

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias
Biológicas

“POTENCIAL FUNCIONAL (*IN VITRO* E *IN VIVO*) Y TECNOLÓGICO
DE EXOPOLISACÁRIDOS (EPS) PRODUCIDOS POR BACTERIAS
LÁCTICAS”

Lic. Elisa C. Ale

Directora de Tesis: *Dra. Ana G. Binetti*

Co-director de Tesis: *Dr. Jorge A. Reinheimer*

Lugar de realización: *Instituto de Lactología Industrial
(INLAIN, UNL-CONICET)*

-2017-

Agradecimientos

A la Universidad Nacional del Litoral, especialmente a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas que me dio la oportunidad de realizar mis estudios de grado y doctorado, y de la cual siempre he recibido apoyo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por su aporte a la realización de la presente Tesis a través de su programa de becas doctorales.

A los miembros del Jurado, por el interés y tiempo dedicados a la evaluación de la presente Tesis.

A mi querida directora, la Dra. Ana Binetti, por su apoyo constante e incondicional todos estos años, por sus consejos en los momentos apropiados, por confiar en mí y permitirme descubrir la vocación por la investigación.

A mi querido codirector, el Dr. Jorge Reinheimer, por compartir su valiosa experiencia, sus consejos, charlas y por guiarme en este trayecto.

A la gente linda que me ayudó en distintas actividades durante el doctorado y con quienes aprendí mucho: Adrián Perez, Patricia Burns, Joaquín Perezlindo, Yanina Pavón, Luciana Vera Candiotti, Olga Ávila, Liliana Contini, Liliana Forzani, Eduardo Tabacman, Carina Bergamini. Gracias por su paciencia y tiempo!

Al programa Erasmus ya que me permitió entablar contactos trascendentes para mi formación. En particular al Prof. Paul O'Toole (*University College Cork*, Irlanda) por darme la oportunidad de trabajar en su grupo, dentro del cual agradezco especialmente a Hugh Harris y Maxence Bourin, por su paciencia y compromiso constante. También quisiera agradecer al Prof. Andrew Laws, al Sr. Hafiz Ahmed y al Dr. Sohaib Sadiq (*University of Huddersfield*, Reino Unido) y al Prof. Paul McSweeney y la Dra. Felicia Ciocia (*University College Cork*, Irlanda), por por brindarme la oportunidad de enriquecer mi trabajo con sus valiosos aportes.

A todos los integrantes del INLAIN, por compartir innumerables lindos momentos, charlas, mates, risas, por el aguante diario.

A mis amigas y amigos de toda la vida, gracias por permitirme contar con ustedes siempre.

A toda mi FAMILIA... mamá, papá, Nana, Toto, tías, tíos, primos, primas, mi abuela, por su cariño y apoyo incondicional, y a los que no están los llevo siempre en mi corazón.

A Guillermo Peralta, quien, además de ayudarme durante todo mi doctorado aportando su conocimiento y tiempo, es mi compañero de vida incondicional,

A todos y cada uno de ellos... MUCHAS GRACIAS!

Publicaciones

Revistas Internacionales

Ale, E.C., Perezlindo, M.J., Pavón, Y., Peralta, G.H., Costa, S., Sabbag, N., Bergamini, C., Reinheimer, J., Binetti, A. (2016). Technological, rheological and sensory characterizations of a yogurt containing an exopolysaccharide extract from *Lactobacillus fermentum* Lf2, a new food additive. *Food Research International*, 90, 259-267.

Ale, E.C., Perezlindo, M.J., Burns, P., Tabacman, E., Reinheimer, J., Binetti, A. (2016). Exopolysaccharide from *Lactobacillus fermentum* Lf2 and its functional characterization as a yogurt additive. *Journal of Dairy Research*, 83, 487-492.

Ale, E.C., Burns, P., Ávila, O.B., Contini, L.E., Reinheimer, J., Binetti, A. Study of the prebiotic/symbiotic effects of a yogurt containing an exopolysaccharide extract from *Lactobacillus fermentum* Lf2 in combination with the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* INL1. **Trabajo en preparación.**

Resumen

En la presente Tesis doctoral se propuso estudiar, en primera instancia, la producción de exopolisacáridos (EPS) por parte de diferentes cepas autóctonas de la colección del INLAIN aisladas de diversos nichos ecológicos y, a partir de las cuales, se seleccionó *Lactobacillus fermentum* Lf2 por su capacidad de producir altos niveles de EPS. La misma fue aislada como flora alterante de queso Tybo elaborado en la región, el cual presentaba defectos gasógenos causados por el metabolismo heterofermentativo de esta cepa.

Este EPS fue estudiado abordando diversos aspectos que, según consideramos, son fundamentales para comprender el comportamiento de este compuesto a los fines de proponer su aplicación como ingrediente alimentario, con un potencial doble rol tecnofuncional.

Primeramente, se evaluaron las condiciones de producción de EPS a escala laboratorio, mediante la modificación de diferentes parámetros de desarrollo de la cepa (pH, temperatura, tiempo) en un medio semidefinido. Posteriormente, aplicando estrategias de diseño experimental, se modificaron aquellos factores con mayor influencia en la producción de este metabolito (fuente de nitrógeno, fuente de carbono y tiempo). A partir de esta optimización se logró un rendimiento de hasta 2 g/L en las condiciones estudiadas hasta el momento, duplicando la producción obtenida en condiciones no optimizadas.

Por otro lado, se caracterizó el extracto purificado desde el punto de vista químico y estructural mediante metodologías adecuadas (RMN, SEC-MALS, GC-MS y HPLC), pudiendo dilucidar que el extracto de EPS está compuesto mayoritariamente por dos fracciones de polisacáridos: un β -glucano de peso molecular relativamente elevado ($1,8 \times 10^3$ kDa), cuya unidad repetitiva es un trisacárido compuesto por glucosa (dos glucosas unidas mediante enlaces $\beta(1,3)$ y una ramificación en el segundo monosacárido compuesta por una molécula de glucosa unida por enlaces $\beta(1,2)$), y otro heteropolisacárido de peso molecular medio (90 kDa), cuya unidad repetitiva es un disacárido formado por glucosa y galactosa (la cadena troncal consiste en moléculas de galactosa unidas por enlaces $\alpha(1,6)$, todas ellas con ramificaciones de glucosa unida mediante enlaces $\alpha(1,2)$). Ambas fracciones están presentes en una proporción similar, de aproximadamente 40 y 45%, respectivamente, en el extracto purificado. Asimismo, fue posible detectar otra fracción polisacáridica, de peso molecular mediano que representa sólo el 10% restante, y cuya composición y estructura se desconoce hasta el momento de escribir este manuscrito.

Desde el punto de vista tecnológico, se abordó el estudio de su influencia en la textura y características organolépticas sobre distintas matrices lácteas, como son el yogur y el queso

Cheddar, cuando se lo incorpora como ingrediente alimentario. El EPS adicionado como extracto crudo le otorgó consistencia y dureza a los yogures (en concentraciones de 300 y 600 mg/L), aumentando su pseudoplasticidad, con un leve efecto sobre la sinéresis y la organolepsis, indicando una suave interacción de la estructura polisacáridica y los componentes de la matriz láctea (micelas de caseína, principalmente). En el caso de los quesos Cheddar, el extracto adicionado en un nivel de 1 g/L en la leche de elaboración no tuvo impacto significativo en la textura del producto final.

Por otro lado, se estudió el rol funcional de este extracto de EPS incorporado a dos matrices lácteas, leche y yogur, mediante tres modelos *in vivo* (ratones BALB/c): estudio de su capacidad de protección frente a una infección por *Salmonella enteritidis* serovar Typhimurium; estudio de su rol inmunomodulador a nivel intestinal; y estudio de su rol probiótico/simbiótico sobre la microbiota intestinal, en forma individual y combinando el EPS con *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, una cepa aislada de leche materna y con efectos probióticos ampliamente demostrados. A partir de estos ensayos se puso en evidencia la capacidad de proteger a los animales frente a una infección por *Salmonella* cuando se lo administró en leche, en una dosis de 9 mg/kg/día durante 25 días. Asimismo, se observó un rol inmunomodulador suave, mediado por IgA y por IL-6 (aumentaron los niveles de IgA en fluido intestinal, y disminuyó la citoquina proinflamatoria IL-6 en intestino delgado), en una dosis de 4,5 mg/kg/día durante 15 días de tratamiento, que se corresponde con la respuesta generalmente observada para polímeros de relativamente bajo peso molecular ($\sim <10^3$ kDa), como el extracto de EPS estudiado. A partir del estudio de su rol prebiótico/simbiótico, cuando se lo administra como ingrediente alimentario en yogures (dosis de 9 mg/kg/día, durante 25 días), se observó un aumento en la producción de ciertos ácidos grasos de cadena corta (ácidos acético y butírico) y en los niveles del grupo *Clostridium coccooides* a lo largo del tratamiento por parte del EPS individualmente, así como un efecto bifidogénico cuando se lo combinó con la bifidobacteria.

Otro objetivo planteado para esta Tesis, y que surgió a partir de una colaboración con el Prof. Paul O'Toole (UCC, Irlanda), fue estudiar el/los *cluster/s* genético/s involucrado/s en la síntesis de EPS de *L. fermentum* Lf2. Para esto, se comenzó por secuenciar el genoma bacteriano y, mediante análisis bioinformáticos, se logró ensamblar el genoma y encontrar genes que codifican enzimas que participan en la síntesis de EPS. A partir del conocimiento de la secuencia genómica (aún en formato *draft*), se pudieron identificar muy recientemente 3 *clusters* genéticos involucrados en la síntesis de EPS, ubicados en diferentes posiciones del genoma, lo que hace de *L. fermentum* Lf2 una cepa con características muy particulares, diferente a lo reportado para esta especie bacteriana. Asimismo, y debido a la importancia de contar con una variante de esta cepa incapaz de producir EPS, se construyó una mutante

knockout (KO) para un gen codificante de una enzima clave en el proceso de síntesis de heteropolisacáridos, la glicosiltransferasa cebadora pGT1 (ORF 119, *cluster* 1). En referencia a este estudio, a pesar de que se pudo eliminar este gen, la cepa KO fue fenotípicamente similar a la *wildtype*.

En base a lo expuesto, se puede concluir que *L. fermentum* Lf2, una cepa autóctona de nuestra región de influencia, tiene una particular relevancia en relación a su elevado rendimiento en la producción de EPS (cerca de 2 g/L, constituido mayoritariamente por dos fracciones polisacáridicas de elevado y mediano peso molecular), que fue capaz de aportar, como ingrediente alimentario, un doble rol tecnológico y funcional, mejorando la textura de la matriz donde se aplica y ejerciendo ciertos beneficios a la salud del consumidor (protección frente a una infección, rol inmunomodulador y rol prebiótico/simbiótico).

Finalmente, cabe remarcar la relevancia de esta cepa, aislada a partir de un evento negativo de la industria láctea y que ha demostrado diversos aspectos positivos a partir de este estudio, todos vinculados a la producción de una combinación de homo y heteropolisacáridos, una característica inédita, al menos, para cepas de *L. fermentum*.

Abstract

In the present Thesis, a study of different autochthonous strains of the INLAIN collection, isolated from different ecological niches, and regarding their ability to produce exopolysaccharides (EPS), was proposed. From the results obtained, *Lactobacillus fermentum* Lf2 was selected for its ability to produce high levels of EPS. This strain was isolated as a spoilage microorganism from Tybo cheese made in the region, which presented defects caused by the heterofermentative metabolism of this strain.

This EPS was studied addressing several aspects which, we believe, are essential to understand the behavior of this compound, in order to suggest its application as a food ingredient, with a potential double functional-technological role.

In the first instance, the conditions for the production of EPS at a laboratory scale were evaluated, by means of the modification of different parameters which are important for the development of the strain (pH, temperature, time) in a semi-defined medium. Then, through the application of experimental design strategies, those factors with greater influence on the production of this metabolite were modified (nitrogen source, carbon source and time). From this optimization, a yield of more than 2 g/L was achieved, doubling the production obtained under non-optimized conditions.

Besides, the purified EPS was characterized from chemical and structural points of view by suitable methodologies (NMR, SEC-MALS, GC-MS, HPLC), allowing us to elucidate that it is composed of two fractions of polysaccharides, a β -glucan of relatively high molecular weight (1.8×10^3 kDa), whose repetitive unit is a trisaccharide composed of glucose (two glucoses linked by $\beta(1,3)$ bonds and a branch composed of a glucose molecule linked by $\beta(1,2)$ bonds to the second monosaccharide) and another, of medium molecular weight (90 kDa), whose repetitive unit is a disaccharide formed by glucose and galactose (the backbone consists of galactose molecules linked by $\alpha(1,6)$ bonds, all molecules with glucose branches linked at position 2). Both fractions are present in similar proportions, approximately 40 and 45%, respectively, in the purified extract. Also, it was possible to detect another polysaccharidic fraction of medium molecular weight that represents only 10%, and whose composition and structure are unknown until now.

From a technological point of view, the analysis of its influence on the texture and organoleptic characteristics of different dairy matrices, such as yogurt and Cheddar cheese, was carried out when it was incorporated as a food ingredient. The EPS added as a raw extract provided yogurts with increased consistency and hardness (in concentrations of 300 and 600 mg/L), increasing the pseudoplasticity with a slight effect on the syneresis and the organolepsis,

indicating a smooth interaction of the polysaccharide with the components of the dairy matrix (casein miscella, mainly). In the case of Cheddar cheeses, the extract added at a level of 1 g/L to the milk had no significant impact on the texture of the final product.

On the other hand, we studied the functional role of this EPS extract incorporated into two milk matrices, milk and yogurt, through three *in vivo* models (BALB/c mice): a study of its ability to protect mice against an infection of *Salmonella enteritidis* serovar Typhimurium; a study of its immunomodulatory role at the intestinal level; and a study of its probiotic/symbiotic role on the gut microbiota, individually and combined with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, a strain isolated from breast milk and with demonstrated probiotic effects. From these assays, the ability to protect animals against a *Salmonella* infection when administered in milk at a dose of 9 mg/kg/day for 25 days was demonstrated. Likewise, a mild immunomodulatory role was observed, mediated by IgA and by IL-6 (increased levels of IgA in intestinal fluid, and decreased levels of the proinflammatory cytokine IL-6 in the small intestine), in a dose of 4.5 mg/kg/day for 15 days of treatment, which corresponds to the response generally observed for neutral polymers of low molecular weight ($\sim <10^3$ kDa), such as the EPS of *L. fermentum* Lf2. From the study of its prebiotic/symbiotic role when administered as a food ingredient in yogurts (at a dose of 9 mg/kg/day, for 25 days), an increase in the production of certain short fatty acids (acetic and butyric acids) and in the levels of *Clostridium coccooides* group was observed throughout the treatment with the EPS, as well as a bifidogenic effect when combined with the bifidobacteria.

Another objective proposed for this Thesis, and that arose from a collaboration with Prof. Paul O'Toole (UCC, Ireland), was the study of the genetic cluster/s involved in the EPS synthesis of *L. fermentum* Lf2. For this purpose, the bacterial genome was sequenced, and, through bioinformatic analysis, it was possible to assemble it and find the genes that code for enzymes that participate in the EPS synthesis. From the knowledge of the complete genomic sequence (in draft format), 3 genetic clusters involved in EPS synthesis could be identified in different positions of the genome, which makes *L. fermentum* Lf2 a strain with very particular characteristics, different from what has been reported for this bacterial species. Due to the importance of having a variant of this strain unable to produce EPS, a knockout mutant (KO) was constructed for a gene coding for a key enzyme in the process of heteropolysaccharide synthesis, the priming glycosyltransferase pGT1 (ORF 119, cluster 1). Despite the fact that this gene could have been eliminated, the KO strain was phenotypically similar to the wildtype.

Based on the above, it can be concluded that *L. fermentum* Lf2, a native strain of our region of influence, has a particular relevance in relation to its high yield of EPS production (close to 2 g/L, constituted by two polysaccharide fractions of high and medium molecular

weight), which can provide, as a food ingredient, both technological and functional roles, improving the texture of the matrix where it is applied and exercising certain benefits to the health of the consumer (protection against infection of *Salmonella*, immunomodulatory and prebiotic/symbiotic roles).

Finally, we can highlight the relevance of this strain, which, although it was isolated from a negative event in the dairy industry, has shown very positive aspects from this study, all related to the production of a combination of homo and heteropolysaccharides, an unprecedented feature for strains of *L. fermentum*.

Índice de Contenidos

Objetivos	1
Capítulo 1: Introducción general	3
1.1. Generalidades de las bacterias ácido lácticas	5
1.2. Identificación y caracterización por medio de herramientas tradicionales y moleculares	6
1.3. Metabolismo de azúcares	10
1.3.1. Fermentación de hexosas y pentosas	10
1.3.2. Fermentación de disacáridos	12
1.3.3. Categorías de BAL según su metabolismo	13
1.4. Bifidobacterias: generalidades.....	14
1.5. Exopolisacáridos (EPS) producidos por BAL.....	16
1.5.1. Biosíntesis de EPS y <i>clusters</i> genéticos en BAL.....	18
1.5.2. Caracterización fisicoquímica	21
1.5.3. Solubilidad en agua	22
1.5.4. Posibles funciones de EPS bacterianos	23
1.5.5. Aplicaciones industriales.....	23
1.5.6. Beneficios para la salud.....	26
Capítulo 2: Selección de bacterias lácticas autóctonas productoras de EPS	29
2.1. Introducción.....	31
2.2. Materiales y métodos.....	34
2.2.1. Cepas: identificación y diversidad genética	34
2.2.2. Cinéticas de desarrollo de las cepas	35
2.2.3. Extracción y purificación de los EPS	36
2.2.4. Determinación de la presencia de genes relacionados a la síntesis de EPS.....	36
2.2.5. Estudio de la influencia del pH y temperatura sobre la producción de EPS de la cepa <i>L. fermentum</i> Lf2	37
2.2.6. Determinaciones de azúcar residual y ácidos orgánicos durante el desarrollo de <i>L.</i> <i>fermentum</i> Lf2.....	37
2.3. Resultados y discusión	38
2.3.1. Cepas: identificación y diversidad genética	38
2.3.2. Cinéticas de desarrollo de las cepas	39
2.3.3. Determinación de la presencia de genes relacionados a la síntesis de EPS.....	40
2.3.4. Estudio de la influencia del pH y temperatura sobre la producción de EPS de la cepa <i>L. fermentum</i> Lf2	42
2.3.5. Determinaciones de azúcar residual y ácidos orgánicos durante el desarrollo de <i>L.</i> <i>fermentum</i> Lf2.....	45
2.4. Conclusiones parciales	47
Capítulo 3: Caracterización química y estructural del EPS producido por <i>L. fermentum</i> <i>Lf2</i>	49
3.1. Introducción.....	51
3.2. Materiales y métodos.....	54
3.2.1. Purificación del extracto EPS.....	54
3.2.2. Determinación de la composición monosacáridica	54
3.2.3. Caracterización estructural	55
3.2.3.1. Análisis de PM	55
3.2.3.2. Análisis estructural por RMN.....	55

3.3.	Resultados y discusión.....	56
3.3.1.	Determinación de la composición monosacáridica	56
3.3.2.	Caracterización estructural	56
3.4.	Conclusiones parciales.....	62

Capítulo 4: Optimización de la producción de EPS de *L. fermentum* Lf2..... 65

4.1.	Introducción.....	67
4.2.	Materiales y métodos.....	68
4.2.1.	Cepa, medio y condiciones de cultivo	68
4.2.2.	Desarrollo para la producción de EPS	68
4.2.3.	Extracción de EPS	69
4.2.4.	Tratamiento estadístico de datos.....	70
4.3.	Resultados y discusión.....	70
4.4.	Conclusiones parciales.....	81

Capítulo 5: Caracterización tecnológica de yogur y queso Cheddar adicionados con extracto de EPS producido por *L. fermentum* Lf2..... 83

5.1.	Introducción.....	85
5.2.	Materiales y métodos.....	94
5.2.1.	Microorganismos y condiciones de crecimiento	94
5.2.2.	Producción de EPS de <i>L. fermentum</i> Lf2.....	95
5.2.3.	Estudio de la influencia del EPS crudo en yogures	95
5.2.3.1.	Elaboración de yogures.....	95
5.2.3.2.	Análisis reológicos de yogures	95
5.2.3.3.	Análisis de los perfiles de textura (APT) de yogures	96
5.2.3.4.	Análisis sensorial de yogures.....	96
5.2.3.5.	Sinéresis de yogures	97
5.2.4.	Estudio de la influencia del EPS crudo en queso Cheddar	97
5.2.4.1.	Elaboración de queso Cheddar	97
5.2.4.2.	Influencia del extracto de EPS en la coagulación de la leche.....	100
5.2.4.3.	Análisis fisicoquímico de quesos Cheddar	100
5.2.4.4.	Análisis de los perfiles de textura (APT) de quesos Cheddar.....	102
5.2.4.5.	Análisis microbiológico de queso Cheddar	102
5.2.4.6.	Proteólisis primaria y secundaria de queso Cheddar	103
5.2.5.	Análisis estadístico	104
5.3.	Resultados y discusión.....	104
5.3.1.	Estudio de la influencia del EPS crudo en yogures	104
5.3.1.1.	Análisis reológico de yogures.....	104
5.3.1.2.	Análisis de los perfiles de textura (APT) de yogures	106
5.3.1.3.	Análisis sensorial de yogures.....	109
5.3.1.4.	Sinéresis de yogures	113
5.3.2.	Estudio de la influencia del EPS crudo en queso Cheddar	114
5.3.2.1.	Influencia del extracto de EPS en la coagulación de la leche.....	114
5.3.2.2.	Análisis fisicoquímicos de quesos Cheddar.....	115
5.3.2.3.	Análisis de los perfiles de textura (APT) de quesos Cheddar.....	116
5.3.2.4.	Análisis microbiológico de queso Cheddar	119
5.3.2.5.	Proteólisis primaria y secundaria de queso Cheddar	120
5.4.	Conclusiones parciales.....	125

Capítulo 6: Caracterización funcional del extracto de EPS producido por *L. fermentum*

Lf2	127
6.1. Introducción.....	129
6.2. Materiales y métodos.....	132
6.2.1. Organismos y condiciones de crecimiento	132
6.2.2. Producción de EPS de <i>L. fermentum</i> Lf2	133
6.2.3. Ensayo preliminar <i>in vitro</i> para analizar el rol inmunomodulador del EPS	133
6.2.4. Elaboración de yogures	134
6.2.5. Animales.....	134
6.2.6. Capacidad inmunomoduladora: determinación de s-IgA (IgA secretoria) y citoquinas en intestino grueso y delgado	135
6.2.7. Capacidad protectora del EPS frente a una infección con <i>S. enteritidis</i> serovar Typhimurium	136
6.2.8. Evaluación del rol prebiótico/simbiótico del EPS en yogures	136
6.2.8.1. Recuentos de bifidobacterias en heces	137
6.2.8.2. Estimación por qPCR de los niveles de diferentes grupos bacterianos en heces ..	137
6.2.8.3. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta en heces	140
6.2.8.4. Determinación de citoquinas e IgA en intestino delgado	140
6.2.8.5. Análisis de cortes histológicos	140
6.2.9. Análisis estadístico	141
6.3. Resultados y discusión	141
6.3.1. Ensayo preliminar <i>in vitro</i> para analizar el rol inmunomodulador del EPS	141
6.3.2. Capacidad inmunomoduladora: determinación de s-IgA (IgA secretoria) y citoquinas en intestino grueso y delgado	146
6.3.3. Capacidad protectora del EPS frente a una infección con <i>S. enteritidis</i> serovar Typhimurium	150
6.3.4. Evaluación del rol prebiótico/simbiótico del EPS en yogures	152
6.3.4.1. Recuentos de bifidobacterias en heces	152
6.3.4.2. Estimación por qPCR de los niveles de diferentes grupos bacterianos en heces ..	153
6.3.4.3. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta en heces	169
6.3.4.4. Determinación de citoquinas e IgA en intestino delgado	182
6.3.4.5. Análisis de cortes histológicos	184
6.4. Conclusiones parciales	185

Capítulo 7: Identificación de genes de *L. fermentum* Lf2 relacionados a la síntesis de EPS.

Construcción de una cepa <i>knockout</i> para la enzima pGT	187
7.1. Introducción.....	189
7.2. Materiales y métodos.....	190
7.2.1. Secuenciación y análisis bioinformáticos.....	190
7.2.1. Microorganismos y condiciones de crecimiento	192
7.2.2. Manipulaciones de ADN	192
7.2.3. Obtención de células electrocompetentes.....	194
7.2.4. Construcción de la mutante <i>knockout</i> para el gen que codifica la glicosiltransferasa cebadora (pGT1, ORF_119)	195
7.3. Resultados y discusión	196
7.3.1. Secuenciación y análisis bioinformáticos.....	196
7.3.2. Construcción de la mutante <i>knockout</i> para el gen que codifica la glicosiltransferasa cebadora (pGT1, ORF_119)	249
7.4. Conclusiones parciales	254

Conclusiones generales	257
-------------------------------------	------------

Referencias	263
--------------------------	------------

Índice de Figuras

Capítulo 1

Figura 1. 1. Vías metabólicas de las bacterias lácticas.....	11
Figura 1. 2. Vías de transporte para la galactosa.....	12
Figura 1. 3. Vía de síntesis de EPS para <i>L. rhamnosus</i> GG... ..	20
Figura 1. 4. Posibles propiedades relacionadas a la salud de los EPS producidos por BAL.....	28

Capítulo 2

Figura 2. 1. Dendrograma obtenido por comparación (Software Gel Comparar, Applied Maths) y agrupación (método UPGMA) de los perfiles RAPD de las cepas en estudio.	39
Figura 2. 2. Cinéticas de desarrollo de las cepas en estudio.....	40
Figura 2. 3. Resultado de la amplificación con los <i>primers</i> LbEPS-F2/R2 de las cepas <i>L. fermentum</i> Lf2 y Lf16 en un gel de agarosa (1,5 % m/v).....	41
Figura 2. 4. Crecimiento de <i>L. fermentum</i> Lf2 en caldo SDM a pH 6 a A) 30°C y B) 37°C.....	43
Figura 2. 5. Crecimiento de <i>L. fermentum</i> Lf2 en caldo SDM a pH libre a 30°C (A) y 37°C (B).	44
Figura 2. 6. Evolución del consumo de glucosa y producción de los ácidos acético y láctico durante el crecimiento de <i>L. fermentum</i> Lf2 en caldo SDM a 30°C (A) y 37°C (B) a pH 6 y a pH libre.....	46

Capítulo 3

Figura 3. 1. Unidad repetitiva del EPS producido por <i>L. fermentum</i> TDS030603; <i>p</i> : piranosa.	52
Figura 3. 2. Dos formas cíclicas de hexosas A) piranosa, B) furanosa.	53
Figura 3. 3. Enlaces β y α -glucosídicos de distintos disacáridos.....	53
Figura 3. 4. Cromatograma (HPLC) de la muestra del eps de <i>L. fermentum</i> Lf2 hidrolizado (120°C, 2 h, TFA 2 N).. ..	56
Figura 3. 5. Análisis de $^1\text{H-RMN}$ para el extracto de EPS purificado.....	58
Figura 3. 6. Estructura de la unidad repetitiva, perfil obtenido para el análisis por SEC-MALLS y espectro $^1\text{H-RMN}$ de los polisacáridos de alto (A) y medio (B) PM contenidos en la muestra de EPS purificado.....	60

Capítulo 4

Figura 4. 1. Distribución de puntos experimentales (puntos rojos) obtenidos mediante el Diseño D-Optimal para las diferentes fuentes nitrogenadas del medio SDM.....	69
Figura 4. 2. Desarrollo de <i>L. fermentum</i> Lf2 para los puntos experimentales (1 al 7, Tabla 4.1) utilizando glucosa 2% (m/v) como fuente de C.	70

Figura 4. 3. Rendimiento de EPS (g/L) crudo obtenido a las 48 y 72 h de desarrollo de <i>L. fermentum</i> Lf2 en cada uno de los puntos experimentales analizados (Tabla 4.1) con glucosa al 2% (m/v) como fuente de C.	71
Figura 4. 4. Gráficas de contorno de la superficie de respuesta obtenidas para la producción de EPS de <i>L. fermentum</i> Lf2 a las 48 h (A) y 72 h (B) en los puntos experimentales (Tabla 4.1), usando glucosa 2% (m/v) como fuente de C.	73
Figura 4. 5. Desarrollo de <i>L. fermentum</i> Lf2 para los puntos experimentales 1 al 7, Tabla 4.1) utilizando sacarosa 2% (m/v) como fuente de C.....	74
Figura 4. 6. Producción de EPS (g/L) crudo obtenido a las 48 y 72 h de desarrollo de <i>L. fermentum</i> Lf2 en cada uno de los puntos experimentales analizados (Tabla 4.1) con sacarosa al 2% (m/v) como fuente de C.	75
Figura 4. 7. Gráficas de contorno de la superficie de respuesta obtenidas para la producción de EPS de <i>L. fermentum</i> Lf2 a las 48 h (A) y 72 h (B) en los puntos experimentales (Tabla 4.1), usando sacarosa (2% m/v) como fuente de C.	77

Capítulo 5

Figura 5. 1. Curvas de esfuerzo cortante vs. gradiente de velocidad para fluidos que presentan distintos comportamientos de flujo.....	88
Figura 5. 2. Curva de esfuerzo cortante vs. gradiente de velocidad obtenida a partir de una dispersión de almidón de tapioca calentada a 67°C por 5 min, representando un comportamiento tixotrópico.. ...	89
Figura 5. 3. Comportamiento de espesamiento dependiente del tiempo (antitixotrópico) de una dispersión de almidón de maíz ceroso entrecruzado calentado a 120 °C durante 30 min.....	90
Figura 5. 4. Curva obtenida al graficar los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') en función del tiempo durante la gelificación de la leche mostrando el periodo lag inicial y el subsecuente periodo de desarrollo del gel..	93
Figura 5. 5. Curva de Análisis de Perfil de Textura típica..	93
Figura 5. 6. Algunas etapas de la elaboración de miniquesos a partir de 500 ml de leche.....	98
Figura 5. 7. Diferentes etapas del proceso de elaboración de quesos Cheddar a partir de 10 L de leche..	99
Figura 5. 8. Diagrama de esfuerzo de corte en función del gradiente de deformación para los diferentes yogures a los 3 días de almacenamiento	106
Figura 5. 9. Evolución de los parámetros APT de yogures controles (C) y adicionados de 300 (E300) y 600 (E600) mg EPS/L luego de 3 (A) y 25 (B) días de almacenamiento a 4 °C.	108
Figura 5. 10. Evolución de los descriptores de textura (consistencia, granulosidad, cremosidad y presencia de grumos) y defectos (sabores a viejo, raro, metálico y rancio) de los yogures controles (C) y adicionados de 300 (E300) y 600 (E600) mg EPS/L luego de 3 (A) y 25 (B) días de almacenamiento.....	112
Figura 5. 11. Evolución del pH durante la maduración para los quesos Cheddar-1 kg controles (C) y con EPS (E) durante los 120 días de maduración.	116
Figura 5. 12. Análisis de los perfiles de textura durante el tiempo de maduración para los quesos controles (C) y adicionados de EPS (E).....	118
Figura 5. 13. Análisis microbiológico de los quesos Cheddar-1 kg controles (C) y con agregado de 1 g/L de extracto de EPS (E) y durante la maduración (7, 30, 60, 90 y 120 días).	120

Figura 5. 14. Determinación de aminoácidos libres por el método de TNBS para la fracción soluble a pH 4,6 de los miniquesos a los 14, 30, 60 y 90 días de maduración.	121
Figura 5. 15. Gel de UREA-PAGE con caseinato de sodio como estándar (S) para las fracciones insolubles a pH 4,6 obtenidas a partir de los miniquesos controles (C) y adicionados de 1g/L de EPS (E) a los 14 (2S), 30 (1M), 60 (2M) y 90 (3M) días de maduración.	122
Figura 5. 16. Perfiles peptídicos (UPLC) obtenidos para los miniquesos controles y con extracto de EPS a los 90 días de maduración.....	122
Figura 5. 17. Gel de UREA-PAGE para los quesos de 1 kg controles (C) y adicionados de 1 g/L de EPS (E) a los 9 (ti) y 120 días de maduración (tf).....	124

Capítulo 6

Figura 6. 1. Determinación de los niveles de citoquinas TNF- α (A), IL-6 (B) e IL-10 (C) para el ensayo <i>in vitro</i> con la línea celular THP-1. Se utilizó extracto de EPS crudo (60 μ g/mL) y purificado (12,6 μ g/ml), y se incluyó un control negativo (células sin tratar) y positivo (células tratadas con 0,5 μ g/ml LPS).....	143
Figura 6. 2. Efecto del extracto de EPS de <i>L. fermentum</i> Lf2 sobre la proporción de sobrevivientes de ratones infectados con <i>Salmonella enteritidis</i> serovar Typhimurium aplicando la estimación de distribuciones Kaplan-Meier.	151
Figura 6. 3. Variación de los recuentos de bifidobacterias en heces (RCM-MUP, 37 °C, 48 h, anaerobiosis) con respecto al tiempo inicial.....	153
Figura 6. 4. Variación en la estimación mediante qPCR, utilizando los <i>primers</i> universales, de los niveles de la carga microbiana en heces de ratones con respecto al tiempo inicial.....	155
Figura 6. 5. Variación en la estimación mediante qPCR de los niveles de la especie <i>B. catenulatum</i> en heces de ratones con respecto al tiempo inicial.....	156
Figura 6. 6. Variación en la estimación mediante qPCR de los niveles de la especie <i>B. animalis</i> en heces de ratones con respecto al tiempo inicial.....	158
Figura 6. 7. Variación en la estimación mediante qPCR de los niveles del género <i>Bifidobacterium</i> en heces de ratones con respecto al tiempo inicial que los asteriscos representan diferencias ($p < 0,05$) entre los distintos tiempos para cada tratamiento.	161
Figura 6. 8. Variación en la estimación mediante qPCR de los niveles del grupo <i>C. coccoides</i> en heces de ratones con respecto al tiempo inicial.....	162
Figura 6. 9. Variación en la estimación mediante qPCR de los niveles del grupo <i>C. leptum</i> en heces de ratones con respecto al tiempo inicial.....	164
Figura 6. 10. Variación en la estimación mediante qPCR de los niveles de enterobacterias en heces de ratones con respecto al tiempo inicial.....	165
Figura 6. 11. Variación en la estimación mediante qPCR de los niveles del género <i>Streptococcus</i> en heces de ratones con respecto al tiempo inicial.....	167
Figura 6. 12. Variación en la estimación mediante qPCR de los niveles del género <i>Lactobacillus</i> en heces de ratones con respecto al tiempo inicial.....	169
Figura 6. 13. Variación de la concentración de ácido láctico en heces de ratones con respecto al tiempo inicial.....	171
Figura 6. 14. Variación de la concentración de ácido acético en heces de ratones con respecto al tiempo inicial.....	172

Figura 6. 15. Variación de la concentración de ácido propiónico en heces de ratones con respecto al tiempo inicial.....	173
Figura 6. 16. Variación de la concentración de ácido butírico en heces de ratones con respecto al tiempo inicial.....	174
Figura 6. 17. Variación de la concentración de la suma de los ácidos butírico, propiónico y acético (SCFA totales) en heces de ratones con respecto al tiempo inicial.....	175
Figura 6. 18. Gráficos de <i>loading</i> (A) y <i>scores</i> (B) para CP1 vs. CP2 del análisis de componentes principales de los ácidos orgánicos y grupos bacterianos en las heces de ratones a los 25 días tratamiento.....	181
Figura 6. 19. Gráfico de caja que representa las determinaciones de las citoquinas IL-10, IL-6, IFN- γ y TNF- α en intestino delgado luego de finalizar el tratamiento (25 días).....	183
Figura 6. 20. Concentraciones de IgA secretoria en fluido intestinal para los 4 grupos.	184
Figura 6. 21. Secciones histológicas del intestino delgado (tinción con May Grünwald Giemsa, 10X) de ratones que recibieron: a) yogur con <i>B. animalis</i> INL1 (Y-B, $1,5 \times 10^8$ UFC/ratón/día); b) yogur con extracto de EPS a una concentración de 600 mg/L (Y-E600); d) yogur con extracto de EPS y bifidobacteria (Y-E600-B); d) sólo yogur (Y, grupo control).....	185

Capítulo 7

Figura 7. 1. Esquema simplificado de la construcción de la mutante KO para la <i>priming glycosyltransferase</i> de <i>L. fermentum</i> Lf2.....	196
Figura 7. 2. Región de la glicosiltransferasa cebadora ubicada entre las posiciones nucleotídicas 98031 y 101867 del genoma de <i>L. fermentum</i> Lf2.....	250
Figura 7. 3. Electroforesis en gel de agarosa (1% m/v) para los productos de amplificación por PCR obtenidos con los <i>primers</i> LF2_out_F y LF2_out_R usando ADN del genoma de <i>L. fermentum</i> Lf2 como molde. KO: mutantes <i>knockout</i> para la glicosiltransferasa cebadora; pGT1: glicosiltransferasa cebadora (por sus siglas en inglés); <i>wt</i> : cepa <i>wildtype</i>	250
Figura 7. 4. Resultados de los alineamientos BLAST obtenidos por comparación de las secuencias de los productos de PCR obtenidos con los <i>primers</i> PGLF2_out_F y PGLF2_out_R con la región del gen que codifica la pGT1 en el genoma de <i>L. fermentum</i> Lf2. Se muestran los resultados para la cepa <i>wt</i> y mutante (KO).	251
Figura 7. 5. Electroforesis en gel de agarosa (1% m/v) para los productos de PCR obtenidos para la cepa <i>wildtype</i> (<i>wt</i>) y mutantes KO para la pGT1 de <i>L. fermentum</i> Lf2 usando los <i>primers</i> PGLF2_partemediá_F y PGLF2_partemediá_R.....	251
Figura 7. 6. Secuencia nucleotídica de la región del gen que codifica para la pGT1 (glicosiltransferasa cebadora).....	252

Índice de tablas

Capítulo 1

- Tabla 1. 1.** Características diferenciales de las bacterias lácticas..... 9
- Tabla 1. 2.** Aplicaciones en la industria alimentaria de exopolisacáridos y oligosacáridos de BAL.... 25

Capítulo 2

- Tabla 2. 1.** Condiciones de las amplificaciones al azar (RAPD-PCR) con las 6 sondas utilizadas..... 35
- Tabla 2. 2.** Origen y características particulares de las cepas en estudio..... 38
- Tabla 2. 3.** Identificación de las cepas en estudio por amplificación y posterior secuenciación del gen (1500 bp) que codifica para la subunidad 16s del ARN ribosomal. 39
- Tabla 2. 4.** Secuenciación y comparación de productos de amplificación con *primers* que hibridan en el *cluster* genético de síntesis de HePS en *L. fermentum* (Dan y col., 2009) con genes que codifican para proteínas relacionadas con la producción del EPS. 41

Capítulo 4

- Tabla 4. 1.** Composición de los medios de cultivo según el diseño D-optimal. 69

Capítulo 5

- Tabla 5. 1.** Definición de las propiedades mecánicas de textura. 94
- Tabla 5. 2.** Parámetros reológicos y sinéresis evaluados para los yogures controles y con agregado de EPS (300 y 600 mg EPS/L) a los 3 y 25 días de almacenamiento a 4 °C. 106
- Tabla 5. 3.** Promedios ponderados y porcentajes percibidos para los atributos del *flavor* para los yogures controles y adicionados de EPS (300 y 600 mg/L) luego de 3 y 25 días de almacenamiento a 4 °C.. 113
- Tabla 5. 4.** Análisis reológico de las propiedades de coagulación de la leche con 1 g/L de extracto de EPS (E) y sin extracto (C), adicionada de quimosina..... 114
- Tabla 5. 5.** Análisis de la composición de los Cheddar-1 kg controles (C) y con agregado de extracto de EPS (E) a los 9 días de maduración..... 115

Capítulo 6

- Tabla 6. 1.** *Primers* utilizados para los diferentes grupos microbianos, estándares usados para las curvas de calibrado, rango dinámico obtenido para cada curva, concentración de *primers*, temperatura de *annealing* (Ta), eficiencia lograda (Ef) y referencia de cada reacción..... 139
- Tabla 6. 2.** Efectos del extracto de EPS de *L. fermentum* Lf2 sobre IgA de fluido intestinal y citoquinas IFN- γ , IL-10, IL-6 de los tejidos provenientes de los intestinos delgado y grueso, cuando fue resuspendido (4,5 mg/ kg de peso corporal) en yogur (Y-E300) o leche (L-E300) luego de 15 días de administración, en comparación con sus controles respectivos (Y y L)..... 147

Tabla 6. 3. Resumen de los resultados obtenidos (estimación por qPCR de los niveles de diferentes grupos bacterianos y cuantificación de SCFA en heces) para el estudio <i>in vivo</i> del rol prebiótico/simbiótico del EPS de <i>L. fermentum</i> Lf2, combinado con <i>B. animalis</i> subps. <i>lactis</i> INL1.	176
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Capítulo 7

Tabla 7. 1. <i>Primers</i> utilizados con sus secuencias, temperatura de <i>melting</i> (Tm) y longitud.	193
Tabla 7. 2. Condiciones utilizadas para las distintas reacciones.	194
Tabla 7. 3. <i>Clusters</i> que podrían participar en la síntesis de EPS de la cepa <i>L. fermentum</i> Lf2.	199
Tabla 7. 4. Selección de genomas que contengan el ORF_119 de <i>L. fermentum</i> Lf2 con, al menos, 70% similitud y 160 aminoácidos de la enzima codificada por este gen (pGT1).	200
Tabla 7. 5. Selección de genomas que contengan el ORF 1945 de <i>L. fermentum</i> Lf2 con al menos 70% similitud y 150 aminoácidos de la enzima codificada por este gen (pGT2).	206
Tabla 7. 6. Estudio de la localización de los genes de <i>L. fermentum</i> Lf2 en los contigs de los genomas seleccionados en la Tabla 7.4 (identidad (% ID) \geq 70%, alineación \geq 50%).	207
Tabla 7. 7. Estudio de la localización de los genes de <i>L. fermentum</i> Lf2 en los <i>contigs</i> de los genomas seleccionados en la Tabla 7.5 (identidad (% ID) \geq 70%, alineación \geq 50%).	214
Tabla 7. 8. Análisis de los genes contenidos en los genomas seleccionados en la Tabla 7.4 en comparación con los de <i>L. fermentum</i> Lf2 (identidad (% ID) \geq 70%, alineación \geq 50%).	229
Tabla 7. 9. Análisis de los genes contenidos en los genomas seleccionados en la Tabla 7.5 en comparación con los de <i>L. fermentum</i> Lf2 (identidad (% ID) \geq 70%, alineación \geq 50%)..	234

Abreviaturas

%ID: % Identidad

6-PG/PK: 6-Fosfogluconato/fosfocetolasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

APT: Análisis de perfiles de textura

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal

BAL: Bacteria/s ácido láctica/s

BC: Bacto Casitona

BN: Base nitrogenada

Cit: Citrato de amonio

Cm: Cloranfenicol

CPS: Polisacárido/s capsular/es

D.O.: Densidad óptica

DGGE: *Denaturing gradient gel electrophoresis*

DHAP: Dihidroxiacetonafosfato

Em: Eritromicina

EPS⁻: Cepas incapaces de producir EPS

EPS: Exopolisacárido

EPS⁺: Cepas capaces de producir EPS

FDP: Fructosa-1,6-difosfato

FS: Fructan-sacarasa/s

GAP: Gliceraldehído-3P

GC-MS: *Gas chromatography– mass spectrometry*

GRAS: *Generally recognized as safe*

GS: Glucan-sacarasa/s

HePs: Heteropolisacárido/s

Hops: Homopolisacárido/s

HPLC: *High-performance liquid chromatography*

Km: Kanamicina

KO: *Knockout*

LDR: Leche descremada reconstituida

LPS: Lipopolisacárido

MRS: *De Man, Rogosa and Sharpe agar*

o.n.: *over night*

ORF: *Open reading frame*

PCR: *Polymerase chain reaction*

PCR-SOE: *PCR-splicing by overlap extension*

PET-PTS: *Phosphoenolpyruvate- phosphotransferase system*

PFGE: *Pulse field gel electrophoresis*

pGT: *Priming glycosyltransferase/s* o glicosiltransferasa/s cebadora/s

pGT1: glicosiltransferasa cebadora codificada por el ORF_119 de *L. fermentum* Lf2

pGT2: glicosiltransferasa cebadora codificada por el ORF_1945 de *L. fermentum* Lf2

PM: peso molecular

qPCR: PCR cuantitativa

RAPD: *Random amplification of polymorphic DNA*

RCM: *Reinforced clostridial medium*

RMN: Resonancia magnética nuclear

SCFA: *Short chain fatty Acids* o ácidos grasos de cadena corta

SDM: *Semi-defined medium*

SEC-MALLS: *Size exclusion chromatography- multi-angle laser light scattering*

s-IgA: Inmunoglobulina A secretoria

Ta: Temperatura de *annealing*

TFA: Ácido trifluoroacético

Tm: Temperatura de *melting*

UFC: Unidades formadoras de colonias

WPC: *whey protein concéntrate* o concentrado de proteína de suero

wt: *wildtype*

Objetivos

Objetivo general

Determinar las propiedades funcionales y tecnológicas de exopolisacáridos (EPS) producidos por bacterias lácticas aisladas de muestras de diversos orígenes (fermentos naturales, heces de neonatos, leche materna, etc.).

Objetivos particulares

1. Seleccionar cepas autóctonas productoras de EPS y optimizar la producción de EPS en diferentes condiciones.
2. Caracterizar química y estructuralmente los EPS aislados.
3. Evaluar el potencial de los EPS crudos como prebióticos (*in vivo*).
4. Evaluar la capacidad de los EPS crudos de modular la respuesta inmune (*in vivo*).
5. Seleccionar los EPS funcionalmente más interesantes para su incorporación como aditivos alimentarios en la elaboración de diferentes productos lácteos (leches fermentadas y quesos). Evaluar las propiedades tecnológicas, reológicas, sensoriales y funcionales (*in vivo*) de los productos obtenidos.

Objetivos particulares incorporados al plan original

1. Secuenciar el genoma parcial de la cepa *Lactobacillus fermentum* Lf2.
2. Identificar el/los *cluster/s* genético/s involucrado/s en la producción de EPS de dicha cepa.
3. Obtener una mutante *knockout* de *L. fermentum* Lf2 incapaz de producir EPS.

Capítulo 1: Introducción general

1.1. Generalidades de las bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son bacterias fermentativas que están presentes naturalmente, o bien son agregadas intencionalmente, en medios ricos en nutrientes donde los carbohidratos y proteínas son abundantes. El uso eficiente de nutrientes, sumado a la producción de ácido láctico durante el crecimiento, les otorga ventajas competitivas en nichos ecológicos muy diversos. Se asocian principalmente a hábitats ricos en nutrientes, como son los alimentos (leche, carne, bebidas y vegetales), pero también forman parte de la flora normal de la boca, intestinos y vagina de mamíferos (Makarova y col., 2006). Las numerosas reacciones enzimáticas que tienen lugar en el sustrato donde desarrollan producen modificaciones de las propiedades organolépticas, reológicas y nutritivas de los alimentos, dando lugar a los alimentos fermentados. Además de ácido láctico (su principal metabolito), producen una variedad de compuestos tales como diacetilo, acetoina y 2-3-butanodiol a partir de la utilización de citrato, junto a otros compuestos volátiles y péptidos bioactivos a partir del catabolismo de aminoácidos (Fernández y Zúñiga, 2006). En la última década se generó una gran cantidad de información en diversos aspectos de la fisiología y genética de estas bacterias, gracias a la secuenciación y análisis de genomas, junto con el uso de técnicas post-genómicas tales como proteómica, transcriptómica y metabolómica.

En general, se considera que las BAL constituyen un grupo de bacterias que comparten las siguientes características (Axelsson, 2004):

- gram-positivas
- inmóviles
- ácido tolerantes
- con requerimientos nutricionales complejos
- catalasa negativas
- anaeróbicas facultativas
- sin citocromos
- no esporuladas
- en forma de cocos o bacilos
- producen ácido láctico como el producto final mayoritario durante la fermentación de carbohidratos
- no patógenas y seguras o GRAS (por sus siglas en inglés, *Generally Recognized as Safe*).

La amplia definición de este grupo incluyó más de 40 géneros, sin embargo, desde el punto de vista tecnológico, las principales BAL pertenecen a los siguientes géneros:

Aerococcus, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. El género *Bifidobacterium* a veces se considera, erróneamente, dentro del grupo de las BAL pero, si bien comparte algunas de las características generales, no está relacionado filogenéticamente y tiene una forma única de fermentar azúcares (Axelsson y Ahrné, 2000). La definición anterior no es estricta, ya que pueden presentarse variaciones; sin embargo, la característica que siempre se mantiene es la de ser gram-positivas, sin excepciones. Las BAL asimismo son incapaces de sintetizar porfirinas, por lo que no poseen una verdadera catalasa (aunque algunas presentan pseudocatalasas) o citocromos cuando se desarrollan en el laboratorio con medios que carecen de grupos hemo u otros relacionados. Es por esto que las BAL no presentan cadena de electrones y son fermentativas (Engesser y Hammes, 1994; Wolf y col., 1991).

1.2. Identificación y caracterización por medio de herramientas tradicionales y moleculares

Para la identificación de BAL, como para microorganismos en general, el único método confiable es la secuenciación del gen que codifica para el 16s ARNr y determinación de la identidad por homología con las secuencias disponibles en las bases de datos. Sin embargo, preliminarmente siempre es importante observar las características fenotípicas, algunas de ellas propias de un determinado género (Tabla 1.1). Este amplio grupo de bacterias puede presentar morfología de bastón o bacilo (géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium*) o cocos (los demás géneros). Una excepción es el género *Weisella*, que incluye especies con morfología de cocos y bacilos (Collins y col., 1993). Además, una característica clave en la diferenciación de los cocos es la división celular en dos direcciones perpendiculares en un mismo plano, dando como resultado la agrupación en tétrada, siendo los géneros representativos *Aerococcus*, *Pediococcus* y *Tetragenococcus* (Sharpe, 1979).

Otra forma de diferenciar estas bacterias es de acuerdo al metabolismo de la glucosa en condiciones estándares (presencia de glucosa y factores de crecimiento como aminoácidos, vitaminas y precursores de ácidos nucleicos ilimitados, y limitada disponibilidad de oxígeno) (Sharpe, 1979). Bajo estas condiciones, se pueden dividir en dos grupos: aquellas que generan ácido láctico como único producto de la fermentación, llamadas homofermentativas, mientras que las heterofermentativas producen, además de ácido láctico, etanol, ácido acético y CO₂. Por lo tanto, se las pueden diferenciar fácilmente de las homofermentativas por la producción de gas. *Leuconostoc*, *Weisella*, *Oenococcus* y un subgrupo de *Lactobacillus* son heterofermentativas, el resto de las BAL son homofermentativas.

El crecimiento a determinadas temperaturas es usado principalmente para distinguir los cocos. Los enterococos crecen a 10°C (algunas cepas) y 45°C, algunas cepas de lactococos y vagicocos a 10°C, pero no a 45°C. Los estreptococos generalmente no crecen a 10°C, mientras que el crecimiento a 45°C depende de la especie. La tolerancia a la sal (6,5% NaCl) también puede usarse para diferenciar enterococos, lactococos/vagicocos y estreptococos (aunque en estos últimos puede ser variable) (Mundt, 1986). El género *Tetragenococcus*, por su parte, se caracteriza por presentar tolerancia salina extrema (18%).

La tolerancia a condiciones ácidas o alcalinas también es indicativa del género: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus* crecen a un pH relativamente alto, aunque no todos pueden crecer con el test estándar de pH 9,6.

La síntesis de distintas formas isoméricas del ácido láctico por fermentación de la glucosa puede ser útil para diferenciar entre *Leuconostoc*, que produce D-ácido láctico y la mayoría de las especies de *Lactobacillus* heterofermentativos, que producen un racemato (DL-ácido láctico), si bien se diferencian claramente por su morfología celular (Axelsson, 2004). En este aspecto el género *Weisella* produce resultados ambiguos.

Carnobacterium se puede distinguir de lactobacilos por su capacidad de crecer a pH 9, mientras que no puede crecer en medio selectivo con acetato para lactobacilos.

Pediococcus puede confundirse con *Aerococcus* por su morfología; sin embargo los primeros son más ácido-tolerantes y crecen bien anaeróbicamente, a diferencia de *Aerococcus* que es de naturaleza microaerófila (Evans, 1986).

Las especies del género *Weisella* se pueden confundir fácilmente con leuconostocs o lactobacilos heterofermentativos. *Oenococcus* presenta similitud con *Leuconostoc* pero se pueden diferenciar por su tolerancia ácida y alcohólica extrema (Dicks y col., 1995).

Algunas de las principales propiedades usadas en la caracterización fenotípica/bioquímica son: el rango de carbohidratos fermentados, hidrólisis de arginina, formación de acetoína, tolerancia a la bilis, tipo de hemólisis, producción de polisacáridos extracelulares, requerimiento de factores de crecimiento, presencia de ciertas enzimas (como β -galactosidasa y β -glucuronidasa), características de crecimiento en leche y tipificación serológica. Asimismo, otras caracterizaciones incluyen tipo de diaminoácido en el peptidoglicano, presencia y tipo de ácido teicoico, presencia y tipo de menaquinonas, proporción de guanina y citosina en el DNA, composición de ácidos grasos y movilidad electroforética de la enzima lactato deshidrogenasa (Axelsson, 2004).

Actualmente, la técnica más utilizada por su nivel de certeza para la identificación de microorganismos en general y, entre ellos, las BAL, consiste en secuenciar el gen del ARNr 16s,

amplificándolo directamente por PCR con *primers* generales que hibridan en regiones conservadas (Collins y col., 1990; Nissen y col., 1994; Salama y col., 1991) pero que amplifican alguna de las regiones variables de este gen, cuya secuencia nucleotídica es característica de cada especie o subespecie. En este caso se determina la identidad por comparación con secuencias disponibles en bases de datos, siendo el método BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool for nucleic acid sequences*; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) el más ampliamente utilizado. Existen en la actualidad un vasto número de secuencias de este gen disponibles en las bases de datos para BAL, lo que ofrece, sin lugar a dudas, la mayor riqueza de información a la hora de identificar una cepa por similitud de secuencias nucleotídicas. Si bien se utilizan otros métodos en la actualidad, como la identificación por MALDI-TOF (por sus siglas en inglés, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*), que se basa en patrones espectrales de masa compuestos en su mayoría por proteínas muy abundantes, que incluyen muchas proteínas ribosomales (características de cada especie bacteriana) (Cherkaoui y col., 2010; Doan y col., 2012), ninguno se compara en su grado de confianza con la secuenciación del gen ARNr 16s. Otras técnicas basadas en PCR también son aplicadas complementariamente a las de identificación para caracterizar cepas o evaluar la diversidad bacteriana, siendo la más común la RAPD (por sus siglas en inglés, *Randomly Amplified Polymorphic DNA*) que permite obtener perfiles característicos (o *fingerprints*) para cada cepa y, cuando se dispone de una base de datos muy amplia, permite inferir su identidad (Du Plessis y Dicks, 1995; Rossetti y Giraffa, 2005; Welsh y McClelland, 1990). Otros métodos se basan en la digestión del ADN cromosomal con endonucleasas de restricción que producen cortes poco habituales (como *NotI*). De esta forma, a partir del genoma completo se obtienen pocos fragmentos de gran tamaño que son separados en geles de electroforesis de campo pulsado o PFGE (por su sigla en inglés, *Pulse Field Gel Electrophoresis*) y, debido a su alto poder de discriminación, permite distinguir cepas (Björkroth y col., 1996; Tynkkynen y col., 1999). Asimismo, se puede obtener el patrón de proteínas solubles, que posibilita analizar por electroforesis en geles de poliacrilamida las proteínas celulares para luego analizar estadísticamente los patrones, comparándolos con los disponibles en bases de datos (Pot y col., 1993; Vauterin y col., 1993). Esta última técnica se puede aplicar para asignar una cepa a una especie, y su limitación es que debe estar estandarizada, porque el medio donde crecen las bacterias, temperatura, y otros factores influyen en la composición proteica y, por ende, en el patrón obtenido. Cada técnica de identificación y clasificación de las BAL presenta ventajas y desventajas. Lo recomendable es complementarlas entre sí, de acuerdo al caso de estudio, para disponer de información de diversa naturaleza.

Tabla 1. 1. Características diferenciales de las bacterias lácticas. *Carnob*: *Carnobacterium*, *Lactob*: *Lactobacillus*, *Aeroc*: *Aerococcus*, *Enteroc*: *Enterococcus*, *Lactoc*: *Lactococcus*, *Vagoc*: *Vagococcus*, *Leucon*: *Leuconostoc*, *Oenoc*: *Oenococcus*, *Pedioc*: *Pediococcus*, *Streptoc*: *Streptococcus*, *Tetragenoc*: *Tetragenococcus*. Tabla adaptada de Salminen y col. (2004).

característica	bacilos		cocos							
	<i>Carnob.</i>	<i>Lactob.</i>	<i>Aeroc.</i>	<i>Enteroc.</i>	<i>Lactoc., Vagoc.</i>	<i>Leucon., Oenoc.</i>	<i>Pedioc.</i>	<i>Streptoc.</i>	<i>Tetragenoc.</i>	<i>Weisella</i> ^a
formación de tétradas	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO ₂ a partir de glucosa ^b	- ^c	±	-	-	-	+	-	-	-	+
crecimiento a 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
crecimiento a 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
crecimiento en NaCl 6,5%	ND ^d	±	+	+	-	±	±	-	+	±
crecimiento en NaCl 18%	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
crecimiento a pH 4,4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
crecimiento a pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
ácido láctico ^e	L	D, L, DL ^f	L	L	L	D	L, DL ^f	L	L	D, DL ^f

+ : positivo, - : negativo, ± la respuesta varía según especie, ND: no determinado

^a *Weisella* también puede presentar forma de bacilo.

^b Test para la homo o heterofermentación de la glucosa, negativo y positivo hacen referencia a la homo y heterofermentación, respectivamente.

^c Pueden producirse pequeñas cantidades de CO₂, según el medio.

^d No se reportó crecimiento a NaCl 8%.

^e Configuración del ácido láctico producido.

^f La producción de D, L, DLvaría entre especies.

1.3. Metabolismo de azúcares

1.3.1. Fermentación de hexosas y pentosas

Para dar inicio a la fermentación de las hexosas, es necesario un enlace fosfato de alta energía para lograr la activación del azúcar mediante, por ejemplo, una glucoquinasa ATP-dependiente o a partir de fosfoenolpiruvato (sistema multiproteico PTS- *phosphotransferase system*, en el que la translocación del azúcar al interior de la bacteria y su fosforilación se dan simultáneamente). La glucólisis (o vía de Embden-Meyerhof-Parnas) es usada por todas las BAL excepto leuconostocs, lactobacilos del grupo III (heterofermentativos obligados), oenococos y weisellas. Se caracteriza por la formación de fructosa- 1,6-difosfato (FDP), que es dividida en dihidroxiacetonafofosfato (DHAP) y gliceraldehído-3P (GAP) por una FDP aldolasa. El GAP (y el DHAP vía GAP) se convierte en piruvato en una secuencia metabólica que incluye fosforilación a nivel sustrato en dos partes. Bajo condiciones normales, en exceso de azúcares y limitada exposición al oxígeno, el piruvato es reducido a ácido láctico por una lactato deshidrogenasa NAD^+ -dependiente, reoxidando el NADH formado en los pasos previos. De esta manera se obtiene un balance redox, siendo el ácido láctico el único producto final, por lo que este metabolismo se conoce como fermentación homoláctica (Figura 1. 1 A, Axelsson, 2004). Se obtienen 2 moles de ácido láctico por mol de glucosa y 2 ATP netos.

