food Microbiology* 78, 2002, Pág. 119-131.
- Kalantzopoulos G. "Fermented products with probiotic qualities", *Anaerobe* 3, 1997, Pág. 185-190.
- Kosikowski F.V. "Cheese and fermented milk foods". Kosikowski and Assoc., Brooktondale, N.Y. 1982.

- Lombardi A., Maistro L.D., Dea D.P., Gatti M., Jirafa G. and Neviani E. "A polyphasic approach to highlight genotypic and phenotypic diversities of *Lactobacillus* strains isolated from dairy starter cultures and cheeses", *Journal of Dairy Research* 69, 2002, Pág. 139-149.
- Loretan T., Mostert J.F. and Vijoën, B.C. "Microbial flora associated with South African household kefir", *South African Journal of Science* 99, 2003, Pág. 92-94.
- Mannu L., Riu G., Comunian R., Fozzi M.C., Scintu M.F. "A preliminary study of lactic acid bacteria in whey starter culture and industrial Pecorino Sardo ewe's milk cheese: PCR-identification and evolution during ripening", *International Dairy Journal* 12, 2002, Pág. 17-26.
- Mattila-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R. and Saarela M. "Technological challenges for future probiotic foods", *International Dairy Journal* 12, 2002, Pág. 173-182.
- Morea M., Baruzzi F. and Coconcelli P.S. "Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing", *Journal of Applied Microbiology* 87, 1999, Pág. 574-582.

- Moschetti G., Blaiotta G., Aponte M., Catzeddu P., Villani F., Deiana P. and Coppola S. "Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains", *Journal of Applied Microbiology* 85, 1998, Pág. 25-36.
- Ogier J., Son O., Gruss A., Tailliez P. and Delacroix-Buchet A. "Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis", *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2002, Pág. 3691-3701.
- Ouwehand A.C., Tuomola E.M. and Tölkkö S. "Assesment of adhesion of novel probiotic strains to human intestinal mucus", *Food Microbiology* 64, 2001, Pág. 119-126.
- Prescott S. y Dunn C.G. "Industrial Microbiology", Avi Publishing Company, Conneticut, USA. 1983.
- Pu Z.Y., Dobos M., Limsowtin G.K.Y. and Powell I.B. "Lactococcus species identification using PCR", *The Australian Journal of Dairy Technolohy* 53, 1998, Pág. 116.
- Salminen S., Owehand, A., Benna Y. and Lee Y.K. "Probiotics. How should they be defined?", *Trends in food science and technology*, 10, 1999, Pág. 107-110.

Saloff-Coste C.J. "Lactic acid bacteria", *World Newsletter Danone* 5, 1994, Pág. 2-5.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

Sánchez M.M., Delgado T., Alonso L. and Mayo B. "Phenotypic and genetic characterization of a selected set of *Lactococcus lactis* strains isolated from a starter-free farmhouse cheese", *Food Microbiology* 17, 2000, Pág. 449-460.

Sanders M.E. "Probiotics", *Food Technology* 53 (11), 1999, Pág. 67-77.

Schleiffer K. Ehrman, M., Beimfohr, C. Brockman, E., Ludwig, W. and Ammann R. "Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria", *International Dairy Journal* 5, 1995. Pág. 1081-1094.

Shah P.N. "Functional foods from probiotics and prebiotics", *Food Technology* 55 (11), 2001, Pág. 46-53.

Simova E., Beshkova, D., Angelov A., Hristozova Ts., Frengova G. and Spasov Z. "Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them", *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 28, 2002, Pág. 1-6.

- Steinkraus K.H. "Handbook of indigenous fermented foods", Marcel Decker, New York, USA, 1996.
- St-Onge M., Farnworth E.R. and Jones P.J.H. "Consumption of fermented and nonfermented dairy products: effects on cholesterol concentrations and metabolism", *American Journal of Clinical Nutrition* 71, 2000, Pág. 674-681.
- Symons H. "Nutritional value of yogurt and fermented milks", *World Newsletter Danone* 2, 1993, Pág. 1-4.
- Tortora G.J., Case C. and Funke B. "Microbiology: An introduction", Benjamin Cummings Publishing Company, 1995.
- Tynkkynen S., Satokari E., Saarella M., Mattila-Sandholm T. and Saxelin M. "Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains", *Applied and Environmental Microbiology* 65, 1999, Pág. 3908-3914.
- Ward L.J.H. and Timmins M.J. "Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction", *Letters in Applied Microbiology* 29, 1999, Pág. 90-92.
- Yeung P.S.M., Sanders M.E., Kitts C.L., Cano R. and Tong P.S. "Species-Specific identification of commercial

probiotic strains", *Journal of Dairy Science* 85, 2002,
Pág. 1039-1051.