La otra vía de fermentación tiene varios nombres, como vía de pentosa fosfato o vía de pentosa fosfocetolasa, también conocida como vía 6-fosfogluconato/fosfocetolasa (6-PG/PK, por sus siglas en inglés), ya que la división de la fosfocetolasa es un paso clave (Kandler y Weiss, 1986). Los primeros pasos son de deshidrogenación para formar 6-fosfogluconato, y luego se produce una descarboxilación. La pentosa-5-fosfato, por acción de una fosfocetolasa, se transforma en GAP y acetil fosfato, y el GAP es metabolizado como en la vía glucolítica, resultando en la formación de ácido láctico. Cuando no hay aceptores de electrones adicionales, el acetil fosfato es reducido a etanol vía acetil-CoA y acetaldehído. Como, además de ácido láctico, se obtienen cantidades significantes de otros productos (CO_2 y etanol), a esta vía de fermentación se la llama heteroláctica, y como resultado se obtienen 1 mol de ácido láctico, etanol y CO_2 , y 1 mol de ATP por mol de glucosa (Figura 1.1. B).

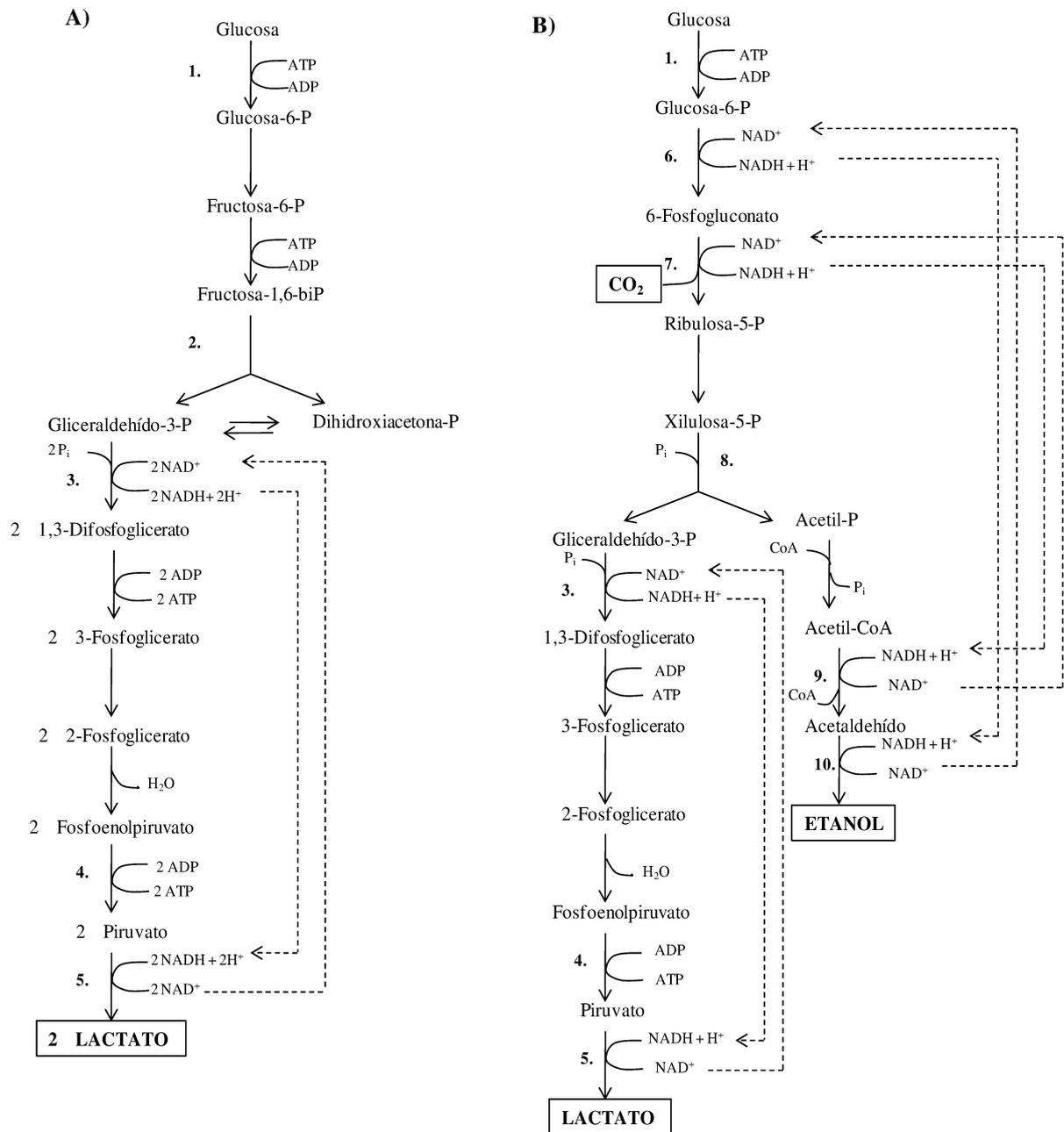


Figura 1. 1. Vías metabólicas de las bacterias lácticas. A) Fermentación homoláctica; B) Fermentación heteroláctica. Las enzimas se enumeran de la siguiente manera: 1. Glucoquinasa; 2. Fructosa-1,6-difosfato aldolasa; 3. Gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa; 4. Piruvato quinasa; 5. Lactato dehidrogenasa; 6. Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa; 7. 6-Fosfogluconato dehidrogenasa; 8. Fosfoacetolasa; 9. Acetaldehído dehidrogenasa; 10. Alcohol dehidrogenasa. Imagen adaptada de Salminen y col. (2004).

Otras hexosas como la manosa, galactosa y fructosa también son fermentadas por las BAL. Estos azúcares entran a las distintas vías como glucosa-6-fosfato o fructosa-6-fosfato luego de la isomerización y/o fosforilación. La galactosa utiliza el sistema PTS para ser luego metabolizada por la vía de tagatosa-6-fosfato que coincide con la glucólisis a nivel del GAP

(Bissett y Anderson, 1974). O bien, en algunas especies que carecen del sistema PTS, transportan la galactosa con una permeasa y la convierten en glucosa-6-fosfato por la vía Leloir (Thomas y col., 1980) (Figura 1.2).

Las pentosas son fermentadas por muchas BAL, en general se usan permeasas específicas para su transporte. Dentro de la célula, las pentosas son fosforiladas y convertidas a ribulosa-5-fosfato o xilulosa-5-fosfato por epimerasas o isomerasas (Kandler, 1983). Estos compuestos pueden ser luego metabolizados en la vía 6-PG/PK. Pero no sólo las BAL heterofermentativas son capaces de fermentar pentosas, ya que todos los géneros son pentosa positivos, con la excepción del grupo I de lacobacilos (homofermentativos obligados). La fermentación heteroláctica de las pentosas resulta en productos finales diferentes de la de la glucosa, no se forma CO₂, y el acetil-fosfato es usado para una fosforilación a nivel sustrato mediante una enzima acetato-quinasa, produciendo como resultado acetato y ATP. En este caso la fermentación de pentosas produce cantidades equimolares de ácido láctico y acético (Axelsson, 2004).

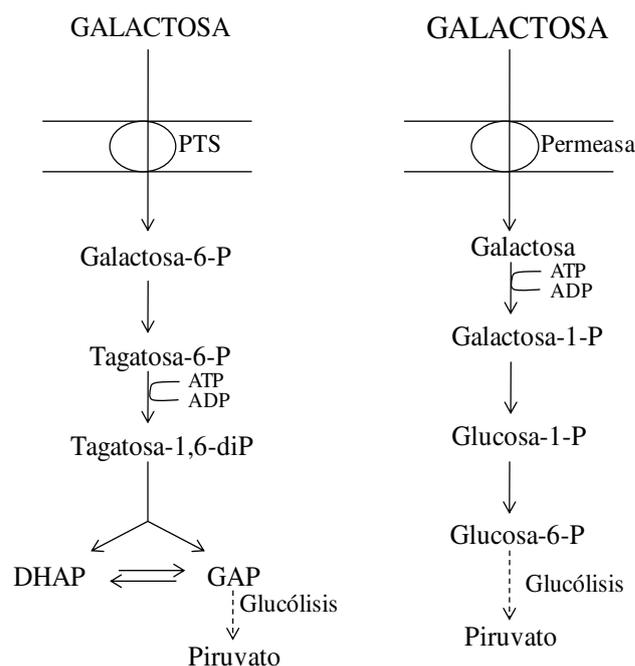


Figura 1. 2. Vías de transporte para la galactosa. Figura adaptada de Salminen y col. (2004).

1.3.2. Fermentación de disacáridos

Con respecto a los disacáridos, dependiendo de la forma de transporte, entran a la célula como azúcares libres o fosfatos de azúcares. Los disacáridos libres son hidrolizados por hidrolasas a monosacáridos que luego siguen los pasos descriptos anteriormente. Cuando

participa el sistema PTS, las fosfohidrolasas dividen a los fosfatos de disacáridos en monosacáridos libres y fosfatos de monosacáridos.

La lactosa es uno de los disacáridos más metabolizados por las BAL (Thompson, 1988). La mayoría de las cepas de *Lactococcus lactis* poseen un sistema PTS para lactosa, que entra al citoplasma como lactosa-fosfato y es hidrolizada por fosfo- β -D-galactosidasa para producir glucosa y galactosa-6-fosfato. La glucosa es fosforilada por una glucoquinasa y metabolizada por la vía glucolítica, mientras que la galactosa-6-fosfato es metabolizada a través de la vía tagatosa-6-fosfato (Kandler, 1983; Lawrence y Thomas, 1979). Otra forma de fermentar lactosa usada comúnmente por las BAL implica un *carrier* para este disacárido (permeasa). Luego es hidrolizada por una β -galactosidasa para producir glucosa y galactosa, que seguirán luego las demás vías (Bhowmik y Marth, 1990; Premi y col., 1972).

Algunas cepas termofílicas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* y *L. acidophilus* sólo metabolizan la glucosa luego de que la lactosa es transportada e hidrolizada por la β -galactosidasa, mientras que la galactosa es excretada al medio (Hickey y col., 1986; Hutkins y Morris, 1987).

La fermentación de maltosa parece llevarse a cabo mediante un sistema de permeasa para su transporte. En *Lc. lactis* 65.1 la maltosa luego es dividida por una maltosa fosforilasa para producir glucosa, que sigue la vía de la glucólisis, y β -glucosa-1-fosfato, que podría ser un precursor de la síntesis de la pared celular (Sjöberg y Hahn-Hägerdal, 1989).

Por otro lado, la fermentación de sacarosa es mediada por un sistema de permeasa y se inicia con la hidrólisis por una sacarosa hidrolasa para producir glucosa y fructosa, que siguen las vías principales. En algunos lactococos la sacarosa es transportada por un sistema PTS y una sacarosa-6-fosfato-hidrolasa hidroliza a la sacarosa-6-fosfato a glucosa-6-fosfato y fructosa. Este sistema es inducido por la presencia de sacarosa en el medio. A su vez, la sacarosa podría aportar monosacáridos para la síntesis de exopolisacáridos (EPS) en algunas BAL (Thompson y Chassy, 1981).

La fermentación de otros disacáridos, como celobiosa, malibiosa y trehalosa no ha sido estudiada extensamente, y la capacidad para fermentar estos azúcares difiere entre especies (Axelsson, 2004).

1.3.3. Categorías de BAL según su metabolismo

Dentro de las BAL, se pueden describir 3 categorías según Axelsson (2004). La primera categoría incluye al grupo I del género *Lactobacillus* y algunas especies de otros géneros, como *Pediococcus damnosus* (Driehuis y Oude Elferink, 2000), que son homofermentativas

obligadas, es decir que sólo metabolizan azúcares vía glucólisis. La segunda incluye *Leuconostoc*, el grupo III de *Lactobacillus*, *Oenococcus* y *Weisella*, que son heterofermentativas obligadas, por lo que la vía 6-PG/PK es la única disponible para la fermentación de azúcares. El resto de las BAL está incluido en la tercera categoría (grupo II de *Lactobacillus* y la mayoría de las especies de *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*). Estas bacterias son homofermentativas con hexosas y heterofermentativas con las pentosas y otros sustratos, por lo que se las denomina heterofermentativas facultativas. *Carnobacterium* es un género cuya clasificación no es del todo clara, pero se las puede considerar dentro de la tercera categoría.

1.4. Bifidobacterias: generalidades

Las bifidobacterias son microorganismos Gram-positivos, heterofermentativos, no móviles y no formadoras de esporos. Debido a que producen ácido láctico como uno de los principales productos finales de fermentación, muchas veces se las incluye dentro del grupo de BAL aunque sean filogenéticamente distintas, y no son estrictamente miembros de este grupo, sino que pertenecen al de las bacterias Gram-positivas con alto contenido G+C (desde 42 a 67%) (Biavati y col., 2001). La familia *Bifidobacteriaceae* incluye a los géneros *Gardnerella* y *Bifidobacterium*, y pertenece al filo de *Actinobacteria*. El grupo “humano” de especies de bifidobacterias comprende principalmente a aquellas que fueron aisladas del intestino o heces de adultos e infantes e incluye *B. pseudocatenulatum*, *B. catenulatum*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *B. angulatum* y *B. dentium* (Ventura y col., 2004). Como la mayoría de las bacterias intestinales, son sacarolíticas y se cree que juegan un papel muy importante en la fermentación de carbohidratos en el colon. Se ha demostrado que las bifidobacterias pueden fermentar fuentes de carbono complejas, tales como xilo-oligosacáridos, transgalactooligosacáridos, oligosacáridos de soja, malto-oligosacáridos, fructo-oligosacáridos, pectinas y otros oligosacáridos derivados de plantas. Su capacidad de metabolizar carbohidratos particulares depende no sólo de la especie, sino también de la cepa (de Vrese y Schrezenmeir, 2008).

En general, las bacterias intestinales degradan carbohidratos poliméricos a oligosacáridos de bajo peso molecular, que pueden ser luego degradados a monosacáridos mediante el uso de una amplia variedad de enzimas. En el caso de las bifidobacterias, estos monosacáridos se convierten en intermediarios de la vía de fermentación de hexosas, llamada “vía bifido” o en inglés, “*bifido shunt*” (de Vries y Stouthamer, 1967; Scardovi y col., 1984). Finalmente, los azúcares son convertidos a ácidos grasos de cadena corta (SCFA, *Short Chain*

Fatty Acid, por sus siglas en inglés) y otros compuestos orgánicos, algunos de los cuales pueden ser beneficiosos para el hospedador. Los SCFA altos en contenido calórico, por ejemplo, son adsorbidos en los colonocitos y hepatocitos, donde son metabolizados y usados como fuente de energía. Además, los SCFA estimulan la adsorción de sodio y agua en el colon y son conocidos por su capacidad de inducir enzimas que promueven la restitución de las mucosas (D'Argenio y Mazzacca, 1999).

En la vía bifido, la enzima fructosa-6-fosfoetolasa juega un rol clave (de Vries y Stouthamer, 1967), y se utiliza como un marcador taxonómico de la familia *Bifidobacteriaceae* (Felis y Dellaglio, 2007). Esta enzima divide a la hexosa fosfato en eritrosa-4-fosfato y acetil fosfato (de Vries y Stouthamer, 1967; Scardovi y Trovatelli, 1965). A partir de fosfatos de tetrasas y hexosas, y a través de la acción sucesiva de transaldolasa y transcetolasa, se forman pentosas fosfatos que, mediante la ruptura 2-3 dan lugar a ácido láctico y cantidades adicionales de ácido acético en una proporción teórica 1,0:1,5. La formación de ácido fórmico y etanol puede alterar el balance de la fermentación. Las distintas especies producen cantidades variables de acetato, lactato, etanol y formiato bajo las mismas condiciones.

Se requieren enzimas adicionales para dirigir a los carbohidratos derivados de la dieta y el hospedador a la vía bifido, permitiendo a las bifidobacterias producir más energía en forma de ATP que la obtenida en vías fermentativas de, por ejemplo, las BAL. La vía de bifidobacterias produce 2,5 moles de ATP a partir de 1 mol de glucosa fermentada, como así también 1,5 mol de acetato y 1 mol de lactato (Palframan y col., 2003). La relación de lactato y acetato formados por bifidobacterias puede variar dependiendo de la fuente carbonada utilizada y de la especie (Palframan y col., 2003). La mayoría de las especies puede utilizar ribosa, galactosa, fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa, melibiosa y rafinosa, pero generalmente no pueden fermentar L-arabinosa, ramnosa, N-acetilglucosamina, sorbitol, melecitosa, trehalosa, glicerol, xilitol e inulina. Se estima que sólo una minoría de azúcares utilizados por bifidobacterias ingresan a la célula vía PEP-PTS (Degnan y Macfarlane, 1993; Maze y col., 2007), mientras que la entrada de azúcares más complejos posiblemente es facilitada a través de transportadores ABC específicos (Schell y col., 2002). Luego del ingreso de los carbohidratos a la célula, son hidrolizados, fosforilados, desacetilados y/o transglicosilados por diferentes enzimas intracelulares (van den Broek y col., 2008; Ventura y col., 2009).

La capacidad de la microflora intestinal para degradar carbohidratos complejos no digeribles por el hospedador se ha establecido claramente. Estos carbohidratos complejos pueden ser compuestos dietéticos (tales como almidones resistentes, celulosa, hemicelulosa, glucógeno, galactano, xilano, pululano, pectinas y gomas), compuestos derivados del

hospedador (tales como mucina, glucosfingolípidos, sulfato de condroitina, ácido hialurónico y heparina) (Hooper y col., 2002), o fuentes carbonadas producidas por otros miembros de la microbiota intestinal (Korakli y col., 2002). Se supone que la cantidad y naturaleza de los carbohidratos no digeribles de la dieta tendría impacto directo en la actividad metabólica, número y composición de la microbiota gastrointestinal (Walker y col., 2006). El contenido de genes de bifidobacterias parece reflejar su adaptación al medio gastrointestinal humano, ya que contienen genes que codifican una variedad de enzimas modificadoras de carbohidratos, como glicosil-hidrolasas, transportadores de azúcares ABC, permeasas, componentes del sistema PEP-PTS, todos ellos requeridos para el metabolismo de carbohidratos derivados de plantas y del hospedador (Barrangou y col., 2009; Kim y col., 2009; Lee y col., 2008; Schell y col., 2002). Se ha visto que cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* que son explotadas industrialmente presentan una reducción en su genoma de genes relacionados al metabolismo de azúcares, en comparación con cepas de *B. longum*, por ejemplo. Esta evolución genómica es consecuencia de cultivar dichas cepas constantemente bajo condiciones artificiales durante las fermentaciones industriales (Lee y col., 2008). *B. longum* subsp. *infantis* ATCC15697 es una cepa que ejemplifica la adaptación de las bifidobacterias al nicho en el que se encuentran. La cepa fue aislada a partir de heces de infantes, y presenta un *cluster* genético de 43 kb responsable del transporte y utilización de oligosacáridos no digeribles provenientes de leche materna (Sela y col., 2008). Cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* y *B. breve* UCC2003, no presentan genes para la degradación de estos oligosacáridos, pero en cambio son capaces de degradar oligosacáridos complejos derivados de plantas (Pokusaeva y col., 2009).

1.5. Exopolisacáridos (EPS) producidos por BAL

Muchas BAL son capaces de producir polímeros exocelulares o exopolisacáridos (EPS), que pueden ser excretados al medio o permanecer fuertemente unidos a la pared celular (EPS capsulares o CPS). Para algunas bacterias, la capacidad de producir EPS es inestable, y esto se ha atribuido a que suele estar codificada en plásmidos, especialmente en BAL mesófilas (Neve y col., 1988; Vedamuthu y Neville, 1986). A su vez, estos polímeros pueden estar formados por un solo tipo de monosacárido (homopolisacáridos, HoPS), o bien pueden presentar más de un tipo de monosacárido en su composición (heteropolisacáridos, HePS).

Existen dos fenotipos de cepas productoras de EPS: el fenotipo *ropy* que se caracteriza por formar un filamento largo cuando se toca la colonia con un ansa de siembra y se levanta lentamente, adensando el medio cuando se desarrolla en caldo o leche; y el fenotipo mucoide

que aparece como colonias brillantes y suaves en las placas de agar (Dierksen y col., 1997; Rühmann, y col., 2015).

Según su estructura, los HoPS se clasifican en 4 grupos: α -D-glucanos (monómeros de D-glucosa unidos por enlaces α , como dextranos, mutanos, alternanos y reuteranos producidos por *Leuconostoc dextranicum*, *Leuc. mesenteroides*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. parabuchneri*, *L. reuteri*, *L. sakei*, *S. downei*, *S. gordonii*, *S. mutans*, *S. sanguis* y *S. sobrinus*); β -D-glucanos (monómeros de D-glucosa unidos por enlaces β , producidos por *L. brevis*, *L. diolivorans*, *P. damnosus*, *P. parvulus*, *Streptococcus* spp., y *O. oeni*); β -D-fructanos (monómeros de D-fructosa unidos por enlaces β , como levanos y fructanos tipo inulina producidos por *Leuc. citreum*, *L. frumenti*, *L. panis*, *L. pontis*, *L. reuteri*, *L. sanfranciscensis*, *Leuc. mesenteroides*, *S. criceti*, *S. ratti*, *S. salivarius*, *S. mutans*, y *Weisella confusa*); y poligalactanos (monómeros de galactosa, producidos por *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lc. lactis* subsp. *lactis*). Los HoPS generalmente se caracterizan por elevados PM (mayores a 10^4 kDa), diversos grados de ramificación, uniones y largo de cadenas (Ruas-Madiedo y col., 2002; Ruas-Madiedo y col., 2008), y presentan rendimientos elevados, en comparación con los HePS de BAL. Por ejemplo, una cepa de *L. reuteri* puede producir 10 g/L de dos tipos de homopolisacáridos (Van Geel-Schutten y col., 1999).

Los HePS, por su parte, se componen por un esqueleto de subunidades repetitivas, ramificadas o no, que consisten de 3 a 8 monosacáridos, derivados de monosacáridos o monosacáridos sustituidos. Principalmente, están integrados por D-galactosa, D-glucosa y L-ramnosa, en diferentes proporciones. En ciertos casos menos frecuentes están presentes ribosa, fucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácido urónico y otras moléculas de diferente naturaleza, como fosfato, acetato y glicerol. En general, estas unidades se caracterizan por tener una estructura de monosacáridos central con cadenas laterales, presentándose múltiples combinaciones. Su peso molecular es variable, oscilando entre 10 y 10^3 kDa (Ruas-Madiedo y col., 2002). El rendimiento de HePS de BAL es bajo, generalmente inferior a 1 g/L, viéndose significativamente afectado por las condiciones de fermentación (temperatura, tiempo, pH, medio de cultivo, fuente de carbono, etc.). No obstante, la mayor parte de las BAL produce HePS, con una gran diversidad en cuanto a su PM, estructura, composición y funcionalidad (Mozzi y col., 2006) e incluso, resulta muy frecuente la síntesis simultánea de más de un HePS, que se pone en evidencia, por ejemplo, por cromatografía de exclusión molecular (Torino y col., 2015).

El rendimiento en la producción de EPS de distintas BAL puede variar desde 0,045 a 0,35 g/L cuando crecen en condiciones no optimizadas y, al optimizarlas, se puede alcanzar un

rendimiento que varía desde 0,15 a 0,6 g/L o mayor, dependiendo de la cepa en estudio (De Vuyst y Degeest, 1999b). Su producción depende fuertemente de las condiciones de desarrollo bacteriano (composición del medio de cultivo, temperatura, pH, fuentes de C y N, etc.) y del método de extracción aplicado (De Vuyst y Degeest, 1999b; Torino y col., 2000, 2015), por lo que suele dificultarse la comparación de rendimientos entre diversas cepas. Esos rendimientos son limitados en comparación a la producción de polímeros de otras bacterias, como el xantano (10-25 g/L) producido por *Xanthomonas campestris*, que es uno de los polímeros de origen microbiano comerciales más ampliamente utilizado (Becker y col., 1998).

1.5.1. Biosíntesis de EPS y *clusters* genéticos en BAL

Con respecto a la biosíntesis de EPS, las BAL utilizan enzimas del tipo sacarosas para convertir sacarosa en HoPS, que consisten en unidades de glucosa (glucanos) o fructosa (fructanos), participando las enzimas glucan-sacarosas (GS) o fructan-sacarosas (FS), respectivamente. Ambas enzimas, presentes en la superficie celular, son glucósido hidrolasas que actúan sobre el mismo sustrato (sacarosa) y catalizan reacciones de transglicosilación a nivel extracelular que resultan en la formación del polisacárido. Sus estructuras proteicas son muy distintas, las GS son proteínas con numerosos dominios que pertenecen exclusivamente a las BAL, y sintetizan α -glucanos que difieren en su tipo de unión glicosídica, grado y tipo de ramificaciones, masa molecular y solubilidad. Por otro lado, las FS están presentes en bacterias Gram positivas y negativas, y sintetizan β -fructanos con enlaces $\beta(2,6)$ (inulina) o $\beta(2,1)$ (levano) (van Hijum y col., 2006). El proceso requiere de sacarosa como sustrato y la energía proviene de su hidrólisis.

Como la biosíntesis de HoPS sólo requiere una enzima sacarasa, las BAL que producen este tipo de EPS necesitan un solo gen codificante para la enzima apropiada (Korakli y col., 2006; van Hijum y col., 2006). Estos polímeros no se sintetizan a partir de monosacáridos activados mediante la actividad de glicosiltransferasas, sino que las transglicosilasas (sacarosas) son capaces de utilizar la energía del enlace glucosídico para catalizar la transferencia del residuo glucosídico al glucano o fructano en formación (Monsan y col., 2001). Además de la síntesis de HoPS de alto PM, las sacarosas pueden catalizar la síntesis de gluco- o fructo-oligosacáridos cuando está presente alguna molécula aceptora eficiente, como la maltosa junto a la sacarosa (Koepsell y col., 1952).

En cambio, la biosíntesis de los HePS difiere de la correspondiente a los HoPS en que las unidades repetitivas del precursor se forman intracelularmente (en el citoplasma), involucrando varias enzimas para la producción de precursores nucleótidos del azúcar: una

glicosil 1-fosfato transferasa (*priming* glicosiltransferasa) que trasfiere la primer molécula de azúcar a un *carrier* lipídico fosforilado, y una o más glicosiltransferasas que agregan secuencialmente azúcares a la cadena en crecimiento, y proteínas adicionales que participan en la regulación de los genes involucrados, traslocación de membrana de las unidades repetitivas, y determinación del largo y grado de polimerización de la cadena.

Los determinantes genéticos (genes *eps*) de la síntesis de HePS, de codificación plasmídica o cromosómica, se organizan generalmente en *clusters* muy conservados con respecto a su organización y secuencia. Dichos *clusters* se caracterizan por presentar 4 regiones funcionales: la primera incluye los genes de regulación de la producción de EPS; la segunda codifica para proteínas involucradas en la determinación de la longitud de la cadena/polimerización; la tercera contiene los genes que codifican para las enzimas glicosiltransferasas específicas para la síntesis de las unidades repetitivas; y la cuarta incluye los genes involucrados en la polimerización y exportación de las unidades repetitivas. (Laws y Marshall, 2001a; Welman y Maddox, 2003). De este modo, en la síntesis de HePS (a diferencia de lo que ocurre con los HoPS) las unidades repetitivas precursoras se forman intracelularmente y un *carrier* lipídico glicosil isoprenoide está involucrado en el proceso (Cerning, 1990). Las unidades repetitivas son translocadas a través de la membrana y polimerizadas extracelularmente.

Dichos *clusters* genéticos específicos se localizan principalmente en el cromosoma bacteriano, como es el caso de *S. thermophilus* o *L. plantarum* (De Vuyst y Degeest, 1999b; Siezen y col., 2010; Stingele y Neeser, 1996). En especies mesófilas, como *Lc. lactis* y *P. damnsosus* suelen estar codificados en plásmidos (van Kranenburg y col., 1997; van Kranenburg y col., 1999). Se arreglan generalmente en operones con todos los genes orientados en la misma dirección, permitiendo la transcripción de una sola molécula de ARNm (Jolly y Stingele, 2001; Lebeer y col., 2008) y son altamente conservados en lactobacilos (Lebeer y col., 2008). Por el contrario, los *clusters* descritos para *Bifidobacterium* no presentan esta organización estructural conservada y existe una amplia variabilidad inter- e intra-especie (Ruas-Madiedo y col., 2012). Fanning y col. (2012) describieron la presencia de un *locus* relacionado a la síntesis de EPS de la cepa *B. breve* UCC2003, que comprendía una región de 25,6 kb con 20 genes relacionados a la síntesis de EPS y dos secuencias codificantes para transposasas. La mayoría de los genes se ubicaban en dos operones distintos, adyacentes pero orientados de manera opuesta entre sí.

Para la biosíntesis de HePS, la obtención de azúcares a partir del ambiente es un proceso activo que incluye complejos proteicos transportadores, tales como el sistema PEP-PTS

(Postma y col., 1993). Durante el transporte transmembrana PEP-PTS, las moléculas de azúcar libres son fosforiladas a azúcares-6-fosfato, que luego son convertidas a azúcares-1-fosfato mediante enzimas con actividad fosfomutasa (Welman y Maddox, 2003). Alternativamente, las moléculas de azúcar pueden ingresar a la bacteria en estado fosforilado, que continúa la vía de biosíntesis (Torino y col., 2005). Los nucleótidos de azúcar activados, como uridina difosfato (UDP)-glucosa, UDP-galactosa y timidina difosfato (dTDP)-ramnosa se forman a partir de los azúcares-1-fosfato (Boels y col., 2001) y se unen a un *carrier* lipídico fosforilado (como el undecaprenil-fosfato) ubicado en la cara citoplasmática de la pared celular mediante actividad enzimática de una glicosiltransferasa cebadora o *priming glycosyltransferase* asociada a la membrana. Luego de esa unión, una serie de glicosiltransferasas adicionales catalizan la síntesis de la unidad repetitiva del EPS, la cual es transportada a la superficie externa de la membrana bacteriana por acción de una enzima flipasa. Una vez que está en el exterior, la unidad repetitiva de EPS es polimerizada y el largo de la cadena parece estar regulado por una enzima fosfatasa que hidroliza el ancla lipídico difosfato de la membrana (Figura 1.3). Se debe destacar que esta vía de biosíntesis fue propuesta por Leeber y col. (2009) basándose en el *cluster* genético de *L. rhamnosus* GG y su homología con el modelo de biosíntesis de polisacáridos capsulares previamente caracterizado en cepas de *S. pneumoniae* (Bentley y col., 2006). Además, este mismo modelo se propuso para bifidobacterias (Hidalgo-Cantabrana y col., 2014b).

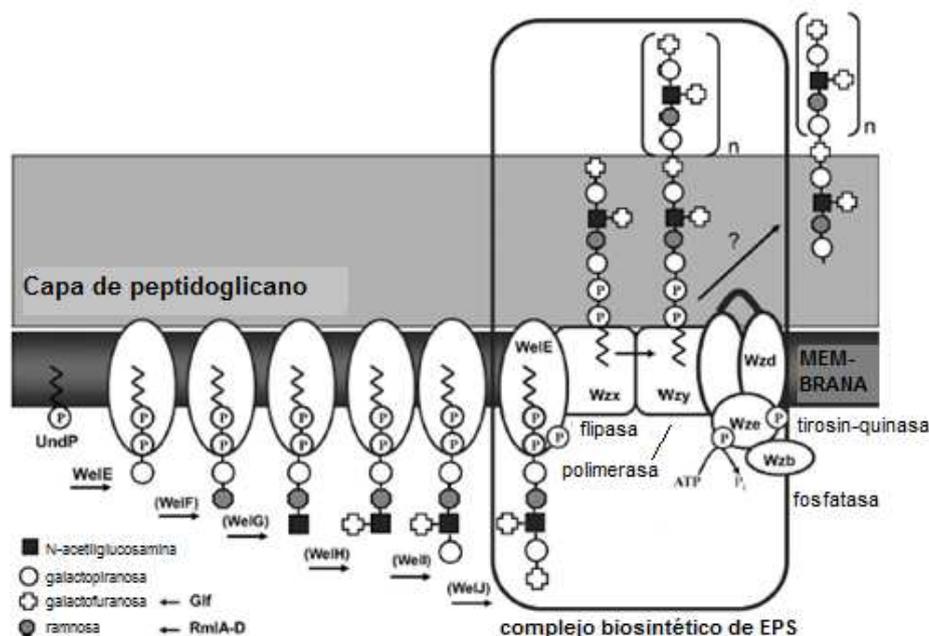


Figura 1. 3. Vía de síntesis de EPS para *L. rhamnosus* GG. Imagen adaptada de Lebeer y col. (2009). WelE: *priming glycosyltransferase*; WelF-J: glicosiltransferasas.

1.5.2. Caracterización fisicoquímica

Las propiedades físicas y reológicas de los EPS en solución están estrechamente relacionadas a su estructura tridimensional y su capacidad para formar asociaciones intermoleculares. Las estructuras de las unidades repetitivas de HePS de BAL fueron analizadas mediante hidrólisis ácida, análisis de metilación, oxidación con peryodato, acetólisis, digestión enzimática, RMN, etc. Su tamaño varía, en general, desde disacáridos a heptasacáridos (Ruas-Madiedo y de los Reyes-Gavilán, 2005), con PM en el rango de $10-10^4$ kDa.

Debido a que los EPS producidos por BAL varían en composición, carga, arreglo espacial, rigidez y en su habilidad de interactuar con otras moléculas, es de esperar que no exista una correlación directa entre la concentración de EPS y las viscosidades aparentes de los productos a los que se los adicionan. Sin embargo, se han establecido algunas relaciones entre estructura y propiedades reológicas. Una elevada viscosidad está relacionada con EPS de masa molecular elevada (mayor a 10^3 kDa) y cadenas relativamente rígidas (Jolly y col., 2002). En este sentido, Hamet y col. (2015) relacionaron el alto PM de EPS producidos en leche por 5 cepas de *L. paracasei* aisladas de kefir con las elevadas viscosidades obtenidas en los geles. Se ha encontrado también una conexión entre los tipos de enlaces de los HePs con su rigidez, los enlaces $\beta(1,4)$ resultan en cadenas más rígidas que los enlaces $\alpha(1,4)$ o $\beta(1,3)$, siendo los enlaces β aquellos que otorgan más rigidez a la cadena en comparación con los enlaces α (De Vuyst y De Vin, 2007). Las cadenas laterales también pueden afectar la rigidez y, por ende, aumentar la eficiencia como espesantes. Tuinier y col. (2001) encontraron que, al remover los residuos de cadenas laterales de EPS producidos por *Lc. lactis* subsp. *cremoris* B39 y B891, presentaron una menor rigidez, por lo que su eficiencia espesante disminuyó. Sin embargo, al remover los grupos acetilos no se afectó la rigidez de la cadena.

Con respecto a la carga, van den Berg y col. (1995) estudiaron un EPS de *L. sake* que presentaba una fuerte carga negativa. Cuando se disolvía en agua pura, el volumen hidrodinámico y, por ende la viscosidad intrínseca, eran elevados, lo cual se debe a la repulsión intramolecular entre las moléculas de polisacáridos. Observaron que al agregar NaCl, estos efectos de repulsión disminuían, lo cual llevaba a un menor volumen hidrodinámico, reduciendo la viscosidad intrínseca de la solución. Esto remarca la importancia de conocer la carga del polisacárido, ya que permite predecir el tipo de interacciones entre la molécula y la matriz alimentaria en la que se utilice, y saber si las características fisicoquímicas de esta matriz (pH, fuerza iónica, composición), junto con aquellas propias del EPS, contribuyen a obtener los efectos buscados en el producto final.

El modelado molecular es una herramienta importante para comprender la relación entre estructura y las propiedades macroscópicas de los EPS y sus interacciones con otras moléculas. En algunos trabajos se ha utilizado microscopía electrónica para estudiar las interacciones entre los EPS y los componentes presentes en alimentos, y se han observado, por ejemplo, efectos de depleción entre los EPS y las micelas de caseína del yogur (Hassan y col., 2003), lo cual trae aparejado una mejora en la retención de agua, disminuyendo la sinéresis y aumentando la consistencia. Una vez conocida la relación entre estructura y propiedades tecnológicas de estos polisacáridos, podrían desarrollarse EPS con las características buscadas mediante ingeniería molecular o modificando las condiciones de cultivo, por ejemplo.

De este modo, es necesario destacar que no todos los EPS producidos por bacterias lácticas son capaces de incrementar la viscosidad o de mejorar la textura y estructura de los productos lácteos fermentados en los que se encuentran. Esta capacidad depende, como se dijo anteriormente, de las características físicoquímicas del EPS (composición química, estructura y tamaño) las cuales, a su vez, determinan el comportamiento de estos polímeros en solución acuosa (en el caso que nos ocupa, la leche tiene de media un 85% de agua) y su capacidad para interactuar con otros componentes de la leche (principalmente la caseína, que es la proteína láctea mayoritaria).

1.5.3. Solubilidad en agua

Varios trabajos indican que los EPS producidos por BAL en general son solubles en agua, propiedad que es conveniente para su potencial aplicación en alimentos. En el trabajo de Piermaria y col. (2009) se evaluó la solubilidad de films de kefiran, observando que la solubilidad en agua aumentaba significativamente con la temperatura, y a 100°C se solubilizaban completamente. Además, el agregado de glicerol aumentaba la solubilidad de estos films a 25°C. El kefiran es un exopolisacárido producido por *L. kefiranofaciens*, al que se le adjudican propiedades beneficiosas para la salud y se encuentra naturalmente presente en el kefir, una bebida fermentada por acción de la microbiota presente en los granos de kefir, muy popular en Europa oriental. La unidad repetitiva de este heteropolisacárido consiste en hepta o hexasacáridos ramificados, con proporciones aproximadamente iguales de D-glucosa y D-galactosa. En un trabajo informaron la producción de kefiran en un medio con base de hidrolizado de arroz, comprobándose que la composición es idéntica a la informada para este polímero por otros autores, con una masa molecular de $7,6 \times 10^5$ g/mol y un radio Z de giro igual a 39,9 nm (Maeda y col., 2004b). Miao y col., (2015) aislaron un EPS soluble en agua a partir de una cepa de *L. reuteri*, que consiste en D-glucano con una masa molecular de $2,50 \times 10^7$

g/mol, y es capaz de aumentar la viscosidad de la solución cuando es usado en una concentración entre 3- 20% (m/v), siendo la viscosidad elevada pero la solubilidad muy baja cuando la concentración supera el 20%. En otro trabajo se estudió un exopolisacárido producido por una cepa de *Leuconostoc* aislada de vegetales en conserva (Miao y col., 2014). Resultó ser un polisacárido de glucosa, soluble en agua, con una masa molecular de $4,62 \times 10^4$ kDa y compuesto por enlaces $\alpha(1,3)$ y $\alpha(1,6)$, con unidades de D-glucopiranosas unidas. La relación de los enlaces era de 5:4, de $\alpha(1,6)$ y $\alpha(1,3)$, respectivamente.

1.5.4. Posibles funciones de EPS bacterianos

Diversas hipótesis consideran que los EPS bacterianos no son usados como fuente de energía por el microorganismo que los produce, ya que la mayoría de las bacterias carecen de los genes involucrados en la degradación del propio EPS que sintetizan (Badel y col., 2011). Sin embargo, especies como *S. mutans* y *S. sobrinus* pueden degradar sus propios dextranos por la acción de una dextranasa, y *S. mutans* puede utilizar oligosacáridos como fuente de nutrientes (Colby y Russell, 1997).

El rol fisiológico de estos polímeros no está claramente establecido y probablemente sea muy complejo. Sin embargo, dada la gran cantidad de energía implicada en su síntesis, seguramente sean responsables de conferir importantes ventajas a los microorganismos que los producen, como puede ser una mejor adaptación a sus nichos ecológicos relacionada con la adhesión celular. Así, existen diferentes hipótesis que atribuyen a los EPS una función de protección de la célula, por ejemplo, frente a la desecación, la fagocitosis y la depredación por parte de protozoos, al ataque de fagos, a la presencia antibióticos o compuestos tóxicos o estrés osmótico. También se considera que juegan un rol en el reconocimiento celular, adhesión a superficies y formación de biofilms, facilitando la colonización en varios ecosistemas (Looijesteijn y col., 2001). Por ejemplo, los EPS producidos por *S. salivarius* y *S. mutans* (habitantes de la cavidad bucal) están implicados en la formación de la placa dentaria (Cerning, 1990). Asimismo, se demostró que el EPS producido por *Lc. lactis* subsp. *cremoris* NZ4010 protege a la bacteria frente a varios factores antimicrobianos como son los bacteriófagos, iones metálicos, nisina y lisozima (Looijesteijn y col., 2001).

1.5.5. Aplicaciones industriales

Los EPS derivados de BAL han recibido una notable atención por sus propiedades tecnológicas, ya que pueden mejorar la reología (viscosidad y elasticidad) de alimentos fermentados actuando como espesantes, agentes gelificantes y estabilizantes, uniendo agua y

limitando la sinéresis (De Vuyst y Degeest, 1999a; Duboc y Mollet, 2001). La aplicación exitosa de los EPS en la elaboración de leches fermentadas depende de su capacidad para unir agua, interaccionar con proteínas (caseína, principalmente) e incrementar la viscosidad de la fase de suero (Ruijsenaars y col., 2000). Por estas razones, las BAL productoras de EPS son microorganismos de gran interés industrial, ya que pueden aplicarse con una doble acción: como *starters*, en el caso de aquellas especies bacterianas acidificantes y, simultáneamente, como espesantes naturales, debido a la producción de EPS *in situ* durante la fermentación, mejorando la textura de yogures, quesos y productos a base de cereales (Amatayakul y col., 2006a; Badel y col., 2011; Hassan y col., 2003; Hassan y col., 2005; Jolly y col., 2002). Como ya se mencionó anteriormente, su rendimiento es bajo (Ruas-Madiedo y col., 2002), por lo que la aplicación de los EPS de BAL como ingrediente alimentario no ha sido reportada aún a nivel industrial. Asimismo, en los últimos años se estudiaron y aplicaron de forma exitosa cepas productoras de HePS en la elaboración de queso con bajo contenido graso (Di Cagno y col., 2014; Ryan y col., 2015a; Zisu y Shah, 2005). De esta forma el EPS producido *in situ*, durante la etapa de coagulación y, posteriormente, durante la maduración del queso, actúa como un espesante natural y un sustituto de la grasa, obteniéndose un queso bajo en calorías con una textura y consistencia adecuadas, que suele mejorar notablemente si se los compara con quesos bajos en grasa elaborados con cepas EPS. Una ventaja adicional en estos casos es que se incrementa el rendimiento de producción, dada la capacidad de algunos de estos EPS para retener agua. Otras aplicaciones industriales se pueden ver en la Tabla 1.2.

Sin embargo, los EPS no siempre producen efectos positivos en la matriz alimentaria donde se producen, ya que en la industria de la cerveza y sidra causan efectos negativos. El primer artículo que reportó la formación de EPS por parte de BAL que deterioran el vino fue de Pasteur (1861). Posteriormente, Orla-Jensen (1943) describió la formación de EPS a partir de sacarosa por *Leuconostoc* spp. y *Pediococcus* e indicó el rol de la formación de EPS en el deterioro de sidra de manzana y cerveza. En este tipo de productos los EPS brindan una textura viscosa y gruesa, sensación aceitosa y, aunque no alteran significativamente el sabor, le otorgan al alimento un aspecto desagradable, causando pérdidas económicas importantes (Gindreau y col., 2001).

Tabla 1. 2. Aplicaciones en la industria alimentaria de exopolisacáridos y oligosacáridos de BAL. Tabla adaptada de Zaninni y col. (2015).

EPS	BAL productora de EPS	Usos	Referencias
Dextranos	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512F <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-640 <i>Leuonostoc citreum</i> NRRL B-742 <i>Leuconostoc citreum</i> NRRL B-1355 <i>Leuconostoc citreum</i> NRRLB-1299 <i>Streptococcus mutans</i> 6715 <i>Weisella cibaria</i> MG1	En productos de panadería, los dextranos mejoran la suavidad, la textura de la miga, el volumen de la barra y pueden compensar el bajo contenido en proteínas de la harina de trigo. En confitería, se pueden usar como estabilizantes para confitería ya que evitan la cristalización, mejoran la retención de humedad, y aumentan la viscosidad y sabor. Su uso también se sugiere en refrescos, bebidas de leche y composiciones heladas. En el helado, se pueden usar como estabilizantes (2-4%) confiriendo propiedades beneficiosas a la viscosidad. En los alimentos congelados y secos, pueden usarse para la estabilización del vacío, secado al aire y liofilizado o alimentos congelados (productos de pescado, carne, verduras, y queso). Los dextranos también pueden usarse como revestimiento para proteger los alimentos de la oxidación y otros cambios químicos y también ayudan a la textura y sabor. En bebidas no alcohólicas a base de mosto, pueden proporcionar propiedades texturales deseables.	(William y Joseph 1959, McCurdy y col., 1994, Vandamme y col., 2002, Naessens y col., 2005, Bounaix y col., 2010, Zannini y col., 2013)
Levanos	<i>Streptococcus salivarius</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL, B-512 F <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> LTH 2590 <i>Lactobacillus reuteri</i> LB 121	Los levanos pueden ser utilizados como una fuente de di-fructofuranos, fructosa y fructooligosacáridos, como estabilizantes, emulsionantes, coadyuvantes de formulación, agentes de acabado superficial, agentes encapsulantes, portadores de sabores, color y fragancias, y como sustitutos de la grasa. En los productos de panadería, los levanos se pueden utilizar como mejoradores de pan, según su capacidad para aumentar el volumen, y mejorar la textura y el sabor de los panes.	(Han, 1990, Vijn y Smeekens, 1999, Song y col., 2000, Jang y col., 2001, Vincent y col., 2005, Van Geel-Schutten, 2006, Park, 2007)
Kefiran	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	Se utiliza en el Kefir (leche fermentada tradicional de Europa Oriental ligeramente alcohólica). El kefiran es el "pegamento" de los granos y confiere una textura fangosa al producto aumentando el enlace del agua y reduciendo al mismo tiempo el flujo de agua en el espacio matricial.	(Cheirsilp y col., 2018, Duboc y Mollet, 2001)
Inulinas	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533 <i>Streptococcus mutans</i> JC2 <i>Leuconostoc citreum</i> CW28 <i>Lactobacillus reuteri</i> 121	Las inulinas pueden usarse como prebióticos, como sustitutos del azúcar (especialmente en combinación con edulcorantes de alta intensidad), como sustitutos de la grasa y modificadores de la textura en productos lácteos bajos en grasas mejorando la sensación bucal. Especialmente, la adición de inulinas de cadena larga a yogures bajos en grasas dio como resultado una cremosidad mejorada. Este efecto también se produce en queso bajo en grasas, en helado de yogur, mousse de chocolate, y en crema.	(Koca y Metin, 2004, Guven y col., 2005, Hennesly y col., 2006, Kip y col., 2006, Tárrega y Costell, 2006, Cardarelli y col., 2008, Paseephol y col., 2008, Guggisberg y col., 2009)

1.5.6. Beneficios para la salud

Además de sus beneficios tecnológicos, algunos EPS producidos por BAL han demostrado efectos fisiológicos positivos en la salud del consumidor, como puede verse resumidamente en la Figura 1.4 (Duboc y Mollet, 2001; Ruas-Madiedo y col., 2002). Los EPS se han relacionado con actividades antitumorales, inmunomoduladoras, prevención de úlceras y capacidad de reducir el colesterol (Ruas-Madiedo y col., 2002). Un beneficio indirecto es la generación de ácidos grasos de cadena corta (SCFA por su sigla en inglés, *Short Chain Fatty Acids*), provenientes de su degradación en el intestino por parte de la microflora del colon, poniendo en evidencia el potencial rol prebiótico de estas moléculas. Los SCFA comprenden mayoritariamente butirato, acetato y propionato. Muchos de estos ácidos grasos parecen estar involucrados en la prevención de cáncer de colon (Duboc y Mollet, 2001; Ruijsenaars y col., 2000) y presentan diversos efectos fisiológicos: contribuyen a modular el medio intestinal, influyen en la fisiología del colon, pueden ser utilizados como fuente de energía por los colonocitos y la microbiota intestinal, y también participan en diferentes mecanismos de señalización del huésped (Ríos-Covián y col., 2016). Otro de los beneficios asociados a los SCFA está relacionado a la disminución del pH luminal, lo cual inhibe microorganismos patógenos y aumenta la absorción de nutrientes (Macfarlane y Macfarlane, 2012). El butirato sirve como fuente de energía para las células epiteliales intestinales y aumenta la producción de mucina, mejorando su unión y por lo tanto, la barrera intestinal (Peng y col., 2009). Se ha observado una reducción en la obesidad y resistencia a la insulina en animales experimentales sometidos a una dieta rica en grasas tratados con butirato (Gao y col., 2009), sugiriendo que se promueve un cambio desde la síntesis lipídica a la oxidación de ácidos grasos (den Besten y col., 2013). El butirato promueve la motilidad del colon, reduce la inflamación, aumenta la irrigación visceral, induce la apoptosis e inhibe la progresión de células tumorales (Canani, 2011; Keku y col., 2015; Leonel y Alvarez-Leite, 2012; Zhang y col., 2010), siendo todas estas propiedades beneficiosas para la prevención de cáncer colorrectal. Además, tanto el butirato como el propionato se asociaron a la diferenciación de células-T reguladoras, favoreciendo el control de la inflamación intestinal (Donohoe y col., 2014; Louis y col., 2014), habiéndose encontrado recientemente una asociación entre los bajos niveles de bacterias productoras de estos dos ácidos grasos de cadena corta y algunas enfermedades en las que se desarrollan procesos inflamatorios (Ríos-Covián y col., 2016). El acetato, por su parte, se ha relacionado con la reducción del apetito mediante la interacción con el sistema nervioso central (Frost y col., 2014).

Asimismo, se ha investigado la capacidad de EPS para ejercer un efecto prebiótico cuando son ingeridos aisladamente o junto a bacterias probióticas (generalmente, bifidobacterias) en un alimento. Las hipótesis que sustentan dichos estudios sugieren que dicha combinación prebiótico/probiótico podría modificar beneficiosamente la microbiota intestinal, siendo los microorganismos saludables del tracto digestivo los que metabolizarían estos polímeros (prebióticos), desarrollándose a expensas de ellos. Este sería el caso de un alimento considerado “simbiótico”, en el que coexisten bacterias probióticas y prebióticos (EPS en este ejemplo) en su formulación. Cabe recordar que un prebiótico es “un sustrato que es utilizado selectivamente por los microorganismos del hospedador confiriendo un beneficio para su salud” (Gibson y col., 2017). Por su parte, los probióticos son “microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del hospedador” (FAO/WHO, 2002). En determinadas ocasiones, para bacterias probióticas productoras de EPS se ha demostrado que el exopolisacárido es el responsable del rol funcional de la bacteria (Balzaretto y col., 2017; Dilna y col., 2015; Fanning y col., 2012), lo que enfatiza la relevancia de las propiedades de estas moléculas.

Para que un polisacárido pueda ser metabolizado por la microbiota intestinal y actuar como prebiótico, debe resistir a las diferentes barreras (acidez, bilis, enzimas digestivas) del tracto digestivo. Hay evidencia indirecta que muestra que algunos HePS son resistentes al estrés gastrointestinal y podrían ejercer una función protectora a la bacteria productora en el intestino (Fanning y col., 2012; Lebeer y col., 2011; Salazar y col., 2011). Los homo y heteropolisacáridos sintetizados por BAL y bifidobacterias suelen ser resistentes a la digestión gastrointestinal, pero difieren en su susceptibilidad a ser degradados por la microbiota intestinal. Esta característica está relacionada, por un lado, a las propiedades fisicoquímicas de los biopolímeros, y por otro, al *pool* de enzimas hidrolíticas provenientes de ciertos microorganismos del intestino, capaces de hidrolizarlos y dejarlos disponibles para la microbiota intestinal.

Si bien preliminarmente, diversos estudios llevados a cabo en la década del '90 han sugerido que las BAL y los productos fermentados poseen actividad anticancerígena. Kitazawa y col. (1991) observaron que la inyección intraperitoneal de células de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* KVS 20 liofilizadas produjo una inhibición del crecimiento de tumores Sarcoma-180 en ratones. Estos autores atribuyeron el efecto antitumoral al material *slime* producido por la cepa. Por otro lado, el *starter* de yogur *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073R-1, productor de EPS, también mostró actividad antitumoral (Kitazawa y col., 1998). Los EPS extracelulares además mejoraron otras funciones inmunológicas como la proliferación de linfocitos-T (Forsén

y col., 1987) y la activación de macrófagos e inducción de citoquinas (Kitazawa y col., 1996). Estos estudios resultan muy preliminares y ningún reporte actual se refiere a tales efectos de los EPS, principalmente debido a que no existen ensayos clínicos que respalden dichas hipótesis.

Otra función adjudicada a cepas productoras de EPS es su capacidad para tratar y prevenir gastritis crónica inducida por ácido acetilsalicílico en ratones BALB/c, produciendo un aumento de células productoras de IL-10 y una disminución de células productoras de IFN- γ (Rodríguez y col., 2009; 2010). También se ha estudiado el rol inmunomodulador de bacterias productoras de EPS, por ejemplo, la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* IPLA R1 fue capaz de disminuir la citoquina proinflamatoria IL-6 e incrementar la citoquina TGF- β cuando se administró en leche, a ratas Wistar (Salazar y col., 2014).

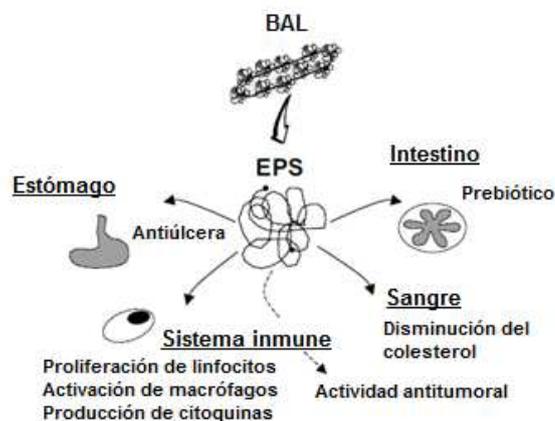


Figura 1. 4. Posibles propiedades relacionadas a la salud de los EPS producidos por BAL. Imagen adaptada de Ruas-Madiedo y col. (2002).

Capítulo 2: Selección de bacterias lácticas autóctonas productoras de EPS

2.1. Introducción

Como ya hemos mencionado, algunas BAL son capaces de producir EPS que pueden estar fuertemente asociados a la pared celular (EPS capsulares o CPS) o bien pueden ser liberados al medio, alterando las propiedades reológicas del mismo (EPS *slime*). La colección de cultivos del INLAIN cuenta con algunas cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* que han evidenciado fenotípicamente esta capacidad, mediante ensayos visuales en leche o a partir de colonias que forman un filamento viscoso al tocarlas con un ansa de siembra.

L. fermentum es una especie heterofermentativa obligada que se encuentra formando parte de la flora secundaria de distintas variedades de quesos, y que ha demostrado poseer, en el caso de algunas cepas, propiedades probióticas (Maldonado y col., 2012; Zoumpopoulou y col., 2008). Esta especie se caracteriza por usar diversas fuentes carbonadas, como arabinosa, celobiosa, galactosa, maltosa, manosa, sacarosa, rafinosa, etc., si bien esta característica es cepa-dependiente (Calasso y Gobbetti, 2011). Por esta razón *L. fermentum* puede encontrarse en hábitats muy diversos, tales como productos lácteos, vegetales fermentados, masas fermentadas y tracto intestinal de humanos y animales. En general, se asocia a fuentes vegetales, tales como granos, purés, vegetales fermentados, etc. (Hammes y Vogel, 1995).

En relación a su uso como probiótico, se han atribuido efectos antioxidantes y antimicrobianos a la cepa *L. fermentum* ME-3 (DSM 14241; Kullisaar y col., 2003), así como capacidad para prevenir las reacciones de estrés oxidativo nocivas para las células epiteliales intestinales mediante un modelo murino de infección con *Salmonella* Typhimurium, al ser administrada oralmente (Truusalu y col., 2004). Asimismo, se le atribuye cierta actividad antiaterogénica, ya que se ha observado que el consumo de leche de cabra fermentada con la cepa *L. fermentum* ME-3 mejoró la antiaterogenicidad en sujetos sanos: prolongó la resistencia de la fracción de lipoproteínas a la oxidación, redujo los niveles de lipoproteínas peroxidadas, LDL oxidado, 8-isoprostanos y la relación redox glutatión, y mejoró la actividad antioxidante total (Kullisaar y col., 2003). Por otro lado, se observó que la combinación de una cepa de *L. rhamnosus* y otra de *L. fermentum* (*L. fermentum* RC-14) redujo el riesgo de la colonización vaginal por parte de microorganismos patógenos y el de contraer infecciones en el tracto urinario, mejorando el mantenimiento de la microbiota normal (Reid y Burton, 2002; Reid y col., 2003).

Además, muchas cepas de BAL (entre ellas, algunas pertenecientes a *L. fermentum*) son capaces de producir biosurfactantes, sustancias que inhibirían la adhesión de microorganismos patógenos (Heinemann y col., 2000). Así se la relacionó con la inhibición de microorganismos patógenos como *Escherichia coli* (Ouweland y Conway, 1996) y también con la producción de

bacteriocinas (De Klerk y Smit, 1967) . Por su parte, Silvi y col. (2003) mostraron una alta prevalencia de *L. fermentum* en personas mayores de edad, por lo que los autores sugieren el uso de esta especie para diseñar alimentos funcionales apropiados para fortificar la microflora intestinal de este grupo etario.

Existen algunos trabajos sobre *L. fermentum* y su capacidad de producir EPS, enfocados en diversos aspectos como la composición del EPS producido, sus propiedades funcionales y reológicas, el rendimiento de su extracción en función de la composición del medio, entre otros. Por ejemplo, en el trabajo de Fukuda y col. (2010) se estudió la cepa *L. fermentum* TDS030603 cuando desarrolla en un medio químicamente definido suplementado con glucosa, sacarosa, galactosa o lactosa. En este caso, observaron que la composición del EPS no depende de la del medio, pero sí observaron diferencias en las distribuciones de masa molecular de las fracciones que identificaron en el extracto, que sugieren estar relacionadas con las diferencias observadas en la viscosidad, como así también en el rendimiento, según el medio utilizado. El mayor rendimiento fue obtenido en medio MRS, alcanzado 97,1 mg/L en forma purificada. Previamente, Leo y col. (2007) estudiaron el desarrollo de esta cepa en suero de quesería suplementado con nutrientes y en MRS. El rendimiento que obtuvieron luego de incubar la cepa en MRS durante 72 h a 30°C y pH libre fue de 568,6 mg/L de extracto crudo, y esta temperatura fue la óptima para la producción de EPS.

Más recientemente, Zhang y col., (2011) estudiaron la producción de EPS de *L. fermentum* F6 en leche reconstituida al 10% (m/v) suplementada con diferentes fuentes de carbono (glucosa, lactosa, galactosa y fructosa) y con concentrado de proteínas de suero (WPC), el cual aumentó la producción de EPS casi al doble. Llegaron a obtener un máximo de 44,49 mg/L cuando se suplementó el medio con glucosa al 2% (m/v) y WPC al 0,5% (m/v) a 37°C y un pH inicial de 6,5. Al igual que para *L. fermentum* TDS030603 (Fukuda y col., 2010), el EPS producido estuvo compuesto por glucosa y galactosa, y presentó una masa molecular de $3,54 \times 10^3$ kDa, además de una alta viscosidad en agua.

Yadav y col. (2011) caracterizaron el EPS producido por una cepa de esta especie aislada de materia fecal humana, *L. fermentum* CFR 2195, resultando ramnosa (94%), rafinosa (3,6%) y maltosa (2,5%) los monosacáridos que lo constituyen.

Con respecto a la especie *L. helveticus*, su metabolismo es homofermentativo y se utiliza ampliamente como cultivo primario en la producción de diversos quesos debido a su capacidad acidificante. Esta especie es tradicionalmente usada para la elaboración de quesos tipo suizo y quesos italianos de largo período de maduración como el Gruyere, Grana, Emmental, Padano, Parmigiano Reggiano, y es la especie que predomina en cultivos lácticos iniciadores utilizados

para la producción de quesos italianos típicos (Gatti y col., 2004; Giraffa, 2014). Una importante proporción de cepas de esta especie posee una elevada actividad proteolítica (cepas “rápidas”), resultando las más interesantes para fines industriales (Reinheimer y col., 1996). En los últimos años, ha surgido un gran interés en aquellas cepas con fenotipo *ropy* para la elaboración de queso Mozzarella reducido en contenido de grasa y quesos similares, ya que el EPS sintetizado mejora las propiedades organolépticas y reológicas de estos productos (Perry y col., 1998). Numerosos estudios se han realizado sobre la naturaleza de los EPS producidos por *L. helveticus* y las condiciones de cultivo favorables para su producción. Torino y col. (2001) estudiaron la influencia del pH sobre *L. helveticus* ATCC 15807 en fermentaciones *batch* usando leche como medio y manteniendo el pH constante. Observaron que el microorganismo cambió su metabolismo homofermentativo a heterofermentativo con la consecuente producción de acetato y succinato. El EPS producido presentó un PM de 10^2 - 10^3 kDa y estuvo formado por fosfatos, ramnosa (trazas), glucosa y galactosa, observando que la proporción de estos últimos dos monosacáridos dependía del pH. La mayor producción se obtuvo a pH 5, condición que permitió obtener 549 mg/L de EPS (según el método de fenol-ácido sulfúrico, Dubois y col., 1956), durante la fase de muerte celular (36 h, en este caso). Li y col. (2014b) estudiaron el EPS de *L. helveticus* MB2-1 desarrollado en suero reconstituido a pH libre y encontraron 3 fracciones: EPS-1, EPS-2 y EPS-3. Estos polisacáridos presentaron pesos moleculares similares (alrededor de 100 kDa) y estuvieron compuestos por galactosa, glucosa y manosa. Además, se midió su actividad antioxidante, que decreció en el siguiente orden: EPS crudo > EPS-3 > EPS-2 > EPS-1. En este caso obtuvieron un máximo rendimiento de 658 mg/L (método fenol-ácido sulfúrico) luego de 32 h de incubación (fase estacionaria tardía). Por otro lado, Yang y col. (2000) pudieron dilucidar la unidad estructural de un EPS producido por *L. helveticus* K16, un hexasacárido compuesto por glucosa y galactosa en proporción 2:1.

En el presente capítulo se seleccionaron 4 cepas autóctonas de la colección del INLAIN: *L. fermentum* Lf2, *L. fermentum* LfQP1, *L. fermentum* Lf16 y *L. helveticus* Lh67. En una primera instancia, la selección de estas cepas se basó en un test visual que consistió en observar la formación de un filamento a partir de las colonias sobre medio agarizado de las cepas de *L. fermentum*, o bien, a partir de cultivos en leche de la cepa de *L. helveticus*. Se procedió a realizar una caracterización preliminar de las mismas en función de su capacidad de producir EPS, su cinética de crecimiento, diversidad genética y la presencia de genes relacionados con la producción de EPS (cuando fue posible). Luego se ensayaron distintas condiciones de desarrollo con el objetivo de aumentar el rendimiento para la cepa que presentó

preliminarmente la mayor producción de EPS. A partir de estos resultados preliminares, se seleccionó la cepa con mejores propiedades, *L. fermentum* Lf2, a los fines de estudiar la síntesis de EPS de esta bacteria, y abordar el estudio de este EPS desde los múltiples enfoques que se plantearon en esta Tesis.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Cepas: identificación y diversidad genética

Se utilizaron cepas de lactobacilos homo y heterofermentativas, todas pertenecientes a la colección del INLAIN, desarrolladas rutinariamente en caldo MRS (Biokar, Bs. As., Argentina) o en leche descremada reconstituida (LDR) estéril 10 % (m/v), en aerobiosis, a 37°C. Las mismas fueron conservadas a -80 y -20°C, utilizando caldo MRS adicionado al 15 % (v/v) de glicerol como agente crioprotector.

La identificación de las cepas productoras de EPS se realizó a partir de ADN genómico, que se extrajo a partir de un cultivo fresco (MRS, 37°C, 16 h) como se indica a continuación: se centrifugaron 1,5 mL del cultivo (16000 g, 2 minutos, 4°C), se lavó el pellet y se procedió según el protocolo del kit comercial GenElute Bacterial Genomic DNA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) ligeramente modificado con una etapa inicial de lisis con lisozima (45 mg/mL) y mutanolisina, que digiere la unión entre el peptidoglicano y el polisacárido de la pared celular (250 U/mL; 30 min, 37°C) y posterior tratamiento con proteinasa K, que inactiva nucleasas y digiere proteínas celulares (2 mg/mL; 10 min, 55°C) y RNAsa A (10 % v/v, 2 min, temperatura ambiente), seguido de una precipitación con etanol absoluto y separación mediante la columna GenElute Miniprep. Luego de los lavados necesarios y elución, el ADN se conservó a -20°C hasta su utilización.

A partir del ADN genómico se amplificó (reacción de PCR) el gen completo (aproximadamente, 1500 bp) que codifica la subunidad 16s del ARN ribosomal, utilizando los *primers* pA y pH (Edwards y col., 1989). El perfil térmico incluyó 36 ciclos de desnaturalización a 93°C durante 1 min, seguido de una etapa de hibridación de los *primers* (Sigma Genosys, The Woodlands, TX, Estados Unidos) a 37°C durante 2 min, y un ciclo de extensión a 72°C durante 6 min. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). La posterior purificación de los amplicones obtenidos se realizó con kit QIAquick Gel Extracción Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). La secuenciación de los fragmentos purificados se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación MacroGen (Seúl, Corea del Norte) y las secuencias nucleotídicas

fueron comparadas con las disponibles en la base de datos GenBank, utilizando la herramienta de alineamiento básico BLAST para determinar la identidad de cada cepa en estudio.

Para evaluar su diversidad genética, a partir del ADN genómico se realizaron amplificaciones al azar (RAPD-PCR) con 6 sondas arbitrarias: M13 y 1254 (Giraffa y col., 2004), B06, B07, B08 y B10 (Binetti y col., 2007). Las condiciones de amplificación para cada sonda se detallan en la Tabla 2.1. Los perfiles obtenidos se analizaron mediante el programa de análisis estadístico Applied Maths (Bélgica), aplicando el método UPGMA para la construcción de los dendrogramas.

Tabla 2. 1. Condiciones de las amplificaciones al azar (RAPD-PCR) con las 6 sondas utilizadas.

<i>Primer</i>	Concentración de dNTP (nM)	Concentración de primers (µM)	Temperatura de annealing (°C)	Ciclado	
M13	200	2,5	50	3 min 94°C; (2 min 95°C, 20 seg 45°C, 2 min 72°C) x 35 ciclos; 7 min 72°C	
1254		0,8	34	2 min 94°C; (5 min 94°C, 5 min 36°C, 5 min 72°C) x 4 ciclos; (1 min 94°C, 1 min 36°C, 2 min 72°C) x 30 ciclos; 7 min 72°C	
B06		0,5		34	5 min 94°C; (1 min 94°C, 2 min 36°C, 2 min 72°C) x 35 ciclos; 7 min 72°C
B07					
B08					
B10					

2.2.2. Cinéticas de desarrollo de las cepas

Las cepas de *L. fermentum* Lf2 y Lf16 se desarrollaron en caldo MRSm a 30°C durante 24 h (MRS en el que se reemplazó el extracto de levadura por tripteína, para reducir parcialmente las interferencias durante la extracción de EPS, principalmente aportadas por el extracto de levadura; Cerning y col., 1992), mientras que la cepa *L. fermentum* LfQP1 se desarrolló en el mismo medio a 37 °C. Se determinó, a intervalos regulares, la densidad óptica a 560 nm y el recuento celular (agar MRS, 48 h, 37°C). La cepa *L. helveticus* Lh67 se desarrolló en LDR 10% (m/v) durante 24 h a 42°C. A intervalos regulares de tiempo se determinó el pH y el nivel de células viables (agar APC (Biokar)- leche, 48 h, 42°C).

2.2.3. Extracción y purificación de los EPS

La extracción se realizó de acuerdo a Ruas-Madiedo y col. (2006). Cultivos (500 mL) de las cepas *L. fermentum* Lf2, Lf16 y LfQP1 en fase estacionaria temprana (16 h), se centrifugaron (19000 g, 30 min, 4 °C) y, a partir del sobrenadante, se precipitaron los EPS con dos volúmenes de etanol absoluto frío (-20 °C, Cicarelli, Buenos Aires, Argentina) durante 48 h. Luego se centrifugó nuevamente (4000 g, 30 min, 4 °C) para recuperar el precipitado, que posteriormente se disolvió en agua bidestilada y se dializó (tubos de diálisis de celulosa, *cut off* 12000-14000 Da, Sigma Aldrich) a 4 °C frente a agua destilada durante 3 días, con cambios diarios de agua. El extracto crudo resultante se liofilizó (liofilizador Crhist Alpha 1-4 LD plus, Martin Christ, Osterode am Harz, Alemania) durante 24 h y finalmente se determinó su peso para expresar el rendimiento como mg EPS crudo/L caldo. Se utilizó el mismo protocolo para el control negativo (medio de cultivo sin inocular), descontando el valor del precipitado (proveniente de las interferencias) al obtenido para los cultivos celulares. Para la cepa *L. helveticus* Lh67 se partió de un cultivo en leche, adicionándole al proceso de extracción una precipitación previa de proteínas con TCA 12 % (m/v) como concentración final durante 24 h, procediendo luego como se indicó anteriormente. La concentración de proteínas totales del extracto crudo se determinó con el kit comercial para proteínas Bio-Rad (Hercules, CA, Estados Unidos) basado en el método de Bradford, por triplicado.

2.2.4. Determinación de la presencia de genes relacionados a la síntesis de EPS

Con el objeto de evaluar si las cepas en estudio poseen fragmentos genómicos del *cluster* genético de síntesis de HePS similares a los descritos en la bibliografía para *L. fermentum*, el ADN bacteriano de las cepas *L. fermentum* Lf2, Lf16 y QP1 se utilizó para amplificar (reacción de PCR) un fragmento de 456 bp empleando los *primers* LbEPS-F2/LbEPS-R2 (Tm 49,3 °C y 45,2 °C, respectivamente; Dan y col., 2009). Se utilizó 1 µl de ADN como templado, 200 nM de dNTPs (Sigma Aldrich), 500 nM de cada *primer* (Sigma Genosys) y 2,5 U/mL de Taq polimerasa (Sigma Aldrich) en un volumen final de 50 µl. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 94 °C por 5 min; 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 40 °C por 1 min y 72 °C por 1 min; y un paso final de 72 °C por 7 min, para asegurar la elongación de los fragmentos obtenidos. Los productos de reacción fueron visualizados en un gel de agarosa 1% (m/v) teñido con GelRed (Biotium, Hayward, CA, Estados Unidos) según protocolos estándares (Sambrook y Russel, 2001). Dichos amplicones se purificaron con columnas comerciales (Gen Elute PCR Clean-up, Sigma Aldrich) para su posterior secuenciación (Servicio de Secuenciación MacroGen) y las

secuencias nucleotídicas fueron comparadas con las disponibles en la base de datos GenBank, utilizando la herramienta de alineamiento básico BLAST.

2.2.5. Estudio de la influencia del pH y temperatura sobre la producción de EPS de la cepa *L. fermentum* Lf2

De entre las 4 cepas estudiadas, se seleccionó *L. fermentum* Lf2 para continuar con su estudio vinculado a la síntesis de EPS. La producción de EPS se llevó a cabo en un fermentador de 2 L (Sartorius Biostat A plus®, Goettingen, Alemania) en caldo SDM (Semi-Defined Medium) (Kimmel y Roberts, 1998), que tiene como base los componentes del MRS pero en el que se reemplazan los extractos de levadura y carne y la peptona proteosa por base nitrogenada de levadura y Bacto Casitona (ambos de Difco, Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, Francia) con el objetivo de minimizar las interferencias en la extracción de EPS. Las condiciones de desarrollo fueron las siguientes: inóculo 0,1 % v/v a partir de un cultivo *o.n.* (*overnight*), incubación a 30 °C durante 72 h, agitación (6 g), pH 6,0 constante (ajustado con NaOH 8 M estéril), y burbujeo con CO₂ (0,2 L/min). Las muestras de 100 mL se tomaron aseptícamente a diferentes tiempos para determinar el recuento celular (agar MRS, 48 h, 37 °C, aerobiosis), los productos finales (azúcar residual y ácidos orgánicos) y la producción de EPS. Paralelamente, se realizó un cultivo sin control de pH en cada experiencia, a los fines de comparar la producción de EPS en ambas condiciones. La extracción de EPS se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección 2.2.3. Las experiencias se realizaron, al menos, por duplicado.

2.2.6. Determinaciones de azúcar residual y ácidos orgánicos durante el desarrollo de *L. fermentum* Lf2

El análisis de la glucosa residual y ácidos orgánicos se llevó a cabo mediante HPLC, a partir de los sobrenadantes de los cultivos de *L. fermentum* Lf2, según Peralta y col. (2016). Las muestras se diluyeron en H₂SO₄ 0,01 M, se filtraron por membranas de 0,45 µm (Millex, Millipore, Sao Paulo, Brasil) y se inyectaron en el cromatógrafo usando un *loop* de 60 µL. La separación cromatográfica se realizó en forma isocrática a 65 °C con H₂SO₄ 0,01 M como fase móvil, a una velocidad de flujo de 0,6 mL/min en una columna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300×7,8 mm; Bio-Rad Laboratories), equipada con un guardacolumna cation H⁺ microguard (Bio-Rad Laboratories), que permite la cuantificación simultánea de azúcares y ácidos orgánicos usando detectores UV e IR conectados en serie.

El equipo de HPLC consistió en una bomba cuaternaria, un desgasificador en línea, un horno para el control de temperatura de la columna, un detector UV-visible (*Series 200*) y un detector de índice de refracción termostatzado a 35 °C (*Series Flexar*, Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos). Para la detección de ácidos orgánicos, se utilizó el detector UV a 210 nm, mientras que para el análisis de la glucosa se usó el detector IR. La información se colectó y procesó con el software Chromera® (Perkin Elmer). Para las curvas de calibrado se emplearon estándares de glucosa y ácidos orgánicos de grado analítico (Sigma Aldrich). Los resultados se expresaron en mg/mL y las determinaciones se realizaron para, al menos, dos cultivos independientes.

2.3. Resultados y discusión

2.3.1. Cepas: identificación y diversidad genética

En la Tabla 2.2 se indican algunas características de las cepas, cuya identificación se muestra en la Tabla 2.3. La diversidad genética de las cepas de la especie *L. fermentum*, evaluada con diversos *primers* en diferentes reacciones de RAPD, permitieron afirmar que los 3 aislamientos son diferentes cepas (similitud inferior al 85%). Los *primers* 1254, B10 y B08 son los que brindaron mayor información sobre su diversidad bacteriana (Figura 2.1). Asimismo, los perfiles RAPD obtenidos para la cepa *L. helveticus* Lh67 (única en su especie incluida en este estudio) permitieron diferenciarla claramente (coeficiente de similitud inferior a 80%) de 2 cepas de colección (*L. helveticus* ATCC 15807 y CNRZ 241), una de ellas productora de EPS (Figura 2.1).

Tabla 2. 2. Origen y características particulares de las cepas en estudio (*L. helveticus* Lh67; *L. fermentum* Lf2; *L. fermentum* Lf16 y *L. fermentum* LfQP1). Se detallan los recuentos celulares y producción de gas de cultivos *o.n* crecidos a 37°C y el rendimiento de EPS crudo en las condiciones de cultivo especificada.

Cepa	Origen	Producción de gas	Condiciones de cultivo	Recuento celular (UFC/mL)	Producción EPS crudo (mg/L)
Lh 67	Suero fermento	-	Leche, 42°C, 16 h	8,50x10 ⁸	83,0
Lf 2	Queso Tybo	+	MRSm, 30°C, 16 h	3,00x10 ⁹	338,0
Lf 16	Queso Tybo	+	MRSm, 30°C, 16 h	1,00x10 ⁹	223,4
LfQP 1	Queso Reggiano	+	MRSm, 37°C, 16 h	2,10x10 ⁹	326,0

Tabla 2. 3. Identificación de las cepas en estudio por amplificación y posterior secuenciación del gen (1500 bp) que codifica para la subunidad 16s del ARN ribosomal.

Cepa	Nucleótidos comparados	Identificación	Secuencia de mayor similitud	% similitud
Lh67	1066	<i>Lactobacillus helveticus</i>	FR683085.1 <i>Lactobacillus helveticus</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM 20075T	100
Lf2	1500	<i>Lactobacillus fermentum</i>	gi 296802251 HM057966.1 <i>Lactobacillus fermentum</i> strain MGA41-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98
Lf16	1498	<i>Lactobacillus fermentum</i>	KJ701555.1 <i>Lactobacillus fermentum</i> Akhavan-G1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
LfQP1	1034	<i>Lactobacillus fermentum</i>	HM058800.1 <i>Lactobacillus fermentum</i> culture-collection IMAU:80609 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99

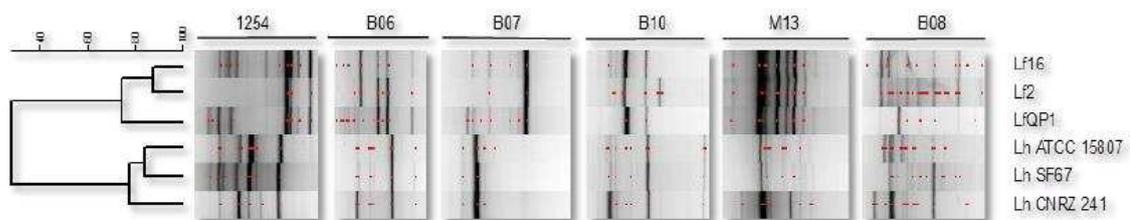


Figura 2. 1. Dendrograma obtenido por comparación (Software Gel Comprer, Applied Maths) y agrupación (método UPGMA) de los perfiles RAPD de las cepas en estudio, con los *primers* 1254, B06, B07, B10, M13 y B08.

2.3.2. Cinéticas de desarrollo de las cepas

En la Figura 2.2 pueden observarse las cinéticas de desarrollo de las cepas en estudio, alcanzando sus valores máximos de crecimiento entre las 14 y 16 h, valores que oscilan desde 8,5 a 9,4 log₁₀ (UFC/mL), y a partir de las 16 h, comienza la fase estacionaria para todos los casos. Para *L. fermentum* LfPQ1 se observó un importante descenso de la viabilidad celular (aproximadamente, 2 órdenes log) entre las 14 y 24 h de incubación.

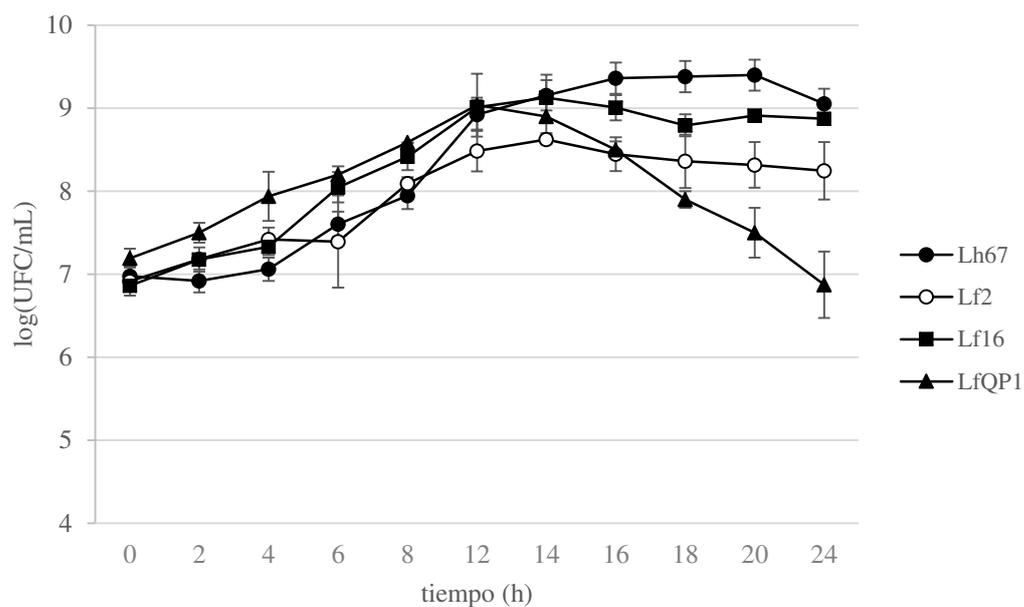


Figura 2. 2. Cinéticas de desarrollo de las cepas en estudio: *L. helveticus* Lh67 en LDR 10% (m/v), 42°C, 24 h; *L. fermentum* Lf2 y Lf16 en caldo MRSm, 30°C, 24 h y *L. fermentum* LfQP1 a 37 °C en caldo MRSm, 24 h.

2.3.3. Determinación de la presencia de genes relacionados a la síntesis de EPS

Utilizando el ADN total de las cepas de *L. fermentum* como molde, se logró amplificar (reacción de PCR) un fragmento de 460 bp (Figura 2.3) en el genoma de *L. fermentum* Lf2 y Lf16, que fue purificado y secuenciado. Las secuencias nucleotídicas fueron comparadas con las disponibles en la base de datos GenBank, mediante la herramienta de alineamiento básico (BLASTx), que a partir de una secuencia nucleotídica indica la similitud con secuencias de base de datos de proteínas. Para *L. fermentum* LfQP1 no se obtuvo señal de amplificación, indicando preliminarmente que en esta cepa no se encuentra presente ese fragmento genómico conservado.

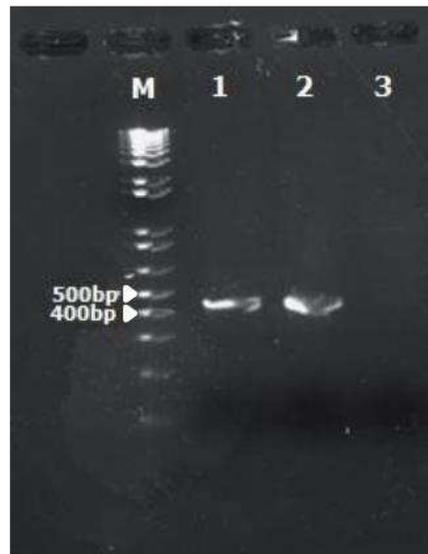


Figura 2. 3. Resultado de la amplificación con los *primers* LbEPS-F2/R2 de las cepas *L. fermentum* Lf2 y Lf16 (producto con un tamaño aproximado de 460 bp) en un gel de agarosa (1,5 % m/v). M: Marcador de peso molecular de 1Kb., (Sigma Aldrich); 1: *L. fermentum* Lf2; 2: *L. fermentum* Lf16, 3: control negativo.

Tabla 2. 4. Secuenciación y comparación de productos de amplificación con *primers* que hibridan en el *cluster* genético de síntesis de HePS en *L. fermentum* (Dan y col., 2009) con genes que codifican para proteínas relacionadas con la producción del EPS.

Cepa	Nucleótidos comparados	Identificación	Nº aminoácidos de la proteína	% Similitud	Secuencia con mayor similitud
Lf2	401	exopolysaccharide biosynthesis protein [Lactobacillus fermentum]	246	98	WP_003685765.1
Lf16	402	exopolysaccharide biosynthesis protein [Lactobacillus fermentum]	246	98	WP_003685765.1

Se encontró que los fragmentos genómicos detectados en *L. fermentum* Lf2 y Lf16 presentan un elevado grado de similitud (98%) con una proteína involucrada en la síntesis de EPS de la especie *L. fermentum*, cuya secuencia está disponible en las bases de datos (Tabla 2.4). Esta región pertenece al gen *epsC* descrito en *L. fermentum* TDS030603, que codificaría para una proteína tipo tirosin-quinasa encargada de facilitar la polimerización del EPS, en combinación con la proteína EpsB, integrantes del *cluster* responsable de la síntesis de HePS. Por lo tanto, si bien la zona secuenciada sólo abarca una porción del gen *epsC*, posiblemente *L. fermentum* Lf2 y *L. fermentum* Lf16 tengan una organización genética similar a la de *L. fermentum* TDS030603 (Dan y col., 2009). Cabe destacar que las secuencias obtenidas son idénticas entre ambas cepas estudiadas y, si bien el resultado es muy preliminar, podría

representar el punto de inicio para el estudio de los *clusters* involucrados en la síntesis de HePS en dichas cepas, especialmente *L. fermentum* Lf2, la cepa seleccionada para continuar con el trabajo de Tesis.

2.3.4. Estudio de la influencia del pH y temperatura sobre la producción de EPS de la cepa *L. fermentum* Lf2

Durante el crecimiento de *L. fermentum* Lf2 en caldo SDM a pH 6, la cepa alcanzó la fase estacionaria a las 16 h, con recuentos celulares de 9,1 y 8,9 log₁₀ (UFC/mL) a 30 y 37 °C, respectivamente (Figura 2.4). Durante las 72 h de crecimiento, los mayores niveles fueron registrados a 30 °C (Figura 2.4 A). Nuestros resultados mostraron que 30 y 37 °C fueron temperaturas adecuadas para el crecimiento de la cepa, pero 30 °C y pH 6 fueron las mejores condiciones para la producción de EPS para las variables estudiadas. El mayor rendimiento de EPS (791 y 531 mg/L, como extracto crudo a 30 y 37 °C, respectivamente) fue observado a las 72 h, correspondiente a la fase estacionaria tardía de crecimiento de *L. fermentum* Lf2, cuando la glucosa fue casi consumida en su totalidad. Los porcentajes de proteínas fueron 0,9% y 2% para el EPS crudo producido a 30 °C y 37 °C, respectivamente. Leo y col. (2007) informaron que para *L. fermentum* TDS030603, los rendimientos de EPS en MRS (30 °C, 72 h) fueron de 568,6 mg/L y 151,2 mg/L, en sus formas cruda y purificada, respectivamente. Tres aislamientos de *L. fermentum* a partir de leche fermentada de Burkina Faso produjeron cantidades similares de EPS (desde 322 a 713 mg de EPS crudo/L en caldo MRS en el que la glucosa fue reemplazada por lactosa, 35 °C, 20 h; Savadogo y col., 2004). Considerando que el caldo MRS contiene importantes cantidades de extracto de levadura (4 g/L), extracto de carne (8 g/L), y peptona-proteosa (10 g/L), todos componentes que interfieren fuertemente en la precipitación de EPS (Kimmel y Roberts, 1998), la producción de EPS por *L. fermentum* Lf2 en caldo SDM (en el que estos componentes fueron reemplazados para minimizar las interferencias) a 30 °C y pH 6,0 es, según sabemos, la mayor producción descrita para esta especie bacteriana. Debido a la diversidad de métodos empleados para la cuantificación, es difícil comparar los rendimientos de EPS entre diversas especies de BAL. En el caso de heteropolisacáridos de *Lactobacillus*, los rendimientos informados varían desde 25 a 150 mg/L (Ruas-Madiedo y de los Reyes-Gavilán, 2005). Sin el control de pH, se obtuvieron para *L. fermentum* Lf2 curvas de crecimiento similares (Figura 2.5) pero la producción de EPS alcanzó el valor más alto a las 40 h a 30 °C (330,6 mg/L; Figura 2.5 A) y a 37 °C (395,5 mg/L; Figura 2.5 B), disminuyendo la producción a las 72 h para ambas temperaturas. Este hecho puede atribuirse a la degradación

enzimática del EPS que suele ocurrir a valores de pH menores a 5 (Degeest y col., 2002; Fukuda y col., 2010; Pham y col., 2000).

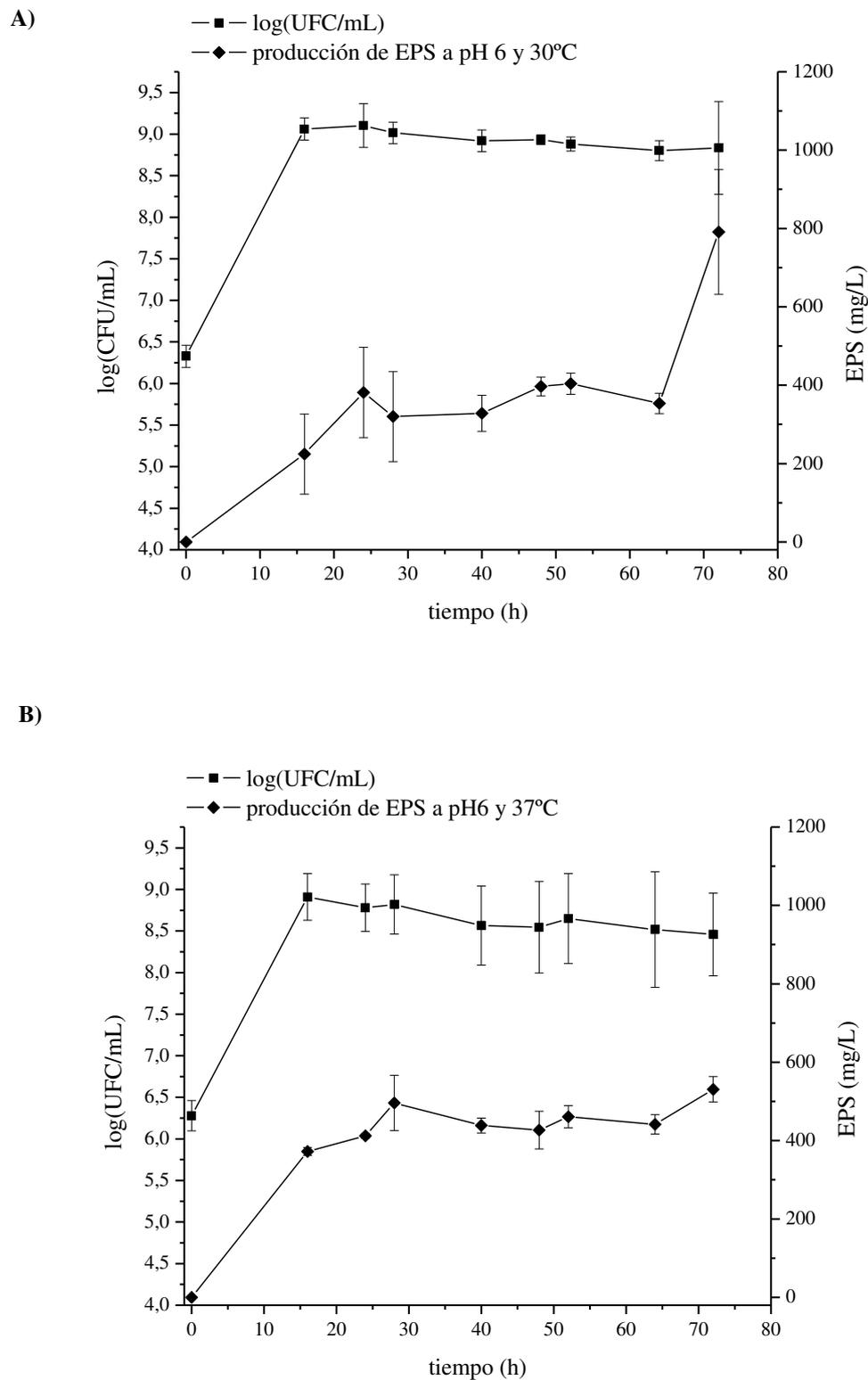


Figura 2. 4. Crecimiento de *L. fermentum* Lf2 en caldo SDM a pH 6 a A) 30°C y B) 37°C. Se muestran los recuentos celulares y la producción de EPS a cada tiempo. Los valores se expresaron como promedios \pm SD.

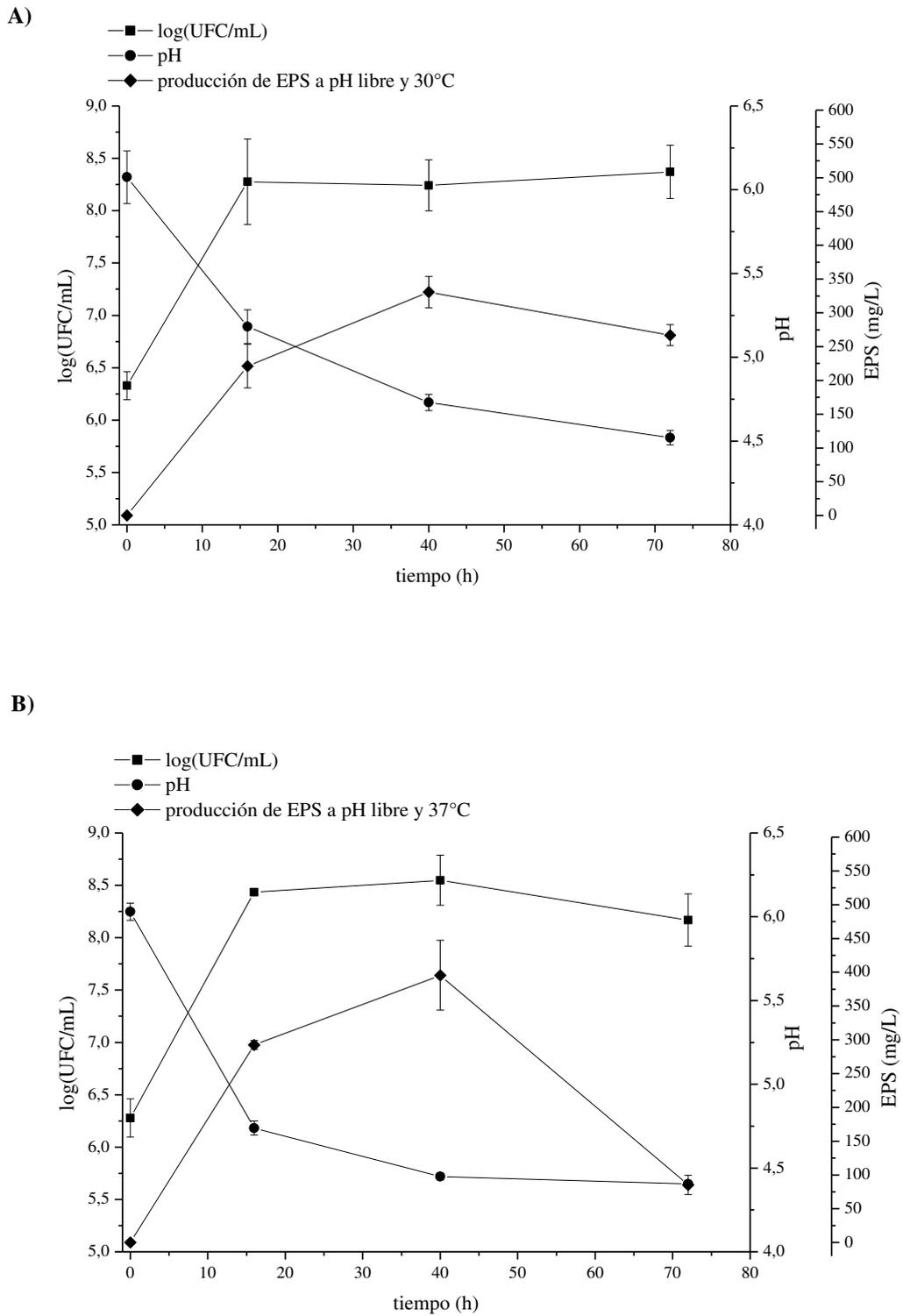


Figura 2. 5. Crecimiento de *L. fermentum* Lf2 en caldo SDM a pH libre a 30°C (A) y 37°C (B). Se muestran las evoluciones del pH, recuentos celulares y producción de EPS para cada tiempo. Los valores se expresaron como promedios \pm SD.

2.3.5. Determinaciones de azúcar residual y ácidos orgánicos durante el desarrollo de *L. fermentum* Lf2

A pH controlado, las producciones más altas de los ácidos láctico y acético fueron acompañadas por los niveles más elevados de glucosa consumida, y esto se observó a las 40 h (a 30 °C) y 16 h (37 °C) de crecimiento (Figura 2.6). En cultivos a pH 6 y 30 °C, la concentración de ácido láctico fue significativamente inferior a las 16 h que aquellas registradas a las 40 y 72 h de desarrollo, mientras que no se observaron diferencias significativas para los ácidos acético y láctico entre las 16 y 72 h de desarrollo a pH controlado y 37 °C. Es notable que la velocidad de consumo de glucosa sea mayor cuando la bacteria creció a pH controlado y 37 °C que cuando creció a pH controlado y 30 °C, o sin control de pH a 37 °C. Esto puede ser explicado si se considera que la temperatura de crecimiento óptima para *L. fermentum* Lf2 es 37 °C. Por lo tanto, cuando el pH fue controlado y la acumulación de ácidos no inhibió su crecimiento, se alcanzó una mayor velocidad en el consumo de glucosa y se observaron los niveles más altos de los ácidos láctico y acético, en comparación a lo visto a los 30 °C (si bien no se vio reflejado en mayores recuentos). Es importante señalar que el extracto crudo (obtenido a pH 6 y 30 °C) presentó un 0,9% de proteínas (método de Bradford), valor menor al límite recomendado para los EPS cuando se adicionan a matrices alimentarias (<3%, De Vuyst y col., 2003).

Se debe destacar que la producción más significativa de EPS fue observada en la fase estacionaria tardía y, aunque no se detectaron cambios en el consumo de glucosa ni en la producción de ácidos láctico y acético, ni en los recuentos celulares luego de las 40 h, la producción de extracto de EPS aumentó hacia el final de la fermentación a pH 6 y 30 °C. Vaningelgem y col. (2004) obtuvieron resultados similares, ya que observaron para una cepa de *S. thermophilus* que la producción de EPS aumentaba con el tiempo de fermentación (en leche, a pH 5,8 y 37 °C). La mayor producción de EPS fue a las 35 h, con recuentos celulares de aproximadamente 2×10^9 UFC/mL. Cuando el medio se suplementó con diferentes fuentes nitrogenadas, el rendimiento aumentó considerablemente (3 veces con casitona, 7 veces con triptona y 5 veces con hidrolizado de proteínas del suero, aproximadamente, cuando se comparó con la producción en leche sin fuente nitrogenada adicionada). Estos autores observaron que, aunque la lactosa se consumió completamente a las 10 h, la mayor cantidad de EPS se obtuvo al final de la fermentación (24 h de incubación). Además, Zisu y Shah (2003) informaron que el crecimiento de *S. thermophilus* 1275 y la producción de EPS se vieron afectados por la adición de WPC 392 (0,5% m/v) a pH 5,5 y 37 °C. Luego de 24 h de crecimiento, la cantidad de EPS aumentó significativamente ($p < 0,05$) desde 458 mg/L (sin WPC) a 1029 mg/L con el

suplemento de WPC. Similarmente, en un estudio reciente sobre la optimización de la producción de EPS de *L. fermentum* TDS030603, Shi y col. (2014) informaron que el mayor rendimiento se obtuvo cuando la cepa se cultivó microaeróbicamente a 30 °C en un medio definido químicamente, suplementado con 5% (m/v) de glucosa y 1% (m/v) de citrato de amonio, y luego de 48 h, cuando la glucosa ya había sido consumida. Parecería que la disponibilidad de fuentes de nitrógeno juega un papel muy relevante para la producción de EPS, un factor importante a tener en cuenta cuando se pretende optimizar su rendimiento.

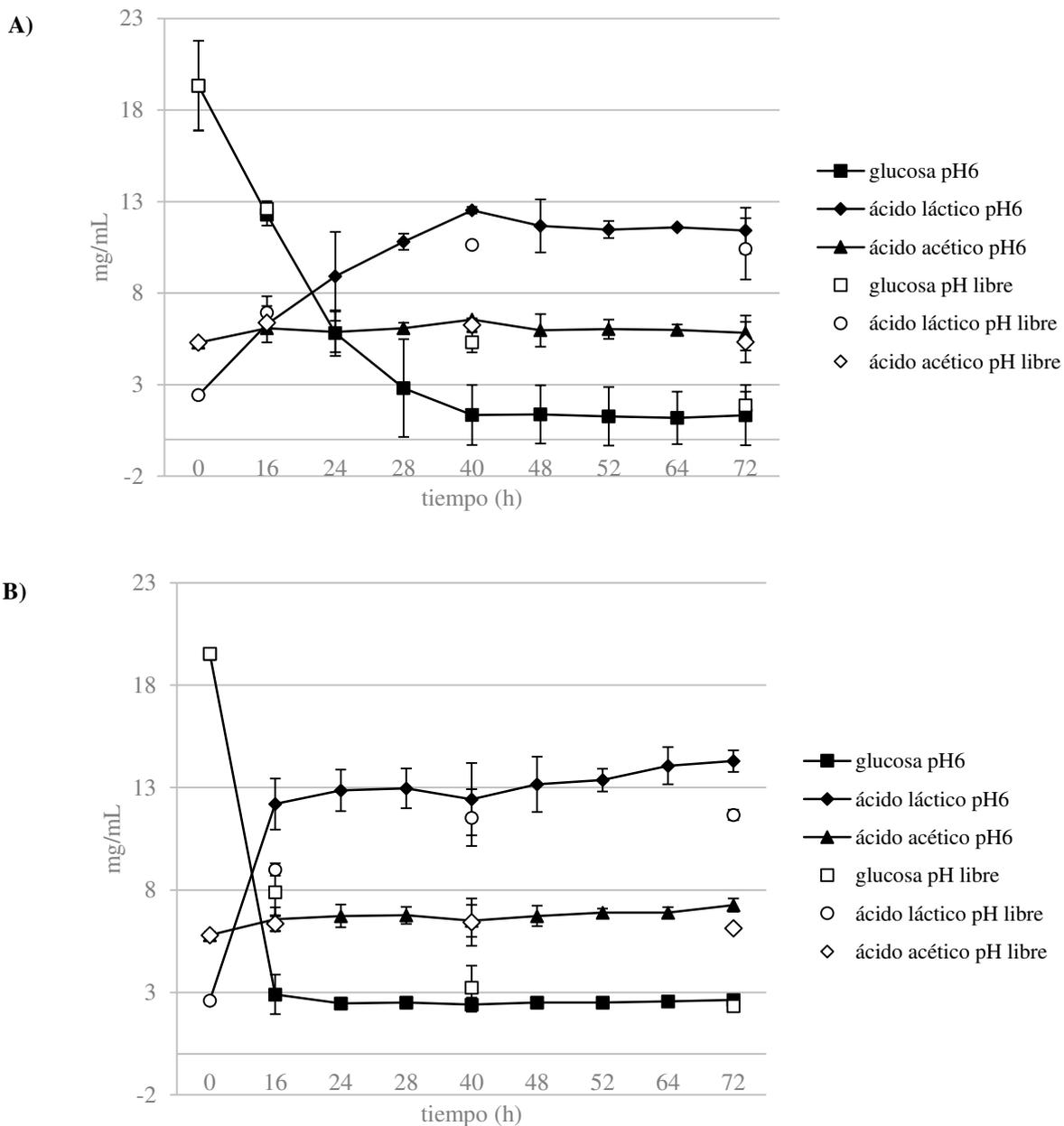


Figura 2. 6. Evolución del consumo de glucosa y producción de los ácidos acético y láctico durante el crecimiento de *L. fermentum* Lf2 en caldo SDM a 30°C (A) y 37°C (B) a pH 6 y a pH libre. Los valores representan promedios \pm SD.

2.4. Conclusiones parciales

Las 4 cepas fueron identificadas y fue posible determinar molecular y fenotípicamente que son cepas diferentes. Asimismo, fue posible caracterizar, al menos de forma preliminar, uno de los genes involucrados en la síntesis de EPS en *L. fermentum* que, de acuerdo a la bibliografía, forma parte de un *cluster* genético responsable de la biosíntesis de HePS. De este modo, en caso de expresarse, podría indicar indirectamente la presencia de, al menos, un heteropolisacárido en las fracciones de EPS de *L. fermentum* Lf2 y Lf16. Seleccionando la cepa *L. fermentum* Lf2 por su producción en EPS, se evaluaron diferentes condiciones de desarrollo (aún sin optimizar mediante un modelo estadístico) y su impacto en la producción de EPS, encontrando condiciones experimentales que resultaron en un rendimiento de, aproximadamente, 0,8 g/L de EPS crudo.

Estos resultados preliminares sentaron las bases para el planteo de las siguientes etapas de trabajo con la cepa seleccionada, *L. fermentum* Lf2: optimización de la producción de EPS mediante un diseño experimental; caracterización química y estructural del EPS; aplicación del EPS como un ingrediente alimentario y estudio de sus propiedades tecnológicas y funcionales y; finalmente, estudio del genoma de la cepa y del *cluster* genético involucrado en la síntesis de HePS.

*Capítulo 3: Caracterización química y
estructural del EPS producido por *L.*
fermentum Lf2*

3.1. Introducción

Los EPS son polisacáridos de cadena larga que consisten en unidades repetitivas de azúcares o derivados de azúcares, principalmente glucosa, galactosa y ramnosa en diferentes proporciones (De Vuyst y Degeest, 1999a). Menos frecuentemente también se han encontrado otros monosacáridos tales como fucosa, manosa, ribosa, fructosa, y monosacáridos N-acetilados (como N-acetil glucosamina y N-acetil galactosamina), o monosacáridos sustituidos (glicerol, ácido glucurónico, grupos acetilos y fosfatos) (Ruas-Madiedo y col., 2012). Como se mencionó en capítulos anteriores, los EPS se pueden clasificar en dos grupos según su composición, homopolisacáridos (HoPS, como la celulosa, dextrano, mutano, pululano y levano) o heteropolisacáridos (HePS, como xantano y gelano) (Laws y col., 2001a).

Los HoPS consisten en unidades repetitivas de un solo tipo de monosacárido (D-glucosa o D-fructosa) y, de acuerdo al monosacárido que lo compone, pueden dividirse en dos grandes grupos: glucanos y fructanos. En cambio, los HePS de BAL presentan unidades repetitivas conformadas por distintos tipos de monosacáridos y, en ciertos casos, poca similitud estructural entre ellos (De Vuyst y col., 2001). La biosíntesis de cada tipo de EPS es particular, interviniendo sacarosas (glucan-sacarosas o fructan-sacarosas, según se trate de glucanos o fructanos, respetivamente) en el caso de los HoPS, o un *cluster* genético con 4 regiones funcionales características y bien definidas, en el caso de los HePS (Korakli y Vogel, 2006; Laws y col., 2001a).

La masa molecular de los HePS oscila entre 40 y 6×10^3 kDa (Ruas-Madiedo y col., 2002), y es bastante frecuente que una misma cepa produzca dos HePS de distinto PM (Torino y col., 2015). Estos polisacáridos están compuestos por múltiples copias de oligosacáridos, de entre 3 a 8 residuos cada una, encontrándose dos o más monosacáridos diferentes en cada unidad repetitiva y presentando distintos tipos de enlaces (Welman y Maddox, 2003). En cambio, los HoPS pueden estar formados por fructosa, mediante la actividad de fructosiltransferasas sobre la sacarosa, dando lugar a dos tipos de fructanos: levano e inulina, formados por enlaces $\beta(2,6)$ y $\beta(2,1)$, respectivamente (Monsan y col., 2001); o bien pueden estar compuestos por glucosa, y las enzimas que intervienen en este caso son las glucan-sacarosas que catalizan la síntesis de una variedad de glucanos formados principalmente por enlaces $\alpha(1,6)$, $\alpha(1,3)$, $\alpha(1,4)$ y $\alpha(1,2)$ (Monchois y col., 1999; Sidebotham, 1974).

Como se ha mencionado, los EPS tienen la capacidad de modificar las propiedades reológicas del medio en el cual se encuentran. Si bien se ha intentado establecer una relación entre la concentración de EPS y la viscosidad de las soluciones, esto no resulta directo sino que es fuertemente dependiente de la composición de estos polímeros, sus cargas, arreglos

formación de estos azúcares cíclicos genera C anoméricos adicionales, C1 en las aldosas y C2 en las cetosas (Rao 1998).

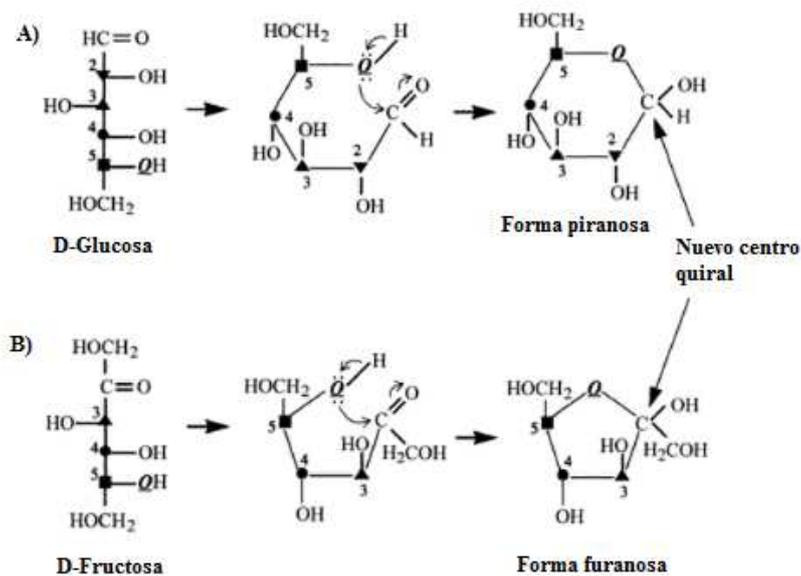


Figura 3. 2. Dos formas cíclicas de hexosas A) piranosa, B) furanosa. Imagen adaptada de Rao (1998).

Al formarse el enlace glucosídico entre dos monosacáridos, pueden tener lugar enlaces α o β , que se diferencian en sus posiciones con respecto al anillo del primer monosacárido (arriba del mismo se denominan β y por debajo α) (Teegarden, 2004) como puede verse en la Figura 3.3. Los enlaces α son más débiles, se rompen y forman con gran facilidad, por lo que se encuentran en los polisacáridos con funciones de reserva, como el almidón o el glucógeno. El enlace tipo beta es mucho más estable y resistente, por lo que es característico de polisacáridos con función estructural, como es el caso de la celulosa.

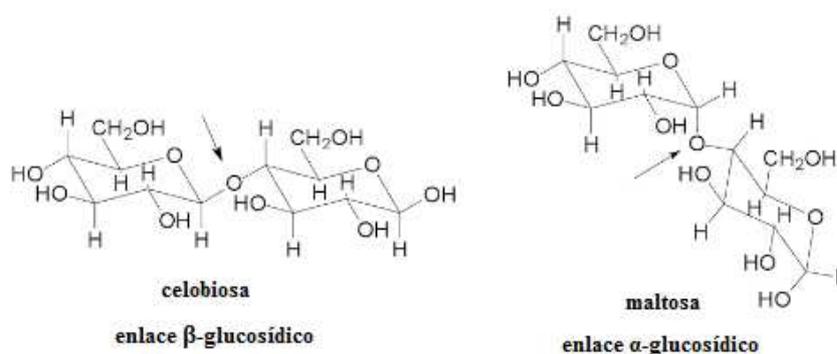


Figura 3. 3. Enlaces β y α -glucosídicos de distintos disacáridos. En la celobiossa dos D-glucopiranosas están unidas mediante un enlace β (1,4), mientras que en la maltosa estas mismas moléculas se unen mediante un enlace α (1,4). Las flechas indican la posición del enlace glucosídico. Imagen adaptada de Teegarden (2004).

Teniendo en cuenta que la influencia de los polisacáridos sobre la textura de los alimentos se encuentra condicionada por sus propiedades fisicoquímicas, resulta imprescindible estudiar la composición y estructura de cada EPS de modo de poder comprender e, incluso, predecir su comportamiento en una matriz alimentaria. Por estas razones, en el presente capítulo se abordó la caracterización molecular del extracto de EPS producido por *L. fermentum* Lf2, con el fin de dilucidar si se trata de un único polímero o una mezcla de polisacáridos diferentes, las unidades repetitivas constituyentes, como así también su PM y los enlaces que intervienen en su estructura.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Purificación del extracto EPS

El extracto de EPS crudo se obtuvo a partir de cultivos de *L. fermentum* Lf2 en las condiciones descriptas en el capítulo 2 (caldo SDM, pH 6, 72 h, 30 °C y burbujeo de CO₂) y según el protocolo indicado anteriormente. A partir de este extracto se aplicó un protocolo de purificación según Nikolic y col. (2012) para reducir, principalmente, el contenido de proteínas y otras posibles interferencias que precipitan con etanol. Para esto, el EPS crudo liofilizado se disolvió en una solución de Tris-HCl 50 mM y MgSO₄·7H₂O (pH 7,5) 10 mM en una concentración final de 5 mg/mL. Luego se realizó un tratamiento con DNAsa tipo-I (Sigma Aldrich, 5 µg/mL) durante 12 h a 37 °C, y luego con Pronasa E (Sigma Aldrich, 50 µg/mL) durante 18 h a 37 °C. Posteriormente, se agregó ácido tricloroacético (TCA, concentración final de 12%) para precipitar las enzimas y péptidos residuales, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se procedió a centrifugar (12000 g, 20 min, 4 °C), se conservó el sobrenadante y se ajustó su pH entre 4 y 5 con NaOH 10 M. Finalmente, la solución se dializó en agua bidestilada durante 3 días a 4 °C (con cambio diario de agua) y se liofilizó para obtener la fracción de EPS purificado.

3.2.2. Determinación de la composición monosacáridica y enlaces

Para el análisis de los monosacáridos presente en la muestra, la fracción purificada de EPS fue resuspendida en una solución de ácido trifluoroacético (TFA) 2 N en una concentración de 10 mg/mL y sometida a un tratamiento térmico fuerte (121 °C por 2 h), de modo de hidrolizar los polímeros presentes. La solución ya hidrolizada finalmente se liofilizó y resuspendió en la fase móvil. La separación cromatográfica se realizó de forma isocrática a 85 °C con agua destilada (0,6 mL min⁻¹) en una columna Aminex HPX-87N (300 × 7,8 mm) equipada con un guardacolumna catión N (Bio-Rad), usando un detector de índice de refracción (Series Flexar,

Perkin Elmer, Norwalk, CT, Estados Unidos). La información se recolectó y procesó con el *software* ChromeraR (Perkin Elmer). Los estándares analizados fueron D(+)-glucosa, D(+)-galactosa, D(+)-manosa, D(-)-arabinosa, D(-)-ribosa, D(-)-levulosa, D-manitol y L-rhamnosa (todos de Sigma Aldrich).

Por otro lado, también se evaluó la composición de monosacáridos y las características de los enlaces mediante GC-MS (*Gas Chromatography– Mass Spectrometry*), a través de un vínculo formal entre el INLAIN y el grupo de investigación encabezado por el Prof. Andrew Laws (*University of Huddersfield*, Queensgate, Reino Unido), con la colaboración del Dr. Sohaib Sadiq y el Sr. Hafiz Ahmed, con el fin de complementar el análisis descrito anteriormente. Este análisis se realizó con un Sistema Agilent 7890A GC (Santa Clara, CA, Estados Unidos) acoplado a un MS Agilent 5675c cuádrupolo.

3.2.3. Caracterización estructural

Para la caracterización molecular se aplicó un conjunto de técnicas complementarias (SEC-MALLS y RMN) también a cargo del Prof. Laws, con el objeto de conocer el PM, tipo de enlaces y conformación de EPS purificado. La metodología empleada en cada de una de ellas se describe a continuación:

3.2.3.1. Análisis de PM

El polisacárido crudo se purificó por cromatografía de exclusión molecular (SEC-HPLC, Shimadzu U.K. Ltd, Milton Keynes, Reino Unido) acoplada a un sistema de detección MALLS (*Multi-Angle Laser Light Scattering*, Wyatt Technology DAWN EOS, Santa Bárbara, CA, Estados Unidos), un detector de índice de refracción (Optilab rEX, Wyatt Technology) y un detector UV (Prominence SPD-20A, Shimadzu), con longitud de onda seteada a 280 y 260 nm para detectar la presencia de proteínas o ADN en las muestras. El EPS se disolvió en agua ultrapura (100 mg/5 mL) y se eluyó a través de una columna Sephacryl S500 (XK-16/60 cm) usando agua ultrapura como fase móvil y aplicando una velocidad de flujo de 5 mL/min.

3.2.3.2. Análisis estructural por RMN

Los espectros de RMN se registraron para las fracciones de EPS encontradas disolviendo (10 mg/mL) directamente en D₂O. Todos los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker Avance 500.13 MHz ¹H (125,75 MHz ¹³C) (Bruker-biospin, Coventry, Reino Unido). Los cambios químicos se expresaron en ppm con respecto a la acetona interna o externa; δ 2,225 para ¹H y δ 31,55 para ¹³C.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Determinación de la composición monosacáridica

Se comprobó por HPLC que el extracto de EPS hidrolizado contiene D(+) glucosa y D(+) galactosa en proporción (2:1) respectivamente, de acuerdo al análisis de las áreas de cada pico identificado a partir de los correspondientes monosacáridos patrones (Figura 3.4).

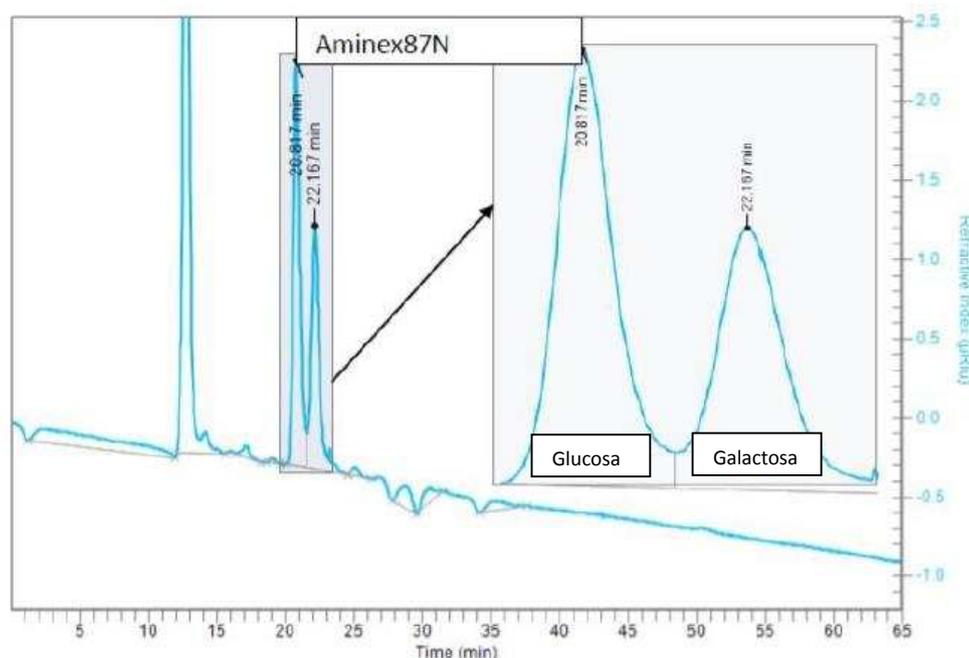


Figura 3. 4. Cromatograma (HPLC) de la muestra del EPS de *L. fermentum* Lf2 hidrolizado (120°C, 2 h, TFA 2 N). Se amplifica (a la derecha de la imagen) la zona de separación de los picos correspondientes a los monómeros identificados, indicando los tiempos de retención (min) para cada uno de ellos.

Cuando la composición monomérica del EPS de *L. fermentum* Lf2 se analizó por GC-MS se obtuvieron los siguientes porcentajes según las áreas de los picos registrados: 35% galactosa, 62,6% glucosa y 2,4% de manosa. Esta información coincide con la obtenida mediante HPLC, indicando que los monosacáridos del extracto de EPS son glucosa y galactosa. La manosa, si bien también está presente, se detectó en niveles muy bajos y posiblemente pueda provenir de polisacáridos minoritarios o bien de una interferencia del medio de cultivo.

3.3.2. Caracterización estructural

El análisis de SEC reveló la presencia de un polisacárido de alto peso molecular (PS1) que eluyó en las fracciones 10-19 y una mezcla de dos polisacáridos de peso molecular medio (PS2 y PS3) que eluyó en las fracciones 25-30. Las fracciones que contenían PS1 se

combinaron, al igual que las fracciones que contenían PS2 y PS3, el agua se removió por liofilización para obtener PS1 puro (10,1 mg) y una mezcla de PS2 y PS3 contaminada (37 mg) con un compuesto que absorbe UV, posiblemente de naturaleza proteica.

Por otro lado, el extracto purificado original se disolvió en D₂O y se registró el espectro de ¹H-RMN, observando, fundamentalmente, cinco resonancias de protones en la región anomérica (4,5-5,5 ppm), lo que sugeriría la existencia de un material compuesto mayoritariamente (~75 %) por unidades repetidas de pentasacárido (dos residuos unidos mediante enlace α y 3 residuos unidos por enlace β) (Figura 3.5). El análisis de ¹H-RMN reveló a su vez la presencia de otro material sacarídico (< 15%) y de una pequeña cantidad de material proteico (Figura 3.5). Por otra parte el espectro ³¹P RMN no presentó señales, indicando que en el extracto no se detectan enlaces fosfatos (datos no mostrados). Luego la muestra se analizó usando SEC-MALLS poniendo en evidencia la existencia de, al menos, dos tipos de polisacáridos y una fracción proteica (Figura 3.6).

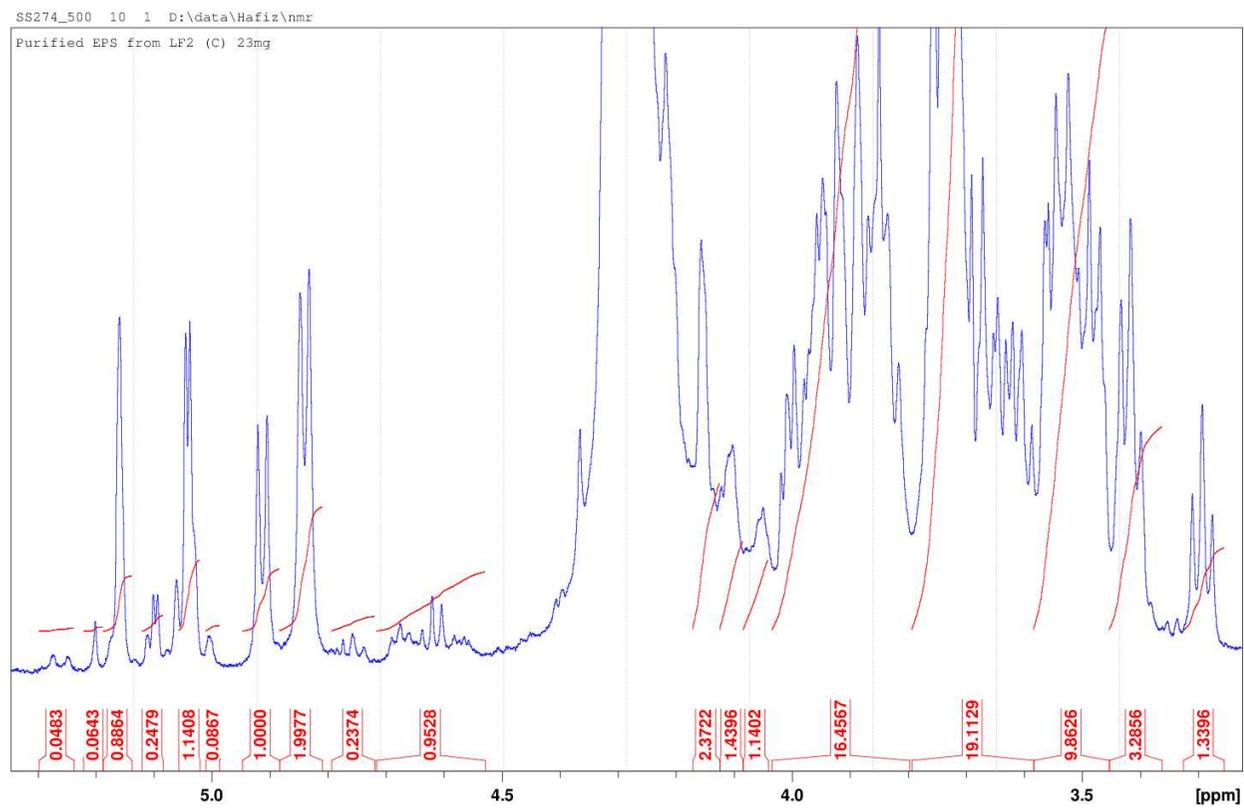


Figura 3. 5. Análisis de ^1H -RMN para el extracto de EPS purificado.

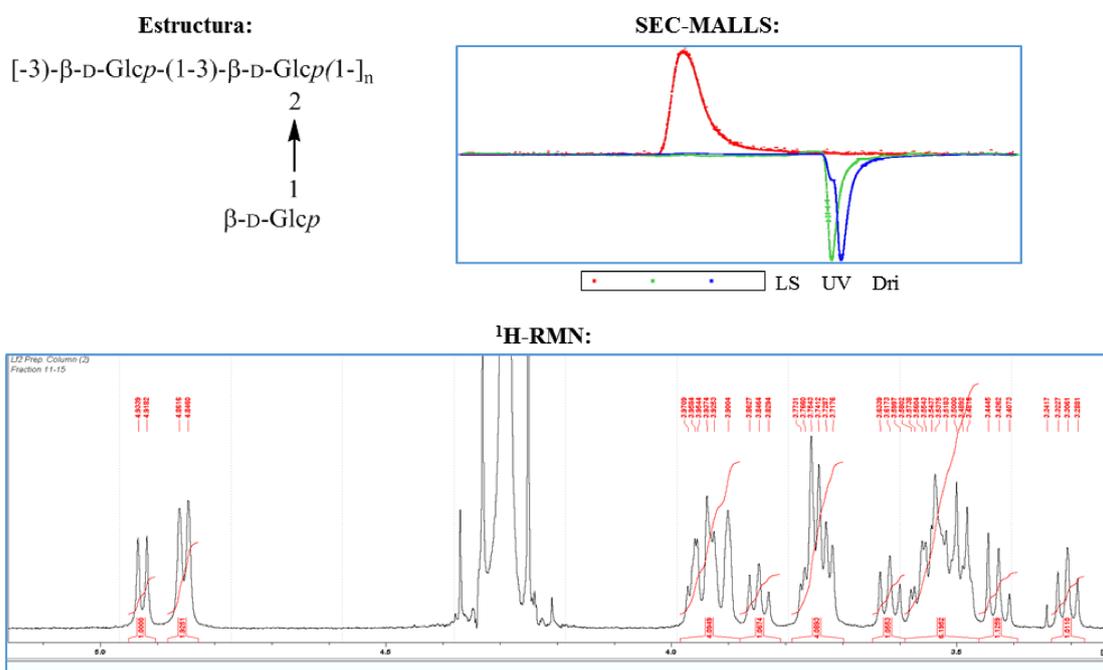
La cromatografía de exclusión por tamaño preparativa permitió separar la muestra en dos fracciones:

(A) una fracción relativamente pura de elevado PM ($1,8 \times 10^3$ kDa, EPS1) con una baja polidispersidad (1,15). El análisis de RMN protón-1D (Figura 3.6 A) indicó tres protones anoméricos. Los análisis de la composición monomérica y de enlaces están de acuerdo con la siguiente estructura propuesta para este polisacárido: un β -glucano que contiene una glucosa terminal, una glucosa unida mediante enlaces 1,3 y una glucosa unida mediante enlaces 1,2,3.

(B) una mezcla de materiales con un componente que domina la mezcla: un polisacárido de PM medio, y que en el SEC-MALLS analítico eluyó cerca del contenido de proteína en la muestra. Este polisacárido presentó una masa molecular promedio de, aproximadamente, 90 kDa (EPS2). La proteína no interfirió con el análisis de RMN y se pudo registrar e identificar los picos que surgen del componente principal. La región anomérica indicó que la unidad repetitiva consistió de un disacárido, formado por residuos de galactosa (uniones $\alpha(1,6)$) con una glucosa unida mediante enlaces $\alpha(1,2)$. La estructura para el polisacárido de PM medio se muestra en la Figura 3.6 B.

En resumen, se puede deducir que los análisis por ^1H -RMN y SEC-MALLS confirmaron la existencia de más de un polisacárido presente, habiéndose detectado finalmente 3 polisacáridos en la muestra de EPS purificado, uno de ellos es el EPS1 (Figura 3.6 A) de relativamente alto PM, que corresponde a un HoPS; otro es el HePS de glucosa y galactosa con la estructura detallada en la Figura 3.6 B, de PM medio (EPS2), y hubo evidencia suficiente para confirmar la presencia de un tercer polisacárido (EPS3), de PM medio muy similar al de EPS2, pero cuya estructura no pudo ser caracterizada por estar presente en muy pequeña proporción en comparación con los dos primeros, además de eluir al mismo tiempo que EPS2. En base a estas determinaciones, las proporciones de EPS1, EPS2 y EPS3 resultaron, aproximadamente, 40%, 45% y 15%, respectivamente.

A) EPS1 de alto PM:



B) EPS2 de PM medio:

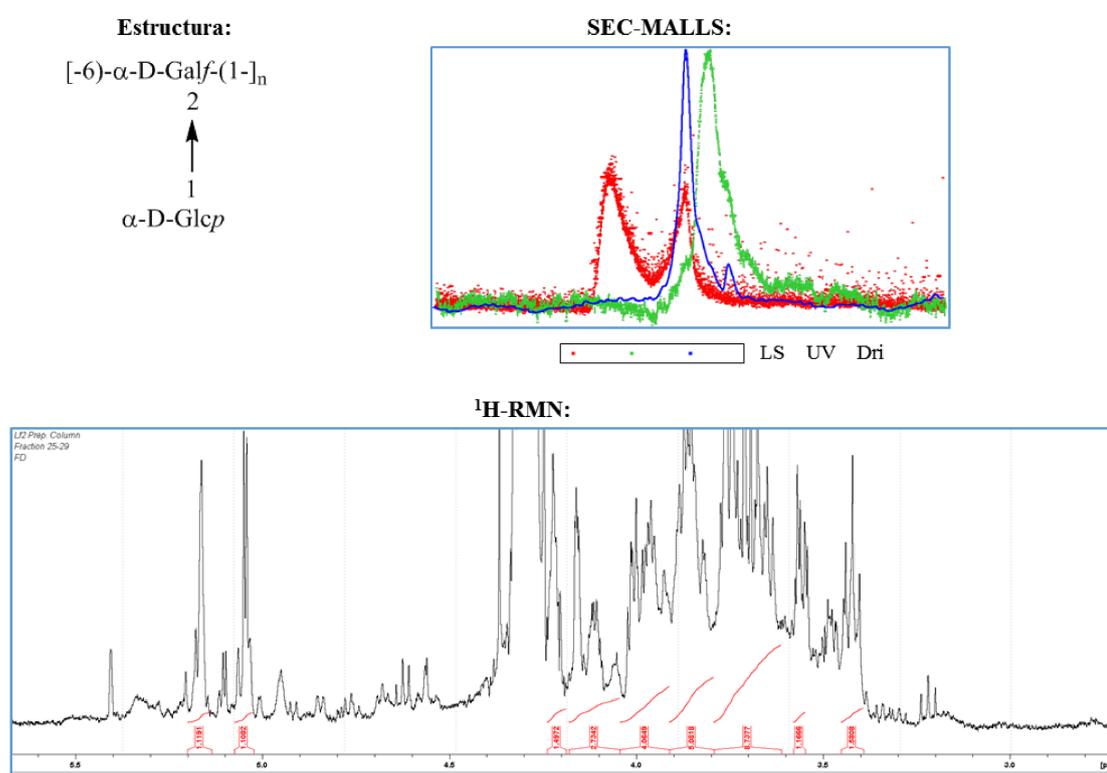


Figura 3. 6. Estructura de la unidad repetitiva, perfil obtenido para el análisis por SEC-MALLS y espectro ¹H-RMN de los polisacáridos de alto (A) y medio (B) PM contenidos en la muestra de EPS purificado. LS: *light Scattering*, Dri: detector de índice de refracción, *p*: piranosa, *f*: furanosa.

Se ha descrito una muy variada composición de numerosos EPS producidos por BAL de distintos géneros y especies. Por ejemplo, se han informado polímeros constituidos exclusivamente de glucosa y galactosa: *L. rhamnosus* C83 produce un EPS de glucosa y galactosa en proporción 1:1 (Gamar y col., 1997) y *S. thermophilus* SFi39 sintetiza un HePS de PM 2×10^3 kDa formado por D-glucosa y D-galactosa en una relación molar de 1:1 (Lemoine y col. (1997)). En otros casos, entre los constituyentes se encuentran otras moléculas: el EPS de *L. acidophilus* LMG 9433 es un heteropolímero cargado, con una composición de D-glucosa, D-galactosa, ácido D-glucurónico y 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa en relaciones molares de 2:1:1:1 (Robijn y col., 1996a); el EPS producido por *L. helveticus* TY1-2 es un heteropolímero de alto PM con residuos de D-glucopiranosilo, D-galactopiranosilo y 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosilo en relación molar 3,0:2,8:0,9 (Yamamoto y col., 1994). El EPS de *S. thermophilus* MR-1C tiene una unidad repetitiva básica compuesta de D-galactosa, L-ramnosa y L-fucosa en una proporción de 5:2:1 (Low y col., 1998); el de *L. paracasei* 34-1 es un heteropolímero compuesto por D-galactosa, 2-acetamido-2-deoxi-D-galactosa y sn-glicerol 3-fosfato en proporciones molares de 3:1:1 (Robijn y col., 1996b); y, finalmente, en el caso de *S. thermophilus* OR 901, se aisló un heteropolímero de suero parcialmente desproteínizado, que presenta residuos de D-galactopiranososa y L-ramnopiranososa en la relación molar 5:2 (Bubb y col., 1997).

Existe evidencia sustancial de producción sincrónica de diversos EPS en ciertos casos. Algunas cepas sintetizan exopolisacáridos que tienen la misma estructura pero diferente PM (Leo y col., 2007). De Vuyst y col. (2003) informaron la producción de un EPS de alto PM ($1,8 \times 10^3$ kDa) y otro EPS de bajo PM ($4,1 \times 10^2$ kDa) por parte de *S. thermophilus* LY03. También se ha reportado la síntesis sincrónica de dos exopolisacáridos de diferentes PM por cepas de *L. rhamnosus* (Pham y col., 2000). Sin embargo, este fenómeno suele asociarse a la hidrólisis catalizada por enzimas, que degradan los productos de alto PM generando moléculas de menor tamaño, de modo que uno (el de mayor tamaño) suele ser el precursor del de menor PM. En el caso de nuestro estudio, los EPS1 y EPS2 de *L. fermentum* Lf2 presentan distintas composiciones y, además, uno es un HoPS y otro un HePS que se biosintetizan mediante mecanismos enzimáticos muy distintos, por lo que se puede asegurar que el segundo, de menor PM, no es un precursor del primero.

En la bibliografía también se ha reportado la síntesis simultánea de HePS y HoPS, como ocurre para *L. johnsonii* FI9785 (Dertli y col., 2013). Esta cepa produce dos EPS, EPS-1 es un α -glucano ramificado con la característica inusual de que cada residuo de la red troncal se encuentra sustituido con una unidad de glucosa en la posición 2 y el EPS-2, que demostró tener

una unidad repetitiva con la siguiente estructura: β -D-Glc-(1-3)- β -D-Glc-(1-5)- β -D-Gal-(1-6)- α -D-Glc-(1-4)- β -D-Gal-(1-4)- β -D-Glc-(1-). En ambos polisacáridos se detectaron sitios ocupados por los siguientes grupos: 1-fosfoglicerol y O-acetilo en EPS-1 y O-acetilo en EPS-2. Por otro lado, Van Dyk y col. (2012) estudiaron la estructura de 3 polisacáridos producidos por una bacteria no láctica, *Bacillus licheniformis* SVD1. Los polisacáridos asociados a las células estaban formados por galactosa, mientras que dos polisacáridos diferentes estaban presentes en el medio extracelular, uno de 2000 kDa (EPS1), que constaba de monómeros de fructosa y se identificó como un levano con enlaces (2,6) y ramificaciones (1,2). El otro polisacárido extracelular (EPS2) estaba constituido por manosa y galactosa y presentó un rango de tamaños variable. Dimopoulou y col. (2014), luego de analizar 50 secuencias genómicas de la especie *Oenococcus oeni*, identificaron 4 *clusters* involucrados en la síntesis de EPS. En su trabajo pudieron distinguir varias vías biosintéticas: una relacionada a la producción de HePS compuestos por glucosa, galactosa y ramnosa, principalmente en forma capsular, una vía de síntesis de β -glucano en forma libre y asociado a las células, responsable del fenotipo *ropy* del medio y otra vía de síntesis de un HoPS a partir de sacarosa (α -glucano o β -fructano).

3.4. Conclusiones parciales

En el presente capítulo se pudo dilucidar la composición química y la estructura molecular de dos de los EPS que conforman el extracto de EPS purificado: dos polisacáridos neutros (hasta donde se conoce) ramificados, uno de alto PM compuesto por glucosa (β -glucano) cuya unidad repetitiva es un trisacárido (40%), y otro de PM medio compuesto por glucosa y galactosa (HePS) cuya unidad repetitiva es un disacárido (45%). También se pudieron identificar los enlaces que intervienen en cada EPS, tratándose en ambos casos de uniones relativamente flexibles.

Esta información es sumamente valiosa para relacionar las propiedades funcionales y tecnológicas que se describirán más adelante con la estructura y composición de estos biopolímeros. Se podría sugerir preliminarmente que, como estos EPS mayoritarios se encuentran en proporciones similares (40 y 45%, respectivamente), ambos podrían actuar de manera combinada influyendo sobre las propiedades observadas en los siguientes capítulos. No obstante, también se detectó minoritariamente otro EPS de mediano PM (15%), lo que pone en evidencia la mayor complejidad de este material. Sin embargo, es preciso remarcar que en todas las aplicaciones propuestas se utilizó el extracto crudo, con el objeto de hacer más factible su potencial uso a nivel industrial. Por lo tanto, los resultados obtenidos constituyen en sí mismos

una aproximación importante que servirá para comprender lo que podría estar ocurriendo a nivel molecular en las matrices lácteas analizadas.

*Capítulo 4: Optimización de la producción
de EPS de *L. fermentum* Lf2*

4.1. Introducción

Los EPS producidos por BAL han sido ampliamente utilizados en la industria láctea mediante su producción *in situ*, es decir, usando cepas EPS⁺ como integrantes del fermento iniciador o adjunto en la elaboración de leches fermentadas y quesos, mejorando las propiedades espesantes y gelificantes, además de reducir la sinéresis y mejorar las propiedades reológicas en yogur (Dabour y col., 2006; Zisu y Shah, 2005). Sin embargo, el bajo rendimiento que producen las BAL (80-600 mg/L; Cerning, 1995; Ruas-Madiedo y col., 2002) limita su uso para fines comerciales. Existen en el mercado dos EPS que se aplican a nivel industrial: el xantano producido por *Xanthomonas campestris*, y la goma gellan producida por *Sphingomonas paucimobilis*, cuyos rendimientos resultan muy superiores a los observados para BAL, oscilando entre 14-30 g/L (García-Ochoa y col., 2000; Pinches y Pallent, 1986; Shu y Yang, 1990) y entre 6 y 36 g/L (Bajaj y col., 2007), respectivamente.

Se sabe que el rendimiento en la producción, la estructura y las propiedades reológicas (como la viscosidad) de los EPS bacterianos varían, en algunos casos significativamente, con factores externos como la composición del medio de cultivo y las condiciones de desarrollo (Petry y col., 2000; Vaningelgem y col., 2004). El medio comercial MRS, rutinariamente utilizado para el desarrollo de lactobacilos en condiciones de laboratorio, contiene en su formulación numerosos componentes (extracto de carne, extracto de levadura y peptona) que interfieren en la cuantificación y análisis de los EPS debido, mayoritariamente, a la presencia de mananos provenientes del extracto de levadura y otros compuestos de naturaleza policarbonada (Cerning y col., 1992; Kimmel y Roberts, 1998). Por esta razón, se suele optar por medios semidefinidos, aptos para eliminar dichas interferencias y evaluar la influencia de los componentes en la producción de EPS. Por otro lado, las fuentes de carbono y de nitrógeno utilizadas resultan, en muchas ocasiones, variables importantes y determinantes tanto de la composición como del rendimiento del EPS (Bryan y col., 1986; Wu y col., 2008). Todas estas razones hablan de la relevancia del estudio de las condiciones experimentales óptimas, que favorezcan tanto el desarrollo de la cepa como la síntesis del EPS, con el objetivo de maximizar la producción de cada EPS en particular, minimizando las interferencias.

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos y los estudios previos sobre la cepa *L. fermentum* Lf2, y en base al elevado rendimiento de su EPS en condiciones no optimizadas, se planteó la necesidad de optimizar su producción a escala laboratorio. Para ello, se aplicó un diseño experimental utilizando un medio semidefinido y se seleccionaron como variables a modificar aquellos factores que presentan mayor influencia en la producción de este metabolito de acuerdo a estudios publicados para cepas de *L. fermentum* y de otras especies bacterianas:

fuente de nitrógeno, fuente de carbono, pH y tiempo de desarrollo.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Cepa, medio y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa *L. fermentum* Lf2, seleccionada entre las cepas autóctonas estudiadas por ser la que mayor rendimiento de EPS crudo (~0,8 g/L) evidenció en condiciones no optimizadas. Los cultivos frescos se realizaron con inóculos al 2% (v/v) y se prepararon rutinariamente en caldo MRS (Biokar) en aerobiosis, con incubación a 37°C. Los recuentos de células viables se realizaron en agar MRS (48 h, 37°C, aerobiosis).

4.2.2. Desarrollo para la producción de EPS

Para la producción de EPS se usó un caldo semidefinido (SDM), cuya base es el MRS (preparado a partir de los componentes individuales) en el que se reemplazaron el extracto de carne, el extracto de levadura y la peptona proteosa por base nitrogenada de levadura y Bacto Casitona (ambos de Difco), de modo de reducir las interferencias que aportan estos componentes del MRS (especialmente, mananos) durante la extracción de EPS (Kimmel y Roberts, 1998). En una primera etapa, utilizando glucosa (2% m/v) como fuente de carbono, se analizó el efecto de las tres fuentes nitrogenadas de este medio: Bacto Casitona, base nitrogenada de levadura y citrato de amonio, variando su contenido en función de un diseño de mezclas D-Optimal con duplicado en el punto central. Los puntos experimentales y la composición derivada de este diseño para cada uno de ellos se muestran en la Figura 4.1 y en la Tabla 4.1, respectivamente. La proporción total de fuente nitrogenada fue 1,7% (m/v) para todos los puntos experimentales, valor que se obtiene al sumar los porcentajes de las tres fuentes en el medio SDM sin modificar (compuesto por 0,5% m/v de base nitrogenada de levadura, 1% m/v de Bacto Casitona y 0,2% m/v de citrato de amonio). Estos mismos puntos experimentales se ensayaron también utilizando sacarosa al 2% (m/v) como fuente de C, ya que en estudios preliminares se observó que la cepa producía cantidades elevadas de EPS crudo con este azúcar (tanto en caldo como en agar MRS).

En cada condición estudiada, el medio se inoculó con un cultivo *o.n.* (18 h) de la cepa en estudio (0,1 % v/v), empleando un biofermentador de 2 L Sartorius Biostat A plus a 30°C por 72 h, con una agitación de 6 g y burbujeo de CO₂ a 0,2 L/min., manteniendo el pH constante en un valor de 6,0, mediante el agregado automático de NaOH 8 M estéril. Cada experiencia se realizó en un volumen final de 1 L de caldo. El diseño experimental se llevó a cabo gracias a la colaboración de la Dra. Luciana Vera Candioti de la cátedra de Bromatología (FBCB, UNL).

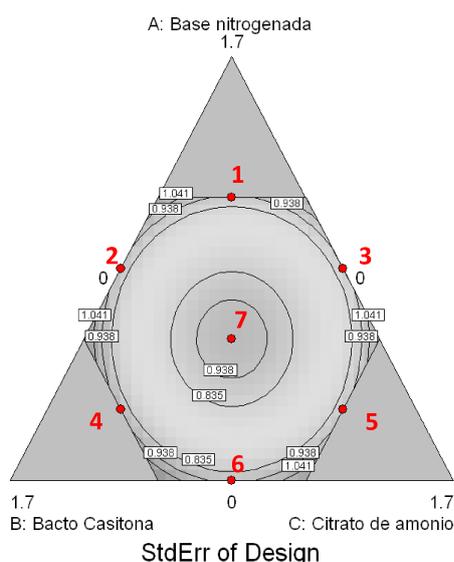


Figura 4. 1. Distribución de puntos experimentales (puntos rojos) obtenidos mediante el Diseño D-Optimal para las diferentes fuentes nitrogenadas del medio SDM: Base nitrogenada de levadura, Bacto Casitona y citrato de amonio. Este mismo diseño se aplicó para ambas fuentes de C evaluadas: glucosa y sacarosa (2% m/v). En rojo se señalan los puntos experimentales.

Tabla 4. 1. Composición de los medios de cultivo según el diseño D-Optimal.

Fuente de Carbono: Glucosa o sacarosa 2% (m/v)			
Experimento	% (m/v) Base nitrogenada de levadura	% (m/v) Bacto Casitona	% (m/v) Citrato de amonio
1	1,133	0,283	0,283
2	0,850	0,850	0,000
3	0,850	0,000	0,850
4	0,283	1,133	0,283
5	0,283	0,283	1,133
6	0,000	0,850	0,850
7	0,567	0,567	0,567

4.2.3. Extracción de EPS

Se tomaron muestras de 200 mL a las 48 y 72 h de desarrollo y se realizaron recuentos para estudiar la viabilidad celular. El extracto crudo de EPS se preparó como se indicó en el capítulo 2. Paralelamente, se realizó este mismo procedimiento a partir de 100 mL de cada medio de cultivo sin inocular, con el fin de obtener blancos para cada punto experimental, y

descontar al rendimiento final las posibles interferencias inespecíficas que pueda aportar el medio y que precipitan junto con el EPS crudo.

4.2.4. Tratamiento estadístico de datos

Los diseños experimentales y su análisis estadístico se realizaron con la versión gratuita de prueba del programa Design Expert 8.0.5.

4.3. Resultados y discusión

Los resultados obtenidos para los recuentos celulares de los puntos experimentales cuando se usó glucosa como fuente de carbono se muestran en la Figura 4.2. Para cada una de las experiencias se partió de un inóculo inicial de, aproximadamente, 2×10^6 UFC/mL. En las condiciones experimentales 1, 2 y 7 se logró el máximo desarrollo de la cepa a las 48 h, alcanzando valores mayores a 1×10^9 UFC/mL. Luego de 72 h de incubación, la viabilidad celular descendió alrededor de un orden logarítmico en estos casos. Para el punto 3 se puede observar que no hubo desarrollo, manteniéndose el recuento celular final similar al inicial, indicando que estas condiciones experimentales (ausencia de Bacto casitona como fuente nitrogenada) no son aptas para el crecimiento de *L. fermentum* Lf2. En cambio, para los puntos 4, 5 y 6 se obtuvieron recuentos a las 72 h mayores que a las 48 h de incubación, siendo el crecimiento más notable en el punto 4 ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL).

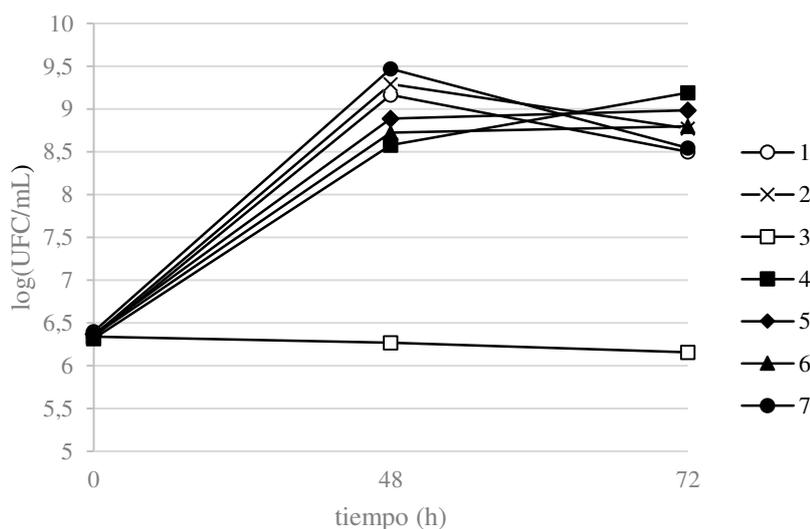


Figura 4. 2. Desarrollo de *L. fermentum* Lf2 para los puntos experimentales (1 al 7, Tabla 4.1) utilizando glucosa 2% (m/v) como fuente de C.

En la Figura 4.3 se pueden observar los rendimientos obtenidos para cada medio de

cultivo analizado, a las 48 y 72 h de incubación.

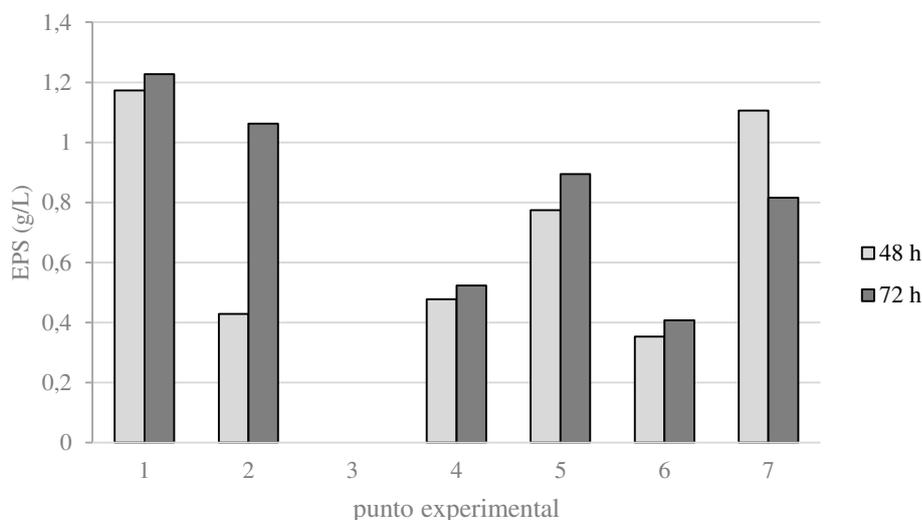


Figura 4. 3. Rendimiento de EPS (g/L) crudo obtenido a las 48 y 72 h de desarrollo de *L. fermentum* Lf2 en cada uno de los puntos experimentales analizados (Tabla 4.1) con glucosa al 2% (m/v) como fuente de C.

Se observa que, cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono, la mayor producción del EPS se obtuvo con la combinación de las tres fuentes nitrogenadas propuesta por el punto 1 del diseño D-Optimal, mostrando un valor aproximado a 1,2 g/L. Por otra parte, en la condición experimental 3, como la cepa no fue capaz de desarrollarse, el rendimiento de EPS fue nulo. Cabe destacar que en este punto experimental la proporción de Bacto Casitona es nula, poniendo en evidencia que este componente desempeñaría un rol crucial y limitante en el crecimiento bacteriano y, en consecuencia, en la producción de EPS. Un punto experimental interesante, en el que se observó un buen rendimiento (1,11 y 0,82 g/L a las 48 y 72 h, respectivamente) fue aquel de las condiciones experimentales centrales (punto 7, igual proporción de las tres fuentes nitrogenadas).

Los datos experimentales correspondientes a la producción de EPS a las 48 (R1) y 72 h (R2) fueron ajustados con modelos polinomiales mediante el *software* Design Expert. Los coeficientes se obtuvieron por regresión múltiple con eliminación *backward* y fueron validados por un análisis de varianza (ANOVA). La producción de EPS a las 48 h se ajustó con un modelo lineal con interacciones dobles y triples (ecuación 1) y la producción de EPS a las 72 h se ajustó con un modelo lineal (ecuación 2). Estos modelos son los que mejor explican el comportamiento de los datos, obteniendo un valor de probabilidad del modelo de 0,0072 para R1 y 0,0043 para R2, y un R^2 ajustado de 0,999 y de 0,9650 para R1 y R2, respectivamente.

$$\text{Producción de EPS 48 h} = 1,19 \times BN - 0,25 \times BC + 0,64 \times Cit - 0,27 \times BN \times BC - 2,14 \times BN \times Cit + 5,37 \times BN \times BC \times Cit$$

ecuación 1

$$\text{Producción de EPS 72 h} = 0,94 \times BN - 0,04 \times BC + 0,51 \times Cit$$

ecuación 2

Siendo: *BN* la base nitrogenada, *BC* la Bacto Casitona y *Cit* el citrato (expresados como concentración, % m/v).

En las ecuaciones de ajuste, los coeficientes de los factores indican la significancia que ejerce la variable sobre la respuesta. Por este motivo, y para ambas respuestas, se concluye que la concentración de base nitrogenada (*BN*) es el factor individual que más afecta la producción de EPS, donde su incremento se traduce en un aumento de producción, dado que su signo en la ecuación es positivo. En segundo lugar, se encuentra la concentración del citrato (*Cit*) y, por último, la de Bacto Casitona (*BC*).

Se puede observar que para R1, una elevada proporción de Bacto Casitona se traduce en una disminución en el rendimiento de EPS, dado que su signo en la ecuación es negativo y para la R2 el coeficiente tiene poco peso (0,04). Teniendo en cuenta sólo estos términos en las ecuaciones, parecería que la Bacto Casitona no contribuye a la formación de EPS. No obstante, se observa para R1 que la interacción entre los tres factores presenta el mayor coeficiente positivo (5,37), indicando que existe una combinación benéfica entre los tres componentes que influye significativamente en la síntesis del EPS. Por lo tanto, la Bacto Casitona no podría ser eliminada de la composición del medio de cultivo sin afectar significativamente la producción de EPS, teniendo en cuenta este modelado. Esta conclusión se correlaciona claramente con las observaciones experimentales cuando se empleó como medio de cultivo el correspondiente al punto experimental 3, en el cual las únicas fuentes nitrogenadas son la base nitrogenada de levadura y el citrato de amonio, en ausencia de Bacto Casitona. En ese punto experimental la bacteria no creció y, consecuentemente, no sintetizó EPS, por lo que se puede confirmar que la presencia de este componente como fuente nitrogenada es fundamental, así sea en baja concentración, para lograr el desarrollo bacteriano y una mayor producción de EPS en los medios evaluados con glucosa.

Finalmente, en la etapa de optimización propiamente dicha, se concluye que la combinación de factores que maximizan la producción de EPS a las 48 h son: 0,656 % de BN,

0,217 % de Bacto Casitona y 0,126 % de Citrato, con una producción de 1,22 g/L de EPS. Para maximizar la producción de EPS a las 72 h, la mejor combinación de factores es: 0,647 % de BN, 0,01 % de Bacto Casitona y 0,342 % de citrato (todos en % m/v), con una producción de 1,33 g/L de EPS. La Figura 4.4 muestra la gráfica de contorno de la superficie de respuesta obtenida para la producción de EPS a las 48 h y 72 h.

Dado que se pretende minimizar el tiempo de desarrollo para economizar en el uso de recursos, a los fines prácticos y para estos niveles de producción, se podría considerar adecuado el desarrollo bacteriano durante 48 h, si bien existen diferencias en el rendimiento final entre 48 y 72 h (0,11 g/L, < 10%).

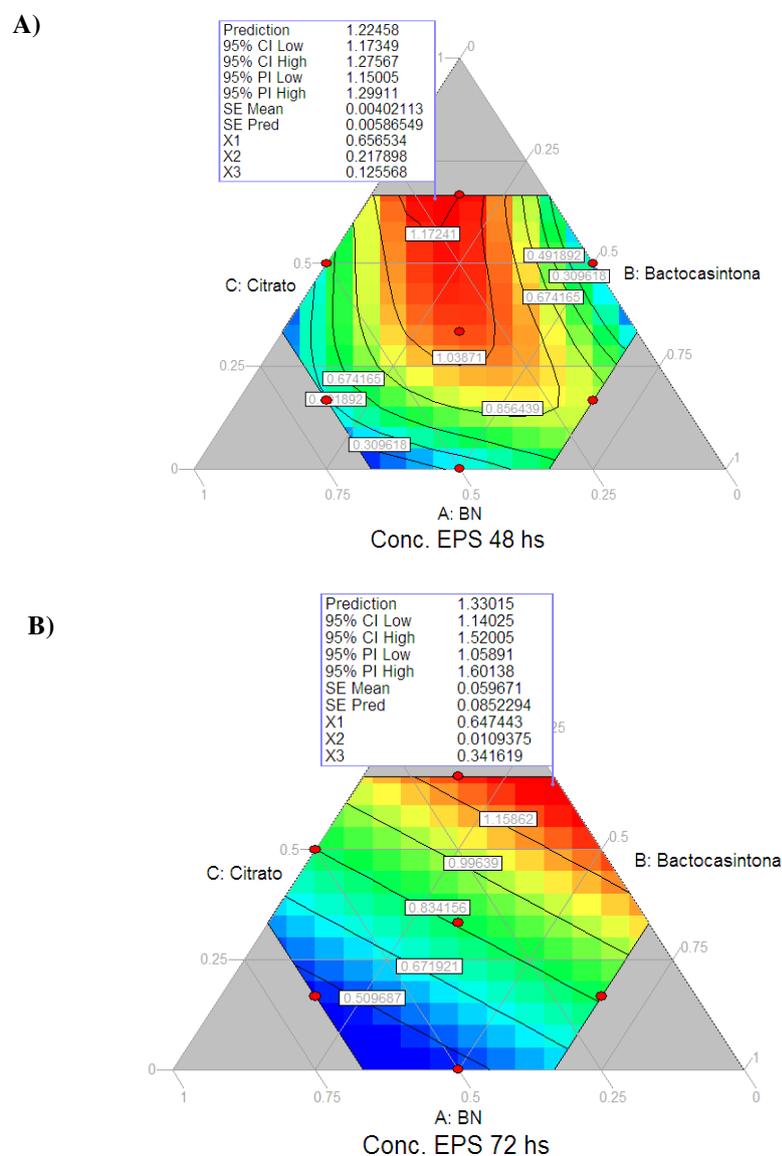


Figura 4. 4. Gráficas de contorno de la superficie de respuesta obtenidas para la producción de EPS de *L. fermentum* Lf2 a las 48 h (A) y 72 h (B) en los puntos experimentales (Tabla 4.1), usando glucosa 2% (m/v) como fuente de C. Los recuadros señalan las condiciones óptimas resultantes en cada caso, siendo X1: base nitrogenada de levadura, X2: Bacto Casitona y X3: citrato de amonio.

Con respecto a la optimización de la producción de EPS con sacarosa como fuente de C, se puede observar que se alcanzó un mayor nivel celular a las 48 h para el punto experimental 2 ($6,2 \times 10^9$ UFC/mL; Figura 4.5), que descendió aproximadamente un orden logarítmico hacia el final del ensayo. En ese punto las concentraciones de base nitrogenada y Bacto Casitona fueron idénticas en ausencia de citrato de amonio, lo que indicaría que este componente no es esencial para el crecimiento de la cepa. En los puntos experimentales 5 y 6, la cepa alcanzó niveles de desarrollo similares entre sí a las 48 h (alrededor de 1×10^9 UFC/mL), como así también los puntos 1, 4 y 7 (5×10^8 UFC/mL, aproximadamente). Al igual que lo observado para los ensayos con glucosa, el punto experimental 3 (ausencia de Bacto Casitona) no proporcionó los nutrientes necesarios para que la cepa se desarrolle adecuadamente.

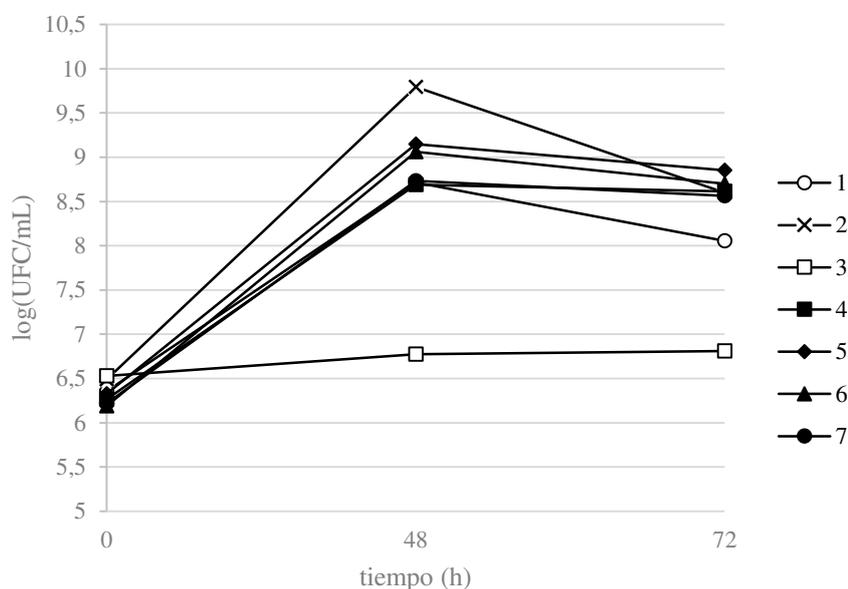


Figura 4. 5. Desarrollo de *L. fermentum* Lf2 para los puntos experimentales (1 al 7, Tabla 4.1) utilizando sacarosa 2% (m/v) como fuente de C.

En la Figura 4.6 se puede observar que, de un modo similar a las condiciones ensayadas con glucosa, la máxima producción de EPS se obtuvo en los puntos experimentales 1 y 7, tanto a las 48 (1,6 g/L, aproximadamente) como a las 72 h (1,8 g/L). Los puntos 3 y 6 fueron los que presentaron rendimientos más bajos y, considerando que el medio 3 no contiene Bacto Casitona y el medio 6 no contiene la base nitrogenada, se puede suponer que la presencia de ambos componentes es de importancia para la producción de EPS cuando la fuente de C es la sacarosa. No se observa una respuesta similar cuando el citrato de amonio está ausente (punto experimental 2), obteniéndose un rendimiento que, si bien no es óptimo, supera al de los puntos 3 y 6. Por otro lado, los puntos 4 y 5 presentaron un comportamiento intermedio, con rendimientos $< 1,5$ g/L.

Debido a que el punto experimental 7 es, desde el punto de vista de los insumos, más económico que el 1 (tiene proporciones iguales de las 3 fuentes nitrogenadas, mientras que el 1 tiene más base nitrogenada, uno de los componentes más costosos del medio de cultivo) se propone, para experiencias futuras, desarrollar la cepa en condiciones cercanas a ese punto, según indica el modelo.

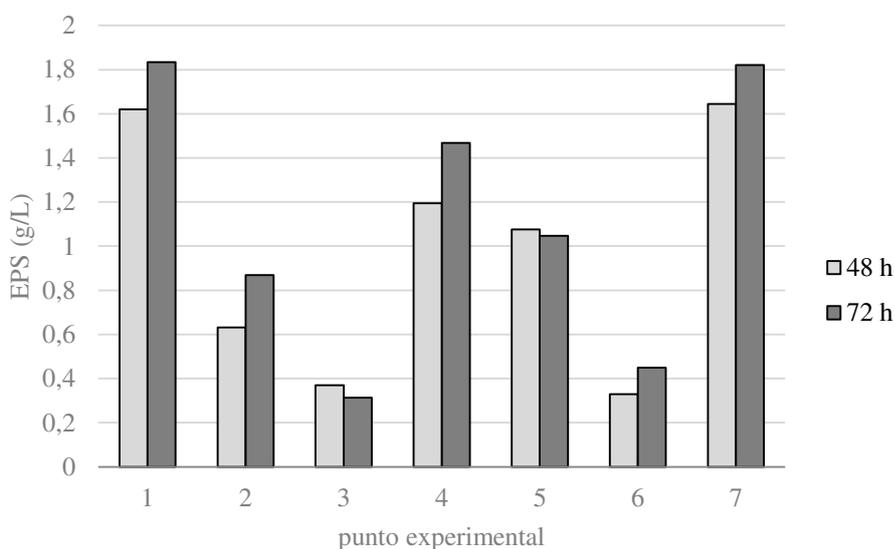


Figura 4. 6. Producción de EPS (g/L) crudo obtenido a las 48 y 72 h de desarrollo de *L. fermentum* Lf2 en cada uno de los puntos experimentales analizados (Tabla 4.1) con sacarosa al 2% (m/v) como fuente de C.

Los datos experimentales correspondientes a la producción de EPS con sacarosa 2 % (m/v) a las 48 (R1) y 72 h (R2) fueron ajustados con modelos polinomiales. Los coeficientes de los factores se obtuvieron por regresión múltiple con eliminación *backward* y fueron validados por un análisis de varianza (ANOVA).

Tanto la producción de EPS a las 48 h como la de 72 h se ajustaron con modelos lineales con interacción triple (ecuaciones 1 y 2).

$$\text{Producción de EPS 48 hs} = 2,69 \text{ BN} + 1,46 \text{ BC} + 1,37 \text{ Cit} + 46,04 \text{ BN BC Cit}$$

ecuación 1

$$\text{Producción de EPS 72 hs} = 3,09 \text{ BN} + 1,86 \text{ BC} + 1,15 \text{ Cit} + 48,91 \text{ BN BC Cit}$$

ecuación 2

Siendo: *BN* la base nitrogenada, *BC* la Bacto Casitona y *Cit* el citrato de amonio (expresados como concentración, % m/v).

Estos modelos son los que mejor explican el comportamiento de los datos, obteniendo un valor de probabilidad del modelo de 0,0266 para R1 y 0,0295 para R2, y un R^2 ajustado de 0,9366 para la R1 y de 0,9319 para la R2.

Se puede observar para ambas respuestas la significancia del coeficiente correspondiente a la interacción triple (coeficientes de 46,04 y 48,91 para R1 y R2, respectivamente).

Finalmente, realizando la optimización propiamente dicha para esta fuente de C, se concluye que la combinación de factores que maximizan la producción de EPS a las 48 h son: 0,636 % de BN, 0,567 % de Bacto Casitona y 0,496 % de Citrato, con una producción de 1,87 g/L de EPS. Para maximizar la producción de EPS a las 72 h, la mejor combinación de factores es: 0,621 % de BN, 0,621 % de Bacto Casitona y 0,458 % de Citrato (todos en % m/v), con una producción de 2,07 g/L de EPS. En la Figura 4.7 se pueden observar las superficies respuestas obtenidas para las 48 h y 72 h de desarrollo, en las que el color rojo indica la región óptima para la síntesis de EPS.

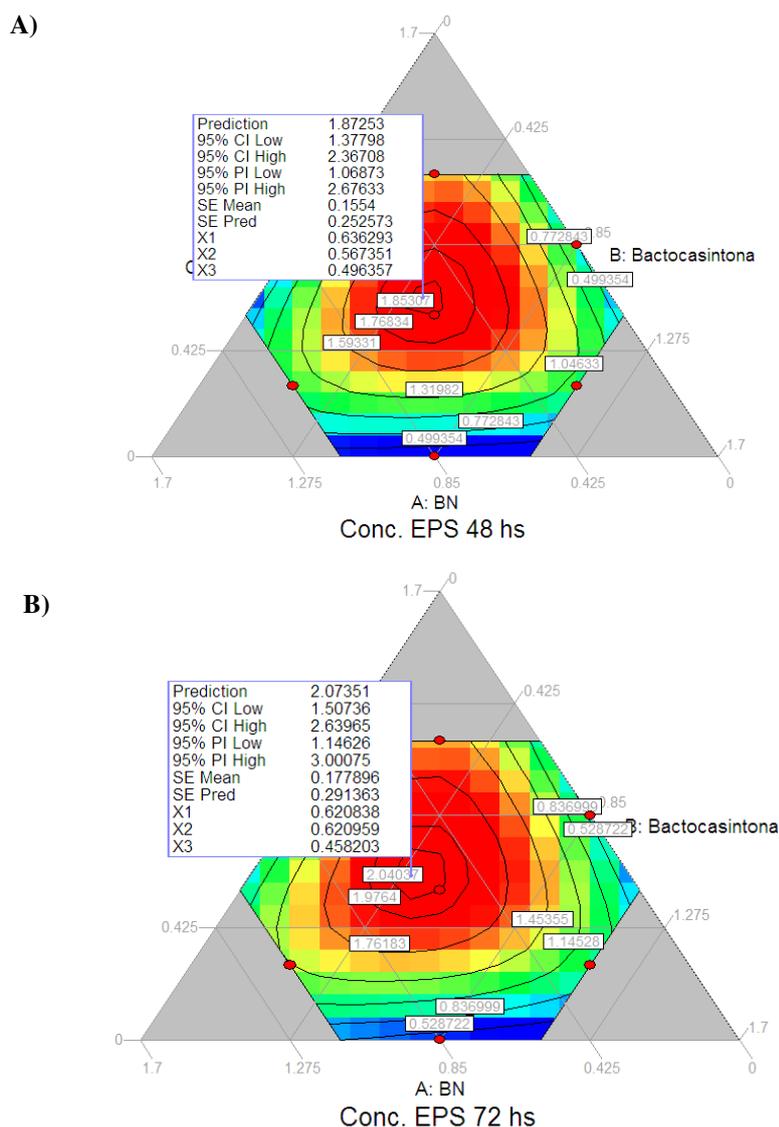


Figura 4. 7. Gráficas de contorno de la superficie de respuesta obtenidas para la producción de EPS de *L. fermentum* Lf2 a las 48 h (A) y 72 h (B) en los puntos experimentales (Tabla 4.1), usando sacarosa (2% m/v) como fuente de C. Los recuadros señalan las condiciones óptimas resultantes de cada caso, siendo X1: base nitrogenada de levadura, X2: Bacto Casitona y X3: citrato de amonio.

Como ya se ha comentado, la producción de EPS sintetizado intracelularmente por BAL de distintas cepas en general es muy variable (entre 0,045 y 0,350 g/L) cuando las bacterias se desarrollan en condiciones no optimizadas (De Vuyst y Degeest, 1999a). Cuando se optimizan las condiciones de cultivo, el rendimiento puede mejorar notablemente (entre 0,150 a 0,600 g/L), dependiendo de la cepa (Cerning, 1995; Cerning, 1990) logrando, en algunos casos particulares, rendimientos mayores a 1 g/L, como en el caso de la cepa *L. sake* O-1 que produce 1,4 g/L de EPS (van den Berg y col., 1995).

Fukuda y col. (2010) observaron que la cepa *L. fermentum* TDS030603 producía 100 mg/L de EPS purificado en MRS. En un trabajo reciente sobre esta misma cepa (Shi y col., 2014) se optimizó su producción en un medio químicamente definido, logrando como máximo rendimiento 199 mg/L (casi el doble) cuando la cepa desarrolló durante 48 h a 30°C, suplementando el medio con 5% (m/v) de glucosa y 1% (m/v) de citrato de amonio y sin control de pH. En el caso de *L. fermentum* Lf2 en las condiciones optimizadas se logró obtener un rendimiento de extracto crudo cercano a 2 g/L, equivalente a, aproximadamente, 400 mg/L de extracto de EPS purificado. Si bien resulta difícil comparar los valores de rendimiento debido a la diversidad de métodos de extracción y cuantificación de EPS, el estudio de esta cepa permitió obtener un rendimiento considerablemente superior a lo informado para otras cepas de esta especie bacteriana y BAL, en general.

Cerning y col. (1994) estudiaron el efecto de distintas fuentes carbonadas (galactosa, glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa y melibiosa) variando sus concentraciones (2, 5, 10 y 20 g/L) en un medio basal mínimo sobre la producción de EPS de *L. casei* CG11. La lactosa y galactosa fueron las fuentes de C que menos impactaron en la producción de EPS, siendo la glucosa el azúcar que afectó más eficientemente su síntesis. Para todos los azúcares, la producción de EPS aumentó con el incremento de la concentración utilizada, alcanzando un máximo de 160 mg/L con glucosa al 2% m/v (método de Dubois, Dubois y col., 1956). Mozzi y col. (1996) estudiaron las condiciones óptimas para la producción de EPS de *L. casei* CRL 87 a pH constante, encontrando la máxima producción del polímero (488 mg/L) para un recuento celular de $2,4 \times 10^{10}$ UFC/mL a pH 6 y a 30°C durante 24 h.

Por otro lado, en algunos casos es importante considerar la relación entre las fuentes de C y N, estudio que se abordó para *S. thermophilus* LY03 (Degeest y de Vuyst, 1999), una cepa de yogur capaz de producir EPS en MRS y leche. En ese trabajo se determinó que el EPS estaba conformado por dos polisacáridos de igual composición monomérica (galactosa y glucosa en relación 4:1) pero de distinto PM, uno de alto ($1,8 \times 10^3$ kDa) y otro de bajo PM (410 kDa). La proporción en que ambos EPS se sintetizan depende fuertemente de la relación C/N del medio de desarrollo. Al aumentar las concentraciones de fuentes nitrogenadas (desde 1,4 a 7,0% m/v), se favorecía la producción del EPS de bajo PM, mientras que al aumentar la concentración inicial de fuente nitrogenada a 4,2 % (m/v) en cultivos en MRS a 42°C y pH 6,2, obtuvieron como máximo rendimiento 1,2 g EPS/L (más del doble que la obtenida para 1,4% m/v), observando un descenso en el rendimiento para concentraciones mayores. Esto evidencia que, al incrementar la concentración de fuentes nitrogenadas, la producción de EPS también aumenta hasta un valor máximo, luego del cual comienza a descender. En nuestro caso, el diseño

experimental se planteó manteniendo la proporción total de fuentes nitrogenadas constante (1,7% m/v), y sólo se variaron las proporciones relativas de las 3 fuentes que componen el medio SDM, observándose modificaciones en el rendimiento de acuerdo a la mayor o menor proporción de cada una de ellas.

Kimmel y col. (1998) optimizaron la producción de EPS de la cepa *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR en el medio semidefinido (SDM) empleado en esta Tesis, mediante curvas de superficie de respuesta y aplicando un diseño experimental cuadrático en el que los factores a estudiar fueron temperatura (35 a 45°C), pH (4 a 6) y concentración de Bacto Casitona (10 a 30 g/L), desarrollando la cepa en cada condición hasta consumir el 90% de la glucosa. Las condiciones óptimas encontradas fueron 38°C, pH 5, y 30 g/L de Bacto Casitona, con un rendimiento de 295 mg de EPS/L según el valor predicho por el modelo. El valor experimental en esas condiciones fue de 354 mg/L, valor que se encontraba dentro del intervalo de confianza del modelo aplicado. Es importante aclarar que en este modelo no se mantuvo constante la proporción total de las fuentes nitrogenadas del medio, a diferencia del elegido para el presente trabajo de Tesis. Se debe destacar también que en este estudio se utilizó otro método para la extracción y cuantificación de EPS. Nuevamente, se puede apreciar el impacto que tiene la concentración de la fuente nitrogenada sobre la producción de EPS.

En otro trabajo se optimizó la producción de EPS de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 (Looijesteijn y Hugenholtz, 1999), que fue máxima (520 mg/L) con glucosa como sustrato, a pH 5,8 y 25°C. En este caso se utilizó un medio químicamente definido y se evaluó un rango de pH entre 5,3 y 6,8 y distintas fuentes de C: fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, manosa y N-acetilglucosamina, en un rango de temperatura muy amplio (15°C a 35°C). Como en nuestro estudio, la concentración obtenida a la temperatura óptima de crecimiento fue menor que a temperaturas subóptimas (*L. fermentum* Lf2 crece óptimamente a 37°C y *Lc. lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 a 30°C). Numerosos trabajos han reportado que las temperaturas subóptimas inducen la formación de EPS (Cerning y col., 1992; Gamar y col., 1997; Kontusaari y Forsén, 1988). La hipótesis para justificar esta respuesta se basa en que el hecho que, para ciertas bacterias Gram-negativas, las células en crecimiento lento biosintetizan polímeros de la pared celular mucho más lentamente que en condiciones óptimas, dejando disponibles *carriers* lipídicos isoprenoides para la síntesis de EPS (Sutherland, 1972). Sin embargo, muchos investigadores encontraron mejores rendimientos en la producción de EPS a temperaturas de incubación óptimas (Mozzi y col., 1995) y en condiciones óptimas de pH (Grobben y col., 1998; Mozzi y col., 1994). Se ha visto que, en general, los mejores rendimientos en la producción de

EPS fueron obtenidos a bajas concentraciones de oxígeno o bien, en anaerobiosis (De Vuyst y col., 1998; van den Berg y col., 1995).

En general se ha establecido que, mientras que las cepas mesófilas parecen producir las máximas cantidades de EPS bajo condiciones subóptimas de desarrollo, como son bajas temperaturas, la producción de EPS en las BAL termófilas parece estar asociada a las condiciones óptimas de crecimiento (De Vuyst y Degeest, 1999a). En este último caso, la biosíntesis de EPS generalmente comienza casi simultáneamente con el desarrollo bacteriano y muestra una máxima velocidad cuando el cultivo está en su fase exponencial, alcanzando la máxima producción hacia el final del crecimiento activo (Abbad y col., 1995; Kimmel y col., 1998). Otros investigadores observaron una producción de EPS continua más allá o sólo en la fase de crecimiento estacionaria (Gancel y Novel, 1994; Kojic y col., 1992). Torino y col. (2001) estudiaron la producción de EPS de la cepa *L. helveticus* ATCC 15807 en leche descremada reconstituida, durante 60 h y en tres condiciones de pH (4,5, 5,0 y 6,2) a 37°C. En este caso, la producción de EPS se cuantificó con el método con fenol/ácido sulfúrico (Dubois y col., 1956). Estos autores informaron que el microorganismo cambió de un metabolismo homofermentativo a uno heterofermentativo, produciendo acetato a pH 5 y 6,2, y acetato y succinato a pH 4,5. El EPS presentó un PM de entre 10²-10³ kDa y estaba compuesto por fosfato, ramnosa, glucosa y galactosa. Las proporciones de estos últimos dos variaban según el pH del cultivo y el mayor rendimiento de EPS resultó 549 mg/L a pH 5,0, y el menor, 49 mg/L a pH 6,2.

En un trabajo posterior (Torino y col., 2005), esta misma cepa se desarrolló durante 30 h en un medio basal a pH controlado, usando glucosa o lactosa como fuente de C. Los autores observaron al emplear lactosa como fuente de energía, una mayor síntesis de EPS (método Dubois) a pH 4,5 (280 mg/L) que a pH 6,2 (97 mg/L). Al usar glucosa, el rendimiento fue aún menor, relacionando esta respuesta con las actividades de las enzimas α -fosfoglucomutasa y galactosa-1-P-uridiltransferasa, necesarias para sintetizar UDP-glucosa y UDP-galactosa (monómeros para la síntesis del EPS). Encontraron que, a pesar de observar diferencias en la producción de EPS al usar glucosa o lactosa, la composición monomérica del polímero no se modificó con la fuente de C utilizada (glucosa y galactosa, 2:1).

Zisu y Shah (2003) describieron los efectos del pH, temperatura y el suplemento de concentrado de proteínas de suero (WPC) sobre la producción de EPS de la cepa *S. thermophilus* 1275. El medio utilizado fue LDR al 10%, con desarrollo durante 24 h a distintos pH (4,5, 5,5 y 6,5) y temperaturas (30, 37, 40, y 42°C). Las condiciones óptimas encontradas fueron pH 5,5 y 40°C, con una producción de 458 mg/L. Este rendimiento mejoró al agregar

WPC (0,5% m/v), logrando un valor de 1029 mg/L de EPS a 37°C y a pH 5,5, evidenciando un impacto significativo cuando la leche se suplementa con una fuente nitrogenada.

Con respecto al pH, y al igual que en nuestro trabajo, se encontró que el óptimo generalmente es cercano a pH 6,0 (Degeest y De Vuyst, 1999; Grobбен y col., 1998). Se ha demostrado que la producción de EPS en cultivos con control de pH es significativamente mayor que en cultivos acidificados, y el efecto del ajuste de esta variable suele tener aún más influencia que el suplemento de nutrientes (Grobбен y col., 1995; Mozzi y col., 1996). La hipótesis que se plantea sobre la menor producción de EPS para cultivos a pH libre o ligeramente ácidos se basa en la degradación de los polisacáridos por la acción de enzimas glicosilhidrolasas, cuya actividad es óptima a pH inferior a 5 (Cerning y col., 1992; De Vuyst y col., 1998; Gancel y Novel, 1994; Gassem y col., 1997). Sin embargo, la reducción en el rendimiento luego de fermentaciones prolongadas parece ser dependiente de la cepa y de las condiciones químicas y físicas de cultivo (temperatura, pH, composición del medio, entre otras) (Mozzi y col., 1995; 1994). Extraer el EPS en el momento adecuado y bajo las condiciones de pH y temperatura apropiadas durante el proceso podría evitar este problema (De Vuyst y Degeest, 1999a). En nuestro caso, se ha podido purificar y analizar la estructura del EPS de *L. fermentum* Lf2 a partir de cultivos de 72 h (a pH 6 y 30°C) sin inconvenientes, posiblemente debido a la constancia de pH.

4.4. Conclusiones parciales

Analizando los resultados en su conjunto, la producción del EPS crudo de *L. fermentum* Lf2 ha resultado óptima a pH 6 controlado, 30 °C, ensayando diferentes proporciones de las 3 fuentes nitrogenadas (base nitrogenada, el citrato de amonio y la Bacto Casitona) y 2 fuentes de C diferentes (glucosa y sacarosa). Se obtuvieron como rendimientos máximos 1,87 y 2,07 g/L a las 48 y 72 h, respectivamente, utilizando sacarosa como fuente de C. Se concluye que los efectos que tienen mayor peso sobre la producción fueron, en las condiciones evaluadas, base nitrogenada, Bacto Casitona y citrato de amonio cuando se usó sacarosa como fuente de C, y la interacción triple de estos factores también parece tener un papel importante en dicha producción.

Por otro lado, estos resultados se pueden correlacionar con los informados en el capítulo 3 sobre la caracterización molecular y estructural del extracto de EPS de *L. fermentum* Lf2. Se ha podido verificar que la cepa produce, al menos, dos EPS: un HoPS y un HePS en proporciones similares (40 y 45%, respectivamente). Muy probablemente, al utilizar sacarosa como fuente de C se vea favorecida la síntesis del HoPS, ya que para los glucanos sólo se

necesita la actividad de sacarosas, sin necesidad de disponer de azúcares activados. Estas enzimas son capaces de utilizar la energía del enlace glucosídico para catalizar la transferencia del residuo al glucano en formación, teniendo este proceso entonces menores requerimientos energéticos para la bacteria que los involucrados en la síntesis de HePs (como se mencionó en el capítulo 1). Esta hipótesis se estudiará en un futuro muy cercano, a la hora de analizar la estructura y proporción de los EPS producidos en las condiciones optimizadas.

De este modo, para la etapa de optimización propiamente dicha (en realización en la actualidad) se seleccionaron 48 h de incubación, sacarosa como fuente de C, manteniendo constantes las proporciones de las fuentes nitrogenadas determinadas como óptimas según el modelo ya descrito, y analizando otras variables, como pH (rango variable entre 5 y 7) y proporción de fuente de sacarosa (rango de 10 a 80 g/L). Para esta etapa final se aplicará un diseño experimental central compuesto con triplicado en el punto central, y finalmente, se pretende analizar la estructura y composición química (mediante estudios de RMN, SEC-MALLS, GC-MS, HPLC) del EPS producido bajo las condiciones óptimas. Estos resultados se compararán con aquellos de estructura y composición química del EPS sintetizado en condiciones no optimizadas, a los fines de poner en evidencia cómo las condiciones de desarrollo de *L. fermentum* Lf2 afectan la síntesis del EPS.

*Capítulo 5: Caracterización tecnológica de
yogur y queso Cheddar adicionados con
extracto de EPS producido por *L. fermentum**

Lf2

5.1. Introducción

En la elaboración de yogures, dos parámetros de calidad muy importantes son la apariencia y características finales del producto. Una calidad óptima está asociada a yogures de textura y sabor suaves, sin signos de sinéresis. Los yogures firmes con una pronunciada liberación de suero son considerados de baja calidad, aunque se trate de un fenómeno natural, propio de este tipo de fermentaciones. Convencionalmente, la sinéresis se reduce incrementando el nivel total de sólidos, ya sea con el agregado de ingredientes lácteos o estabilizantes (Tamime y Deeth, 1980), lo que incrementa (en ciertos casos, significativamente) los costos de producción. Asimismo, la adición de estabilizantes como gelatina, almidones modificados o gomas afecta negativamente la percepción por parte de los consumidores. En la última década, a partir de esta necesidad por mejorar la calidad de los yogures con el mínimo agregado de aditivos, ha surgido la tendencia a incorporar cultivos *starter* productores de EPS, ya sea capsulares o *ropy*. De esta manera, el EPS se sintetiza *in situ* durante la fermentación, afectando ciertos atributos por sus propiedades espesantes, impactando positivamente en la calidad del producto final. Amatayakul y col. (2006a) estudiaron el efecto de cultivos *starter ropy* o productores de EPS capsulares (de la especie *S. thermophilus*) y observaron que los cultivos *ropy* redujeron la sinéresis y firmeza de los yogures firmes. Por otro lado, Hassan y col. (2003) también utilizaron una cepa de *S. thermophilus* productora de EPS para la elaboración de yogur, y encontraron que estos yogures presentaron coeficientes de consistencia aumentados en relación a yogures control, lo que pondría en evidencia su poder o capacidad estabilizante. Marshall y Rawson (1999) compararon las propiedades sensoriales y reológicas de yogures elaborados con cultivos comerciales productores y no productores de EPS. Según sus resultados, no necesariamente la concentración final de EPS afecta directamente dichas propiedades, sino que la naturaleza del EPS y sus interacciones en la matriz en la que se encuentra son las principales responsables del efecto final logrado. Han y col. (2016) compararon las propiedades sensoriales y de textura de yogures elaborados con una cepa de *S. thermophilus* productora de EPS, siendo las mismas más satisfactorias que las observadas en yogures elaborados con cultivos *starter* EPS⁻ en relación a la disminución de la sinéresis.

Por otro lado, en el caso de ciertos quesos con bajo contenido graso, la reducción de lípidos siempre va asociada a la presencia de defectos de sabor y textura, que suele tornarse gomosa, seca y granulosa. Un modelo muy estudiado ha sido el de los quesos Cheddar reducidos en grasa, para los cuales tradicionalmente se busca minimizar tales defectos mediante el agregado de sustancias no grasas que aporten humedad y mejoren la textura. Ciertos estabilizantes, como las carrageninas, aumentan la capacidad de retener agua y la fuerza del gel

(Ma y col., 1997). Sin embargo, frente a la creciente demanda de productos con aditivos novedosos, una alternativa interesante, similar a la planteada para el caso de los yogures, es utilizar cepas EPS⁺ en la elaboración de distintas variedades de quesos donde, al producirse *in situ* el EPS, el polímero pueda actuar beneficiosamente como sustituto de materia grasa, otorgando una textura agradable y húmeda similar a los quesos elaborados con leche entera (Hassan y col., 2005). Por ejemplo, Dabour y col. (2006) evaluaron el efecto de cepas de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* productoras de EPS *ropy* y capsulares sobre la textura de quesos Cheddar reducidos en grasas al 50%. Vieron que los quesos con cepas EPS⁺ presentaron humedad y rendimiento caseario aumentados en comparación con los controles reducidos en grasa. Con respecto a la textura, los quesos tratados presentaron firmeza, elasticidad y cohesividad reducidos, pero mayor fragilidad que los controles, efecto que fue menos pronunciado hacia el final de la maduración. Por otro lado, Hassan y col. (2005), al usar una cepa de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* EPS⁺ en queso Cheddar reducido en grasa, detectaron propiedades viscoelásticas similares al queso control no reducido en grasa, lo que podría sugerir el uso de este EPS como sustituto de la grasa láctea. Zisu y Shah (2005) combinaron cultivos productores de EPS con los reemplazantes de grasa adecuados y un tratamiento de preacidificación de la leche, informando que fue posible aumentar el rendimiento de quesos Mozzarella reducidos en grasa, logrando atributos de textura mejorados al compararlos con los quesos reducidos en grasa no tratados y reduciendo asimismo el período de maduración.

A pesar de todos estos antecedentes, no se ha descrito el uso de EPS de BAL como ingredientes alimentarios en matrices lácteas. Como hemos descrito en capítulos anteriores, *L. fermentum* Lf2 produce un extracto EPS en un nivel significativamente mayor (0,8 g/L en condiciones no optimizadas) al reportado para cepas de esta especie bacteriana y de BAL, en general. El elevado rendimiento de EPS producido por esta cepa combinado con la demanda creciente de nuevos ingredientes alimentarios funcionales fueron los principales determinantes de uno de los objetivos de la presente Tesis: aplicar el EPS crudo de *L. fermentum* Lf2 como aditivo en yogures (a escala laboratorio) y queso Cheddar, evaluando los aspectos sensoriales y de textura de los productos finales. Por un lado, se estudiaron las propiedades reológicas y sensoriales de yogures elaborados a escala laboratorio con extracto de EPS de esta cepa; y por otro, se incorporó este extracto a quesos Cheddar a escala piloto, a los fines de evaluar su efecto sobre las propiedades microbiológicas y de textura del queso, como así también estudiar su influencia en la coagulación de la leche, proteólisis primaria y secundaria de este producto.

A los fines de ayudar a comprender el análisis de este capítulo, a continuación se describen brevemente los fundamentos de las metodologías seleccionadas para analizar la textura y características reológicas de los yogures y quesos elaborados.

El análisis de la viscosidad y comportamiento de flujo es fundamental para matrices lácteas, ya que permite evaluar la interacción de las proteínas de la leche con los EPS bacterianos (Hassan y col., 2003; Rimada y Abraham, 2006).

La reología estudia el flujo y la deformación de un material sometido a esfuerzos externos, que se traduce en mediciones instrumentales. La estructura interna de los materiales es la que determinará los diferentes comportamientos y la reología brinda información sobre ello.

El flujo de un líquido newtoniano viene descrito por la siguiente ecuación (Rao, 2007):

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (\text{ecuación 1})$$

Esto significa que el esfuerzo de corte (τ) es igual al gradiente de velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) multiplicado por una constante, el coeficiente de viscosidad (η). Para líquidos newtonianos la representación de τ vs. $\dot{\gamma}$ es una línea recta que pasa por el origen, donde la pendiente de esta línea viene dada por η . Sin embargo, existen numerosos líquidos, frecuentemente empleados en las industrias alimentarias, en los que esta relación tan simple no se cumple. Suelen tratarse de dispersiones acuosas, suspensiones de sólidos, o emulsiones (Rao, 2007).

Para estos líquidos alimentarios, el coeficiente de viscosidad deja de ser una constante. Por esta razón, en lugar del coeficiente de viscosidad, se usa frecuentemente un “coeficiente de viscosidad aparente”, η_{ap} dado por la siguiente ecuación:

$$\eta_{ap} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (\text{ecuación 2})$$

Al no cumplir con la ecuación 1, a estos líquidos se les denomina líquidos no newtonianos. Así, los diferentes comportamientos de flujo posibles son: dilatante, pseudoplástico, plástico de Bingham y tipo Herschel Bulckley. Las curvas de flujo representativas de estos fluidos se muestran junto a la curva de flujo correspondiente a un fluido newtoniano en la Figura 5.1.

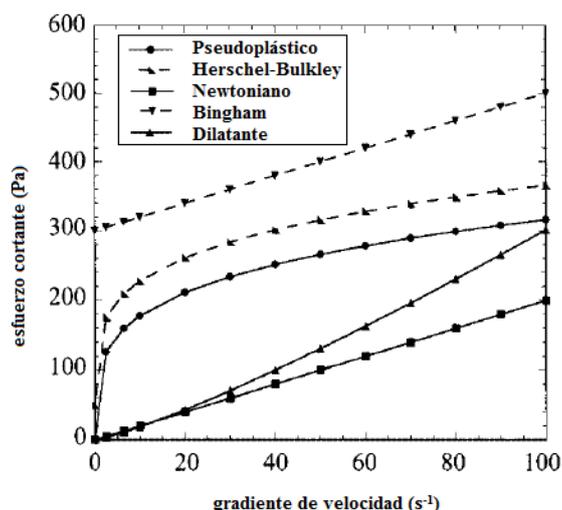


Figura 5. 1. Curvas de esfuerzo cortante vs. gradiente de velocidad para fluidos que presentan distintos comportamientos de flujo. Imagen adaptada de Rao, (2007).

Los alimentos con comportamiento newtoniano son aquellos que presentan componentes de bajo peso molecular (como azúcares) y que no contienen grandes concentraciones de polímeros disueltos (como pectinas, proteínas y almidones) o sólidos insolubles. Ejemplos de este tipo de alimentos son: agua, jarabes de azúcar, bebidas gasificadas, aceites comestibles, jugos filtrados y leche (Rao, 2007).

Los demás alimentos no incluidos en este grupo son considerados no newtonianos, lo que significa que, al graficar el esfuerzo cortante vs. el gradiente de velocidad, no se obtiene una línea recta, y/o la curva no comienza en el origen, o el material exhibe un comportamiento reológico tiempo-dependiente debido a los cambios estructurales. Además el comportamiento de flujo puede depender solamente del gradiente de velocidad y no de la duración del tratamiento (tiempo-independiente).

En los fluidos pseudoplásticos la viscosidad aparente decrece al aumentar el esfuerzo cortante (Holdsworth, 1971). Esto significa que la resistencia del líquido a fluir disminuye con el aumento del gradiente de velocidad aplicado. Dentro de este grupo se encuentran los aderezos para ensaladas y jugos concentrados de fruta. Lo opuesto ocurre en los fluidos dilatantes, en los que la viscosidad aparente aumenta a medida que aumenta el esfuerzo cortante. Este comportamiento se da en dispersiones de almidón parcialmente gelatinizadas (Rao, 2007).

Otra forma de clasificar a los comportamientos de flujo es en función de su reacción con el tiempo de tratamiento. A los alimentos que exhiben un comportamiento pseudoplástico dependiente del tiempo se los denomina tixotrópicos. La mayoría de estos alimentos son sistemas heterogéneos que contienen una fase dispersa en la que, cuando está en reposo, las

partículas o moléculas se encuentran unidas por fuerzas muy débiles. Cuando se someten a un esfuerzo cortante suficientemente alto, estas uniones se rompen lo que resulta en una disminución del tamaño de las unidades estructurales con una consecuente reducción de la resistencia a fluir (Mewis, 1979). Este tipo de comportamiento es común en aderezos para ensaladas y quesos blandos. En cambio, los alimentos que presentan un comportamiento dilatante dependiente del tiempo tienen un comportamiento llamado antitixotrópico.

El comportamiento tixotrópico tiene lugar cuando las curvas obtenidas en la gráfica de esfuerzo cortante vs. gradiente de velocidad no coinciden al aumentar la velocidad y luego disminuirla, mostrando un ciclo de histéresis (Figura 5.2). La curva obtenida cuando la velocidad disminuye se ubica debajo de la primera y el área encerrada por ambas curvas se denomina área de histéresis.

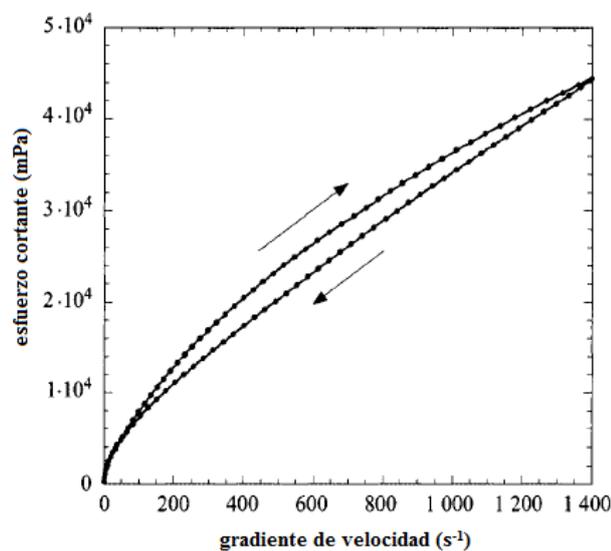


Figura 5. 2. Curva de esfuerzo cortante vs. gradiente de velocidad obtenida a partir de una dispersión de almidón de tapioca calentada a 67°C por 5 min, representando un comportamiento tixotrópico. Imagen adaptada de Tattiyaku1(1997).

En los alimentos que presentan comportamiento antitixotrópico (menos frecuente que el tixotrópico), la curva obtenida cuando la velocidad aumenta se ubica por debajo de la que resulta al descender la velocidad (Figura 5.3).

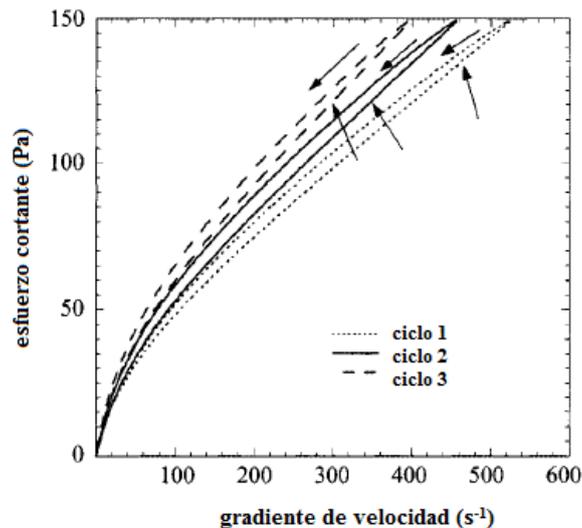


Figura 5. 3. Comportamiento de espesamiento dependiente del tiempo (antitixotrópico) de una dispersión de almidón de maíz ceroso entrecruzado calentado a 120 °C durante 30 min, datos de Chamberlain (1996). En este caso las curvas decrecientes de cizallamiento de las muestras presentan valores de tensión más altos que las curvas de cizallamiento crecientes. Las flechas señalan las curvas con velocidad ascendente para cada ciclo.

Desde el punto de vista de la reología, el yogur es un fluido no newtoniano, tixotrópico, aunque su tixotropía es parcial, no reversible o descripta como “pseudotixotropía” debido a que la estructura del yogur se recupera sólo parcialmente o no se recupera durante el tiempo de relajación, tiempo en el que ceden las fuerzas de corte. En estos casos las viscosidades aparentes son siempre decrecientes (Gösta Bylund, 2003). Para intentar recuperar su estructura original, de mayor viscosidad, el material debe quedar en reposo durante cierto tiempo característico de cada material (Gösta Bylund, 2003).

Por otro lado, el comportamiento reológico de un alimento fluido puede describirse según distintas ecuaciones que relacionan el esfuerzo cortante (τ) con el gradiente de velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$). En la literatura existen muchos modelos para describir el comportamiento reológico; sin embargo, son varios los autores que coinciden al afirmar que uno de los modelos más comúnmente usados y de aplicación general para ajustar los datos experimentales y expresar cuantitativamente el comportamiento al flujo de los fluidos, es el modelo generalizado de Herschel y Bulkley, cuya expresión supone ampliar la ley de la potencia con un término correspondiente al umbral de fluencia (Garza Garza, 1999):

$$\tau = \tau_0 + K \dot{\gamma}^n$$

τ_0 : umbral de fluencia, es la fuerza mínima requerida para iniciar el flujo (movimiento) y es una medida de la resistencia de la red formada por interacción entre partículas. La

extrapolación de la curva de flujo a un τ_0 es una medición indirecta de τ_0 (Vanegas Pérez, 2009); $[\tau_0] = \text{Pa}$.

K: índice de consistencia, da una medida de la consistencia del producto, se relaciona directamente con la viscosidad del sistema (Vanegas Pérez, 2009); $[K] = \text{Pa}\cdot\text{s}^n$.

n: índice de comportamiento, hace relación a la dependencia del comportamiento de flujo con el gradiente de velocidad $\dot{\gamma}$, da una idea de la desviación del comportamiento al flujo respecto al newtoniano (Garza Garza, 1999; Vanegas Pérez, 2009); $[n] = \text{adimensional}$.

Este modelo puede representar, dependiendo de los valores que tomen las constantes, comportamientos newtonianos, plásticos de Bingham, pseudoplásticos y dilatantes. Cuando $n=1$, el fluido es newtoniano (la viscosidad es constante independientemente del esfuerzo de corte y gradiente de deformación al cual se somete el fluido), cuando $0 < n < 1$ el fluido es pseudoplástico (la viscosidad disminuye a medida que aumenta el esfuerzo de corte sobre el fluido), cuando $n > 1$ el fluido es dilatante (la viscosidad aumenta a medida que aumenta el esfuerzo de corte al cual es sometido el fluido) (Garza Garza, 1999).

La ecuación del modelo de Bingham es muy similar a la de Herschel y Bulkley, con $n=1$ y en lugar de K, aparece otra constante llamada viscosidad plástica de Bingham (η'):

$$\tau = \tau_0 + \eta' \dot{\gamma}$$

Otro modelo muy utilizado es el modelo de Casson, que está definido por la siguiente ecuación:

$$\tau^{0,5} = \tau_0^{0,5} + Kc \dot{\gamma}^{0,5}$$

Kc: constante de Casson; $[Kc] = (\text{Pa}\cdot\text{s})^{0,5}$ y se cita numerosas veces como umbral de frecuencia.

Si se grafica $\tau^{0,5}$ vs. $\dot{\gamma}^{0,5}$, Kc es igual a la pendiente y $\tau_0^{0,5}$ igual a la ordenada al origen.

Para describir el comportamiento viscoelástico de geles generalmente se aplica un método dinámico mediante el uso de un reómetro. Desde un punto de vista energético, el comportamiento elástico de los materiales representa una recuperación completa de la energía almacenada durante la deformación, mientras que el flujo viscoso representa una pérdida completa de energía ya que toda la energía provista durante la deformación es disipada como calor. Los comportamientos viscoso y elástico ideales son en realidad dos respuestas extremas de los materiales frente a una deformación externa. Los materiales reales, sin embargo, exhiben una amplia variedad de respuestas entre estos comportamientos ideales, y la mayoría de ellos exhibe ambos a la vez, y se los llama materiales “viscoelásticos”. Casi todos los alimentos, ya sean sólidos o líquidos pertenecen a este grupo. Una forma de medir las propiedades

viscoelásticas de los materiales es mediante métodos dinámicos oscilatorios (Gunasekaran y Ak, 2000).

Los tests dinámicos se realizan aplicando una velocidad de deformación muy pequeña sobre el material a estudiar para asegurarse que la respuesta se ubique en el régimen de viscoelasticidad lineal, donde existe una relación lineal entre el esfuerzo (σ) y deformación (γ). La mayoría de los estudios sobre geles lácteos han sido realizados usando amplitudes de deformación menores a 5% y una frecuencia igual a 1 Hz (Gunasekaran y Ak, 2000).

La respuesta de esfuerzo oscilatorio de un material con viscoelasticidad lineal frente a una deformación sinusoidal está dada por la siguiente ecuación:

$$\sigma(t) = \gamma_0 G'(\omega) \text{sen}(\omega t) + \gamma_0 G''(\omega) \text{cos}(\omega t)$$

Las funciones dependientes de la frecuencia ω , G' y G'' , se denominan módulo elástico (o de almacenamiento) y módulo viscoso (o de pérdida), respectivamente. G' es la medida de la energía almacenada y subsecuentemente liberada por ciclo de deformación por unidad de volumen, esta propiedad se relaciona con eventos moleculares de naturaleza elástica. En cambio, G'' es una medida de la energía disipada como calor por ciclo de deformación por unidad de volumen, y se relaciona con eventos moleculares de naturaleza viscosa (Gunasekaran y Ak, 2000). Otra propiedad viscoelástica usada normalmente es la tangente de pérdida (*loss tangent*) o viscoelasticidad relativa, $LT = G''/G'$, y describe los efectos relativos de los componentes viscoso y elástico en el comportamiento viscoelástico.

Una curva típica obtenida durante la gelificación de leche se muestra en la Figura 5.4 como un ejemplo. El comienzo del eje x, $t=0$, usualmente hace referencia a la adición del cuajo o ácido a la leche. Generalmente se observa un periodo lag antes de que las propiedades dinámicas alcancen valores mayores que el torque mínimo del reómetro. Luego de ese periodo, G' y G'' aumentan con una velocidad que depende de las condiciones experimentales. Si las propiedades dinámicas alcanzan o no un valor *plateau* depende también de las condiciones experimentales como de la temperatura a la que el gel se forma (Zoon y col., 1988). El punto de cruce entre las curvas G' y G'' tradicionalmente se lo considera como el tiempo de gelificación, aunque otros autores toman como referencia el tiempo en el que G' excede 1 Pa (Ibáñez y col., 2016; Jaros y col., 2008).

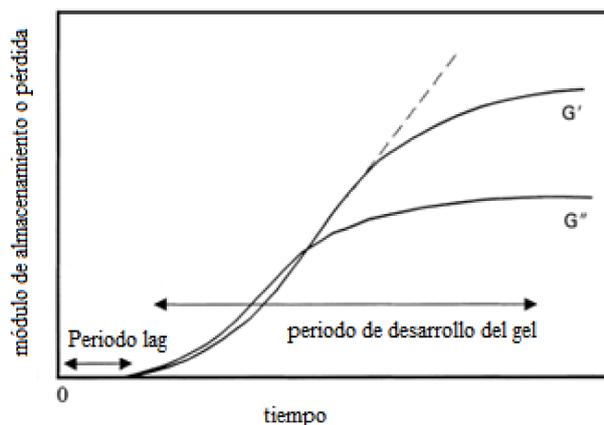


Figura 5. 4. Curva obtenida al graficar los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') en función del tiempo durante la gelificación de la leche mostrando el periodo lag inicial y el subsecuente periodo de desarrollo del gel. Imagen adaptada de Gunasekaran y Ak, (2000).

Otro método comúnmente utilizado para determinar parámetros relacionados con la textura de los alimentos es el Análisis de Perfil de Textura (APT) que se basa en el uso de un texturómetro. Bajo condiciones estándares controladas, una sonda con una geometría dada (que depende del alimento a analizar) penetra el alimento en dos ciclos de compresión que simulan dos mordiscos, hasta una profundidad determinada, generando una curva de fuerza (N) vs. tiempo (s), como la que se puede ver en la Figura 5.5. A partir de esta curva se pueden determinar los parámetros de textura, tales como dureza, cohesividad, elasticidad, adhesividad, gomosidad, masticabilidad y resiliencia, cuyas descripciones se muestran en la Tabla 5.1. El potencial de esta técnica reside en poder complementar el análisis sensorial de los alimentos con parámetros cuantificables, y permite una aproximación de lo que ocurriría físicamente durante el proceso de masticación.

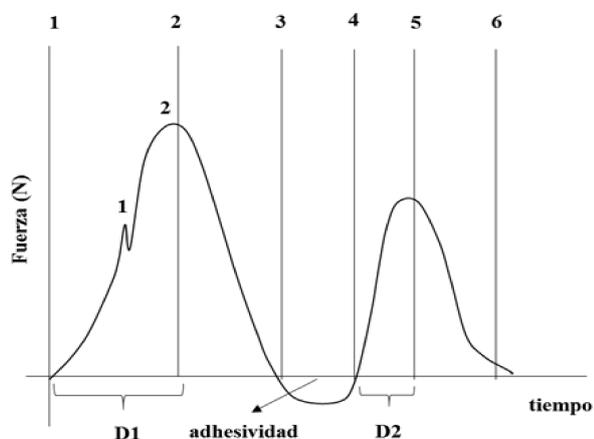


Figura 5. 5. Curva de Análisis de Perfil de Textura típica. D: distancia. La numeración sirve como referencia para el análisis de las propiedades mecánicas de textura descriptas en la Tabla 5.1.

Tabla 5. 1. Definición de las propiedades mecánicas de textura (adaptada de Borda, 2011). Las áreas mencionadas hacen referencia a las indicadas en la Figura 5.5.

Parámetro	Descripción física	Descripción gráfica
Fracturabilidad	Este parámetro corresponde a la fuerza necesaria para la primera ruptura.	Pico 1
Dureza	Propiedad relativa a la fuerza requerida para deformar el alimento o para hacer penetrar un objeto (cuchara, cuchillo) en él. En la boca se percibe al comprimir los productos sólidos entre los dientes o los semisólidos entre la lengua y el paladar.	Pico 2
Cohesividad	Propiedad relativa al grado de deformación de un producto antes de romperse. Sensorialmente relacionada con el grado en que una sustancia es comprimida entre los dientes o dedos antes de romperse. Visualmente se asocia al autosostén de la estructura.	Área 4-6/Área 1-3
Elasticidad	Propiedad relacionada con la rapidez de recuperación de la deformación producida al aplicar una fuerza y el grado de dicha recuperación al eliminarla. Sensorialmente relacionada con el grado en que una sustancia recupera su forma inicial luego de ser comprimida con los dientes o estirada con los dedos.	Distancia 2/Distancia 1
Adhesividad	Propiedad relativa al esfuerzo requerido para separar la superficie del alimento de otra superficie (lengua, dientes). También relacionada con la pegajosidad.	Área negativa
Gomosidad	Propiedad relativa a la cohesión de un producto blando. La sensación bucal está relacionada con el esfuerzo requerido para reducir el producto al estado necesario para su deglución. Deriva de dureza y cohesividad. Asociado a la pastosidad/harinosidad.	Dureza x Cohesividad
Masticabilidad	Propiedad relacionada con la cohesión y con el tiempo necesario o el número de masticaciones requeridas para dejar un producto sólido en condiciones para su deglución. Relacionada con los parámetros de dureza, cohesividad y elasticidad. Asociado a la ternura/fibrosidad.	Dureza x Elasticidad x Cohesividad
Resiliencia	Este parámetro describe qué tan bien el producto recupera su altura y forma original en relación con la primera mordida	Área 2-3/Área 1-2

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Microorganismos y condiciones de crecimiento

L. fermentum Lf2 se conservó y desarrolló rutinariamente, como se indicó anteriormente. Para la producción de yogur se seleccionaron dos cepas comerciales de acuerdo a su incapacidad (test visual) de producir EPS en leche: *S. thermophilus* SC42 y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 254 (Biochemical, Argentina). Ambas cepas se desarrollaron en LDR a 43 °C y se conservaron a -80 °C en el mismo medio. Para la elaboración de queso Cheddar se

utilizó un cultivo *starter* comercial que contiene *Lc. lactis* subsp. *lactis* y *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (R-604Y, Chr. Hansen Ltd.), en formato liofilizado.

5.2.2. Producción de EPS de *L. fermentum* Lf2

El extracto crudo de EPS se preparó como se indicó en el capítulo 2, desarrollando la cepa *L. fermentum* Lf2 en un fermentador de 2 L (Sartorius Biostat A plus)® en caldo semidefinido (SDM; Kimmel y Roberts, 1998), con agitación constante (5 g), burbujeo de CO₂ (0,2 L/min) y pH 6,0 controlado con NaOH 8M, a 30 °C por 72 h. El EPS se extrajo del cultivo como se indicó en el capítulo 2.

5.2.3. Estudio de la influencia del EPS crudo en yogures

5.2.3.1. Elaboración de yogures

Los yogures se elaboraron con LDR estéril al 10% (m/v) inoculando *S. thermophilus* SC42 y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 254 (10⁶ y 10⁵ UFC/mL, respectivamente), con 0 (control), 300 (equivalente a 73 mg de EPS purificado/L) y 600 (equivalente a 146 mg EPS purificado/L) mg/L de extracto de EPS, con incubación (baño termostático) a 43 °C hasta un pH final de 4,6. Las concentraciones de EPS crudo se eligieron teniendo en cuenta el principio que señala que, para “productos reales” como el yogur, el contenido de EPS frecuentemente varía entre 13 y 170 mg/L como extracto puro (Mende y col., 2013). Luego de la fermentación, los yogures se enfriaron inmediatamente y almacenaron a 4 °C por 25 días.

Los posteriores análisis reológicos, de textura y sensoriales de los yogures se llevaron a cabo gracias a la colaboración de la Dra. Yanina Pavón, del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA, UNL).

5.2.3.2. Análisis reológicos de yogures

Para analizar las propiedades reológicas de los yogures se utilizó un reómetro de cilindros concéntricos Rotovisco Haake RV-2 (Haake Mess-Technik, Karlsruhe, Alemania) con una celda de 50 N·cm y un sistema sensor rotatorio MVII. Las muestras de yogures se mezclaron 10 veces en sentido horario con una cuchara de tamaño mediano y luego se las dejó reposar 10 min dentro del recipiente cilíndrico antes de comenzar el análisis (Hassan y col., 2003). El gradiente de deformación se incrementó desde 0 a 200 s⁻¹ y luego se redujo a 0 s⁻¹ (Mende y col., 2013). Se obtuvieron los reogramas de esfuerzo de corte vs. gradiente de deformación y se calculó el área entre las curvas superior e inferior (índice de tixotropía, IT) para cada muestra. Se aplicó el modelo de Herschel-Bulkley descripto anteriormente,

considerando $\tau_0=0$, para estimar el índice de consistencia (K) y el índice de comportamiento de flujo (n). A esta versión simplificada del modelo se la conoce como Ley de Potencia, representada por la siguiente ecuación:

$$\tau = K \dot{\gamma}^n$$

K: índice de consistencia; [K] = Pa.sⁿ;

n: índice de comportamiento; [n] = adimensional;

$\dot{\gamma}$, da una idea de la desviación del comportamiento al flujo respecto al newtoniano.

Las determinaciones se realizaron por duplicado a los 3 y 25 días de almacenamiento.

5.2.3.3. Análisis de los perfiles de textura (APT) de yogures

En el caso de los yogures, el APT se realizó según Szczesniak (2002) empleando una máquina universal de ensayo o texturómetro (Instron Bluehill®, MA, Estados Unidos) equipada con una celda de carga de 10 N. Se determinaron las siguientes propiedades mecánicas en los yogures firmes: dureza, adhesividad, cohesividad, gomosidad, elasticidad y masticabilidad. Se aplicó una penetración doble de 30 mm en las muestras, a una velocidad de 1 mm s⁻¹. Los diámetros del penetrómetro y del cilindro fueron de 12 y 36 mm, respectivamente, y las mediciones se realizaron a 10 °C (Pons y Fiszman, 1996; Santini y col., 2007). Los análisis se llevaron a cabo por cuatuplicado a los 3 y 25 días de almacenamiento.

5.2.3.4. Análisis sensorial de yogures

Las muestras fueron sometidas a la evaluación de un panel sensorial entrenado de diez jueces (7 mujeres y 3 hombres de entre 25 y 55 años de edad), quienes habían realizado análisis descriptivos cuantitativos (*International Organization for Standardization* [ISO], 1993) regularmente durante los últimos 2 años. El panel fue entrenado en el uso de los atributos elegidos en 6 sesiones de entrenamiento. Durante dichas sesiones, los panelistas discutieron y acordaron sobre las definiciones y la forma de calificar los atributos en una escala, mediante la evaluación de yogures comerciales naturales de acuerdo a las recomendaciones de la *International Dairy Federation* (IDF, 1997). Los descriptores de textura, consistencia, granulosis, cremosidad y presencia de grumos, fueron evaluados en una escala lineal no estructurada de 10 cm anclada en los extremos con los términos apropiados a la izquierda (1= ‘casi nada’) y derecha (9= ‘mucho’). La intensidad de los defectos, gustos extraño, rancio, metálico y viejo, fue evaluada como se describió anteriormente. Luego se asignó manualmente un valor a cada descriptor y se usó el valor promedio para el análisis estadístico. Los atributos del *flavor*, sabores ácido, dulce, amargo, a leche en polvo y cocido, fueron determinados usando

una escala dividida en intervalos iguales (usando 5 categorías en el siguiente orden: apenas, poco, moderado, muy y extremadamente perceptible). Se asignó un número escalar a cada categoría (1, 3, 5, 7 y 9, respectivamente) y se calculó el promedio ponderado (considerando el número total de jueces que eligieron una categoría específica), junto con el porcentaje percibido. Las muestras fueron identificadas con un código de tres dígitos y se presentaron a los panelistas en orden aleatorio y a 10 °C luego de 3 y 25 días de almacenamiento a 4 °C. Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado en una habitación estandarizada (ISO, 1988) del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA, UNL).

5.2.3.5. Sinéresis de yogures

La sinéresis de las muestras fue determinada mediante el método de centrifugación adaptado por Amatayakul y col. (2006b). Brevemente, los yogures, inmediatamente luego de retirarlos de la heladera, se mezclaron 20 veces sentido horario y 20 veces sentido antihorario con una varilla de vidrio. Luego se centrifugaron a 3300 g por 15 min a 10°C, se pesó el suero despedido y se expresó como % (m/m) de suero en función del peso inicial de cada yogur. Las determinaciones se realizaron en triplicado, 3 y 26 días después de la elaboración y conservación a 4 °C de los yogures.

5.2.4. Estudio de la influencia del EPS crudo en queso Cheddar

5.2.4.1. Elaboración de queso Cheddar

El estudio del agregado de EPS en queso Cheddar se llevó a cabo íntegramente en la *School of Food and Nutritional Sciences, University College Cork* (UCC, Cork, Irlanda), bajo la supervisión del Prof. Paul Mc Sweeney.

Preliminarmente, para evaluar la influencia de la concentración de EPS elegida sobre la textura, se elaboraron miniquesos Cheddar (de alrededor de 50 g) de acuerdo al protocolo descrito por Shakeel-Ur-Rehman y col., (1998), a partir de 500 mL de leche entera pasteurizada, por duplicado, utilizando una concentración de EPS de 1 g/L. Brevemente, la leche cruda vacuna fue pasteurizada en un baño a 65°C por 30 min, con agitación regular. Luego se tomaron 4 vasos de precipitado de vidrio y se colocaron 500 mL de leche en cada uno (2 controles y 2 tratados), y se dejó enfriar hasta 31°C. Una vez alcanzada dicha temperatura, se les agregó el extracto de EPS antes del cultivo primario y se mezcló hasta completa disolución (sólo a las muestras tratadas), momento en el que se agregó el cultivo *starter* (R-604Y, Chr. Hansen Ltd.) a una concentración de 0,02% (m/v), y se mezcló con una varilla de vidrio. Se procedió entonces a agregar la quimosina (Maxiren, DSM, 0,03% v/v), se mezcló y se esperó a

que la leche coagule durante aproximadamente 45 min. Una vez que el gel alcanzó suficiente firmeza, se cortó usando liras pequeñas verticales y horizontales y se agitó suavemente con una varilla de vidrio. Se calentó la cuajada a 38 °C, aumentando paulatinamente la temperatura, agitando suavemente y controlando el pH regularmente, hasta que alcanzó un valor de 6,2. Las cuajadas se centrifugaron (1700 g por 60 min a temperatura ambiente) para separar el suero y las muestras volvieron a colocarse en los vasos de precipitado en un baño a 36 °C hasta que se alcanzó un pH de 5,2, invirtiendo los quesos regularmente. Se procedió entonces a colocarlos en recipientes plásticos con pequeños agujeros, y sobre los miniquesos se ejerció peso para continuar drenando el suero remanente por 30 min (Figura 5.6 A). Para salarlos, se colocaron en salmuera (20% NaCl, 0,05% CaCl₂·2H₂O) durante 30 min a temperatura ambiente (Figura 5.6 B) y, finalmente, se secaron con papel y se dejaron reposar en vasos de precipitados limpios *o.n.* a temperatura ambiente (Figura 5.6 C), cubiertos con papel aluminio, para el balance de la sal y humedad. Al día siguiente, se envasaron al vacío y se maduraron a 8 °C durante 3 meses.

La etapa siguiente del estudio comprendió la elaboración de seis quesos Cheddar de alrededor de 1 kg (Cheddar-1 kg) de acuerdo al protocolo estandarizado para una escala de 10 L en la planta piloto ubicada en *School of Food and Nutritional Sciences, University College*

A)



B)



C)



Figura 5. 6. Algunas etapas de la elaboración de miniquesos a partir de 500 mL de leche. A) Drenaje del suero remanente bajo presión. B) Inmersión en salmuera. C) Reposo *o.n.* antes del envasado al vacío.

Cork (UCC, Cork, Irlanda). La leche entera bovina se estandarizó a una relación caseína/grasa de 0,7, se pasteurizó a 63 °C por 30 min y se enfrió a 30 °C. La leche así tratada se distribuyó

aleatoriamente en 6 tinas, 3 para cada grupo (controles y tratados, Figura 5.7 A). En esta instancia se adicionó el extracto de EPS en una concentración de 1 g/L de leche en las 3 tinas experimentales (quesos tratados), mezclando hasta su completa disolución. Se adicionó luego el cultivo primario R-604Y en una concentración de 0,02% (m/v), y la quimosina comercial (CHY-MAX™ Plus, Chr. Hansen A/S, Horsholm, Dinamarca, 200 IMCU/mL) en una concentración de 0,03 % (v/v). Una vez que la cuajada desarrolló la firmeza suficiente, el coágulo fue cortado y cocido a 38 °C por 30 min hasta que el pH descendió a 6,2, momento en que se drenó el suero (Figura 5.7 B). La cuajada fue “cheddarizada”, paso que consistió en invertir frecuentemente los cortes de cuajada hasta que se alcanzó un pH de 5,2 (Figura 5.7 C), luego se cortó y saló en seco (concentración de NaCl 2,5% m/m), se transfirió a moldes cilíndricos (Figura 5.7 D) y se presionó durante toda la noche a 5 g.cm² (Figura 5.7 E). Los quesos se envasaron al vacío y se maduraron a 8 °C durante 4 meses.

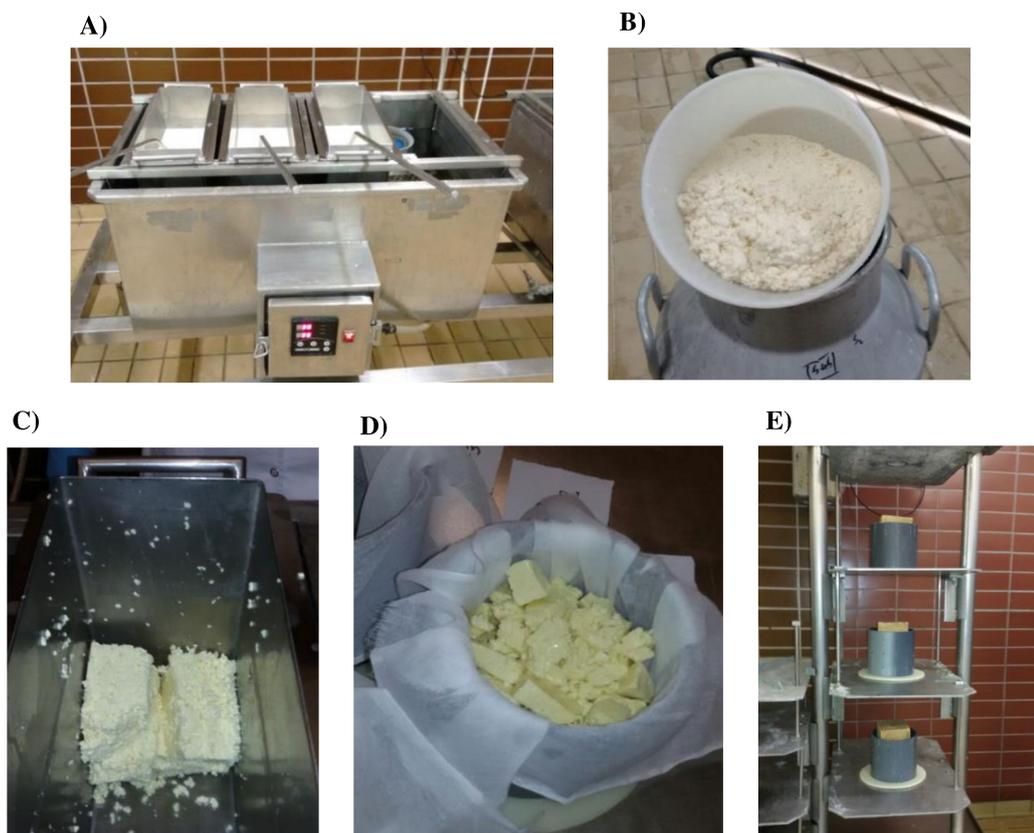


Figura 5. 7. Diferentes etapas del proceso de elaboración de quesos Cheddar a partir de 10 L de leche. A) Tina donde se realizaron los quesos, B) Drenaje del suero, C) Cheddarizado del queso, D) Pasaje a los moldes cilíndricos una vez salados, E) Armado del dispositivo en el que se ejerció presión *o.n.*

5.2.4.2. Influencia del extracto de EPS en la coagulación de la leche

Las propiedades de coagulación de la leche (adicionada o no de EPS) se determinaron con un reómetro oscilatorio dinámico de pequeña amplitud (modelo AR-G2; TA Instruments, Waters LLC, Leatherhead, Surrey, Reino Unido). La celda utilizada fue plato-plato y consistió en una placa de aluminio de 60 mm de diámetro, la frecuencia de oscilación fue de 1 Hz y la deformación de 0,1%. El extracto de EPS fue agregado a la leche a una concentración de 1 g/L y mezclado hasta completa disolución. La quimosina (Maxiren 180 DSM Food Specialities) fue diluida 10 veces y se adicionaron 7 μ l a 4 mL de leche (previamente calentada a 32 °C, con y sin EPS). Se dejaron transcurrir 3 min entre la adición de la quimosina y el comienzo de la oscilación. El módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G'') fueron medidos durante un tiempo de gelificación de 60 min a 32 °C. Se registraron, para cada condición, la tangente de pérdida (*loss tangent*, $LT = G''/G'$) y G' a los 60 min. El tiempo de gelificación (*gelation time*, GT) para este ensayo se definió como el tiempo requerido para que G' exceda 1 Pa (Ibáñez y col., 2016; Jaros y col., 2008). Cada tratamiento se analizó por triplicado.

5.2.4.3. Análisis fisicoquímico de quesos Cheddar

El análisis de la composición de los quesos de aproximadamente 1 kg (Cheddar-1 kg) se llevó a cabo a los 9 días de maduración, mientras que el de los miniquesos se realizó a los 14 días. La determinación del contenido de humedad se realizó por secado de la muestra a 102 ± 1 °C hasta pesada constante (FIL-IDF, 1982:4A). Para ello, se utilizó cristalizador y varilla de vidrio, al cual se agregaron aproximadamente 30 g de arena (Sigma Aldrich). Este conjunto se llevó a sequedad en estufa a 102 °C durante 12 h, y luego se colocó en desecador durante ~1 h para que alcance temperatura ambiente. Una vez seco y enfriado en desecador, se determinó exactamente el peso del sistema de cristalizador, arena y varilla, antes y después de la adición de aproximadamente 2 g de la muestra de queso previamente rallado. El queso se dispersó en la arena utilizando la varilla de vidrio, para aumentar la superficie de evaporación de la muestra, y se llevó a estufa a 102 °C hasta pesada constante. Las masas de la muestra húmeda y seca se obtuvieron por diferencia y se utilizaron para calcular el contenido de humedad.

El pH se determinó a partir de homogeneizados de 2 g de queso con 4 mL de agua destilada a temperatura ambiente. El pH se midió a los 9, 30, 60, 90 y 120 días de maduración para los quesos Cheddar-1 kg y a los 14 días para los miniquesos. Las mediciones se realizaron por triplicado en los Cheddar-1 kg y al menos por duplicado en los miniquesos, debido a la limitación del tamaño de muestra para los demás ensayos.

El contenido de materia grasa se determinó mediante el método butirométrico de Gerber (FIL-IDF, 1997:152A), empleando un butirómetro específico para queso. Para ello, primeramente se adicionaron al butirómetro 10 mL de ácido sulfúrico (densidad 1,815 g/cm³ a 20 °C), 3 mL de agua destilada a 60 °C y 3 g de queso rallado envuelto en papel manteca. Luego se adicionaron otros 5 mL de agua destilada a 60 °C y finalmente, 1 mL de alcohol isoamílico. Se cerró el butirómetro y se agitó suavemente hasta disgregación total de las partículas de queso y papel. Para facilitar la disgregación y lograr una separación óptima de la materia grasa durante la centrifugación, los butirómetros se colocaron en un baño de agua a 65 °C durante 10 min. Alcanzada dicha temperatura, las muestras se centrifugaron en una centrífuga específica para butirómetros durante 5 min a 1300 rpm. Finalmente, los butirómetros se colocaron nuevamente en el baño de agua y se realizó la lectura a 65 °C.

El contenido de proteínas totales en las muestras se determinó mediante el método de Kjeldahl (FIL-IDF, 1993:20B). Se pesaron 0,3 g de queso en un vaso de precipitado, que luego se trasvasaron a un tubo de digestión mediante enjuagues con un volumen pequeño de agua destilada. Luego, se adicionaron los catalizadores (aproximadamente 3,5 g de sulfato de potasio y 100 mg de dióxido de titanio) y posteriormente, bajo campana, 10 mL de ácido sulfúrico concentrado utilizando un dosificador. La mineralización de la muestra se llevó a cabo en una unidad digestora (*Digestion System 6, 1007 Digester*, Tekator, Suecia), y calentando 30 min a 150 °C, 30 min a 250 °C y luego, aproximadamente 2 h a 400°C, hasta que el líquido se tornara completamente límpido y claro. Posteriormente, se dejaron enfriar los tubos. El análisis del contenido de proteínas totales se realizó sobre el digerido mediante una destilación y posterior titulación. Cada tubo conteniendo la muestra digerida se conectó a una unidad destiladora automática. En primer lugar, se adicionó automáticamente hidróxido de sodio para transformar el amonio proveniente de las proteínas, péptidos y aminoácidos presentes en la muestra en amoníaco, y luego se inició la destilación por arrastre con vapor de agua. El destilado se colectó en un erlenmeyer conteniendo 50 mL de ácido bórico al 4% y 4 gotas de solución indicadora de punto final, compuesta por verde de bromocresol 0,1 % (m/v) y rojo de metilo 0,15 % (m/v) en etanol 96 % (v/v). El amoníaco destilado fue, de esta manera, capturado en forma de ion amonio en la solución recolectora. La destilación se realizó en un equipo BÜCHI *Distillation Unit B-324* (Suiza), programado con los siguientes parámetros: 70 mL de hidróxido de sodio 32 % (m/v), 60 mL de ácido bórico 2 % (m/v), 3 min de destilación, 100 % de vapor, con aspiración de la muestra. Finalmente, las muestras destiladas y recogidas como borato de amonio se titularon con una solución valorada de ácido clorhídrico 0,1 N hasta el viraje del

indicador de verde a fucsia. Para expresar el resultado en g % m/m de proteínas totales, al valor obtenido de nitrógeno total se le aplicó el factor de 6,38, que corresponde a proteínas lácteas.

Para determinar el contenido de sal se aplicó el método potenciométrico (Fox, 1963). Para esto se pesaron 2 g de queso en un vaso de precipitado de 150 mL y se adicionaron 100 mL de ácido nítrico diluido 0,02 M. Luego se colocó la muestra así tratada en un baño termostatzado a 60 °C por, al menos, 15 min. Una vez que la mezcla alcanzó la temperatura ambiente, se tituló con nitrato de plata 0,1 N hasta que el potenciómetro indicó una lectura final de +255 mV.

5.2.4.4. Análisis de los perfiles de textura (APT) de quesos Cheddar

Para los quesos este análisis se realizó empleando un Analizador de Textura TA-XT2i (*Stable Micro Systems*, Godalming, Surrey, Reino Unido) a los 30, 60, 90 y 120 días de maduración. Las muestras de quesos se cortaron en cilindros de 20 mm de diámetro y 20 mm de alto, y se almacenaron *o.n.* a 8 °C en bolsas plásticas herméticas. Luego de retirarlas de la heladera, inmediatamente se llevó a cabo la compresión hasta el 25% de su altura original en dos ciclos consecutivos, a una velocidad de 1 mm/s. Se determinaron: dureza, elasticidad, cohesividad, resiliencia y gomosidad (Bourne, 1978) por cuatriplicado a los 30, 60, 90 y 120 días de maduración.

5.2.4.5. Análisis microbiológico de queso Cheddar

Se tomaron muestras de 10 g de los quesos en esterilidad y se colocaron en bolsas estériles de homogeneizador. Se diluyeron 1:10 con citrato de sodio (2% m/v) y se trataron en el homogeneizador (*Seward Stomacher 400*; Seward Ltd., Londres, Reino Unido) durante 5 min a velocidad máxima. Se prepararon diluciones sucesivas en solución de Ringer, dependiendo del tiempo de maduración. Las bacterias del fermento iniciador o SLAB (*Starter Lactic Acid Bacteria*) se enumeraron en agar LM17 (Terzaghi y Sandine, 1975) y se incubaron 3 días aeróbicamente a 30 °C. Las bacterias de la flora secundaria o NSLAB (*Non-Starter Lactic Acid Bacteria*) se determinaron en agar Rogosa (Rogosa y col., 1951) y se incubaron anaeróbicamente (Anaerocult® A, Merck, Darmstadt, Alemania) por 5 días a 30 °C. Los recuentos se realizaron por duplicado para los quesos Cheddar-1 kg a los 7, 30, 60, 90 y 120 días de maduración.

5.2.4.6. Proteólisis primaria y secundaria de queso Cheddar

La proteólisis se evaluó por electroforesis en geles de urea-poliacrilamida (UREA-PAGE) para los quesos Cheddar-1 kg usando el procedimiento descrito por Andrews (1983), a los 9 y 120 días de maduración. Se disolvieron directamente 10 mg de queso en 1 mL de buffer para muestras (0,75 g de tris (hidroximetil) metilamina, 49 g urea, 0,4 mL de HCl concentrado, 0,7 mL de 2-mercaptoetanol, 0,15 g de azul de bromofenol, en un volumen final de 100 mL) y se calentó a 50 °C por unos pocos minutos.

Las fracciones insoluble y soluble a pH 4,6 se obtuvieron a partir de los miniquesos para evaluar la proteólisis primaria y secundaria, respectivamente (McSweeney y Fox, 1997). Esta técnica, basada en el trabajo de Kuchroo y Fox (1982) consistió en homogeneizar en *stomacher* una determinada cantidad de queso rallado con el doble de volumen de agua destilada, luego se ajustó el pH a 4,6 con HCl 1 N, se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente y se volvió a ajustar el pH a 4,6. Se colocó el homogenato en un baño a 40°C durante 1 h, se centrifugó (3000 g, 30 min, 4°C), se colocó en la heladera a 4°C por 30 min, y se filtró el sobrenadante con lana de vidrio y papel de filtro (Whatman N° 113). Para obtener la fracción insoluble, se cortó el pellet en pequeños pedazos para liofilizarlo, mientras que el resto de material soluble (sobrenadante) también se congeló directamente para su liofilización. La fracción insoluble se analizó por electroforesis en geles de urea-poliacrilamida (Andrews, 1983) a los 14, 30, 60 y 90 días de maduración. Los geles fueron coloreados con Coomassie blue G250 como se describió por Blakesley y Boezi (1977).

Sobre la fracción soluble de los miniquesos se aplicó el método del ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) para medir los niveles de aminoácidos libres totales, por triplicado (Fields, 1971) a los 14, 30, 60 y 90 días de maduración. Brevemente, este método consistió en tomar una alícuota (5-50 µl, según la concentración esperada) del extracto soluble resuspendido en agua y llevar a un volumen final de 1 mL con agua destilada. De esta dilución, se tomaron 0,5 mL y se agregaron 0,5 mL de buffer borato ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,1 M en NaOH 0,1 M, pH 9,5) y 1 mL del reactivo de TNBS (diluido previamente 1:50). La mezcla se calentó a 37°C por 1 h y la reacción se detuvo mediante el agregado de 2 mL de NaH_2PO_4 0,1 M conteniendo Na_2SO_3 1,5 mM. Se midió la absorbancia a 420 nm. Los resultados se expresaron como mg Leu/g queso mediante una curva estándar de leucina (0,05-0,50 mM).

Los perfiles peptídicos de la fracción soluble se determinaron por cromatografía líquida de *ultra-performance* de fase reversa (RP-UPLC) a los 14, 30, 60 y 90 días de maduración (Sousa y col., 2001), utilizando una columna Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm, de 2,1 mm de

diámetro y 100 mm de largo del sistema Waters Acquity H-Class, con un espectrofotómetro como detector (las mediciones se realizaron a una longitud de onda de 214 nm).

5.2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el software SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos) aplicando ANOVA de un factor para la comparación de más de dos grupos, y Kruskal-Wallis cuando los supuestos del ANOVA no se cumplían. Las diferencias entre medias se determinaron por el test de Tukey o por el de Dunns (cuando se usó Kruskal-Wallis). Se aplicó ANOVA de dos factores para verificar si la interacción entre el tiempo de almacenamiento de los yogures y la concentración de EPS no era significativa. Se usó t-Test para analizar la variable respuesta entre un grupo tratado y otro control, y Mann Whitney cuando las distribuciones no eran normales. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ para todos los tests descriptos anteriormente.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Estudio de la influencia del EPS crudo en yogures

5.3.1.1. Análisis reológico de yogures

La Tabla 5.2 muestra los valores obtenidos para los parámetros reológicos evaluados para las muestras de yogur con EPS. Se observaron valores del índice de consistencia (K) significativamente mayores ($p < 0,05$) para yogures adicionados con 300 mg/L de EPS al compararlos con los controles a ambos tiempos de elaboración, con una leve tendencia a incrementar este valor en el tiempo. No se observó lo mismo para la adición de 600 mg/L de EPS, coincidiendo con algunos reportes en los que se indica una relación no muy clara entre la concentración de EPS y las características reológicas de yogures. Según Doleyres y col. (2005), las características fisicoquímicas de los EPS y sus interacciones con las proteínas de la leche serían las principales responsables de las propiedades reológicas del producto, independientemente de la concentración de EPS presente. Estos autores describieron un comportamiento similar para un cultivo comercial productor de EPS adicionado a yogures, los cuales presentaron un índice de consistencia mayor en comparación con el grupo control. En un estudio similar, pero usando leche de búfala, Yang y col. (2014) describieron que la adición de EPS redujo la viscosidad de yogures, contrariamente a lo observado en nuestro caso. Dichos autores plantearon que este comportamiento podría deberse a la composición de la leche de búfala, principalmente a los niveles de materia seca. En nuestro estudio, y para los 3 días de almacenamiento, el valor mínimo del índice de comportamiento de flujo (n) fue detectado en

las muestras adicionadas de 300 mg/L de EPS crudo ($p < 0,05$). Valores de n menor a 1 indican comportamiento pseudoplástico, típico en este tipo de alimentos. El índice de comportamiento de yogures con 600 mg/L de EPS disminuyó significativamente con el tiempo (desde 0,22 a 0,157), resultando similar al de los yogures con 300 mg/L de EPS. Por lo tanto, se observó para n una diferencia significativa entre los yogures con EPS (a ambas concentraciones evaluadas) y el grupo control a los 25 días de almacenamiento. Se observó también un aumento en el grado de histéresis (índice tixotrópico, IT) en los yogures con EPS a los 3 días de almacenamiento, aunque esta diferencia no fue significativa en comparación con los controles (Figura 5.8). Este comportamiento de las muestras indicaría que estos productos tienen menor capacidad de recuperar su estructura luego de inducir una ruptura de la estructura por cizallamiento a los 3 días de almacenamiento. Con el tiempo, el índice de tixotropía aumentó significativamente para los yogures con 300 mg/L de EPS, observando en consecuencia diferencias significativas entre los yogures con 600 mg/L de EPS, los cuales presentaron los menores valores de IT ($p < 0,05$) al final del tiempo de vida útil, y el resto de las muestras. El único parámetro reológico que no se modificó con el tiempo de almacenamiento fue el índice de consistencia para todas las muestras evaluadas.

A partir de los valores de la Tabla 5.2 se puede observar que para ambos tiempos evaluados la adición de EPS tiende a aumentar K y disminuir n con respecto a los controles, mientras que el aumento de la concentración de EPS parecería ocasionar una disminución de K y un incremento de n . De la primera observación se puede sugerir que, debido a su poder espesante, la presencia de EPS aumentaría la consistencia de los yogures, fundamentalmente debido a sus características hidrofílicas, o bien considerando interacciones favorables con las proteínas lácteas, las cuales dependen de las condiciones del medio acuoso (pH, fuerza iónica), presencia de cosolutos y de la concentración relativa de biopolímeros. A partir de la segunda observación se concluye que una mayor concentración de EPS no conlleva necesariamente a un aumento de la consistencia, lo cual confirma que la misma depende de las interacciones con las proteínas lácteas, las que a su vez están moduladas por la concentración relativa de biopolímeros en la matriz del yogur. En este caso las interacciones se favorecen a 300 mg/L EPS. Estudios adicionales serían necesarios para confirmar la naturaleza fisicoquímica de dichas interacciones.

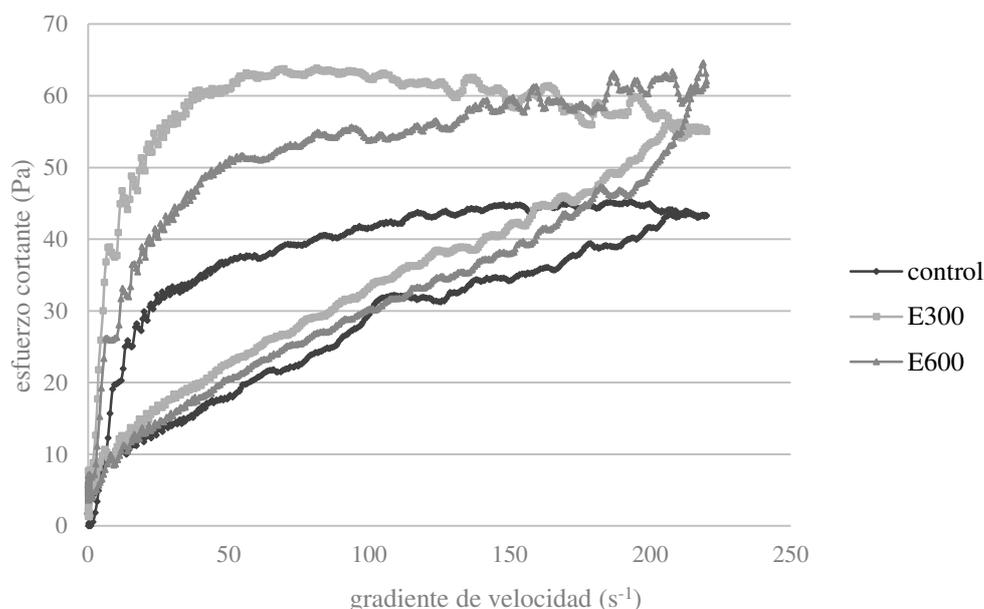


Figura 5. 8. Diagrama de esfuerzo de corte en función del gradiente de deformación para los diferentes yogures a los 3 días de almacenamiento (controles, yogures con 300 y 600 mg EPS/L).

Tabla 5. 2. Parámetros reológicos y sinéresis evaluados para los yogures controles y con agregado de EPS (300 y 600 mg EPS/L) a los 3 y 25 días de almacenamiento a 4 °C. Los valores representan promedios \pm SD. Las letras distintas indican diferencias entre grupos ($p < 0,05$) a tiempo inicial y final. Los asteriscos indican diferencias entre el mismo grupo durante el período de almacenamiento. Las determinaciones se realizaron por duplicado para los parámetros reológicos (índice de consistencia, comportamiento de flujo e índice tixotrópico) y por triplicado para el análisis de la sinéresis.

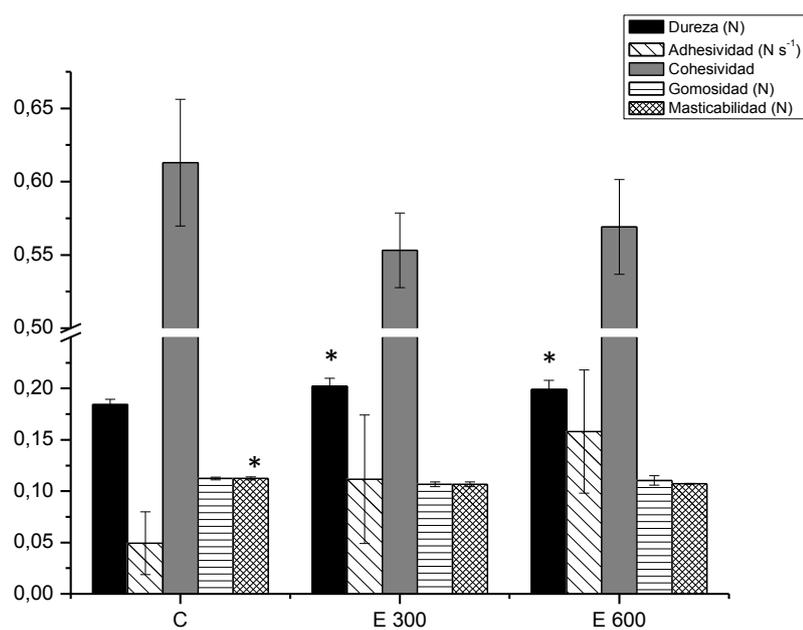
	Concentración EPS (mg/L)	Índice de consistencia (K) (Pa s ⁿ)	Índice de comportamiento de flujo (n)	Índice tixotrópico (IT) (Pa s ⁻¹)	Sinéresis (%)
3 días	0	5 ^b \pm 1	0,2516 ^a \pm 0,0001	1177 ^a \pm 316	72,3 ^{a,b} \pm 0,8
	300	9,74 ^a \pm 0,09	0,17 ^b \pm 0,01	1661 ^a \pm 31	70,8 ^b \pm 0,4
	600	7,2 ^{a,b} \pm 0,2	0,22 ^{a*} \pm 0,01	1500 ^a \pm 102	72,8 ^{a*} \pm 0,9
25 días	0	6,1 ^b \pm 0,2	0,25 ^a \pm 0,01	1838 ^a \pm 32	72,9 ^a \pm 0,4
	300	10 ^a \pm 1	0,12 ^b \pm 0,03	1827 ^{a*} \pm 0,9	72,0 ^{a*} \pm 0,4
	600	7,8 ^{a,b} \pm 0,2	0,157 ^b \pm 0,009	1644 ^b \pm 20	69,4 ^b \pm 0,3

5.3.1.2. Análisis de los perfiles de textura (APT) de yogures

A partir del análisis de perfiles de textura (APT), no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para la cohesividad, adhesividad y gomosidad en las muestras, independientemente del período de almacenamiento (Figura 5.9) si bien la adhesividad se incrementó ligeramente con la concentración de extracto de EPS a los 3 días ($p > 0,05$). El grupo

control mostró los mayores valores de masticabilidad a los 3 días de almacenamiento, mientras que la elasticidad fue similar entre las muestras, como se esperaba, y presentó valores entre 0,999 y 1,002 a ambos tiempos analizados. Por otro lado, los yogures con distintas concentraciones de EPS tuvieron mayores valores de dureza que el grupo control tanto a los 3 como a los 25 días de elaboración ($p < 0,05$), sin detectar diferencias significativas entre las muestras con 300 y 600 mg/L de EPS ($p > 0,05$). En general, estos resultados son consistentes con los obtenidos en la sección previa. Interacciones favorables entre la matriz proteica y el EPS pudo haber incrementado la dureza de los productos, y para conocer la naturaleza de dichas interacciones serían necesarios estudios adicionales comenzando por matrices menos complejas. Nuestras observaciones fueron similares a las publicadas por Yang y col. (2014) para yogures de leche de búfala con EPS adicionado. En las muestras control, el almacenamiento no modificó los parámetros de APT. En cambio, los yogures con EPS presentaron mayores valores de dureza ($p < 0,05$) a los 25 días a 4 °C, en comparación con los valores observados al tercer día de almacenamiento. La gomosidad y la masticabilidad aumentaron significativamente durante el almacenamiento sólo en yogures con 300 mg/L de EPS. Es importante remarcar que el único parámetro de textura que evidenció diferencias significativas entre los yogures con y sin EPS luego del tiempo de almacenamiento fue la dureza.

A)



B)

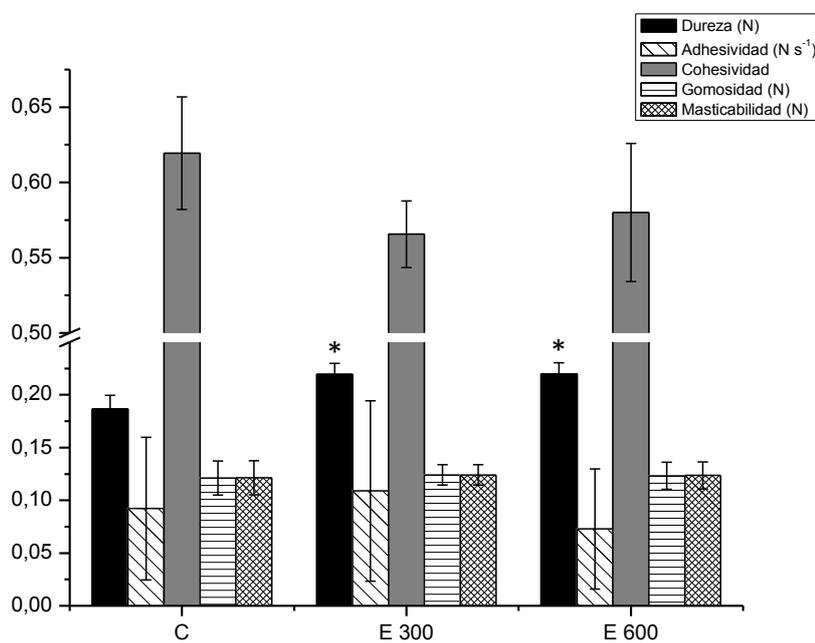


Figura 5. 9. Evolución de los parámetros APT de yogures controles (C) y adicionados de 300 (E300) y 600 (E600) mg EPS/L luego de 3 (A) y 25 (B) días de almacenamiento a 4 °C. Las barras representan promedios ± SD. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras.

5.3.1.3. Análisis sensorial de yogures

La Figura 5.10 muestra la evolución de los descriptores de textura de los yogures con extracto de EPS a los 3 y 25 días de almacenamiento. Los yogures adicionados de 600 mg/L mostraron altos niveles ($p < 0,05$) de consistencia cuando se los comparó con el grupo control a los 3 días de elaboración, pero este efecto no se verificó hacia el final de la vida útil. Todas las muestras presentaron valores bajos ($< 2,5$) de granulosidad, y la cremosidad fue más notable en aquellas muestras con la mayor cantidad de EPS al día 3 de almacenamiento, pero se observó una tendencia a alcanzar texturas cremosas similares hacia el final de la vida útil en todos los casos. Se obtuvieron puntajes altos (> 6) para la presencia visual de grumos para todas las muestras. Los grumos son agregados de proteínas que suelen formarse como consecuencia de una excesiva producción de ácido a altas temperaturas de incubación, de un excesivo tratamiento térmico de la leche o de la adición de altos niveles de proteínas de suero (Humphreys y Plunkett, 1969). En nuestro caso el tratamiento térmico de la leche, quizás excesivo (30 min a 115 °C), podría ser el causante de este defecto visual. Sin embargo, cuando los panelistas evaluaron la presencia de grumos en boca durante el consumo de yogur, dicho defecto no fue perceptible. Analizando el efecto del tiempo de conservación sobre cada grupo, la consistencia aumentó significativamente para los yogures sin EPS agregado y para aquellos con 300 mg/L, resultando en valores similares para todas las muestras al final del ensayo. Además, los grumos visuales disminuyeron con el tiempo ($p < 0,05$) para los yogures con 600 mg/L de EPS. Los defectos, tales como gusto a viejo, a extraño, a metálico y a rancio, presentaron valores bajos (< 2) para todas las muestras, a ambos tiempos evaluados.

La Tabla 5.3 muestra los promedios ponderados y porcentajes percibidos para los atributos del *flavor* a los 3 y 25 días de almacenamiento. Debe señalarse que, en general, los gustos amargo, a leche cocida y a leche en polvo tuvieron un comportamiento variable entre las muestras, ya que los promedios ponderados oscilaron entre 0 y 0,6 para ambos períodos evaluados, alcanzando bajas intensidades para el 30% de los evaluadores. El gusto ácido fue variable entre las muestras pero la tendencia observada fue que los yogures con 300 mg/L de EPS presentaron la mayor intensidad en este atributo a ambos tiempos, posiblemente como consecuencia de una post-acidificación. Este hecho se podría justificar a partir de los valores de pH observados a los 25 días de almacenamiento, porque, aunque todas las muestras alcanzaron el mismo pH al final de la fermentación (alrededor de 4,8), al final de su vida útil los yogures con 300 mg/L de extracto de EPS presentaron valores de pH menores que aquellos con 600 mg/L y la muestra control (4,65 vs. 4,81 y 4,70, respectivamente). Se detectó una acidez típica para este tipo de yogures, para la cual los panelistas ($> 60\%$) consideraron puntajes de

acidez aceptables de entre 3 y 5 (poco y moderadamente perceptible) a ambos tiempos y para todas las muestras. El sabor dulce no fue detectado en niveles altos, como se esperaba, ya que los yogures no contenían ningún endulzante agregado, y sólo algunos panelistas (< 30%) lo percibieron.

En general, la evaluación sensorial reveló que la adición del extracto de EPS produce efectos cuando se agrega en la mayor concentración y durante el período de almacenamiento inicial, afectando su consistencia. Por otro lado, luego de 25 días, los efectos fueron similares entre las muestras. Es importante remarcar que el agregado del extracto de EPS no afectó negativamente a los yogures, ya que no se observaron diferencias significativas para los defectos evaluados (sabor a viejo, a extraño, a metálico y a rancio). Además, el análisis del *flavor* mostró puntajes menores a 5 puntos para todas las muestras y atributos del *flavor* (moderadamente perceptibles), con un porcentaje percibido menor al 30%, a excepción de la acidez que alcanzó un 90%. Este último resultado no fue atípico debido a la naturaleza del yogur elaborado, un yogur natural sin el agregado de saborizantes o edulcorantes. Considerando los resultados del análisis sensorial en conjunto, se puede concluir que la aplicación de este extracto de EPS como un ingrediente alimentario podría ser factible, con efectos positivos en la textura y sin la aparición de efectos no deseados. Se observaron resultados similares en otros estudios. Folkenberg y col. (2006) informaron que yogures elaborados con cultivos productores de EPS fueron más espesos a la boca, filantes y cremosos que aquellos con cepas no productoras de EPS, luego de 3 días de almacenamiento. En un trabajo previo de los mismos autores (Folkenberg y col., 2005) describieron dos perfiles sensoriales diferentes que dependieron de las interacciones proteína-EPS al utilizar cultivos de *S. thermophilus* EPS⁺ para la elaboración de yogures. En una de las microestructuras observadas mediante microscopía confocal de barrido láser, el EPS estaba homogéneamente distribuido en el producto, principalmente ubicado alrededor de los poros (que contenían el suero) formados por la red proteica. Pudieron ver una superposición entre las proteínas y el EPS, pero no pudieron dilucidar si el EPS se encontraba asociado a la red proteica o bien formaba una red independiente. El panel sensorial caracterizó a estos yogures como muy filantes, brillosos, con sensación espesa en la boca, cremosidad media y en ellos se observaba un corte limpio. Asimismo, presentaron menor firmeza, menor separación del suero y fueron relativamente resistentes al batido. En cambio, en la otra microestructura observada, el EPS se ubicaba dentro de los poros, en la fase formada por suero. Según los perfiles sensoriales, estos productos eran menos filantes, presentaban menor espesor en la boca, eran un poco más cremosos y tenían mayor firmeza. Al batirlos, se los sintió más espesos en la boca, debido a rearrreglos que resultaron en más interacciones en el producto,

y mostraron niveles altos de sinéresis. Estas observaciones indicaron que esta última microestructura fue menos resistente al tratamiento mecánico, y no fue capaz de mantener el suero dentro del producto, en comparación con la primera microestructura descrita.

En otro estudio, Vreeker y col. (2000) analizaron 4 cepas productoras de EPS de composición conocida. Dos producían polisacáridos lineales compuestos por azúcares neutros, y las otras dos producían EPS aniónicos con grupos fosfatos cargados a lo largo de la cadena lineal. Los autores encontraron que las propiedades tecnológicas de los productos fermentados dependían de las cargas de los EPS y propusieron un modelo que explica cómo la carga determina la distribución del polisacárido en la red proteica. Este modelo asume una interacción fuerte y directa entre EPS de carga negativa y la red proteica, resultando en una estructura similar a la primera observada por Folkenberg y col. (2005). En cambio, los EPS no cargados, como podrían ser los producidos por *L. fermentum* Lf2 (hasta el momento no se ha detectado la presencia de ligandos cargados en su estructura), se ubicarían en los poros de la red proteica, como se observó para la segunda estructura propuesta por el modelo de Folkenberg y col. (2005). Por otro lado, teniendo en cuenta el tipo de uniones detectadas en la estructura de los dos polisacáridos identificados en el extracto de EPS estudiado (un β -glucano ramificado en la posición 2 de PM $1,8 \times 10^3$ kDa, y un HePS compuesto por glucosa y galactosa de PM 90 kDa, capítulo 3), se justifica la respuesta observada ya que se consideran mejores espesantes aquellas moléculas de EPS con elevado PM ($> 10^3$ kDa) y con alta proporción de uniones $\beta(1,4)$, lo que le otorga mayor rigidez a la estructura de la matriz (Laws y Marshall, 2001b; Torino y col., 2015) en comparación a la observada en presencia de enlaces $\beta(1,3)$ y $\beta(1,2)$ (como las presentes en el polímero de mayor PM) o $\alpha(1,6)$ y $\alpha(1,2)$ (como en nuestro caso, para el polímero de mediano PM) que son uniones más flexibles y que resultan espesantes más débiles. Esto justificaría, en parte, los resultados obtenidos a partir de nuestros estudios reológicos y sensorial, donde se detectan efectos relativamente suaves sobre la viscosidad y la consistencia de los yogures suplementados con EPS.

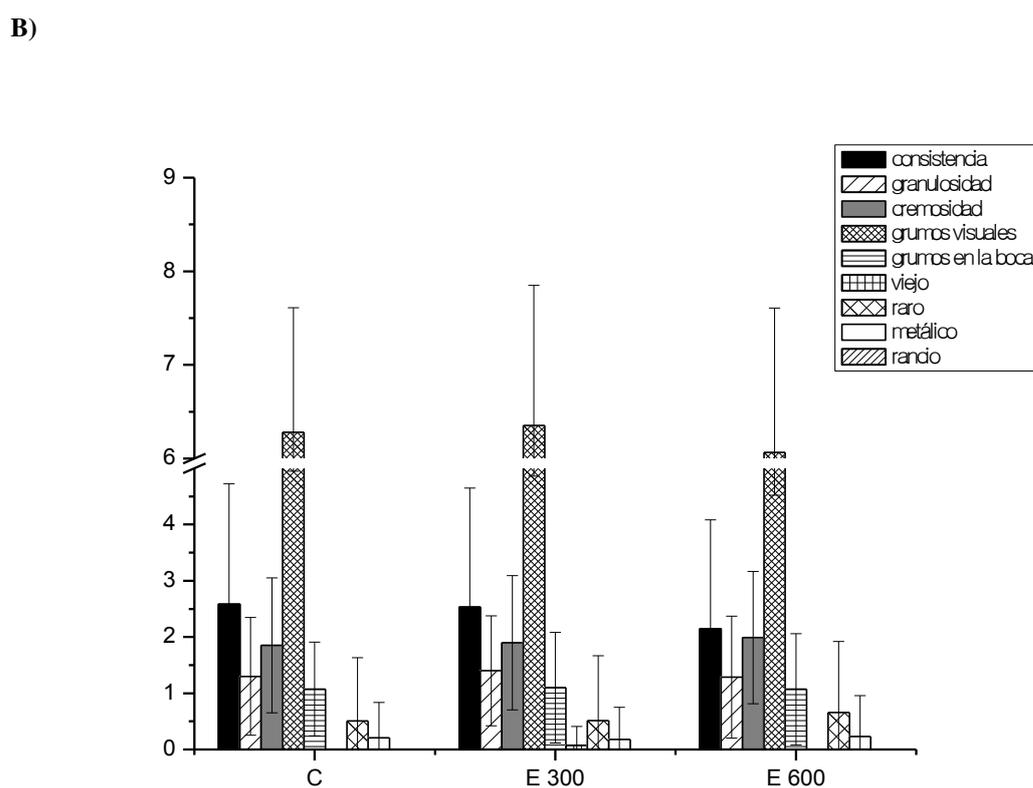
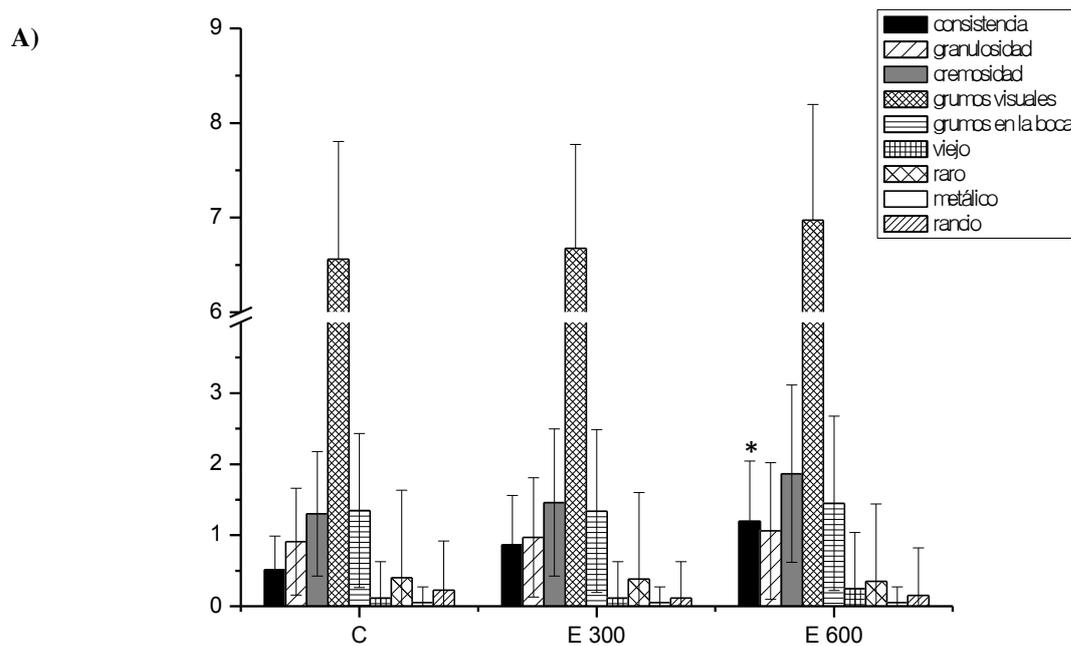


Figura 5. 10. Evolución de los descriptores de textura (consistencia, granulosis, cremosidad y presencia de grumos) y defectos (sabores a viejo, raro, metálico y rancio) de los yogures controles (C) y adicionados de 300 (E300) y 600 (E600) mg EPS/L luego de 3 (A) y 25 (B) días de almacenamiento. Las barras representan valores promedios \pm SD. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$).

Tabla 5. 3. Promedios ponderados y porcentajes percibidos para los atributos del *flavor* para los yogures controles y adicionados de EPS (300 y 600 mg/L) luego de 3 y 25 días de almacenamiento a 4 °C. Prom. pond.: promedio ponderado; % Perc.: % percibido.

Atributo	3 días						25 días					
	control		300 mg/L		600 mg/L		control		300 mg/L		600 mg/L	
	Prom. pond.	% Perc.										
Leche en polvo	0,10	10	0,10	10	0,05	5	0,15	15	0,10	10	0,25	15
Ácido	2,90	80	3,50	80	2,60	60	3,00	90	3,35	85	2,30	80
Dulce	1,30	30	0,85	25	1,40	20	0,60	20	0,20	10	0,25	15
Amargo	0,20	10	0,10	10	0,05	5	0,20	10	0,35	15	0,60	20
Leche cocida	0,35	15	0,40	20	0,45	15	0,30	20	0,25	25	0,30	10

5.3.1.4. Sinéresis de yogures

La determinación de la sinéresis mostró (Tabla 5.2) que los yogures adicionados con 300 mg/L de EPS presentaron menor ($p < 0,05$) sinéresis que aquellos con 600 mg/L de EPS, pero no se evidenciaron diferencias con el grupo control, a los 3 días de elaboración.

Al final de la vida útil, los yogures con 600 mg/L de EPS presentaron menor sinéresis ($p < 0,05$) que los yogures con 300 mg/L y el grupo control. El mejoramiento en la capacidad de retención de agua de los yogures con EPS ha sido descripta en diversos estudios previos; por ejemplo, Zhang y col. (2016) informaron que una cepa de *L. bulgaricus* productora de EPS mejoró la capacidad de retención de agua en yogures batidos bajos en grasa. Amatayakul y col. (2006b) observaron una respuesta similar para yogures firmes con 14% de sólidos. Además, Buldo y col. (2016) concluyeron que yogures batidos elaborados con un cultivo iniciador que produce altas cantidades de EPS presentaron una sinéresis reducida en comparación a los controles. Qin y col. (2011) informaron resultados similares, ya que observaron que yogures fermentados con la cepa productora de EPS, *S. thermophilus* 05–34, mostraron menor susceptibilidad a la separación de suero que el grupo control. El aumento de la capacidad de retención de agua de yogures con EPS puede ser explicada debido a que, al utilizar cepas EPS⁺, se produce una interacción favorable entre las proteínas de la matriz y el EPS, dando lugar a la formación de grandes poros ricos en suero donde se localiza el EPS, produciendo una segregación de fases. Por otro lado, los yogures con cultivos EPS⁻ suelen presentar una fase homogénea, con poros pequeños y uniformemente distribuidos (Hassan y col., 2003). En nuestro caso, considerando los cambios desencadenados por el tiempo, el grupo control no presentó diferencias significativas entre los 3 y 25 días de almacenamiento, mientras que para los yogures con 300 mg/L de EPS aumentó levemente, y para las muestras con 600 mg/L de EPS disminuyó la sinéresis con el tiempo ($p < 0,05$). Este resultado indica que la concentración

de EPS más alta puede tener un impacto positivo sobre la capacidad de retención de agua de las muestras durante el tiempo de almacenamiento. Estos resultados concuerdan con los modelos propuestos por Vreeker y col. (2000) y las observaciones de Folkenberg y col. (2005) para EPS no cargados. Según este modelo, el EPS de *L. fermentum* Lf2 (integrado, al menos, por dos polisacáridos ramificados) daría lugar a la formación de poros grandes en la red proteica donde se ubica el EPS en la fase formada por el suero, dando lugar a una microestructura poco resistente al tratamiento mecánico, favoreciendo la segregación de fases y que, en parte, beneficiaría la sinéresis del producto final (efecto opuesto a lo que se sugiere para EPS cargados). De todas maneras, estudios reológicos y estructurales adicionales deberían llevarse a cabo para conocer la naturaleza de la interacción entre estos polímeros y la matriz donde se encuentran.

5.3.2. Estudio de la influencia del EPS crudo en queso Cheddar

5.3.2.1. Influencia del extracto de EPS en la coagulación de la leche

Se evaluó el impacto de la adición del extracto de EPS en 1 g/L (concentración utilizada en la elaboración de los quesos) durante la coagulación de la leche mediante determinaciones reológicas con un reómetro oscilatorio dinámico de pequeña amplitud. Los resultados se muestran en la Tabla 5.4, indicando que no hubo diferencias significativas para G' , LT y GT entre la leche adicionada y control.

Tabla 5. 4. Análisis reológico de las propiedades de coagulación de la leche con 1 g/L de extracto de EPS (E) y sin extracto (C), adicionada de quimosina. G' 60 min: módulo elástico a los 60 min; LT: tangente de pérdida; GT: tiempo de gelificación.

	G' 60 min	LT	GT (min)
C	38,42 ± 0,03	0,313 ± 0,002	13 ± 1
E	40 ± 4	0,314 ± 0,004	17 ± 2

Ibáñez y col. (2016) evaluaron las consecuencias de agregar tres tipos de pectinas comerciales a quesos Cheddar reducidos en grasas y también evaluaron las propiedades reológicas de la leche de elaboración durante la coagulación. Observaron que la tangente de pérdida (LT) a los 45 min sólo disminuyó con la pectina amidada mientras que permaneció similar a los quesos bajos en grasas controles con las pectinas de alto y bajo metoxilo. El tiempo de gelificación (GT) fue reducido con las tres pectinas y el módulo elástico (G') a los 45 min fue menor que el grupo control para la pectina amidada y mayor para las otras dos. En nuestro estudio no se vieron

diferencias significativas para LT, G' y GT entre los quesos con y sin extracto de EPS, indicando que el agregado de extracto crudo en la concentración evaluada no afecta la coagulación de la leche de elaboración.

5.3.2.2. Análisis fisicoquímicos de quesos Cheddar

La composición de los quesos Cheddar-1 kg a los 9 días de maduración se muestra en la Tabla 5.5. No se observaron diferencias significativas en los parámetros evaluados entre los quesos tratados y control. Además, se determinó el pH a los 30, 60, 90 y 120 de maduración y no se observaron diferencias significativas entre los grupos (Figura 5.11).

Con respecto a los miniquesos, los controles presentaron más humedad (38,1 % vs. 36,1%) que los tratados ($p < 0,05$), mientras que no se detectaron diferencias significativas para los demás parámetros. Los valores promedios de pH, proteínas, grasa y sal de los miniquesos fueron: 5,4, 23,7%, 30,4% y 1,06%, respectivamente.

Tabla 5. 5. Análisis de la composición de los Cheddar-1 kg controles (C) y con agregado de extracto de EPS (E) a los 9 días de maduración. Se presenta promedio \pm SD. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada queso.

	Proteínas (%)	Grasa (%)	Humedad (%)	pH	Sal (%)
C	24 \pm 1	35 \pm 1	38 \pm 2	5,2 \pm 0,2	1,7 \pm 0,1
E	24,8 \pm 0,6	34 \pm 1	38 \pm 2	5,2 \pm 0,1	1,7 \pm 0,3

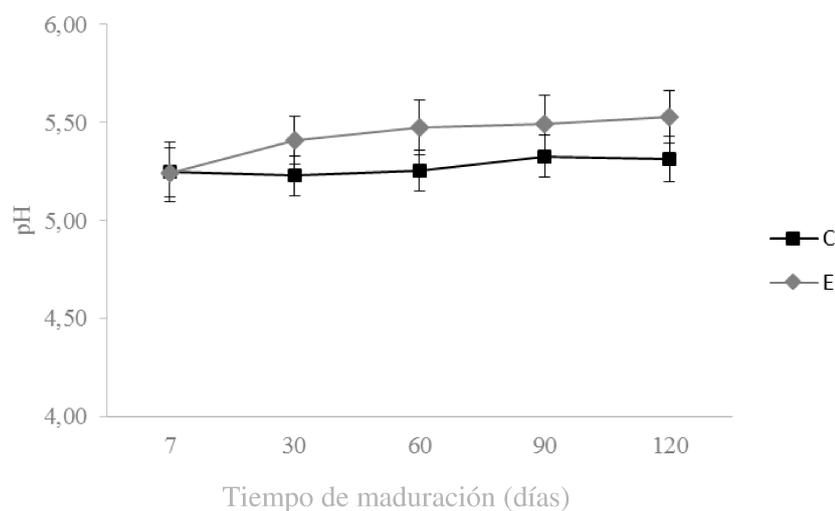


Figura 5. 11. Evolución del pH durante la maduración para los quesos Cheddar-1 kg controles (C) y con EPS (E) durante los 120 días de maduración. Los resultados se expresan como promedios \pm SD.

Debido a que no existen antecedentes que describan la influencia de la adición de EPS en quesos, se utilizaron como referencia estudios en los que se evaluó el comportamiento de otros polisacáridos en alimentos, y que permitieron elegir la concentración de EPS a usar en este trabajo. Por ejemplo, como se mencionó anteriormente, Ibáñez y col. (2016) evaluaron las consecuencias de agregar tres tipos de pectinas comerciales a quesos Cheddar (si bien reducidos en grasas), ya que se demostró que los hidrocoloides mejoraban la textura de quesos reducidos en grasas (Johnson y col., 2009; Mistry, 2001). Las concentraciones que usaron variaron desde 0,075% a 0,175% (m/m), y los niveles se eligieron de modo de evitar la separación de fase de las micelas de caseína. Antes de la elaboración de los quesos Cheddar, se evaluó si no ocurría la separación de fases a la concentración de extracto de EPS elegida. En aquel trabajo, las pectinas fueron agregadas a la leche antes del proceso, en la misma etapa en la que se adicionó el EPS. Oberg y col. (2015) evaluaron diferentes gomas y almidones en quesos Mozzarella bajos en grasa y concluyeron que la goma xantano tuvo efectos positivos en la aceptación sensorial y elasticidad de los quesos cuando el queso fue elaborado usando una solución al 10% de goma xantano adicionada a un nivel del ~1% (m/m). La adición de esta goma no cambió la composición de los quesos, resultado que coincide con lo observado para el extracto de EPS de nuestro estudio.

5.3.2.3. Análisis de los perfiles de textura (APT) de quesos Cheddar

En una etapa preliminar, se ensayó el agregado de extracto de EPS en miniquesos, previo a pasar a una escala mayor. A partir del análisis de textura, los miniquesos con extracto de EPS (1 g/L) presentaron valores mayores de dureza (11431,64 g vs. 8995,79 g), elasticidad (0,517 vs. 0,489), cohesividad (0,238 vs. 0,187), gomosis (1430,4 vs. 822,4) y resiliencia (0,067 vs.

0,045) que el grupo control. Considerando estos resultados preliminares, se elaboraron los quesos con esta misma concentración de EPS a mayor escala (1 kg) para evaluar dichos parámetros (Figura 5.12) y, en este caso, aunque todos los valores determinados fueron mayores para las muestras tratadas, las diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$) con respecto al grupo control a todos los tiempos de maduración analizados.

Ibañez y col. (2016) observaron que los quesos con pectinas presentaron menor dureza que los controles a los 180 días de maduración, mientras que las propiedades de fusión o *melting* se vieron mejoradas durante la maduración. Además, los quesos tratados con pectinas presentaron contenidos de humedad más altos. En nuestro caso, aunque la dureza aumentó levemente en los quesos tratados con EPS en comparación con los controles, la textura y la composición no fueron significativamente diferentes entre ellos. Con respecto a la cohesividad y elasticidad, los quesos con y sin pectinas presentaron valores similares a los 180 días de maduración. En otro trabajo, Rahimi y col. (2007) analizaron el efecto de diferentes concentraciones de goma tragacanto (0,25 a 1 g/kg de leche) sobre la textura del queso blanco iraní bajo en grasas durante la maduración. Estos autores observaron que altas concentraciones de esta goma volvieron a los quesos más suaves y más blancos, y además presentaron más humedad que los controles. La goma fue agregada antes del cultivo iniciador al igual que en nuestro trabajo. Cabe destacar que tanto la pectina como la goma tragacanto utilizadas en estos trabajos son polímeros cargados negativamente y de PM similares a los descritos para el extracto de EPS, ampliamente utilizados como agentes gelificantes en la industria de alimentos.

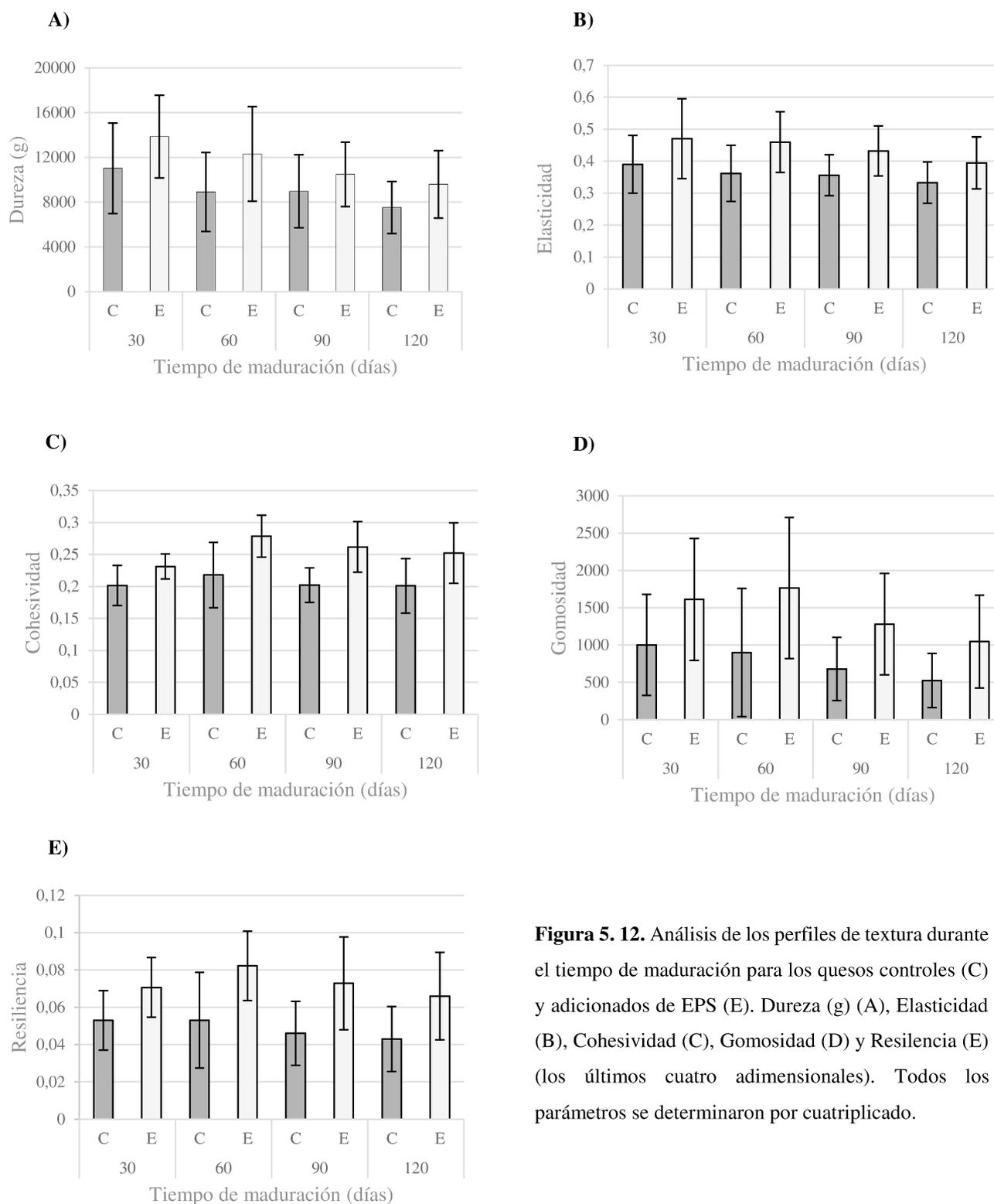


Figura 5. 12. Análisis de los perfiles de textura durante el tiempo de maduración para los quesos controles (C) y adicionados de EPS (E). Dureza (g) (A), Elasticidad (B), Cohesividad (C), Gomosidad (D) y Resiliencia (E) (los últimos cuatro dimensionales). Todos los parámetros se determinaron por cuatuplicado.

Cooke y col. (2013) investigaron el efecto de la goma tragacanto en las propiedades reológicas y funcionales de quesos Cheddar no reducidos en grasa y reducidos un 50% en grasa. La leche de elaboración fue suplementada con la goma a una concentración de 0,05% (m/v). Observaron un aumento en la humedad de los quesos por la adición de esta goma, acompañado

de una disminución en la dureza y elasticidad durante la maduración, detectando una leve disminución en el pH en presencia de la goma, efecto que favorecería la proteólisis a través del mejoramiento de la actividad de la quimosina. Con respecto a la dureza, los quesos reducidos en grasa un 50% fueron generalmente los quesos más duros y significativamente más duros que los controles sin reducción de grasa en la mayoría de los tiempos evaluados; y cuando el contenido de grasa fue reducido, el efecto de la adición de la goma fue más apreciable.

Numerosos trabajos describen los efectos de cepas EPS⁺ sobre las propiedades tecnológicas de productos lácteos. Por ejemplo, Costa y col., informaron en diversas publicaciones (Costa y col., 2010; Costa y col., 2012a; Costa y col., 2012b) el efecto de una cepa EPS⁺ de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* capaz de mejorar la funcionalidad y rendimiento de quesos reducidos en grasas, en comparación con su cepa isogénica EPS⁻. Esta cepa le otorgó a la leche mayor viscosidad, propiedad que fue relacionada a la separación de fase de este EPS causada por interacciones de segregación, produciendo como consecuencia la formación de agregados de caseína más grandes. Por otro lado, Zisu y Shah (2007) produjeron un queso Mozzarella bajo en grasas con dos cepas de *S. thermophilus* productoras de EPS, una de ellas producía EPS *ropy* y la otra, EPS capsular. En este caso, la dureza fue mayor para los quesos controles que la obtenida para quesos con EPS. En general, los EPS aumentaron la meltabilidad y mejoraron la textura de los quesos, pero, debido a que se detectaron una secreción desagradable en los quesos elaborados con la cepa *ropy*, los autores sugirieron el uso de la cepa productora de EPS capsular, con la cual las mejoras de textura no se ven acompañadas de efectos indeseables. Hassan y col. (2005) usaron cultivos EPS⁺ en la manufactura de quesos Cheddar reducidos en grasa, y detectaron un aumento en la humedad. El uso de un cultivo de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* productor de EPS previno la reducción en la rigidez durante la maduración. Además, las propiedades viscoelásticas obtenidas fueron similares a las de los quesos sin reducción de grasa durante la maduración. Al igual que en este estudio, el pH no fue diferente entre las muestras.

5.3.2.4. Análisis microbiológico de queso Cheddar

En la Figura 5.13 se puede ver la variación en los recuentos de SLAB y NSLAB durante la maduración de los quesos Cheddar-1 kg. El nivel del cultivo iniciador (SLAB) decreció (reducción de 1,79 órdenes log) con el tiempo, mientras que la flora secundaria (NSLAB) aumentó (> 4 órdenes log) durante la maduración, como era esperable. No se observaron diferencias significativas entre los quesos controles y tratados, señalando que la adición de este extracto de EPS no altera las características microbiológicas del queso Cheddar.

De un modo similar, Ibañez y col. (2016) evaluaron el efecto de la adición de distintos tipos de pectinas a quesos Cheddar reducidos en grasas y tampoco observaron diferencias significativas entre los tratamientos tanto para el cultivo iniciador como para la flora secundaria a los 180 días. Cooke y col. (2013) también observaron que la adición de la goma tragacanto no afectó al recuento de SLAB y NSLAB en quesos Cheddar reducidos y no reducidos en grasas.

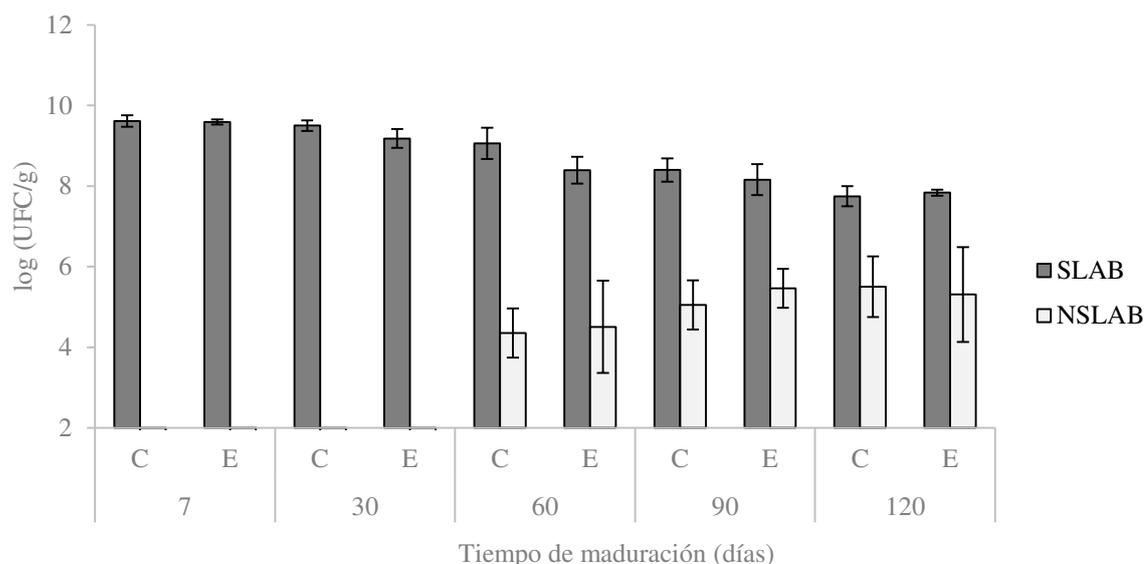


Figura 5. 13. Análisis microbiológico de los quesos Cheddar-1 kg controles (C) y con agregado de 1 g/l de extracto de EPS (E) y durante la maduración (7, 30, 60, 90 y 120 días). SLAB: cultivo *starter* o iniciador (LM17, 30 °C, 3 días, aerobiosis); NSLAB: cultivos no *starter* o flora secundaria (Rogosa, 30 °C, 5 días, anaerobiosis). Los valores representan promedios \pm SD.

5.3.2.5. Proteólisis primaria y secundaria de queso Cheddar

En los miniquesos se analizó el grado de proteólisis y no se observaron cambios importantes entre controles y tratados. Para estas muestras, los resultados obtenidos con el método de TNBS no mostraron diferencias significativas entre las muestras, a los 14, 30, 60 y 90 días de maduración, indicando que la adición del extracto de EPS a la concentración usada no cambió significativamente el contenido de aminoácidos libres en el queso durante la maduración (Figura 5.14). Los resultados derivados del análisis de los geles UREA-PAGE se correspondieron con aquellas observaciones (Figura 5.15). A partir de los extractos solubles a pH 4,6 de los miniquesos se analizaron los perfiles peptídicos mediante RP-UPLC y tampoco se vieron diferencias muy notorias entre los grupos a los 14, 30, 60 y 90 días de maduración.

La Figura 5.16 muestra los perfiles obtenidos para los quesos controles y tratados a los 90 días de maduración.

Con respecto a los Cheddar-1 kg, el análisis por UREA-PAGE (Figura 5.17) no mostró diferencias de importancia entre los quesos con y sin extracto de EPS, a los 9 y 120 días de maduración, resultado que coincide con los ensayos preliminares para los miniquesos.

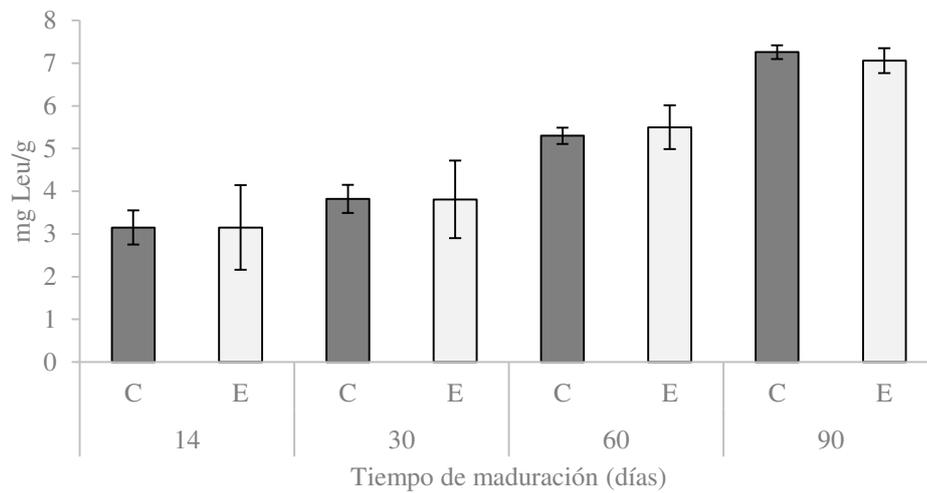


Figura 5. 14. Determinación de aminoácidos libres por el método de TNBS para la fracción soluble a pH 4,6 de los miniquesos a los 14, 30, 60 y 90 días de maduración. C: controles, E: quesos adicionados de extracto de EPS (1 g/L). Las barras representan promedios ± SD.

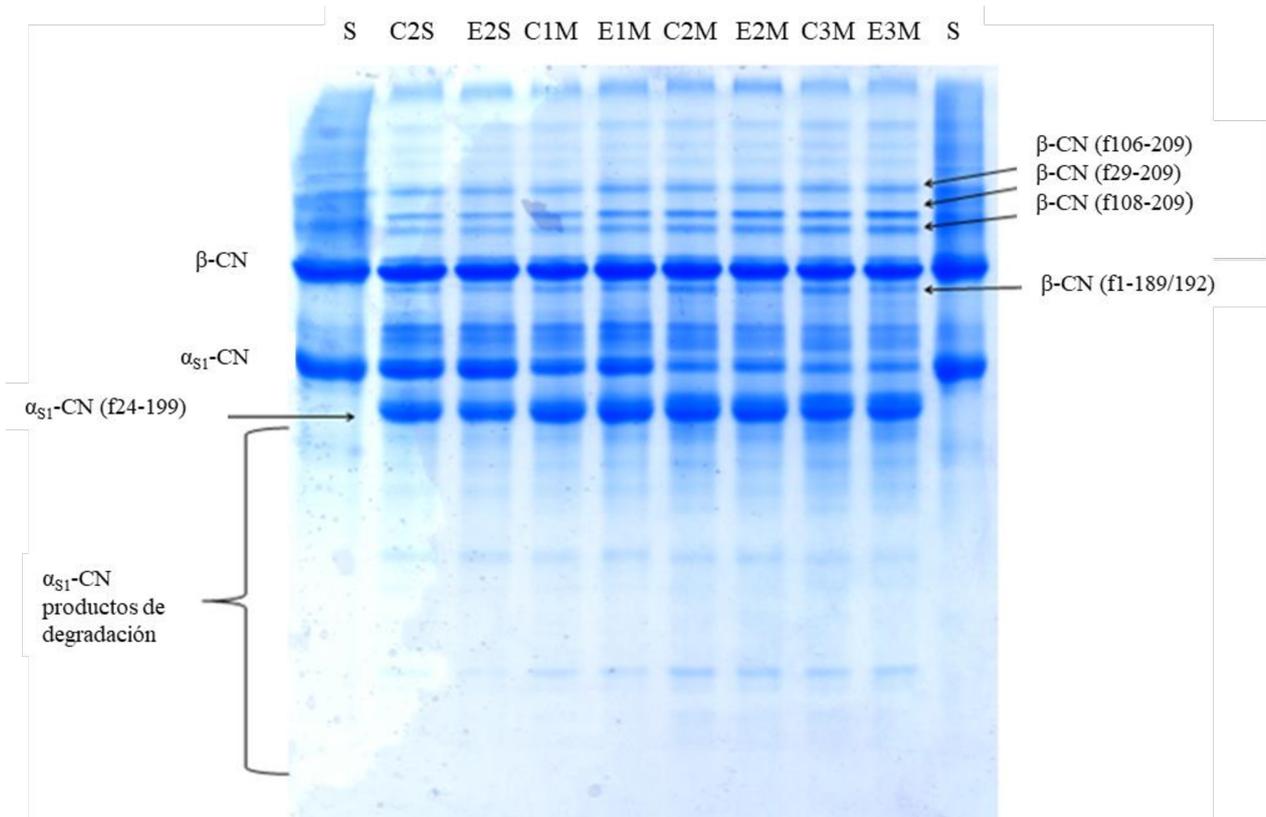


Figura 5. 155. Gel de UREA-PAGE con caseinato de sodio como estándar (S) para las fracciones insolubles a pH 4,6 obtenidas a partir de los miniquesos controles (C) y adicionados de 1g/L de EPS (E) a los 14 (2S), 30 (1M), 60 (2M) y 90 (3M) días de maduración.

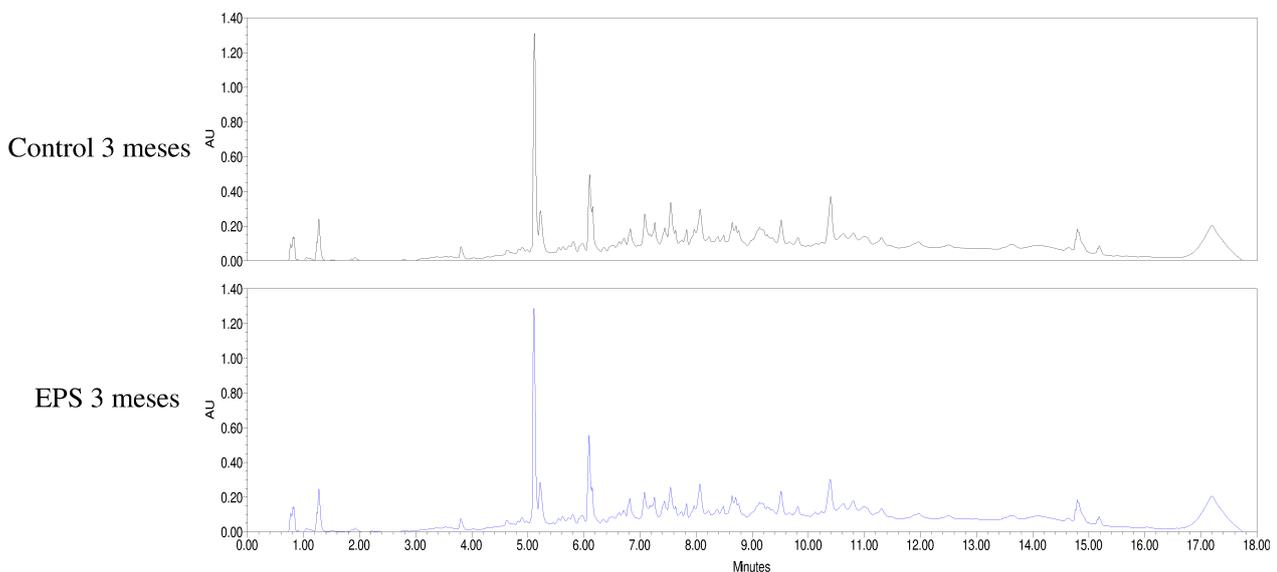


Figura 5. 16. Perfiles peptídicos (UPLC) obtenidos para los miniquesos controles y con extracto de EPS a los 90 días de maduración.

En el trabajo de Ibáñez y col. (2016) también se estudiaron las proteólisis primaria y secundaria en quesos Cheddar reducidos en grasa adicionados de diferentes tipos de pectinas,

y tampoco encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a los 180 días de maduración. Di Cagno y col. (2014) usaron una cepa de *S. thermophilus* EPS⁺ para elaborar un queso italiano tipo Caciotta, bajo en grasa y con concentrado de proteínas de suero microparticulado, evidenciando un incremento en la humedad y con mejores atributos sensoriales para los quesos con EPS. El análisis con UREA-PAGE de la fracción de N insoluble a pH 4,6 reveló diferencias no significativas entre los quesos controles y tratados, y tampoco se encontraron diferencias significativas con respecto a los perfiles peptídicos y niveles totales de aminoácidos libres. El pH al inicio de la maduración fue el mismo y se mantuvo similar en el tiempo, como también observamos en nuestro trabajo. Además, tampoco vieron diferencias en los recuentos celulares. Dabour y col. (2006) estudiaron el efecto de cepas de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* productoras de EPS capsulares en quesos Cheddar reducidos al 50% en grasas. Como se describió anteriormente, la humedad aumentó para los quesos con las cepas productoras de EPS. Observaron que los quesos tratados con dichas cepas fueron menos firmes, elásticos y cohesivos con respecto a su textura, y fueron más frágiles que los quesos controles. El contenido de nitrógeno soluble en agua aumentado en los quesos con esta cepa productora de EPS *ropy* fue atribuido a la elevada humedad o a las actividades proteolíticas y autolíticas de la cepa. En este caso, la cepa *ropy* causó una disminución en el pH en comparación a los controles bajos en grasas durante la maduración.

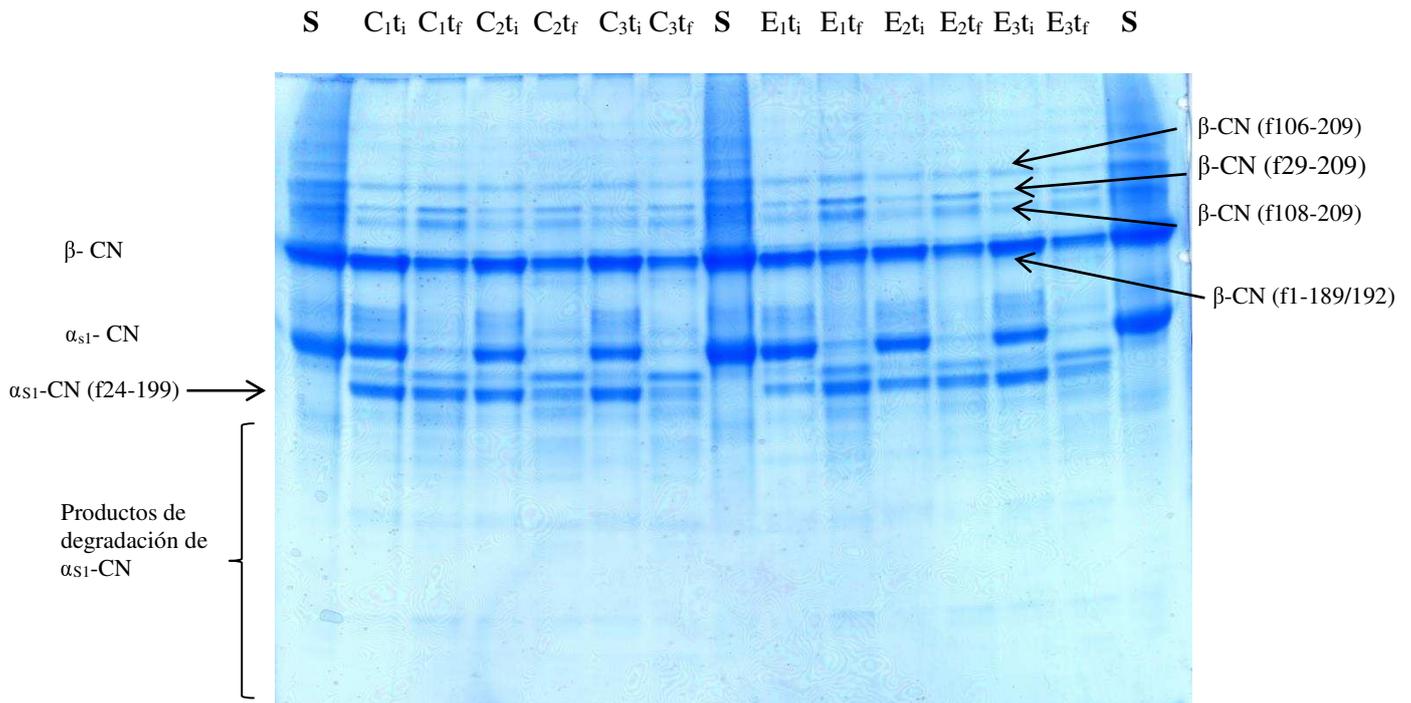


Figura 5. 17. Gel de UREA-PAGE para los quesos de 1 kg controles (C) y adicionados de 1 g/L de EPS (E) a los 9 (ti) y 120 días de maduración (tf). S: caseinato de sodio.

Considerando nuestros resultados, no se apreciaron cambios en los quesos Cheddar adicionados de extracto de EPS con respecto a sus propiedades microbiológicas y texturales, ni a la proteólisis primaria y secundaria de las muestras. En relación a la composición, no se obtuvieron diferencias significativas para los Cheddar-1 kg, pero los miniquesos con extracto de EPS presentaron valores mayores de humedad que los miniquesos controles. Esta diferencia, que no fue observada en la escala mayor, pudo haberse debido a algunas diferencias en los procedimientos. Por ejemplo, los miniquesos una vez que el suero fue drenado, se sumergieron en salmuera por 30 min, mientras que los quesos Cheddar-1 kg se salaron en seco. Además, los miniquesos fueron removidos de la salmuera y mantenidos *o.n.* para que se produzca el balance de sal y humedad, mientras que los Cheddar-1 kg fueron presionados *o.n.*

En estudios futuros, una mayor concentración de EPS podría aplicarse, ya que, para todos los parámetros de textura evaluados, se vio una tendencia de aumento con el agregado de EPS en comparación con los controles, a pesar de que las diferencias no llegaron a ser significativas. Estos resultados se podrían explicar considerando que *L. fermentum* Lf2 produce, al menos, dos EPS y de pesos moleculares que oscilan entre relativamente alto y medio ($1,8 \times 10^3$ kDa y 90 kDa, en proporción 40% y 45% en la fracción total, respectivamente) en comparación con otros espesantes utilizados en la industria, como el xantano, de alrededor 2500 kDa, y que además presenta estructura lineal y carga negativa. Otros espesantes tales como el alginato (32-

200 kDa), pectinas (5- 150 kDa) y carragenanos (200- 400 kDa), aunque no superen el tamaño del EPS de mayor PM, presentan carga negativa (Friberg y col., 2003) . Además, podría ser de interés estudiar sus efectos en los parámetros de textura de quesos reducidos en grasa, como se ha propuesto en otros trabajos, para evaluar el potencial del EPS de *L. fermentum* Lf2 como sustituto de la grasa láctea. En base a la bibliografía analizada, la influencia de los espesantes se evidencia más notablemente en quesos con reducido porcentaje de grasa y, probablemente, eso ocurra con el EPS de *L. fermentum* Lf2. Además, el efecto de la adición de EPS sobre la salud podría ser estudiado también, en un modelo murino por ejemplo, ya que para el EPS en estudio se verificaron efectos funcionales en yogures con un concentraciones mucho menor a la estudiada en este caso (Ale y col., 2016; capítulo 6 de esta Tesis).

5.4. Conclusiones parciales

El EPS de *L. fermentum* Lf2 incorporado como ingrediente alimentario en una concentración de 300 mg/L otorgó a los yogures dureza e índice de consistencia aumentados, y una mayor pseudoplasticidad que las muestras controles, permitiendo la producción de un yogur sin defectos sensoriales. Asimismo, la sinéresis se vio ligeramente reducida (cuando se agregó en la mayor concentración, 600 mg/L). De este modo, el EPS agregado como ingrediente a los yogures mejora la viscosidad sin afectar en gran medida el grado de sinéresis, resultados que se corresponden con lo descrito en la bibliografía para moléculas de polisacáridos del tipo a las identificadas en este extracto (enlaces glicosídicos $\alpha(1,6)$ y $\beta(1,3)$ característicos de cadenas flexibles y poco rígidas), que suelen actuar como espesantes ligeros y no afectan significativamente la viscosidad de las matrices donde se adicionan.

De todos modos, las ligeras mejoras detectadas en la textura de los yogures permiten concluir que este EPS posee potencial para ser usado como un ingrediente natural tecnofuncional, reemplazando el uso de los aditivos de uso común en la industria. Serían necesarios estudios suplementarios basados en los cambios en la matriz (aumentando posiblemente los niveles de sólidos totales en la leche o el contenido de grasa, por ejemplo) para optimizar su aplicación en productos lácteos, y poder dilucidar su comportamiento en muestras similares a los yogures industriales disponibles en el mercado. Asimismo, el estudio de la interacción con la matriz alimentaria (mediante estudios en modelos más simples y posterior microscopía confocal de barrido, por ejemplo) así como la identificación integral de los polisacáridos presentes en este extracto aportarían las bases moleculares para comprender su influencia en los parámetros de textura.

A partir del estudio en queso Cheddar elaborado con leche entera, se concluye que este extracto de EPS no modificó significativamente las características microbiológicas y de textura de las muestras durante la maduración, y tampoco alteró la composición o los perfiles de proteólisis de estos quesos. De acuerdo al análisis reológico, la coagulación de la leche no se vio afectada negativamente por la adición de este extracto. Por lo tanto, al menos en las condiciones estudiadas, este tipo de matriz es compatible con la adición de este exopolisacárido. A partir de estas observaciones y teniendo en cuenta las diversas propiedades funcionales evidenciadas para el EPS crudo de *L. fermentum* Lf2 (capítulo 6), el queso Cheddar sería una matriz apropiada para la elaboración de un nuevo alimento funcional con características reológicas, microbiológicas y fisicoquímicas idénticas a la de un queso Cheddar tradicional, que resultaría claramente aceptable por parte del consumidor.

*Capítulo 6: Caracterización funcional del
extracto de EPS producido por *L. fermentum*
*Lf2**

6.1. Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud, los alimentos funcionales son “aquellos que ejercen efectos benéficos en el consumidor más allá de la nutrición básica” (FAO/WHO, 2002). El mercado de alimentos funcionales se encuentra en constante expansión debido a la adopción creciente por parte de los consumidores de hábitos de vida más saludables, para cuyo crecimiento es fundamental la generación y difusión de estudios científicos que sientan las bases mecanísticas por las cuales las bacterias probióticas o ciertos ingredientes alimentarios ejercen sus efectos benéficos. De este modo, desde los comienzos de este siglo, el desarrollo de alimentos funcionales se ha incrementado significativamente, generando un importante impacto tanto en el ámbito de la salud como en el económico. Los EPS de BAL han demostrado poseer propiedades beneficiosas para la salud del consumidor, de modo que, tanto sus cepas productoras como el polisacárido propiamente dicho resultan adecuados para la formulación de alimentos funcionales novedosos. Algunos trabajos se han llevado a cabo mediante administración oral de dichos compuestos. Entre estos trabajos, la mayor parte se refiere al efecto de los EPS ocasionado *in situ* por administración de la bacteria productora (Salazar y col., 2011; Vinderola y col., 2005) y sólo unos pocos estudiaron el efecto de EPS crudos extraídos de cultivos bacterianos (Rodríguez y col., 2009; Rodríguez y col., 2010; Vinderola y col., 2006).

La mayoría de las investigaciones sobre los efectos moduladores del sistema inmune de los EPS producidos por lactobacilos se ha concentrado en los macrófagos, ya que representan una gran proporción de la población de células del sistema inmune innato. Por ejemplo, se ha visto que EPS aislados de *L. rhamnosus* RW-9595M y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* promovieron la proliferación de poblaciones de macrófagos humanas y murinas (Chabot y col., 2001; Kitazawa y col., 1998). Un estudio más reciente (Bleau y col., 2010) demostró que el EPS aislado de *L. rhamnosus* RW-9595M pudo también inhibir la producción de TNF- α , IL-6 e IL-12 y estimular la secreción de IL-10 (citoquina reguladora) en macrófagos peritoneales murinos, sugiriendo un rol antiinflamatorio del mismo. Por otro lado, Wachi y col. (2014) informaron que EPS aislados de la especie *L. delbrueckii* fueron capaces de inhibir significativamente la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-8 y MCP-1) inducidas por *E. coli* enterotoxigénica en células epiteliales intestinales porcinas. Asimismo, Nowak y col. (2012) demostraron que la administración sistémica de un EPS de *L. rhamnosus* KL37C produjo una disminución significativa en la concentración sérica de anticuerpos IgG específicos de colágeno tipo II en un modelo murino de artritis reumatoide, mejorando, en consecuencia, la condición.

También se les ha atribuido un rol positivo a los EPS frente a la inflamación intestinal. Şengül y col. (2006) demostraron, en un modelo murino de colitis inducida por ácido acético, que el cuadro pudo ser aliviado significativamente por una cepa productora de grandes cantidades de EPS, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3, cuando se comparó el tratamiento con otra cepa con escasa capacidad de producir EPS, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* A13. La primera cepa (B3) también presentó actividades antioxidantes y quelantes de iones metálicos aumentadas en comparación con la cepa A13.

Otros estudios se han enfocado en las propiedades antitumorales de estas moléculas. En la publicación de Choi y col. (2006) se analizó la eficacia antiproliferativa de EPS de lactobacilos, demostrando que la fracción soluble de polisacáridos obtenida a partir de células de *L. acidophilus* 606 tratadas térmicamente fue capaz de inhibir significativamente la proliferación de una línea celular de carcinoma de colon. Otro trabajo más reciente (Wang y col., 2014) demostró actividad antitumoral para un EPS de *L. plantarum* 70810, asociada a un efecto anti-proliferativo moderado sobre la línea celular HepG-2 de carcinoma hepático, así como por efectos significativos sobre las líneas HT29 de cáncer de colon y BGC-823 de carcinoma gástrico.

Los EPS también se han relacionado con efectos protectores frente a gastritis inducida por ácido acetilsalicílico en modelos *in vivo*. Rodríguez y col. (2009) describieron que, tanto la cepa productora de EPS *S. thermophilus* CRL 1190, como el EPS purificado resuspendido en leche, fueron efectivos para prevenir gastritis crónica y además, podrían ser aplicados como una terapia alternativa para tratar la gastritis una vez inducida (Rodríguez y col., 2010).

Asimismo, se han relacionado los EPS de BAL a la disminución del colesterol en sangre. Tal fue el caso de los trabajos de Maeda y col. (2004a) y Ai y col. (2008), quienes alimentaron ratas espontáneamente hipertensas con EPS de kefiran de *L. kefiranofaciens* WT-2B y EPS de *L. casei* LC2W. Las ratas tratadas exhibieron menor presión sanguínea sin que su ritmo cardíaco se viera afectado y, en el caso del kefiran, se encontraron niveles menores de colesterol y triglicéridos en suero e hígado con respecto al grupo control.

Por su parte, un compuesto prebiótico se define como “un sustrato que es utilizado selectivamente por los microorganismos del hospedador confiriendo un beneficio para su salud” (Gibson y col., 2017). Los prebióticos que han sido más estudiados en relación a sus propiedades funcionales son inulina (compuesta por fructosa), fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS) y glucooligosacáridos como los β -glucanos. La fermentación de estos sustratos por las bacterias beneficiosas intestinales conduce a la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA), principalmente ácidos acético, propiónico y butírico. Estos

compuestos cumplen funciones importantes para los colonocitos, contribuyen a regular el metabolismo de lípidos y azúcares del hospedador y, al disminuir el pH intestinal, favoreciendo la exclusión de patógenos. La composición química de varios EPS se asemeja a la de ciertos carbohidratos prebióticos (aunque son mayores en tamaño), siendo entonces candidatos adecuados para la fermentación por parte de la microbiota intestinal (Ruas-Madiedo y col., 2008). Dentro de los efectos saludables adjudicados a los EPS, el rol prebiótico es una de las funciones menos estudiada (Salazar y col., 2011; Salazar y col., 2016). Por ejemplo, se han reportado propiedades bifidogénicas para EPS de *L. plantarum* DM5 y *L. rhamnosus* E/N (Das y col., 2014; Polak-Berecka y col., 2013) así como para kefiran, el EPS presente en los granos de kefir (Hamet y col., 2016). Sarikaya y col. (2017) encontraron, mediante un modelo *in vitro*, que el EPS liofilizado de *L. fermentum* LB-69, a una concentración de 1 mg/mL, además de ejercer un efecto bifidogénico, presenta actividad anti-biofilm sobre bacterias patógenas, presentando una inhibición mayor al 85% para cepas de *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Li y col. (2014a) eligieron la cepa *B. bifidum* WBIN03 por su alta velocidad de crecimiento y producción de EPS para estudiar el efecto del EPS sobre la microbiota de ratones BALB/c. Sus resultados demostraron que este polisacárido aumentó significativamente el crecimiento de lactobacilos y bacterias anaeróbicas totales, y produjo una inhibición en el crecimiento de enterobacterias, enterococos y *Bacteroides fragilis*.

Una de las características que debe cumplir un prebiótico es la de poseer resistencia a la digestión gástrica. En un estudio de Ruijssenaars y col. (2000) se demostró la resistencia a la biodegradación fecal humana de EPS de *L. sakei* O-1 y *L. helveticus* Lh59, sugiriendo que estos EPS podrían resistir el estrés enzimático del medio del colon. Adicionalmente, un estudio más reciente (Hongpattarakere y col., 2012) mostró evidencia sobre la resistencia de EPS a las condiciones del tracto gastrointestinal, ya que un EPS aislado a partir de *L. plantarum* A3 exhibió una alta resistencia a la digestión gástrica e intestinal simulada.

Como ya hemos comentado en capítulos anteriores de esta Tesis, las cepas de *L. fermentum* que han sido estudiadas con respecto a la producción de EPS son *L. fermentum* TDS030603 (Aryantini y col., 2017; Dan y col., 2009; Fukuda y col., 2010; Gerwig y col., 2013; Leo y col., 2007; Shi y col., 2014;), *L. fermentum* F6 (Zhang y col., 2011), *L. fermentum* CFR 2195 (Yadav y col., 2011), *L. fermentum* V10 (Behare y col., 2013), un aislamiento a partir de leche fermentada Burkina Faso (Savadogo y col., 2004) y *L. fermentum* LB-69 aislada de heces de niños (Sarikaya y col., 2017). Hasta este momento no hay estudios relacionados con las propiedades funcionales de ninguna de estas cepas en productos lácteos, menos aún con

sus EPS aplicados como ingredientes alimentarios. Este hecho, combinado con la demanda creciente de ingredientes funcionales novedosos, fueron los factores principales para estudiar y caracterizar funcionalmente (rol inmunológico y de protección frente a *Salmonella* Thyphimurium) el EPS producido por *L. fermentum* Lf2, enfocándonos en su aplicación como ingrediente alimentario en un yogur funcional. Por otro lado, se abordó el estudio de la combinación (en un yogur) de este EPS y una bifidobacteria aislada de leche materna, *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, con propiedades funcionales previamente demostradas (Burns y col., 2017; Zacarías y col., 2011; Zacarías y col., 2014;). El objetivo de esta última experiencia fue evaluar si esta combinación actuaba sinérgicamente, modificando selectivamente la microbiota intestinal de ratones BALB/c, en vista de sugerir su aplicación para elaborar un yogur simbiótico.

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Organismos y condiciones de crecimiento

La cepa *L. fermentum* Lf2 se desarrolló rutinariamente como se indicó en capítulos anteriores. *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 se desarrolló rutinariamente en caldo MRS con el agregado de cisteína 0,1% (m/v) (MRSc) y sus recuentos se realizaron en MRSc agar, en condiciones de anaerobiosis (AnaeropackAnaero, Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc., Japón), a 37°C por 48 h. Ambas se conservaron en caldo MRS con 15% de glicerol (v/v) a -80°C. *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 pertenece a la colección del INLAIN, y fue aislada de leche materna. Posee propiedades probióticas y tecnológicas demostradas (Burns y col., 2017; Zacarías y col., 2011; Zacarías y col., 2014) por lo que resulta adecuada para incorporar como adjunto probiótico a un alimento. Asimismo, tenemos indicios experimentales de que esta cepa es productora de EPS, con un rendimiento aproximado de 600 mg/L (caldo SDM, pH 6, 37 °C, 72 h, en presencia de CO₂), si bien el EPS que produce no ha sido aún estudiado.

Para la producción de yogur, se usaron las cepas comerciales *S. thermophilus* SC42 y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 254 como cultivos *starter* o iniciadores. Se seleccionaron según su inhabilidad (test visual) para producir EPS en leche. Se desarrollaron rutinariamente en leche descremada reconstituida (LDR) estéril al 10% (m/v) a 43 °C y fueron conservadas a -80 °C en el mismo medio. Los recuentos se realizaron en APC (*Agar Plate Count*, Britania, Buenos Aires, Argentina) con LDR al 1% (m/v) en condiciones de microaerofilia a 42°C por 48 h. Se realizaron, al menos, dos repiques *o.n.* previos al 2% (v/v) antes de cada ensayo con las cepas descriptas anteriormente.

Para el estudio del rol protector del EPS frente a una infección con *Salmonella* se utilizó la cepa de origen humano *Salmonella enteritidis* serovar Typhimurium FUNED, cedida por el Instituto INEI-ANLIS 'Dr. Carlos Malbrán' (Buenos Aires, Argentina). La cepa se mantuvo a -80 °C en caldo TS (Tripteína Soya, Britania) con 15 % (v/v) de glicerol. Para infectar a los animales, se prepararon y diluyeron convenientemente cultivos *o.n.* (16 h, 37 °C, aerobiosis) obtenidos inmediatamente luego de descongelar. Los recuentos se realizaron en TS agar (Biokar) a 37°C por 48 h.

6.2.2. Producción de EPS de *L. fermentum* Lf2

El extracto crudo de EPS se preparó como se indicó en el capítulo 2, desarrollando la cepa *L. fermentum* Lf2 en un fermentador de 2 L (Sartorius Biostat A plus)® en caldo semidefinido (SDM; Kimmel y Roberts, 1998), con agitación constante (5 g), burbujeo de CO₂ (0,2 L/min) y pH 6,0 controlado con NaOH 8M, a 30 °C por 72 h. El EPS se extrajo del cultivo como se indicó en el capítulo 2.

6.2.3. Ensayo preliminar *in vitro* para analizar el rol inmunomodulador del EPS

Este ensayo fue realizado por Maxence Bourin bajo la supervisión del Prof. Paul O'Toole (*University College Cork*, Cork, Irlanda) mediante una colaboración formal. Se utilizó la línea celular THP-1, la cual se desarrolló en medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium*; RPMI-1640 Medium, Sigma Aldrich, R8758) conteniendo 10% (m/v) de suero fetal bovino y 50 mg/mL de estreptomycin y penicilina a 37°C, con 5% de CO₂. Los monocitos THP-1 fueron diferenciados a macrófagos mediante incubación por 48 h con 13-acetato de 12-miristato de forbol (PMA, Sigma Aldrich, P8139) 50 nM, seguido de una incubación por 24 h en medio RPMI. Los macrófagos derivados THP-1 fueron estimulados con EPS crudo o purificado: 60 µg/mL de la forma cruda conteniendo 0,9% de proteínas según el método de Bradford (Bio-Rad), y 12,6 µg/mL de la forma purificada. Esta última concentración se propuso considerando que, luego de la purificación del EPS crudo, se recupera un 21% (aproximadamente) de EPS purificado, de modo que ambas muestras contengan, aproximadamente, la misma proporción de EPS. Se incluyó, asimismo, un control positivo tratado con lipopolisacárido (LPS, 0,5 µg/mL). Las células fueron incubadas a 37°C, con 5% CO₂ durante 4 h para la detección de TNF-α, y 8 h para IL-6 e IL-10. La detección de citoquinas se realizó en los sobrenadantes de cultivo usando los kits DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis, Estados Unidos) de acuerdo a los protocolos recomendados por el proveedor. Se

incluyó asimismo un control negativo con células sin tratar, y todas las determinaciones se realizaron por cuatuplicado.

6.2.4. Elaboración de yogures

Los yogures a utilizar en los ensayos *in vivo* fueron elaborados en recipientes cilíndricos con 100 mL de LDR estéril, inoculada con *S. thermophilus* SC42 y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 254 (10^6 UFC/mL), adicionada con 0 (control), 300 y 600 mg/L de extracto de EPS (tratamientos Y-E300 y Y-E600, respectivamente). La incubación se realizó a 43 °C hasta un pH final de 4,8, e inmediatamente se enfriaron y conservaron *o.n.* a 4 °C. La dosis de EPS utilizada se seleccionó de acuerdo a ensayos previos que demostraron que yogures con 300 y 600 mg/L de este extracto de EPS presentaron diferencias sensoriales y reológicas en comparación a los controles.

En el caso del estudio del rol prebiótico/simbiótico del EPS, al día siguiente de la elaboración de los yogures, un cultivo *o.n.* de la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (caldo MRSc, 16 h, 37°C, anaerobiosis) fue lavado dos veces con PBS estéril, resuspendido en los yogures sin EPS (tratamiento Y-B) o con 600 mg/L de EPS (tratamiento Y-E600-B), a una concentración final de 5×10^8 UFC/mL. La bifidobacteria se agregó como un cultivo probiótico adjunto luego de la elaboración del yogur con el fin de garantizar la concentración deseada, minimizando el riesgo de muerte celular durante la fermentación. Durante los 25 días posteriores a la elaboración se realizaron recuentos celulares de la bifidobacteria para verificar que la concentración suministrada a los ratones se mantuviera constante durante el desarrollo del experimento.

6.2.5. Animales

En los tres ensayos *in vivo* se utilizaron ratones machos BALB/c de 6 semanas de edad (con peso entre 19 y 21 g) adquiridos en el Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio (Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL, Esperanza, Santa Fe, Argentina). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética para Experimentación Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV-UNL, Esperanza, Santa Fe, Argentina), y fueron llevados a cabo siguiendo las recomendaciones del bioterio del INLAIN (Zacarías y col., 2014). Los animales se mantuvieron durante una semana en el bioterio para su aclimatación antes de comenzar los ensayos. Se distribuyeron en jaulas plásticas autoclavables (hasta 4 ratones por jaula), con control automático de las condiciones de humedad ($55 \pm 2\%$), luz (ciclos de luz/oscuridad de 12 h) y temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$). Todos los animales recibieron,

simultáneamente y *ad libitum*, agua corriente estéril y una dieta convencional balanceada (Cooperación, Buenos Aires, Argentina) con la siguiente composición: 230 g/kg de proteínas, 60 g/kg de fibra cruda, 100 g/kg de minerales totales, 13 g/kg de Ca, 8 g/kg de P, 120 g/kg de agua y vitaminas.

6.2.6. Capacidad inmunomoduladora: determinación de s-IgA (IgA secretoria) y citoquinas en intestino grueso y delgado

Se utilizaron 32 ratones que se distribuyeron en 4 grupos (8 ratones/grupo) y cada grupo recibió, durante 15 días consecutivos y por intubación gástrica, 300 μ l/día de una de las siguientes muestras: (a) LDR (grupo L); (b) LDR + 300 mg EPS/L (equivalente a 4,5 mg/kg/día) (grupo L-E300); (c) yogur control (grupo Y); (d) yogur + 300 mg EPS/L (grupo Y-E300). Luego del período de alimentación, los animales fueron anestesiados y sacrificados por dislocación cervical. El *cocktail* para anestesiarnos se preparó de la siguiente manera: se mezclaron 1,8 mL de Ketamina (50 mg/mL, KetonalTM, Richmond Vet Pharna, Argentina), 0,9 mL de xylacina 2% (Alfasan, Argentina), 0,3 mL de acepromacina (10 mg/mL, Acedan, Hollyday, Argentina) y se llevó a 10 mL con 7,3 mL de solución salina estéril, se conservó a 4°C y se administró de forma intraperitoneal (0,3 mL/ratón). Se removió el hígado, se homogeneizó en 5 mL de PBS estéril y se sembró en agar ABRV (37 °C, 24 h, aerobiosis) para evaluar posible translocación de enterobacterias al hígado. También se recuperó el intestino delgado y se lo lavó internamente con 5 mL de buffer PBS frío con 1 % (v/v) de un *cocktail* de inhibidor de proteasas (Sigma Aldrich). Esta suspensión se centrifugó (10000 g, 10 min, 4 °C) y se conservó el sobrenadante a -80 °C para la cuantificación de s-IgA por ELISA (Peteán y col., 2014). Por otro lado, se removieron las porciones distales del intestino delgado (yeyuno e íleon) y el intestino grueso completo para preparar los homogenatos. Los tejidos fueron conservados congelados (-80 °C) inmediatamente luego de su extracción. En el momento de la preparación de los homogenatos, se agregó buffer de extracción frío (1 mL/100 mg de tejido, compuesto por 100 mL PBS, 0,293 g EDTA y 50 μ l Tween 20, 4 °C) con *cocktail* inhibidor de proteasas (1% v/v). Luego se homogeneizó (Ultra-turrax T8, IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) y centrifugó (9600 g, 10 min, 4 °C) para conservar el sobrenadante. Las citoquinas IL-10, IL-6, IFN- γ y TNF- α se determinaron en los sobrenadantes usando el Set ELISA correspondiente para ratón (BD OptEIA, BD, Biosciences PharMingen, San Diego, CA, Estados Unidos). Las lecturas se realizaron en un lector de microplacas (MultiskanTM FC, Thermo Scientific) a 492 nm.

6.2.7. Capacidad protectora del EPS frente a una infección con *S. enteritidis* serovar Typhimurium

Se eligió un diseño completamente aleatorio para este estudio, incluyendo 64 animales que fueron divididos en 2 grupos (32 animales/grupo). Cada grupo recibió, durante 15 días consecutivos y por intubación gástrica, 300 $\mu\text{l}/\text{día}$ de alguna de las siguientes muestras: (a) 600 mg/L de EPS resuspendido en LDR estéril y (b) LDR estéril (grupo control). En este ensayo se decidió analizar sólo el efecto del EPS resuspendido en LDR estéril a los fines de aumentar el número de animales/grupo (de acuerdo a las limitaciones del bioterio del INLAIN) y, de este modo, maximizar la potencia del ensayo, cumpliendo con el principio de las 3R. La dosis de EPS ensayada fue elegida en base a un ensayo preliminar con 10 animales/grupo, donde se administraron 4,5 y 9,0 mg/kg/día del extracto de EPS (equivalentes a 300 y 600 mg/L de EPS, respectivamente), donde se demostró que la dosis menor no causó efectos significativos en la supervivencia de los ratones tratados. Por un ensayo preliminar de traslocación (de 8 ratones) con la dosis usada en este ensayo (600 mg/L) se sabía que esta dosis era segura. Luego del período de tratamiento, todos los animales fueron desafiados con una única dosis infectiva de cultivo fresco (16 h, 37 °C, aerobiosis) de *S. enteritidis* serovar Typhimurium (10^6 UFC/ratón), dosis que fue previamente optimizada en el INLAIN para lograr una mortalidad de 40–50% de los ratones (Zacarías y col., 2014). Diariamente se registraron el peso de los animales y el número de sobrevivientes durante 25 días post-infección, y los resultados se expresaron como porcentaje de animales que sobrevivieron a la infección.

6.2.8. Evaluación del rol prebiótico/simbiótico del EPS en yogures

Para este tercer ensayo *in vivo* se utilizó un total de 28 ratones, distribuidos en 4 grupos (7 ratones/grupo) que recibieron, durante 25 días consecutivos y por intubación gástrica, 300 $\mu\text{l}/\text{día}$ de una de las siguientes muestras: (a) yogur control (Y); (b) yogur + 600 mg EPS/L (equivalente a 9 mg/kg/día) (Y-E600); (c) yogur con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 a una concentración de 5×10^8 UFC/mL (Y-B, equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ratón/día); (d) yogur + 600 mg EPS/L + 5×10^8 UFC/mL de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (Y-E600-B). El día previo a la recolección de heces, los ratones se colocaron en jaulas metabólicas individuales (Tecniplast, Buguggiate, Italia) y, luego de la recolección, se devolvieron a sus respectivas jaulas grupales. Se procedió a realizar el ensayo de esta manera para minimizar, en lo posible, el estrés ocasionado por las jaulas metabólicas, que presentan pisos enrejados, espacio reducido y en las que los ratones no pueden interactuar entre ellos.

6.2.8.1. Recuentos de bifidobacterias en heces

A partir de heces de cada ratón se realizaron recuentos de viabilidad de bifidobacterias totales en agar RCM (*Reinforced Clostridial Medium*, Biokar) con el suplemento selectivo para bifidobacterias MUP (mupirocina, Merck), según Miranda y col. (2014) a tiempo inicial (antes de recibir el tratamiento) y a los 8, 18 y 25 días post-tratamiento. Para la primera dilución decimal se utilizó buffer PBS estéril y la mezcla se colocó en *stomacher* durante 3 min a máxima velocidad. Las diluciones sucesivas se realizaron en agua de peptona al 0,1% (m/v). La incubación fue en anaerobiosis (Anaerocult®, Merck) a 37°C durante 48 h y se verificó microscópicamente (100X, contraste de fases) la morfología de las diferentes colonias, seleccionando aquellas típicas de bifidobacterias.

6.2.8.2. Estimación por qPCR de los niveles de diferentes grupos bacterianos en heces

A partir de las heces diluidas (dilución 1:10 en PBS) y homogeneizadas en *stomacher* (3 min a máxima velocidad) se extrajo ADN total utilizando el kit QIAmp DNA Stool Mini kit (Qiagen), conservando las muestras a -20°C hasta el momento de la extracción y posterior amplificación. La selección de los grupos microbianos a analizar se basó en estudios *in vivo* de grupos de referencia llevados a cabo con ratones BALB/c (Gómez-Gallego y col., 2012). La PCR cuantitativa se llevó a cabo en un termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems), utilizando Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Los ciclos de reacción, para todos los casos, fueron: 95°C-10 min y 40 ciclos de amplificación (95°C-15 s, T° *annealing*-1 min). Las temperaturas de *annealing* óptimas para cada reacción, los *primers* utilizados, sus características y las eficiencias obtenidas en cada curva de calibrado se muestran en la Tabla 6.1. El R² obtenido para todas las curvas de calibrado fue superior a 0,994. Los estándares utilizados también se detallan en la Tabla 6.1, y a la mayoría de las cepas disponibles en el INLAIN, se les realizaron las extracciones de ADN con el mismo kit utilizado para las heces de ratón, partiendo de 5 mL de un cultivo *o.n.* al que se le realizó un recuento el mismo día de la extracción. Tres de los ADN estándares fueron adquiridos de la colección alemana de cultivos (DSMZ): DSM 17677 de *Clostridium leptum*, DSM 20438 de *Bifidobacterium catenulatum*, DSM 935 de *Clostridium coccooides*, y con fines prácticos se consideró que provenían de un cultivo inicial con una concentración 1x10⁸ UFC/mL. *L. fermentum* Lf2 y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (ambas de la colección del INLAIN) fueron cultivadas de acuerdo a lo descrito en la sección 6.2.1. *B. breve* 110 (colección del INLAIN) y *B. bifidum* ATCC 35914 fueron cultivadas del mismo modo que *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (caldo MRSc, anaerobiosis, 37°C). *S. thermophilus* SC42 (colección del INLAIN) se cultivó en caldo Elliker

(Biokar) a 42°C; *E. coli* EC101 (facilitada por la *University College Cork*, UCC) en caldo LB (preparado a partir de sus componentes), con agitación continua, a 37°C y aerobiosis y *Staphylococcus aureus* 76 (colección del INLAIN) se desarrolló en caldo TS (Biokar) a 37 °C en aerobiosis. Todos los cultivos se desarrollaron a partir de una colonia aislada y todas las determinaciones se realizaron, al menos, por duplicado para cada muestra, incluyendo los controles negativos correspondientes a cada caso por triplicado. Para los *primers* correspondientes a las especies *B. breve* y *B. bifidum*, como así también para el género *Staphylococcus* se obtuvieron valores menores al límite de detección en todas las muestras analizadas.

Tabla 6. 1. *Primers* utilizados para los diferentes grupos microbianos, estándares usados para las curvas de calibrado, rango dinámico obtenido para cada curva, concentración de *primers*, temperatura de *annealing* (Ta), eficiencia lograda (Ef) y referencia de cada reacción.

Primers	Secuencias (5'-3')	Estándar	Rango dinámico (UFC/mL)	Conc. primers (nM)	Ta (°C)	Ef (%)	Referencia
<i>Lactobacillus</i> -F	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	<i>Lactobacillus fermentum</i> Lf2	6x10 ⁸ -2x10 ⁵	200	55	73	Echarri y col. (2011)
<i>Lactobacillus</i> -R	CATGGAGTTCCACTGTCCTC						
<i>Bifidobacterium</i> -F	GATTCTGGCTCAGGATGAACGC	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1	4x10 ⁹ -4x10 ⁴	200	60	90	Gueimonde y col. (2004)
<i>Bifidobacterium</i> -R	CTGATAGGACGCGACCCCAT						
<i>Bifidobacterium animalis</i> -F	ACCAACCTGCCCTGTGCACCG	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1	4x10 ⁹ -4x10 ⁴	200	60	92	Rinne y col. (2005)
<i>Bifidobacterium animalis</i> -R	CCATCACCCCGCCAACAAGCT						
<i>Bifidobacterium breve</i> -F	AATGCCGGATGCTCCATCACAC	<i>Bifidobacterium breve</i> 110	1x10 ⁹ -1x10 ⁵	200	63	80	Gueimonde y col. (2006)
<i>Bifidobacterium breve</i> -R	GCCTTGCTCCCTAACAAAAGAGG						
<i>Clostridium leptum</i> -F	GCACAAGCAGTGGAGT	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> JCM 31915	1x10 ⁵ -32	200	54	83	Matsuki y col. (2004)
<i>Clostridium leptum</i> -R	CTTCCTCCGTTTTGTCAA						
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> -F	GCCGGATGCTCCGACTCCT	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> ATCC 27919	8x10 ⁴ -26	200	55	81	Gueimonde y col. (2006)
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> -R	ACCCGAAGGCTTGCTCCCGAT						
<i>Clostridium coccooides</i> -F	AAATGACGGTACCTGACTAA	<i>Blautia coccooides</i> ATCC 29236	2x10 ⁵ -700	300	55	65	Matsuki y col. (2002)
<i>Clostridium coccooides</i> -R	CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA						
<i>Bifidobacterium bifidum</i> -F	TGACCGACCTGCCCCATGCT	<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 35914	2x10 ⁸ -2x10 ³	100	60	88	Gueimonde y col. (2006)
<i>Bifidobacterium bifidum</i> -R	CCCATCCCACGCCGATAGAAT						
<i>Staphylococcus</i> -F	ACGGTCTTGCTGTCACTTATA	<i>Staphylococcus aureus</i> 76	2x10 ⁸ -2x10 ³	300	56	102	Matsuda y col. (2007)
<i>Staphylococcus</i> -R	TACACATATGTTCTCCCTAATAA						
Enterobacteriaceae-F	CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC	<i>Escherichia coli</i> EC101	2x10 ⁸ -2x10 ³	300	60	95	Bartosch y col. (2004)
Enterobacteriaceae-R	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC						
<i>Streptococcus</i> -F	GTACAGTTGCTTCAGGACGTATC	<i>Streptococcus thermophilus</i> SC 42	1.5x10 ⁸ -1.5x10 ⁵	200	60	81	Picard y col. (2004)
<i>Streptococcus</i> -R	ACGTTTCGATTTTCATCACGTTG						
Universales-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	<i>Lactobacillus fermentum</i> Lf2	3x10 ⁸ -1x10 ⁶	200	58	70	Kullen y col. (2000)
Universales-R	GGCTGCTGGCACGTAGTTAG						

6.2.8.3. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta en heces

La determinación de ácidos grasos de cadena corta (SCFA, por sus siglas en inglés) se llevó a cabo a partir de las heces por cromatografía líquida de alta *performance* (HPLC) a tiempo inicial, 8, 18 y 25 días. Las muestras diluidas 1:10 en PBS estéril y tratadas en *stomacher* (3 min a máxima velocidad) se centrifugaron 10 min a 10000 g, el sobrenadante se acidificó con H₂SO₄ concentrado hasta pH 2 y se filtró (45 µm de diámetro de poro, Millipore) antes de inyectar las muestras al equipo. El sistema cromatográfico consistió en una bomba cuaternaria, un desgasificador en línea, un inyector manual, un horno para el control de la temperatura de la columna y dos detectores en línea: UV-visible (210 nm) e índice de refracción (Perkin Elmer). Los datos fueron analizados y procesados utilizando el software Chromera®. Se utilizó una columna Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm, un guardacolumna Aminex Cation-H (30 x 4,6 mm) (Bio-Rad Laboratories) y un flujo isocrático de 0,6 mL/min con una fase móvil de H₂SO₄ 0,01 M, a una temperatura de 65 °C. La identificación se realizó con los detectores UV e IR comparando los tiempos de retención de soluciones de estándares (Sigma Aldrich), mientras que la cuantificación se llevó a cabo mediante el detector de índice de refracción, ya que los cromatogramas obtenidos fueron más limpios que aquellos resultantes del otro detector.

6.2.8.4. Determinación de citoquinas e IgA en intestino delgado

Se realizó según las técnicas descriptas en la sección 6.2.6.

6.2.8.5. Análisis de cortes histológicos

Con el fin de evaluar si los diferentes tratamientos provocaron daños a nivel del epitelio intestinal en los ratones luego del segundo ensayo *in vivo*, se prepararon tacos de parafina con secciones de intestino delgado y grueso. Brevemente, la técnica consistió en colocar los tejidos en *cassettes* para histología y sumergirlos *o.n.* en una solución de PBS y formaldehído al 4% v/v (Cicarelli, Buenos Aires, Argentina). Al día siguiente, los tejidos se deshidrataron mediante pasajes sucesivos en soluciones de concentraciones crecientes de alcohol etílico. Para el aclarado, se dejaron secar los *cassettes* sobre papel absorbente y se trataron con tolueno durante 30 min. Una vez secos, las muestras se entacaron en parafina y los tacos se conservaron a 4°C. Para el análisis histológico se realizaron cortes de 5 µm y se colorearon con May Grúndwald (MG)-Giemsa. El colorante MG se diluyó 1:5 y el Giemsa 1:100 en agua destilada. El desparafinado de los cortes y la rehidratación se realizó en baños sucesivos de tolueno, alcohol etílico y, finalmente, agua destilada. La coloración consistió en dejar los cortes 15 min en MG (37°C), 40 min en Giemsa (37°C) y dos baños posteriores en agua destilada. Para la

diferenciación, las muestras se colocaron 30 seg en ácido acético (dilución 1:100) y 10 seg en alcohol/acetona (50:50). Finalmente, se realizó el montaje dejando los cortes en tolueno unos seg, se colocó una gota de EUKITT® sobre cada portaobjeto y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se analizaron al menos dos secciones por animal.

6.2.9. Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los resultados se usó el software SPSS. Se aplicó T-test para comparar entre los grupos control y tratado, y el test de Mann-Whitney U se aplicó cuando la distribución no era normal (según el test de Shapiro-Wilk). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. Las proporciones de sobrevivientes al final del desafío con *Salmonella* Typhimurium fueron comparadas con el test exacto de Barnard usando el software R (R Core Team, 2015). El cociente del riesgo de muerte para cada grupo de tratamiento con respecto a los grupos controles fue estimado con el modelo de riesgos proporcionales de Cox, calculado con la biblioteca “*survival*” de R (Calhoun, 2015; Therneau, 2015). El valor p de la estimación del cociente de riesgos en este modelo fue estimado usando un test de permutación de pertenencia de grupo (100000 repeticiones), mientras que los intervalos de confianza fueron estimados usando Bootstrap (100000 repeticiones).

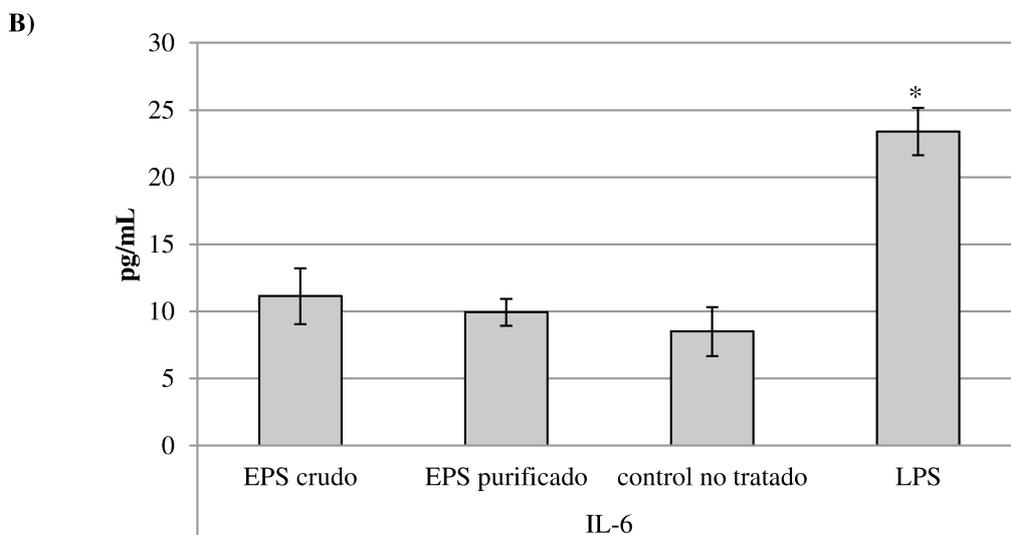
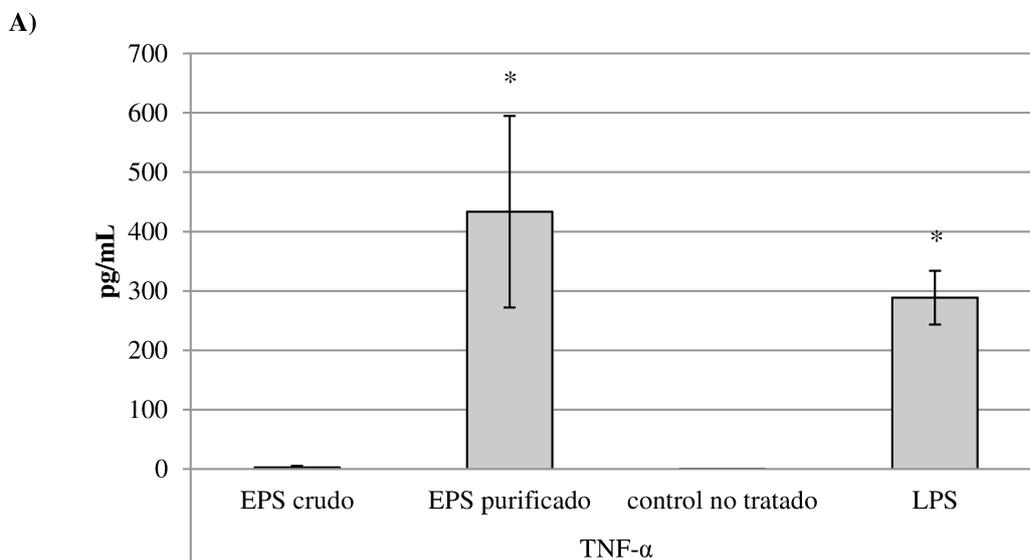
Cuando se analizaron más de dos grupos se aplicó ANOVA y se usó Kruskal-Wallis si los supuestos del ANOVA no se cumplían. Las diferencias entre medias se determinaron por el test de Tukey o por Dunns, respectivamente. Para el ensayo *in vivo* de determinación del rol prebiótico/simbiótico se aplicó el test de medidas repetidas para analizar los factores tiempo y tratamiento. Se verificó que se cumpla el criterio de esfericidad mediante la prueba de Mauchly, y cuando no se cumplió, se consideraron los estadísticos multivariados. Las comparaciones múltiples se realizaron con Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ para todos los tests descriptos anteriormente. Además, se incluyó un análisis de componentes principales para los SCFA y los grupos bacterianos, para el que se utilizó el programa estadístico Minitab 16 (Minitab, Inc., State College PA, Estados Unidos).

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Ensayo preliminar *in vitro* para analizar el rol inmunomodulador del EPS

En la Figura 6.1 se pueden ver los resultados obtenidos para la cuantificación de las citoquinas TNF- α (1 A), IL-6 (1 B) e IL-10 (1 C) en el sobrenadante de las células de la línea THP-1 tratadas con EPS purificado y crudo, a una concentración de 12,6 $\mu\text{g/mL}$ y 60 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Con respecto a la citoquina TNF- α , se observaron diferencias significativas

entre las células tratadas con LPS (lipopolisacárido, control positivo) y las no tratadas, como era esperable, y entre las no tratadas y aquellas expuestas al EPS purificado ($p < 0,05$). No se detectaron diferencias significativas entre el EPS crudo y el control sin tratamiento. Cuando se analizó la citoquina IL-6, en cambio, sólo se vieron diferencias significativas entre las células tratadas con LPS y el resto, mientras que para la citoquina IL-10, no hubo diferencias significativas entre las células tratadas con EPS puro y crudo; los niveles para las células tratadas con LPS o no tratadas no pudieron ser detectados. Estos resultados indicarían que el EPS, en su forma purificada, causa un aumento en los niveles de la citoquina proinflamatoria TNF- α , al menos *in vitro*, mientras que ambas formas de EPS produjeron un aumento de la citoquina reguladora IL-10.



C)

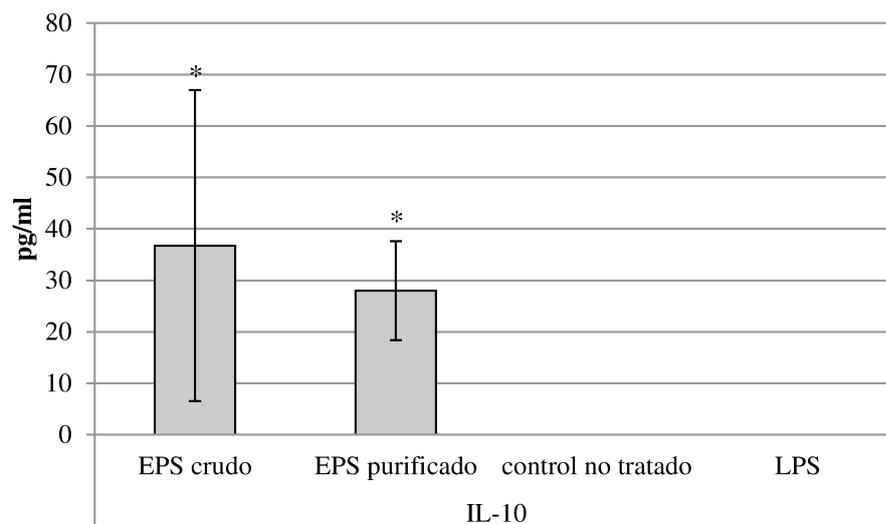


Figura 6. 1. Determinación de los niveles de citoquinas TNF- α (A), IL-6 (B) e IL-10 (C) para el ensayo *in vitro* con la línea celular THP-1. Se utilizó extracto de EPS crudo (60 $\mu\text{g/mL}$) y purificado (12,6 $\mu\text{g/mL}$), y se incluyó un control negativo (células sin tratar) y positivo (células tratadas con 0,5 $\mu\text{g/mL}$ LPS). Se muestran promedios \pm SD. Los asteriscos señalan diferencias significativas ($p < 0,05$).

En un trabajo de Ciszek-Lenda y col. (2011) se estudió en un modelo *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón, el efecto inmunomodulador del EPS de *L. rhamnosus* KL37 como así también de bacterias muertas. Encontraron que el EPS fue menos efectivo para estimular la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-12) que las bacterias enteras o el LPS (control). Además, el EPS fue capaz de inducir de una forma más marcada las citoquinas TNF- α e IL-12 que IL-10, lo cual sugiere un potencial inmunorregulatorio proinflamatorio del tipo Th1. Además, vieron que el EPS estimulaba la liberación de citoquinas en función de la dosis utilizada. En concentraciones mayores a 3 $\mu\text{g/mL}$ el EPS indujo fuertemente la producción de citoquinas mientras que a concentraciones menores (0,01-1 $\mu\text{g/mL}$) el EPS no presentó ningún efecto. Por otro lado, Liu y col. (2011) estudiaron el efecto inmunomodulador *in vitro* de los EPS producidos por las cepas *L. paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 (101EP) y *L. plantarum* NTU 102 (102EP), y observaron una inducción en la producción de citoquinas (IL-6, TNF- α , e IL-1 β) por ambos EPS en la línea celular Raw 264.7, de un modo dosis-dependiente (5-500 $\mu\text{g/mL}$), demostrando asimismo que los EPS exhibían *in vitro* propiedades antioxidantes. López y col. (2012) estudiaron las citoquinas producidas en células mononucleares de sangre periférica tratadas con EPS purificados de diferentes bifidobacterias. En general, vieron que EPS neutros y de alto PM no fueron eficientes para inducir la respuesta inmune, mientras que aquellos de bajo PM y de carga negativa

desencadenaban una respuesta más fuerte. No detectaron diferencias significativas para los niveles de IL-1 β , IL-17 e IL-8 ya sea con la presencia de EPS purificados o las cepas productoras de EPS con respecto al control (medio RPMI). La concentración de IL-10 no se modificó tampoco con los EPS pero sí fue aumentada con las bacterias productoras, mientras que los valores de IL-12 no cambiaron, o bien fueron apenas menores cuando se agregaron algunos EPS. Por otro lado, todos los EPS estudiados y sus bacterias correspondientes aumentaron significativamente la producción de IFN- γ y TNF- α , con excepción de uno. Los resultados de estos trabajos concuerdan con lo observado para la citoquina pro-inflamatoria TNF- α para el EPS purificado de *L. fermentum* Lf2 y, considerando las características químicas y estructurales determinadas hasta el momento para el extracto de EPS (dos fracciones de elevado y medio PM), habría una correlación entre nuestros resultados (si bien sólo se ensayaron 3 citoquinas en nuestro caso) y los hallazgos de López y col. (2012), justificando la respuesta inmune débil observada *in vitro*.

Amrouche y col. (2006) estudiaron el efecto de distintas fracciones de bifidobacterias aisladas de heces de niños recién nacidos (citoplasma, pared celular y EPS) sobre la producción de IFN- γ e IL-10 en esplenocitos de ratones BALB/c, utilizando la cepa comercial *B. lactis* Bb12, una cepa ampliamente estudiada, como control positivo. En ese trabajo encontraron que la fracción correspondiente a la pared celular fue la que indujo más fuertemente la producción de ambas citoquinas mientras que el EPS no presentó ningún efecto significativo. Por su parte, Nikolic y col. (2012) evaluaron el perfil de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica al tratarlas con una cepa productora de EPS, *L. paraplantarum* BGCG11, y con su EPS purificado en concentraciones de 1, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$. Estos autores vieron que los perfiles obtenidos para la cepa y el EPS (en su mayor concentración) eran similares entre sí, atribuyéndole entonces el rol inmunomodulador al EPS. La cepa presentó una relación elevada de IL-10/IL-12 (perfil pro-Th2-Tregulador) como así también una relación IL-1 β /IL-12 aumentada con respecto al control sin tratar (respuesta pro-Th17).

La citoquina IL-10 juega un rol importante en la regulación de la respuesta inmune. Es producida por las células T-helper 2 (Th2) e inhibe la síntesis de un número de citoquinas, entre ellas IFN- γ . Esta citoquina también es producida por células T reguladoras y lleva a la supresión de la respuesta Th2 y al cambio de anticuerpos IgE por IgG4, previniendo enfermedades alérgicas (Robinson y col., 2004). Por otro lado, la citoquina IL-10 es producida por macrófagos y linfocitos T (principalmente reguladores), y se trata de un inhibidor de los macrófagos y células dendríticas activadas, participando en el control de las reacciones inmunitarias innatas y de la inmunidad celular. Una de las formas en la que actúa es inhibiendo la síntesis de IL-12

por los macrófagos y células dendríticas activadas, además de inhibir la expresión de coestimuladores y de moléculas de CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) de clase II sobre los macrófagos y células dendríticas.

La citoquina TNF- α participa en la inmunidad innata y es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda frente a bacterias gram-negativas y otros microorganismos infecciosos (Abbas y col., 2007). Principalmente, es producida por macrófagos y linfocitos T, y su principal función biológica es estimular la atracción de neutrófilos y monocitos hasta los focos de infección, así como activar a estas células para que erradiquen los microorganismos. También contribuye a las inflamaciones locales que pueden ser perjudiciales para el huésped (enfermedades autoinmunitarias) (Abbas y col., 2007).

La citoquina IL-6 participa tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa. Se sintetiza por fagocitos mononucleares, células endoteliales vasculares, fibroblastos, algunos linfocitos T activados y otras células en respuesta a los microorganismos y otras citoquinas, sobre todo IL-1 y TNF- α . En la inmunidad innata, esta citoquina estimula la síntesis de proteínas de la fase aguda por los hepatocitos, contribuyendo a la respuesta de la fase aguda. Además, estimula la producción de neutrófilos a partir de progenitores de la médula ósea. En la inmunidad adaptativa, la IL-6 estimula el crecimiento de los linfocitos B que se han diferenciado en células productoras de anticuerpos. También actúa como factor de crecimiento de células plasmáticas neoplásicas (mieloma), y muchas células mielomatosas que crecen de forma autónoma secretan IL-6 como factor de crecimiento autocrino. Se ha visto que esta citoquina estimula la síntesis de algunas citoquinas proinflamatorias, sobre todo de IL-17 e inhibe la generación y acción de los linfocitos T reguladores (Abbas y col., 2007).

Según nuestros resultados, el EPS de *L. fermentum* Lf2 purificado, a una concentración de 12,6 $\mu\text{g/mL}$, fue capaz de desencadenar una respuesta inmune más fuerte que el extracto crudo, estimulando la producción de las citoquinas TNF- α e IL-10, mientras que el EPS crudo, a un nivel de 60 $\mu\text{g/mL}$, indujo la producción de IL-10 únicamente. Ninguna de las dos formas de EPS modificó significativamente los niveles de IL-6 respecto al control no tratado. Teniendo en cuenta esta información, se puede sugerir que ambas formas del EPS de *L. fermentum* Lf2 (crudo y purificado) estimulan *in vitro* citoquinas que intervienen en la inmunidad innata, pero que la forma purificada desencadena una respuesta inmune más fuerte hacia un perfil proinflamatorio si se comparan las concentraciones entre las citoquinas TNF- α e IL-10 (433 vs. 28 pg/mL). En cambio, el EPS crudo sólo estimula significativamente la producción de IL-10 (37 pg/mL) con respecto al control no tratado indicando que, posiblemente, al estar contenido en una matriz mucho más compleja, pueda existir algún componente que inhiba su potencial

inmunomodulador. De todas maneras, se continuó trabajando con el extracto crudo para los ensayos *in vivo*, sin perder de vista su potencial aplicación industrial.

6.3.2. Capacidad inmunomoduladora: determinación de s-IgA (IgA secretoria) y citoquinas en intestino grueso y delgado

En la dosis ensayada no se observó translocación en los ratones de los grupos L-E300 e Y-E300, lo que permitió continuar los ensayos *in vivo* administrando esta dosis segura a los animales. Los efectos de la administración de EPS en los niveles de s-IgA en el intestino delgado se muestran en la Tabla 6.2. La concentración de s-IgA se incrementó significativamente cuando el extracto de EPS se adicionó al yogur (Y-E300, $p < 0,05$), en comparación con el grupo control que recibió sólo yogur. Cuando se administró el EPS en leche, la estimulación de la respuesta inmune mediada por IgA fue marcadamente menor (alrededor de 2,6 veces) que la observada para el yogur, evidenciando un aumento leve y no significativo ($p > 0,05$) en comparación al grupo control que recibió sólo leche.

Con respecto a las citoquinas, se determinaron en los intestinos delgado y grueso al final del período de administración, y los niveles detectados fueron comparables a los de sus controles respectivos (Tabla 6.2), con la excepción de IL-6 en intestino delgado para ratones que recibieron el extracto de EPS en leche (L-E300), que se redujo significativamente ($p < 0,05$) con respecto a su control.

Tabla 6. 2. Efectos del extracto de EPS de *L. fermentum* Lf2 sobre IgA de fluido intestinal y citoquinas IFN- γ , IL-10, IL-6 de los tejidos provenientes de los intestinos delgado y grueso, cuando fue resuspendido (4,5 mg/ kg de peso corporal) en yogur (Y-E300) o leche (L-E300) luego de 15 días de administración, en comparación con sus controles respectivos (Y y L). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control correspondiente. Los resultados se expresan como promedios \pm SEM.

	Tratamiento	Intestino delgado	Intestino grueso
IFN-γ (pg/g tejido)	Y	821 \pm 243	2628 \pm 280
	Y-E300	724 \pm 109	3053 \pm 124
	L	634 \pm 176	2672 \pm 476
	L-E300	589 \pm 95	2597 \pm 325
IL-10 (pg/g tejido)	Y	6833 \pm 1932	16404 \pm 798
	Y-E300	3594 \pm 927	14875 \pm 1567
	L	3010 \pm 827	14873 \pm 1649
	L-E300	4993 \pm 1028	15096 \pm 1648
IL-6 (pg/g tejido)	Y	4409 \pm 535	8440 \pm 647
	Y-E300	4632 \pm 485	6690 \pm 1089
	L	5656 \pm 699	6079 \pm 1303
	L-E300	2853 \pm 715*	5642 \pm 686
IgA (μ g/g fluido)	Y	447 \pm 40	No determinado
	Y-E300	959 \pm 189*	
	L	202 \pm 25	
	L-E300	328 \pm 68	

Este estudio fue el primero en describir el efecto de un extracto de EPS adicionado como un ingrediente a un alimento sobre los niveles de s-IgA y citoquinas (IL-6, IL-10 e IFN- γ) a nivel intestinal. Aparentemente, el extracto de EPS resuspendido en leche mostró una leve influencia en el perfil inmune reduciendo la citoquina proinflamatoria IL-6 en el intestino delgado (si bien en el modelo *in vitro* utilizado no se detectaron modificaciones para esta citoquina). Resultados similares fueron informados por Salazar y col. (2014) para una cepa de *B. animalis* subsp. *lactis* (productora de EPS) en ratas saludables, evidenciando un perfil inmune protector mediante la supresión de IL-6 y la promoción de la síntesis de la citoquina reguladora TGF- β , esta última no analizada en nuestro estudio.

Cuando se usó yogur como matriz, se observó un aumento significativo en los niveles de s-IgA ($p < 0,05$) en fluido intestinal de ratones tratados con EPS, en comparación con el grupo control Y. Como es esperable (Gill, 1998), los microorganismos vivos aportados con el yogur parecen mejorar el sistema inmune de la mucosa intestinal mediante el incremento de IgA secretoria, ya que el efecto de esta matriz alimentaria fue significativamente mayor al observado en los ratones tratados con leche. En los intestinos, la IgA secretoria es la principal inmunoglobulina cuyo rol principal es el de otorgar exclusión inmune mediante la íntima

cooperación con los mecanismos de protección innatos no específicos (Brandtzaeg y col., 1987). Varios autores describieron la producción de anticuerpos a nivel sistémico luego de la administración oral de EPS o de cepas productoras (Fanning y col., 2012; Salazar y col., 2014; Vinderola y col., 2006; Willers y col., 1995). En general, estos estudios se refieren a la administración de dosis mayores a las evaluadas en el presente trabajo, siendo las últimas más representativas de la concentración real de cualquier EPS en un alimento. Por ejemplo, Vinderola y col. (2006) han reportado la administración de 100 mg/kg de kefiran (una dosis 22 veces más alta que la usada en nuestro estudio), evidenciando una inmunomodulación (mediada por IgA, IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α) a nivel del intestino grueso y sangre, y mejorando la producción de IgA tanto en el intestino grueso como el delgado. Otros EPS, en cambio, mostraron efectos no tan claros, por ejemplo, con EPS de *L. rhamnosus* KL37 y *L. reuteri* 115 se estimuló la secreción de una citoquina antiinflamatoria (IL-10) y de citoquinas proinflamatorias simultáneamente (TNF- α e IL-6) en macrófagos murinos peritoneales (Ciszek-Lenda y col., 2011). Más recientemente, diversos trabajos indicaron que no sólo la presencia/ausencia del polímero o su concentración final, sino más bien las características intrínsecas de cada EPS, principalmente la carga y el peso molecular, son importantes a la hora de evaluar su capacidad de inducir una respuesta inmune. Como se mencionó anteriormente, se propuso que los EPS con carga negativa y/o peso molecular pequeño (menor a 10³ kDa) podrían actuar como estimuladores suaves de las células inmunes, mientras que aquellos polímeros no cargados y de gran tamaño (con peso molecular mayor a 10³ kDa) podrían producir una disminución en el nivel de cualquier citoquina, evidenciando un perfil supresor (Hidalgo-Cantabrana y col., 2014a; López y col., 2012; Ryan y col., 2015b; Salazar y col., 2014). Por otro lado, se ha demostrado que ciertos polisacáridos con grupos sulfatos producidos por *Lactobacillus* son capaces de inhibir la unión virus-célula y, consecuentemente, ejercer un efecto antiviral contra varios tipos de virus, incluyendo virus de hepatitis B, cytomegalovirus humano, herpes simplex y virus de la influenza (Oh y col., 2010). Además, se ha visto que HePS ácidos, que se caracterizan por presentar grupos fosfatos en su estructura (carga negativa) son buenos inductores de la respuesta inmune. Este hecho fue demostrado para el HePS sintetizado por *Lc. lactis* subsp. *cremoris* KSV20, que se utiliza en la elaboración de leche fermentada escandinava viili. Este EPS fue capaz de inducir la síntesis de IFN- γ e IL-1 α en macrófagos de bazo de ratón cultivados *in vitro* (Kitazawa y col., 1996). Posteriormente, los mismos autores demostraron que el fosfato era la molécula que desencadenaba la respuesta inmune, ya que la desfosforilación del HePS disminuyó su efecto estimulante (Kitazawa y col., 1998).

Por otro lado, en el trabajo de Yasuda y col. (2009) se utilizó la cepa *L. casei* Shirota como modelo. Los mutantes *knockout* de los genes relacionados a la síntesis de EPS de alto PM fueron capaces de inducir la producción de TNF- α , IL-12, IL-10 e IL-6 en una línea celular de macrófagos de ratón (RAW-264.7) o en una línea celular de bazo de ratón, en mayor medida que la bacteria *wildtype*. También se ha visto supresión inmune en células mononucleares de sangre periférica humana inducida por *L. paraplantarum* BGCG11, productor de EPS de alto PM, en comparación con la cepa isogénica EPS⁻ (Nikolic y col., 2012).

Por lo tanto, si nos basamos en evidencia que indica que el extracto de EPS de *L. fermentum* Lf2 está formado por dos polisacáridos mayoritarios, uno con PM de $1,8 \times 10^3$ kDa y otro de 90 kDa, identificados como EPS1 y EPS2 (ver capítulo 3), podríamos justificar la estimulación de las células inmunes cuando ha sido administrado a los ratones teniendo en cuenta su PM. Hemos podido determinar experimentalmente que ambos polímeros se encuentran en una proporción aproximada de 40 y 45%, respectivamente. De modo que ambas fracciones polisacáridicas, que en promedio darían lugar a un extracto con un PM de, aproximadamente, 380 kDa, representarían un EPS de PM pequeño según el modelo propuesto por López y col. (2012). En correlación a lo observado por estos autores, parecerían ser los responsables de una leve estimulación de la respuesta inmunitaria y de la puesta en evidencia de un perfil supresor (reducción significativa de IL-6), como hemos observado experimentalmente.

Los mecanismos moleculares a través de los cuales los EPS producen efectos beneficiosos para la salud deben ser aún dilucidados. Se ha sugerido que los EPS bacterianos podrían ejercer su acción inmunomoduladora a través de receptores de manosa (Chabot y col., 2001). Sin embargo, esto es cuestionable debido a la heterogeneidad de estructuras de estos EPS. De todas maneras, la familia multifuncional de receptores tipo TOLL (*Toll-like receptor*, TLR), que son capaces de reconocer un amplio rango de productos bacterianos extracelulares (Patten y Collett, 2013), representan una posibilidad más prometedora. Esta hipótesis fue corroborada en un estudio de Patten y col. (2014), en el que observaron que la leve respuesta proinflamatoria observada para la estimulación de células epiteliales intestinales humanas con EPS aislados de *L. acidophilus* sp. 5e2 y *L. helveticus* sp. Rosyjski fue mediada a través de TLR-2, debido al gran aumento en la expresión del mRNA de este receptor. El receptor TLR-4 también se propuso en trabajos anteriores como un candidato prometedor (Hoshino y col., 1999; Poltorak, 1998). Otra posibilidad implicaría la participación de TLR-2 y TLR-4, ya que un estudio reciente mostró que los EPS producidos por *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*

TUA4408L pueden actuar como ligandos de ambos receptores para inducir efectos antiinflamatorios en células epiteliales intestinales porcinas (Wachi y col., 2014).

Nuestro modelo experimental se llevó a cabo con ratones BALB/c estándares, “naïve” y saludables. Entonces, esta es otra razón que podría justificar por qué la mayoría de las citoquinas evaluadas (excepto IL-6) no se vieron afectadas significativamente por la administración del extracto de EPS. De un modo similar a nuestras observaciones, Fanning y col. (2012) demostraron en un modelo murino también “naïve” que la cepa productora de EPS *B. breve* UCC2003 falló al producir una respuesta inmune fuerte en comparación con su variante deficiente de EPS, evadiendo la respuesta de las células B. Tradicionalmente, los hidratos de carbono se consideran antígenos células T-independientes, ya que no inducen memoria inmunológica. Por esta razón, se postuló una teoría que sostiene que los polisacáridos interactúan con células B específicas y estimulan la producción de anticuerpos, evadiendo los mecanismos mediados por las células T. Sin embargo, se ha visto que polisacáridos (principalmente zwitteriónicos) podrían comportarse como antígenos dependientes de células T (Stephen y col., 2010). En nuestro caso, y teniendo en cuenta esta teoría, los resultados se relacionan más con una respuesta células T- independiente a nivel del intestino delgado por el bajo impacto que se ha visto en la producción de citoquinas. Sin embargo, se necesitarían estudios adicionales para corroborar esta respuesta.

La razón por la cual las dos matrices (leche y yogur) presentaron distintas respuestas en los niveles de s-IgA e IL-6 resulta poco clara, y requeriría de estudios adicionales (por ejemplo, incrementando el número de citoquinas evaluadas).

6.3.3. Capacidad protectora del EPS frente a una infección con *S. enteritidis* serovar Typhimurium

Luego del tratamiento durante 15 días y el posterior desafío con *Salmonella*, la proporción de animales sobrevivientes (hasta 25 días post-desafío) que recibió el extracto de EPS fue del 31%. Se observaron diferencias significativas (p valor unilateral de 0,016, test exacto de Barnard de proporciones con 95% de nivel de confianza) cuando el grupo tratado se comparó con el control, que sólo sobrevivió en un 9%. La Figura 6.2 muestra las curvas de supervivencia aplicando la estimación de distribución de Kaplan-Meier. El poder estimado para este test fue 87,3% (asumiendo un 95% de nivel de confianza y proporciones verdaderas iguales a aquellas observadas para los 2 grupos de 32 ratones/grupo). El poder indica la probabilidad de detectar una diferencia significativa cuando esa diferencia realmente existe. El cociente del riesgo de sobrevida para cada grupo de tratamiento con respecto a los grupos control fue

estimado con modelos de riesgos proporcionales de Cox. El riesgo instantáneo de muerte para el grupo tratado con EPS fue estimado en un 0,63 del riesgo del grupo control (p valor unilateral de 0,053, intervalo de 95% de confianza: [0,35, 1,09]). Esto indica que no se observaron diferencias significativas entre los grupos al aplicar este modelo a los resultados obtenidos.

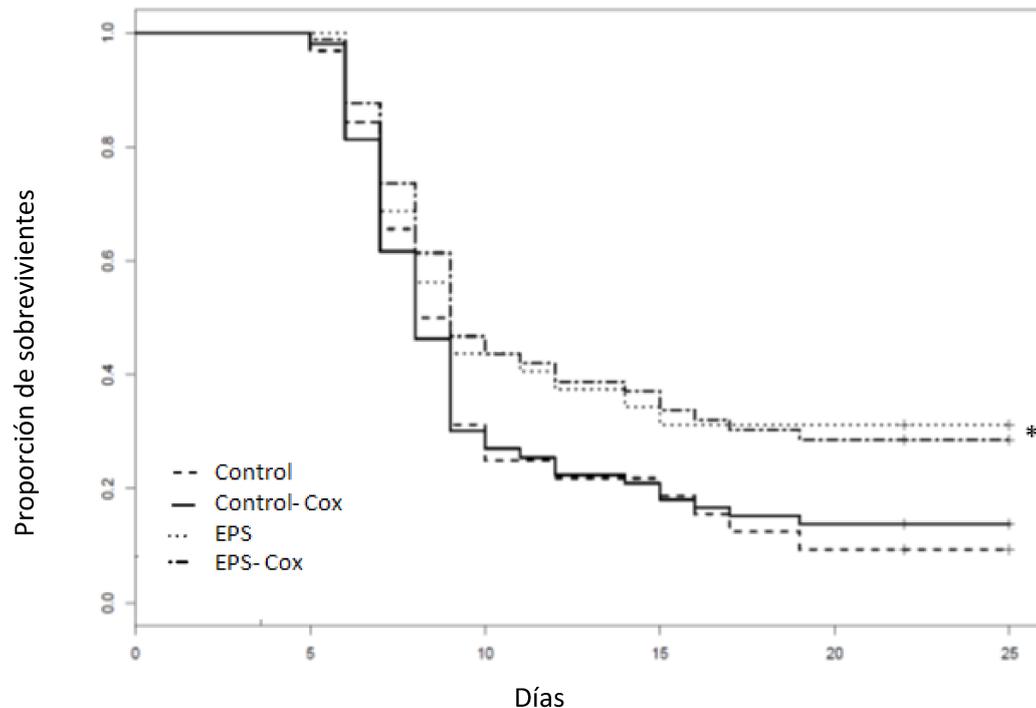


Figura 6. 2. Efecto del extracto de EPS de *L. fermentum* Lf2 sobre la proporción de sobrevivientes de ratones infectados con *Salmonella enteritidis* serovar Typhimurium aplicando la estimación de distribuciones Kaplan-Meier. Los ratones BALB/c fueron tratados con LDR estéril (Control) o EPS resuspendido en LDR (EPS, 9 mg/kg peso corporal). Las curvas correspondientes con el modelo estimado de Cox están especificadas (Control-Cox y EPS-Cox). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$, según el test de Barnard) en comparación al grupo control.

En general, se desea que un desafío frente a un patógeno cause 40-50% de mortalidad en el grupo control para evaluar el efecto protector del tratamiento en estudio en un modelo moderadamente severo. En nuestro trabajo, la elección de la dosis de patógeno se basó en estudios previos realizados en el bioterio del INLAIN, con el mismo modelo de infección de ratones BALB/c y utilizando la misma cepa de *Salmonella*, evidenciando que una dosis de 10^6 UFC permitía la supervivencia de un 40% de la población. En nuestro ensayo, solo el 9% del grupo control pudo sobrevivir después del desafío, tornando a este ensayo muy exigente o demandante. La razón para esta variabilidad es incierta, pero podría estar relacionada al hecho de que las infecciones por *Salmonella* en ratones son consideradas dinámicas y fuertemente

dependientes de numerosas variables del hospedador (Watson y Holden, 2010). A pesar de las condiciones exigentes de este ensayo, los resultados indicaron que la administración diaria del extracto de EPS, administrado en una dosis de 9 mg/kg previo al desafío con *Salmonella*, protegió a los animales frente a esta infección, sobreviviendo el 31% de la población tratada.

Proporciones de sobrevivientes similares fueron observadas por Nagai y col. (2011) cuando evaluaron el efecto de un EPS de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sobre una infección con virus de influenza luego de 21 días de administración de yogur. Aunque evaluaron la capacidad protectora del EPS frente a un virus, la supervivencia de ratones varió desde 0% para los grupos controles hasta 38,9% para distintas fracciones de EPS.

El rol de los polisacáridos en la tolerancia oral y en el balance del estado inmune asociado a algunas infecciones o desórdenes inflamatorios ha sido bien descrito (Rodríguez y col., 2009; Zivkovic y col., 2015). Fanning y col. (2012) demostraron los efectos de una cepa EPS⁺ de *B. breve* sobre la inmunomodulación y la protección frente a patógenos, ya que la presencia de EPS fue asociada a la evasión de la respuesta adaptativa de las células-B y a la reducción de la colonización de *Citrobacter rodentium* (modelo murino de ratones BALB/c “naïve”). Estos autores propusieron que el EPS cubriría las superficies celulares epiteliales del hospedador mediante la formación de un biofilm, evitando que *C. rodentium* pueda interactuar con todos los receptores y unirse exitosamente.

6.3.4. Evaluación del rol prebiótico/simbiótico del EPS en yogures

6.3.4.1. Recuentos de bifidobacterias en heces

Aún cuando la microbiota fecal no refleja estrictamente el ecosistema gastrointestinal completo, la determinación de los niveles bacterianos en heces puede considerarse una aproximación aceptable del contenido bacteriano del colon distal (Hamet y col., 2016).

En la Figura 6.3 se pueden ver los resultados de los recuentos de bifidobacterias en heces a 8, 18 y 25 días de tratamiento, restando el nivel basal de bifidobacterias detectados a tiempo inicial para cada ratón, en escala logarítmica. A los 8 días de tratamiento, se vieron diferencias significativas entre el grupo Y-E600 e Y-B, presentando este último recuentos aproximadamente un orden mayor que el primero. A los 18 días no se vieron diferencias significativas entre los grupos y al final del tratamiento, el grupo que recibió el EPS se mantuvo a niveles más bajos que los grupos que recibieron la bifidobacteria *B. animalis* INL1, ya sea con o sin EPS ($p < 0,05$).

Los ratones que recibieron sólo EPS presentaron un comportamiento similar al grupo control a lo largo de todo el tratamiento, lo que señala que el aumento de los niveles de este

género en heces estaría relacionado al consumo de la bifidobacteria *B. animalis* INL1, independientemente del agregado de EPS. Se puede observar también que, a los 18 días, todos los recuentos disminuyeron con respecto a los 8 días, salvo aquellos del grupo Y-E600-B, indicando una posible interacción beneficiosa entre *B. animalis* INL1 y el EPS, para lograr mantener los niveles de bifidobacterias en el intestino.

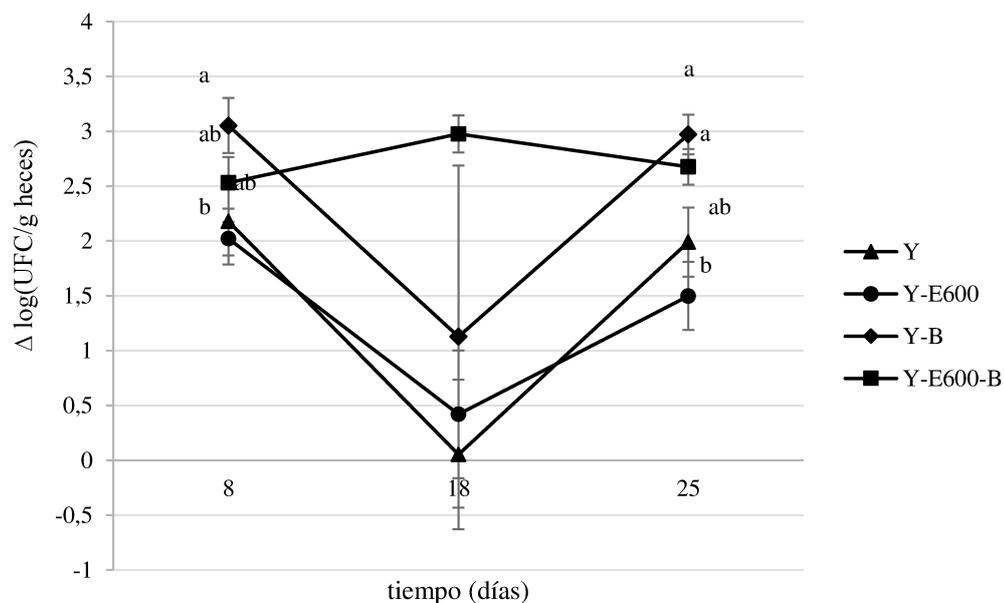


Figura 6. 3. Variación de los recuentos de bifidobacterias en heces (RCM-MUP, 37 °C, 48 h, anaerobiosis) con respecto al tiempo inicial ($\log_{i,t_f}(\text{UFC/g heces}) - \log_{i,t_0}(\text{UFC/g heces})$), para cada ratón i , siendo t_f 8, 18 o 25 días). Y-E600: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS a una concentración de 600 mg/L; Y-B: ratones que recibieron yogur con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 a una concentración de 5×10^8 UFC/mL; Y-E600-B: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, ambas a los niveles detallados anteriormente; Y: grupo control que recibió sólo yogur. Se presentan promedios \pm SEM.

6.3.4.2. Estimación por qPCR de los niveles de diferentes grupos bacterianos en heces

Los *primers* universales han sido diseñados para tener especificidad con las regiones conservadas del rRNA-16S de las células procariotas (Baker y col., 2003), dando una idea de la carga microbiana total presente, en este caso, en las heces de los ratones, y así relacionarla con la que se encuentra a nivel intestinal.

Para este caso, el tratamiento aplicado no tuvo efecto significativo, pero sí se observó un efecto del tiempo para uno de los 4 grupos, el grupo control que recibió sólo yogur (Y) (Figura 6.4). A los 25 días los niveles fueron significativamente menores ($p < 0,05$) que los niveles a los 8 y 18 días de tratamiento. En cambio, para el resto de los grupos no se presentaron diferencias significativas a lo largo del tiempo.

Según Baker y col. (2003), ningún par de *primers* universales son recomendables para garantizar la amplificación de todas las células procariotas, y para conocer mejor la estructura de la comunidad microbiana se debería complementar esta información con el uso de otros *primers*. A pesar de esto, se podría sugerir que tanto la administración de EPS como de la bifidobacteria *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, ya sea por separado o en conjunto, evitaría la disminución de la carga microbiana en el tiempo, si se compara con lo observado para el grupo de animales que sólo recibió yogur durante el tratamiento.

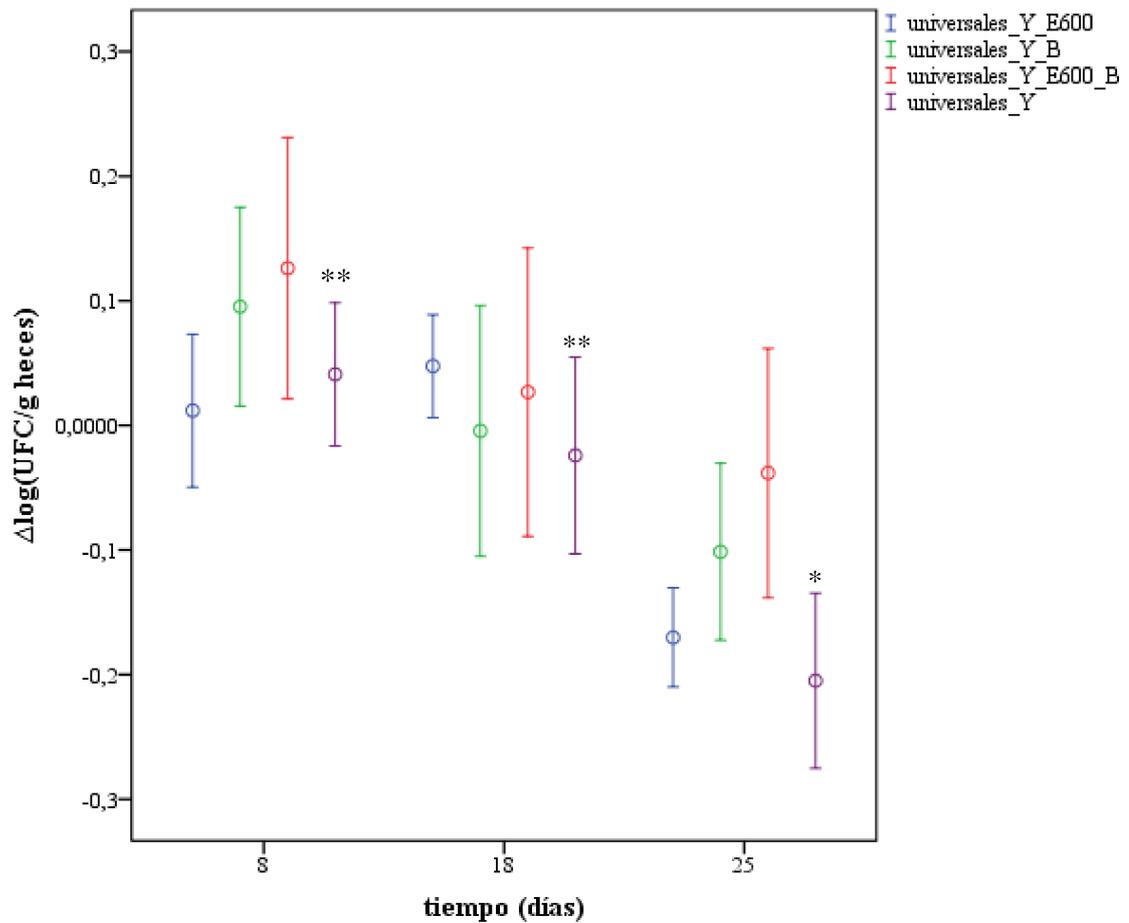


Figura 6. 4. Variación en la estimación mediante qPCR, utilizando los *primers* universales, de los niveles de la carga microbiana en heces de ratones con respecto al tiempo inicial ($\log_{i,t_f}(\text{UFC/g heces}) - \log_{i,t_0}(\text{UFC/g heces})$, para cada ratón i , siendo t_f 8, 18 o 25 días). Y-E600: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS a una concentración de 600 mg/L; Y-B: ratones que recibieron yogur con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 a una concentración de 5×10^8 UFC/mL; Y-E600-B: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, ambas a los niveles detallados anteriormente; Y: grupo control que recibió sólo yogur. Se presentan promedios \pm SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas para un tratamiento en el tiempo ($p < 0,05$).

En la Figura 6.5 se pueden ver las estimaciones obtenidas mediante qPCR para la especie *B. catenulatum* en las heces de ratón, a los distintos tiempos de tratamiento. Para este caso, la interacción entre los factores tiempo y tratamiento fue significativa por lo que no fue posible analizarlos por separado. A los 8 y 25 días no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, pero sí a los 18 días, tiempo en el que se observaron diferencias significativas entre los niveles de esta especie para los grupos Y e Y-E600, presentando este último, niveles menores. Si se analizan las tendencias de cada tratamiento en el tiempo, se puede apreciar que los grupos Y, Y-B e Y-E600-B mantienen niveles constantes, mientras que el grupo de animales que recibió sólo EPS (Y-E600) presenta una disminución a partir de los 18

días. Aparentemente, ni el extracto de EPS ni la bifidobacteria estimularían el desarrollo de esta especie bacteriana en el tracto intestinal de los animales tratados en las condiciones ensayadas.

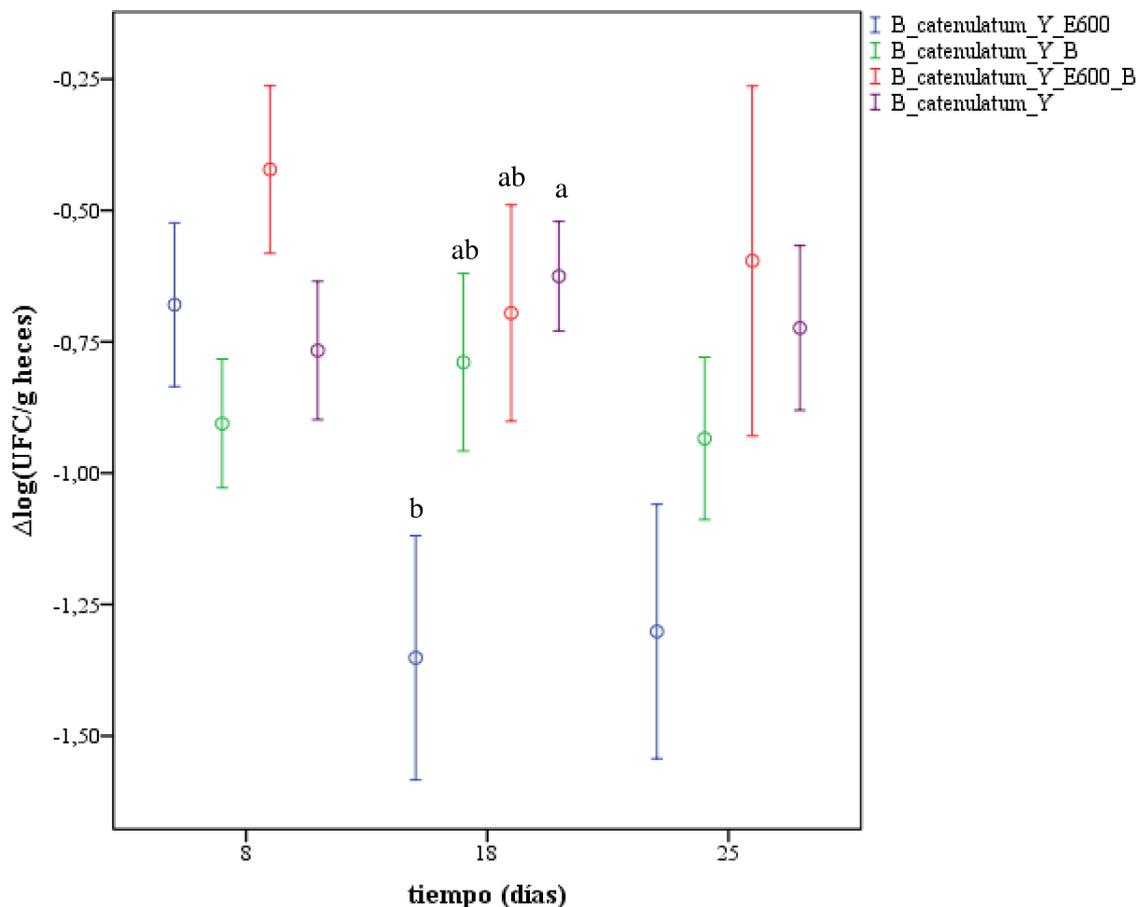


Figura 6. 5. Variación en la estimación mediante qPCR de los niveles de la especie *B. catenulatum* en heces de ratones con respecto al tiempo inicial ($\log_{i,t_f}(\text{UFC/g heces}) - \log_{i,t_0}(\text{UFC/g heces})$), para cada ratón *i*, siendo t_f 8, 18 o 25 días). Y-E600: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS a una concentración de 600 mg/L; Y-B: ratones que recibieron yogur con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 a una concentración de 5×10^8 UFC/mL; Y-E600-B: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, ambas a los niveles detallados anteriormente; Y: grupo control que recibió sólo yogur. Se presentan promedios \pm SEM. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos a cada tiempo ($p < 0,05$).

También se determinaron los niveles de la especie *B. animalis* mediante qPCR y la interacción entre factores volvió a ser significativa ($p < 0,05$), observándose diferencias a todos los tiempos de tratamiento evaluados y una tendencia generalizada a aumentar los niveles hacia el final del ensayo (Figura 6.6). A los 8 días, los grupos que recibieron la bifidobacteria (Y-B e Y-E600-B) presentaron niveles significativamente mayores que el grupo control (Y). A los 18 días, el único grupo que presentó diferencias significativas en comparación con el grupo control

fue el grupo Y-E600-B, indicando que la combinación del EPS y la bifidobacteria fue más efectiva para aumentar los niveles la especie *B. animalis* a este tiempo en relación a la administración de la bifidobacteria por sí sola (Y-B). A los 25 días sólo se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos Y-E600-B e Y-E600, pero ninguno fue distinto al grupo control. Este resultado sugiere que la combinación del EPS y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 fue más eficiente para estimular los niveles de esta especie que el EPS o la bifidobacteria por sí solos, y estaría indicando un posible rol simbiótico, al menos, cuando se evalúa esta especie bacteriana en particular.

Salazar y col. (2011) ensayaron dos bifidobacterias, una de la especie *B. animalis* y otra de *B. longum* (ambas productoras de EPS) en un modelo *in vivo* (ratas) y encontraron mayores niveles de *B. animalis* a nivel de ciego, al estimar por qPCR los niveles de *B. animalis* y *B. longum*, independientemente del microorganismo administrado. Aparentemente, y de un modo similar a lo observado en nuestro estudio, la población de *B. animalis* sería más susceptible de ser estimulada por efecto de la ingesta de cepas y/o componentes con potencial prebiótico. Además, estos autores analizaron las poblaciones microbianas por PCR-DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) y encontraron una mayor diversidad de bandas en el contenido del ciego para las ratas alimentadas con la cepa *B. animalis* IPLA R1 que el grupo control y que aquellas ratas alimentadas con *B. longum* IPLA E44.

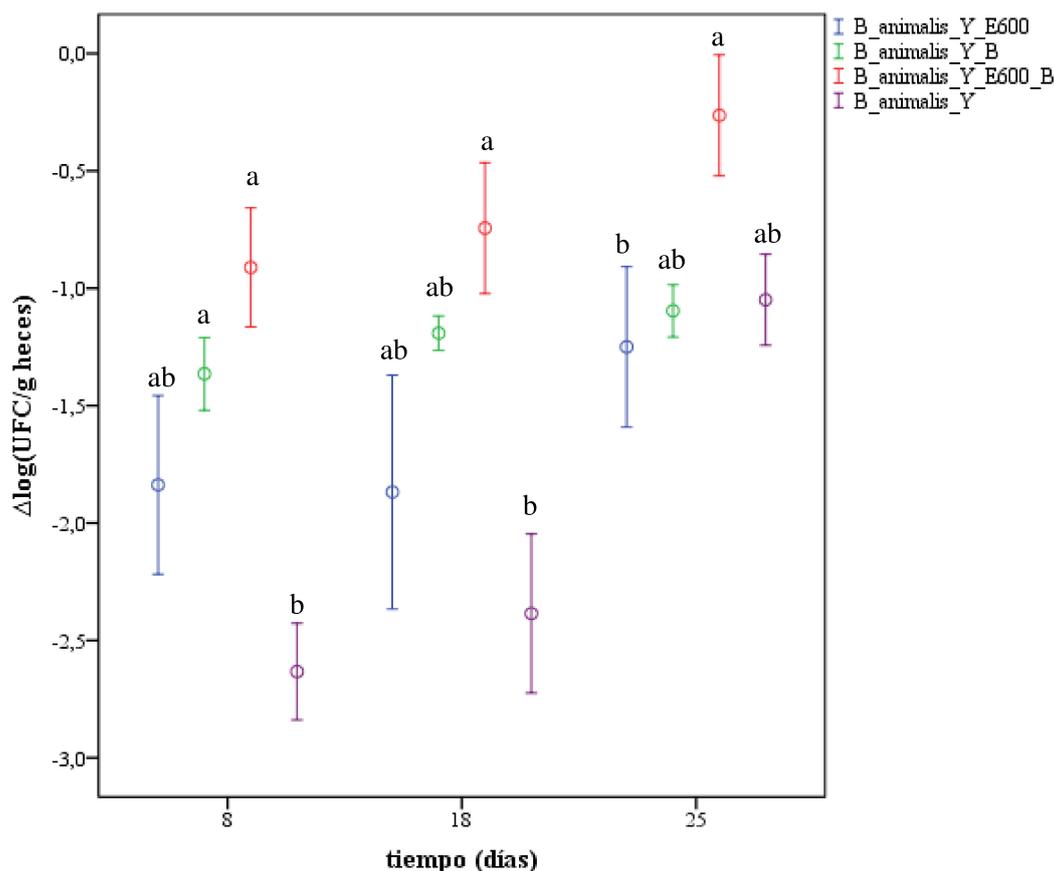


Figura 6. 6. Variación en la estimación mediante qPCR de los niveles de la especie *B. animalis* en heces de ratones con respecto al tiempo inicial ($\log_{i,t_f}(\text{UFC/g heces}) - \log_{i,t_0}(\text{UFC/g heces})$), para cada ratón i , siendo t_f 8, 18 o 25 días). Y-E600: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS a una concentración de 600 mg/L; Y-B: ratones que recibieron yogur con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 a una concentración de 5×10^8 UFC/mL; Y-E600-B: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, ambas a los niveles detallados anteriormente; Y: grupo control que recibió sólo yogur. Se presentan promedios \pm SEM. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) para cada tiempo evaluado.

Cuando se usaron *primers* específicos del género *Bifidobacterium* se detectaron diferencias significativas para el tiempo y los tratamientos (Figura 6.7). Si se comparan primero los tratamientos a cada tiempo, se observaron diferencias sólo a los 25 días, siendo el nivel de bifidobacterias del grupo Y-E600-B significativamente mayor al del grupo Y-E600 ($p < 0,05$) pero, al mismo tiempo, ninguno se diferenció del grupo control (Y). De este modo, parecería que ambos ingredientes incorporados al yogur, EPS y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 conjuntamente (y no en forma aislada) ejercerían un rol bifidogénico a los 25 días de tratamiento. Esto también fue confirmado mediante recuentos en placa, ya que a los 25 días el grupo Y-E600-B presentó niveles significativamente más altos de este género en comparación con el grupo Y-E600 (en este último ensayo los dos grupos que recibieron bifidobacterias

mostraron niveles significativamente mayores que el grupo Y-E600). Si bien los métodos no son comparables (el recuento en placa indica los niveles de una población microbiana cultivable y la qPCR cuantifica ADN bacteriano), las tendencias observadas para este género son similares para el grupo que combina EPS y bifidobacteria.

Si, por otro lado, se evalúa la influencia del tiempo para cada tratamiento, tanto para el grupo control (Y), como para el grupo que recibió sólo EPS (Y-E600), los niveles a los 18 días fueron significativamente menores que los obtenidos a los 25 días, indicando que la población de bifidobacterias se enriquece hacia el final del ensayo. Para el tratamiento Y-B no se observaron diferencias significativas en el tiempo, mientras que para el grupo Y-E600-B los niveles obtenidos a los 25 días fueron mayores que a los 8 y 18 días ($p < 0,05$). Esto sugiere que, nuevamente, el tratamiento más efectivo es el que combina el EPS con la bifidobacteria (posible rol simbiótico), ya que hacia el final del tratamiento los niveles no sólo son mayores que a los 18 días, sino que también superan significativamente a los obtenidos a los 8 días. Estos resultados se correlacionan con el efecto bifidogénico observado a partir de los recuentos en heces para estas muestras (sección 6.3.4.1).

Salazar y col. (2008) observaron por qPCR que 11 EPS diferentes producidos por bifidobacterias presentaron un efecto bifidogénico moderado (estudiado en cultivos *batch* de materia fecal), que para algunos EPS fue comparable al de la inulina (control positivo), pero menor al observado con glucosa. Además, mediante PCR-DGGE y utilizando *primers* universales para amplificar la región del rRNA 16s, evaluaron los cambios producidos durante la fermentación de otros grupos microbianos. Estos cambios fueron dependientes del EPS en estudio (y de la especie de la que se obtuvieron) y en general se observaron para *Bacteroides*, *E. coli* y microorganismos relacionados con este último.

En otro trabajo más reciente, Salazar y col. (2011) estudiaron una cepa de la especie *B. animalis* y otra de *B. longum* en relación a su capacidad de modular la microbiota intestinal en ratas Wistar. Mediante qPCR determinaron que los niveles de bifidobacterias fecales y en el ciego eran mayores para las ratas alimentadas con bifidobacterias a los 24 días, como se esperaba, mientras que al final del tratamiento el recuento total en placa de anaerobios no mostró diferencias con el grupo control. En nuestro estudio, los niveles de bifidobacterias determinados mediante recuento en placa para los dos grupos que recibieron bifidobacterias (Y-E600-B e Y-B) a los 18 días también se incrementaron, coincidiendo con lo observado en este trabajo.

Para el kefir, el EPS producido por *L. kefiranofaciens* contenido en los granos de kefir, Hamet y col. (2016) demostraron que, al administrarlo oralmente a ratones BALB/c

siguiendo dos modelos experimentales, modificó la microbiota intestinal y fecal, incrementando la población de bifidobacterias.

Ramírez-Farías y col. (2009), mediante un ensayo clínico, analizaron los cambios inducidos en la microbiota humana por el consumo de inulina (10 g/día durante 16 días) mediante qPCR a partir de heces. La prevalencia de la mayoría de los grupos no cambió luego del tratamiento, salvo la especie *Faecalibacterium prausnitzii* que exhibió un aumento significativo. Estudiaron además la composición del género *Bifidobacterium* y encontraron que *B. adolescentis* y *B. longum* estaban presentes en todos los voluntarios, y se detectaron las especies *B. pseudocatenulatum*, *B. animalis*, *B. bifidum* y *B. dentium*, siendo la especie *B. adolescentis* aquella que mostró mayor respuesta al consumo de inulina, incrementándose significativamente también *B. bifidum*. En nuestro caso, esta especie no pudo ser determinada porque los valores resultaron menor al límite de detección de la técnica en todas las muestras.

Sarikaya y col. (2017) encontraron que el EPS liofilizado de *L. fermentum* LB-69, a una concentración de 1 mg/mL, ejerce un doble efecto estimulador bifidogénico y anti-biofilm. Ambos ensayos se realizaron *in vitro*, el primer efecto se evaluó sobre la cepa *B. breve* BASO-1 en MRS suplementado con cisteína y adicionado de cada EPS (0,5 y 1 mg/mL), y el segundo sobre 4 cepas patógenas de las especies *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Según los autores, el consumo de este EPS por vía oral podría incrementar los niveles de bifidobacterias en el tracto gastrointestinal como así también prevenir y tratar algunas enfermedades, ya que es capaz de evitar la formación de biofilms por parte de bacterias patógenas. Este EPS resultó estar compuesto principalmente por manosa (96%) y sólo un 4% de glucosa.

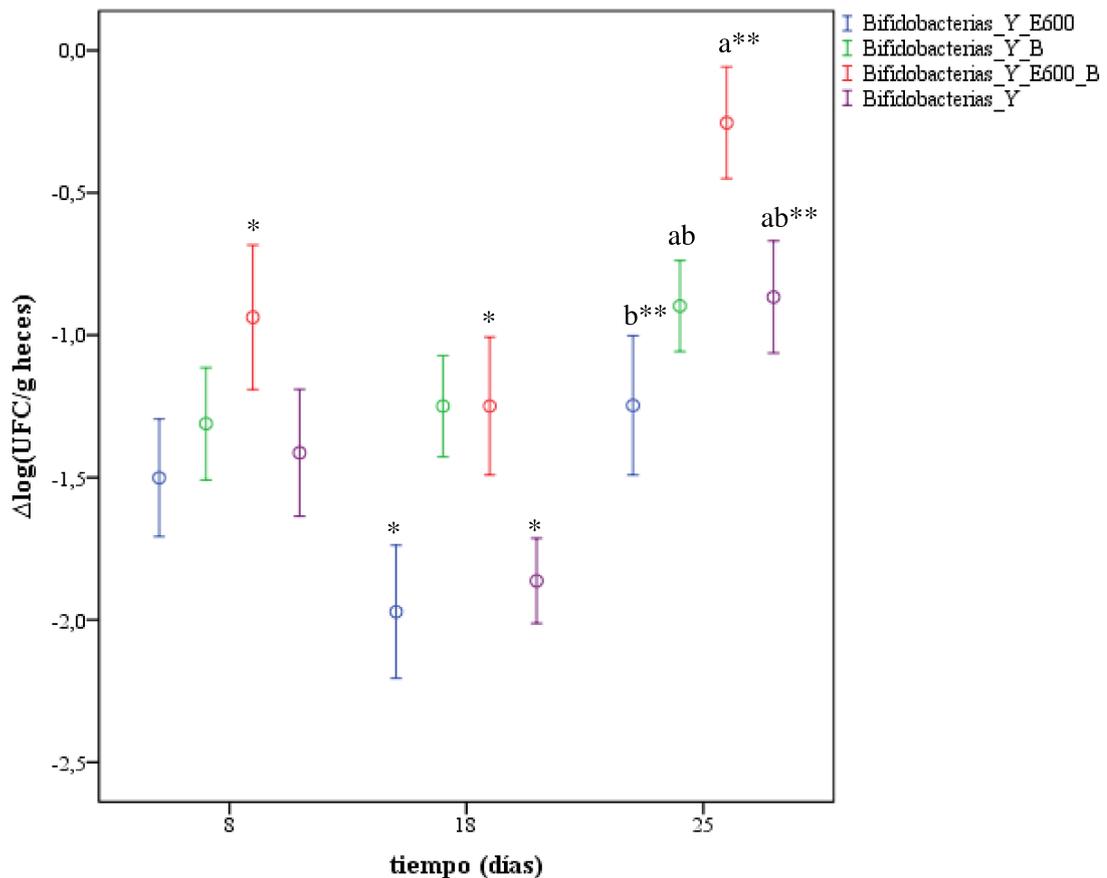


Figura 6. 7. Variación en la estimación mediante qPCR de los niveles del género *Bifidobacterium* en heces de ratones con respecto al tiempo inicial ($\log_{i,t_f}(\text{UFC/g heces}) - \log_{i,t_0}(\text{UFC/g heces})$), para cada ratón i , siendo t_f 8, 18 o 25 días). Y-E600: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS a una concentración de 600 mg/L; Y-B: ratones que recibieron yogur con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 a una concentración de 5×10^8 UFC/mL; Y-E600-B: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, ambas a los niveles detallados anteriormente; Y: grupo control que recibió sólo yogur. Se presentan promedios \pm SEM. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) para cada tiempo evaluado, mientras que los asteriscos representan diferencias ($p < 0,05$) entre los distintos tiempos para cada tratamiento.

Con respecto a la especie *C. coccoides* los factores tiempo y tratamiento presentaron diferencias significativas (Figura 6.8). Sólo a los 8 días se observaron diferencias significativas entre los grupos Y-E600 e Y-E600-B, presentando el primero niveles significativamente menores que el segundo pero al mismo tiempo ambos fueron similares al grupo control.

Al analizar el efecto del tiempo para cada tratamiento, se detectaron diferencias ($p < 0,05$) entre los días 18 y 25 con respecto al día 8 para el grupo Y-E600, indicando un aumento significativo para esta especie bacteriana, y que se mantuvo en el tiempo. Para el grupo Y-E600-B se vieron diferencias entre los días 18 y 8, mientras que para el resto de los tratamientos el tiempo no tuvo un efecto apreciable ($p > 0,05$). Esta información sugiere entonces que el EPS podría ser el responsable del aumento en los niveles de este grupo en el tiempo, siendo más efectivo desde los 18 días de administración. Aunque a los días 18 y 25 no se obtuvieron

diferencias significativas entre los grupos, se puede observar una tendencia, ya que el tratamiento Y-E600-B presentó niveles más elevados de esta especie, en comparación con el resto.

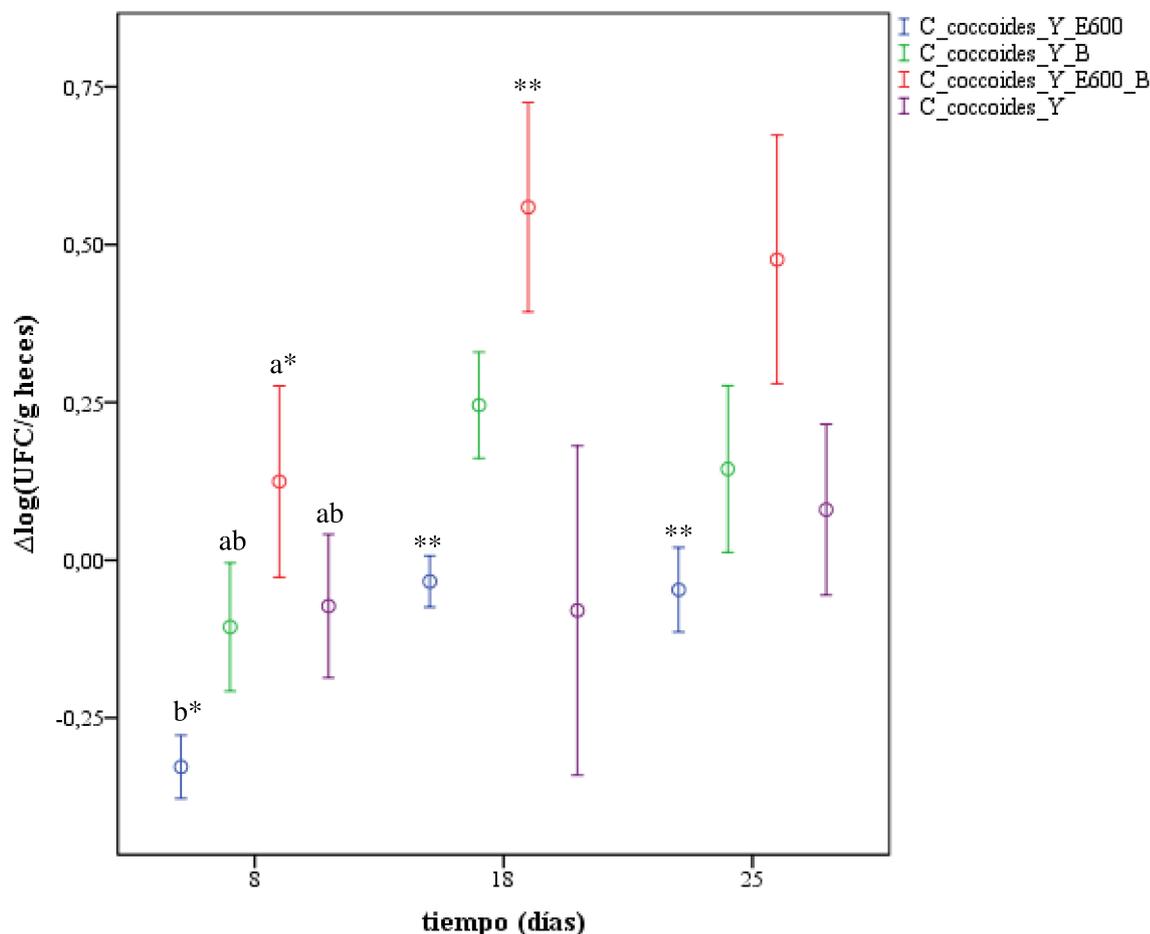


Figura 6. 8. Variación en la estimación mediante qPCR de los niveles del grupo *C. coccooides* en heces de ratones con respecto al tiempo inicial ($\log_{i,t_f}(\text{UFC/g heces}) - \log_{i,t_0}(\text{UFC/g heces})$), para cada ratón i , siendo t_f 8, 18 o 25 días). Y-E600: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS a una concentración de 600 mg/L; Y-B: ratones que recibieron yogur con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 a una concentración de 5×10^8 UFC/mL; Y-E600-B: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, ambas a los niveles detallados anteriormente; Y: grupo control que recibió sólo yogur. Se presentan promedios \pm SEM. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) para cada tiempo evaluado, mientras que los asteriscos representan diferencias ($p < 0,05$) entre los distintos tiempos para cada tratamiento.

Para otro grupo de clostridios, *C. leptum*, así como para el grupo de enterobacterias (Figuras 6.9 y 6.10, respectivamente) no se observaron diferencias significativas para ambos factores estudiados. Sin embargo, sí se pueden considerar algunas tendencias observadas experimentalmente. Para *C. leptum* se aprecia un pico máximo a los 18 días en el grupo Y-E600-B, considerablemente mayor que para el resto de los grupos, y se observa que los niveles

de esta especie se incrementaron a lo largo del tiempo para el grupo Y-E600 pero sin alcanzar los niveles detectados cuando se combina el EPS con el probiótico.

Con respecto al grupo de las enterobacterias, se puede observar que el grupo Y-E600 mantiene niveles bajos desde los 8 días de tratamiento y a los 25 días, para los grupos Y-B, Y-E600 e Y-E600-B, se detectan niveles inferiores (aunque no significativamente) a los del grupo control, que presentó una tendencia inversa (en aumento desde los 8 días). De un modo similar, se puede ver que para los grupos que recibieron la bifidobacteria, sola o combinada con EPS, se redujeron los niveles de enterobacterias a lo largo del tiempo ($p > 0,05$).

Li y col. (2014a) eligieron la cepa *B. bifidum* WBIN03 por su alta velocidad de crecimiento y producción de EPS (241,2 mg/mL) para estudiar el efecto de éste sobre la microbiota de ratones BALB/c (50 y 500 mg/kg/día). Sus resultados demostraron que este polisacárido aumentó significativamente el crecimiento de lactobacilos y bacterias anaeróbicas totales, y produjo una inhibición en el crecimiento de enterobacterias, enterococos y *Bacteroides fragilis*. Mediante DGG observaron que el EPS incrementó significativamente la diversidad de bacterias totales y lactobacilos, pero decreció la diversidad de enterobacterias.

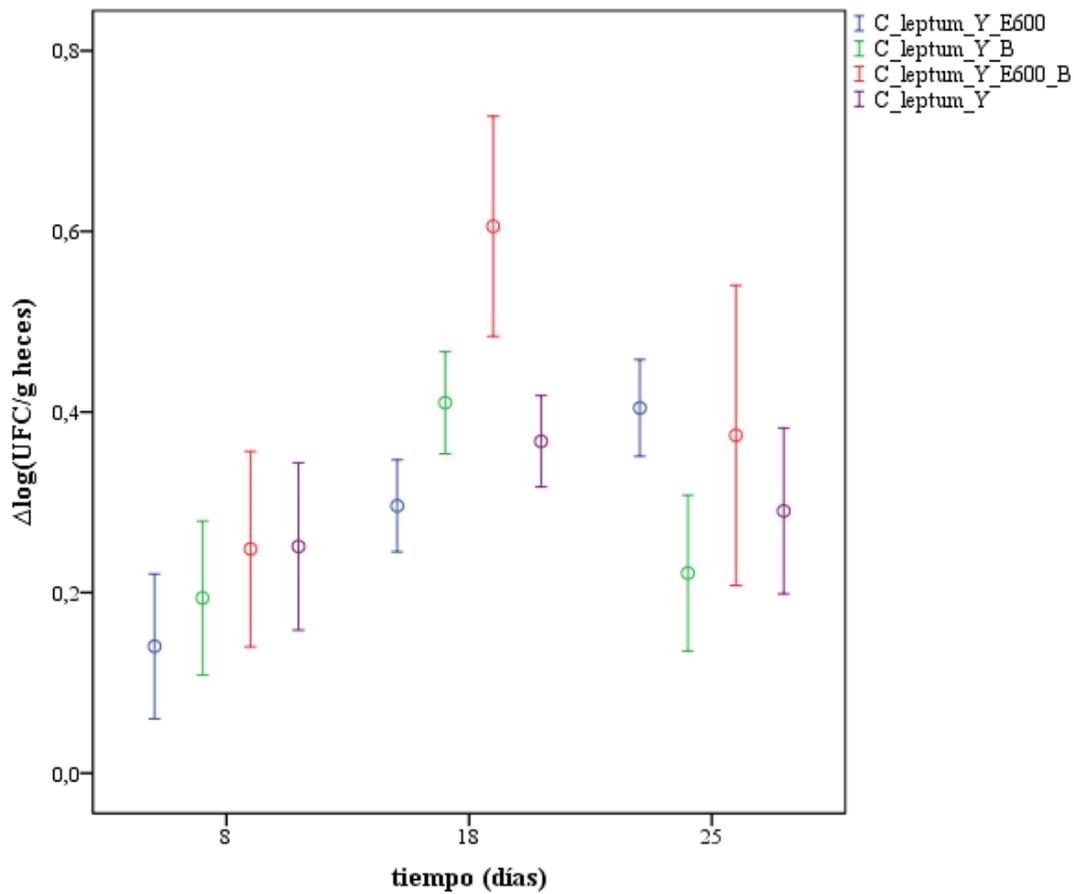


Figura 6. 9. Variación en la estimación mediante qPCR de los niveles del grupo *C. leptum* en heces de ratones con respecto al tiempo inicial ($\log_{i,t_f}(\text{UFC/g heces}) - \log_{i,t_0}(\text{UFC/g heces})$), para cada ratón i , siendo t_f 8, 18 o 25 días). Y-E600: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS a una concentración de 600 mg/L; Y-B: ratones que recibieron yogur con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 a una concentración de 5×10^8 UFC/mL; Y-E600-B: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, ambas a los niveles detallados anteriormente; Y: grupo control que recibió sólo yogur. Se presentan promedios \pm SEM.

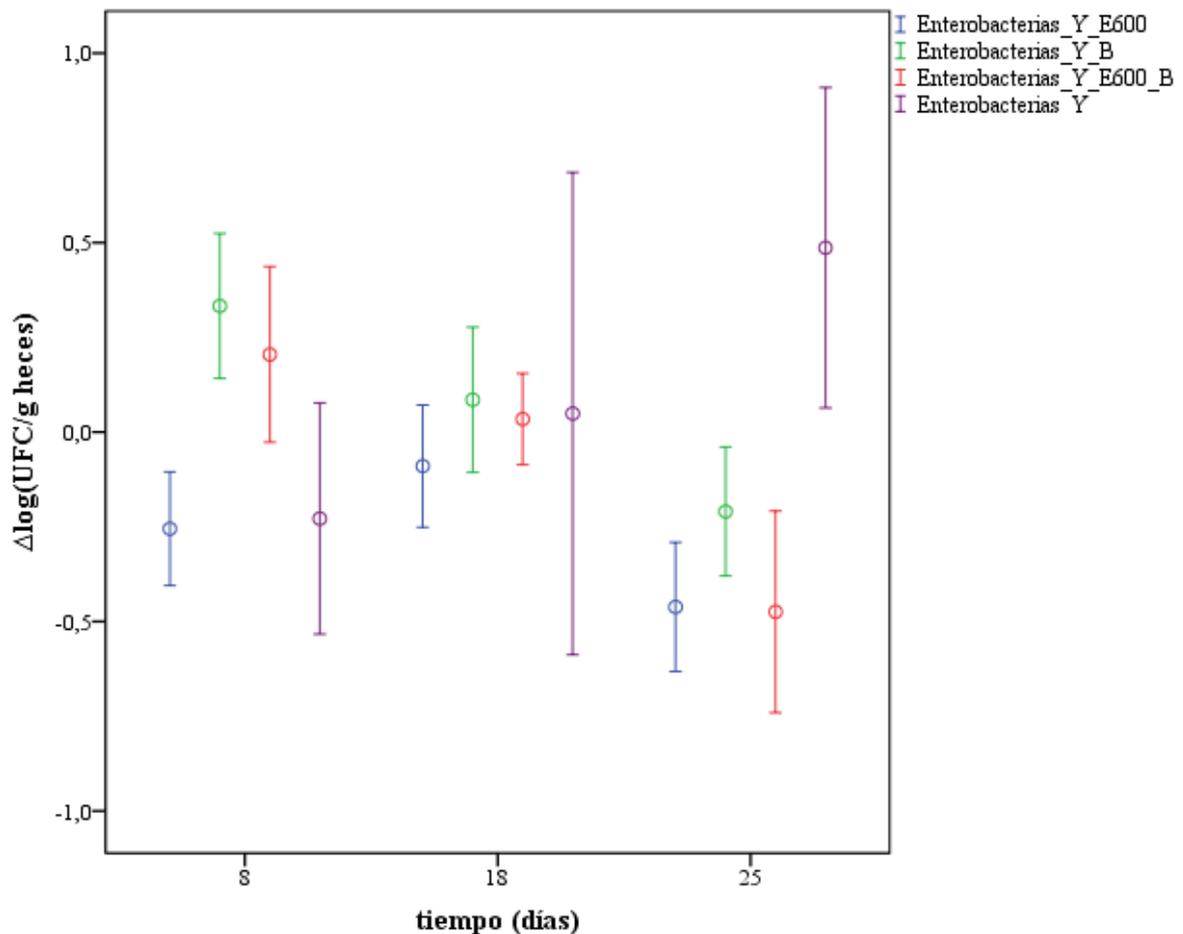


Figura 6. 10. Variación en la estimación mediante qPCR de los niveles de enterobacterias en heces de ratones con respecto al tiempo inicial ($\log_{i,t_f}(\text{UFC/g heces}) - \log_{i,t_0}(\text{UFC/g heces})$), para cada ratón i , siendo t_f 8, 18 o 25 días). Y-E600: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS a una concentración de 600 mg/L; Y-B: ratones que recibieron yogur con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 a una concentración de 5×10^8 UFC/mL; Y-E600-B: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, ambas a los niveles detallados anteriormente; Y: grupo control que recibió sólo yogur. Se presentan promedios \pm SEM.

Al evaluar las estimaciones de los recuentos del género *Streptococcus* también se obtuvo una interacción significativa entre los factores tiempo y tratamiento. En este caso, sólo se detectaron diferencias significativas a los 25 días (Figura 6.11). A dicho tiempo, el grupo Y-E600-B presentó niveles significativamente mayores que el grupo Y-E600, pero ninguno de ellos se diferenció del grupo control Y ($p > 0,05$). Si se analiza la tendencia de cada grupo en el tiempo, se puede apreciar que aquellos ratones que recibieron la bifidobacteria, sola o en combinación con EPS, presentaron un aumento en los niveles de estreptococos hacia el final del tratamiento mientras que los demás grupos se mantuvieron constantes.

Es importante remarcar que las bacterias tienen además capacidad de generar muchos neurotransmisores y neuromoduladores. Se ha determinado que *Lactobacillus* spp. y

Bifidobacterium spp. producen GABA (ácido γ -aminobutírico); *Escherichia* spp., *Bacillus* spp. y *Saccharomyces* spp. producen noradrenalina; *Candida* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia* spp. y *Enterococcus* spp. producen serotonina; *Bacillus* spp. produce dopamina y *Lactobacillus* spp. produce acetilcolina (Barrett y col., 2012; Matur y Eraslan, 2012, Lyte, 2011) por lo que podrían tener impacto en el cerebro y por ende en el comportamiento (Cryan y Dinan, 2012). De este modo, la tendencia de este género a incrementarse para los tratamientos con bifidobacteria (Y-B e Y-E600-B), hacia el final del tratamiento, y cuando se administraron conjuntamente EPS y la bifidobacteria (también productora de EPS) a los 25 días, podría ejercer un efecto positivo en la salud del consumidor.

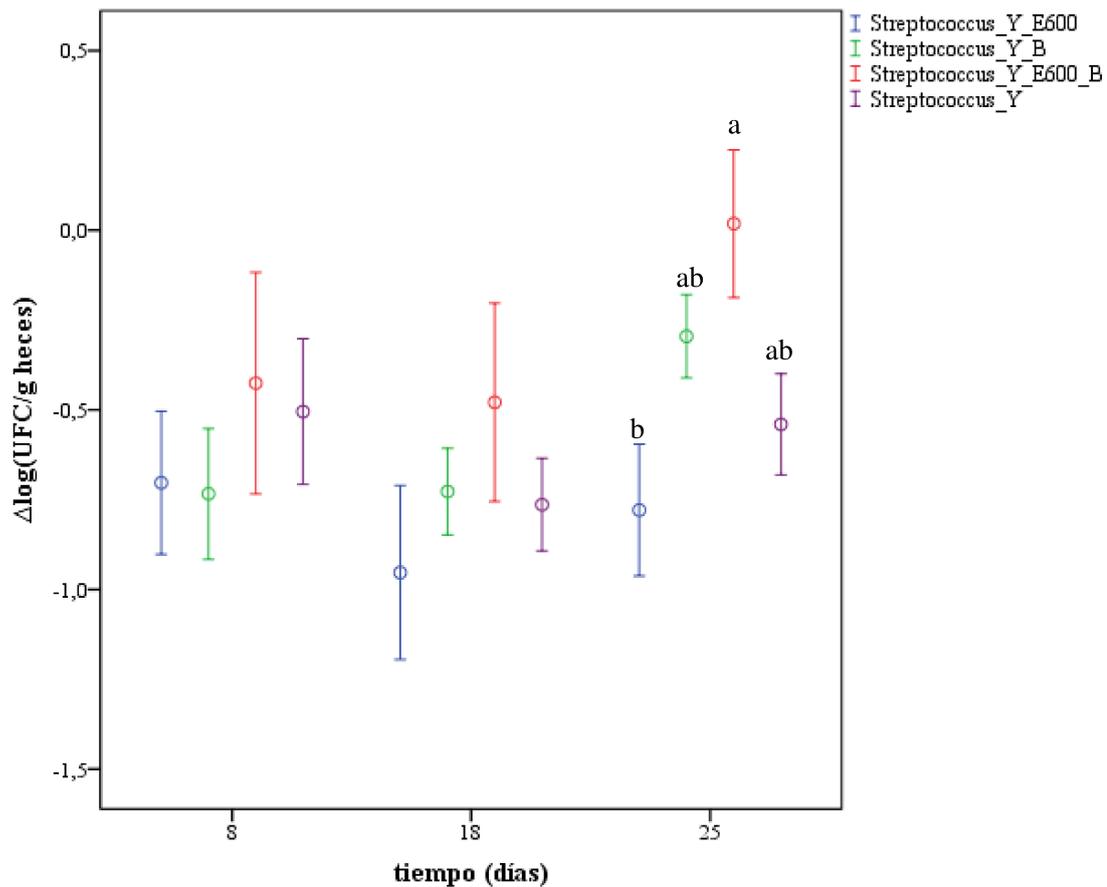


Figura 6. 11. Variación en la estimación mediante qPCR de los niveles del género *Streptococcus* en heces de ratones con respecto al tiempo inicial ($\log_{i,t_f}(\text{UFC/g heces}) - \log_{i,t_0}(\text{UFC/g heces})$), para cada ratón i , siendo t_f 8, 18 o 25 días). Y-E600: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS a una concentración de 600 mg/L; Y-B: ratones que recibieron yogur con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 a una concentración de 5×10^8 UFC/mL; Y-E600-B: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, ambas a los niveles detallados anteriormente; Y: grupo control que recibió sólo yogur. Se presentan promedios \pm SEM. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo dado ($p < 0,05$).

Finalmente, la estimación de la población del género *Lactobacillus* también fue evaluada para cada tratamiento a lo largo del tiempo (Figura 6.12), presentando interacciones significativas entre los factores. Sólo se observaron diferencias significativas a los 8 días, presentando el grupo Y-B niveles más altos ($p < 0,05$) que los grupos que recibieron EPS, solo o combinado con bifidobacteria. Al mismo tiempo, ninguno de estos 3 grupos fue diferente al control ($p > 0,05$). Por otro lado, al evaluar la tendencia de cada grupo en el tiempo, es notable que los niveles de lactobacilos disminuyen notoriamente a partir de los 18 días, independientemente del tratamiento que los animales hayan recibido, y alcanzando niveles similares al basal ($\Delta \log (\text{UFC/g heces})$ cercanos a 0).

En el trabajo de Haarman y Knol (2006) se comparó la microbiota intestinal entre bebés amamantados, bebés que consumían una leche de fórmula estándar o bebés que consumían esa fórmula suplementada con galacto- y fructo-oligosacáridos en una relación 9:1. Durante la intervención de 6 semanas, el primer y el tercer grupo presentaron un aumento significativo en el porcentaje de lactobacilos totales en heces, estimados mediante qPCR. Además, concluyeron que una fórmula de leche infantil suplementada con una mezcla de prebióticos fue capaz de inducir una microbiota similar a la observada en los bebés amamantados. En nuestro caso, el tratamiento con EPS o EPS combinado con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 no ejerció ningún efecto sobre la población de lactobacilos detectados por qPCR, comportándose todos los grupos de un modo similar ($p > 0,05$) al grupo control, y que se correlaciona a lo observado para el kefir por DGGE (Hamet y col., 2016), ejerciendo un rol bifidogénico que no estuvo acompañado por modificaciones en la población de *Lactobacillus*.

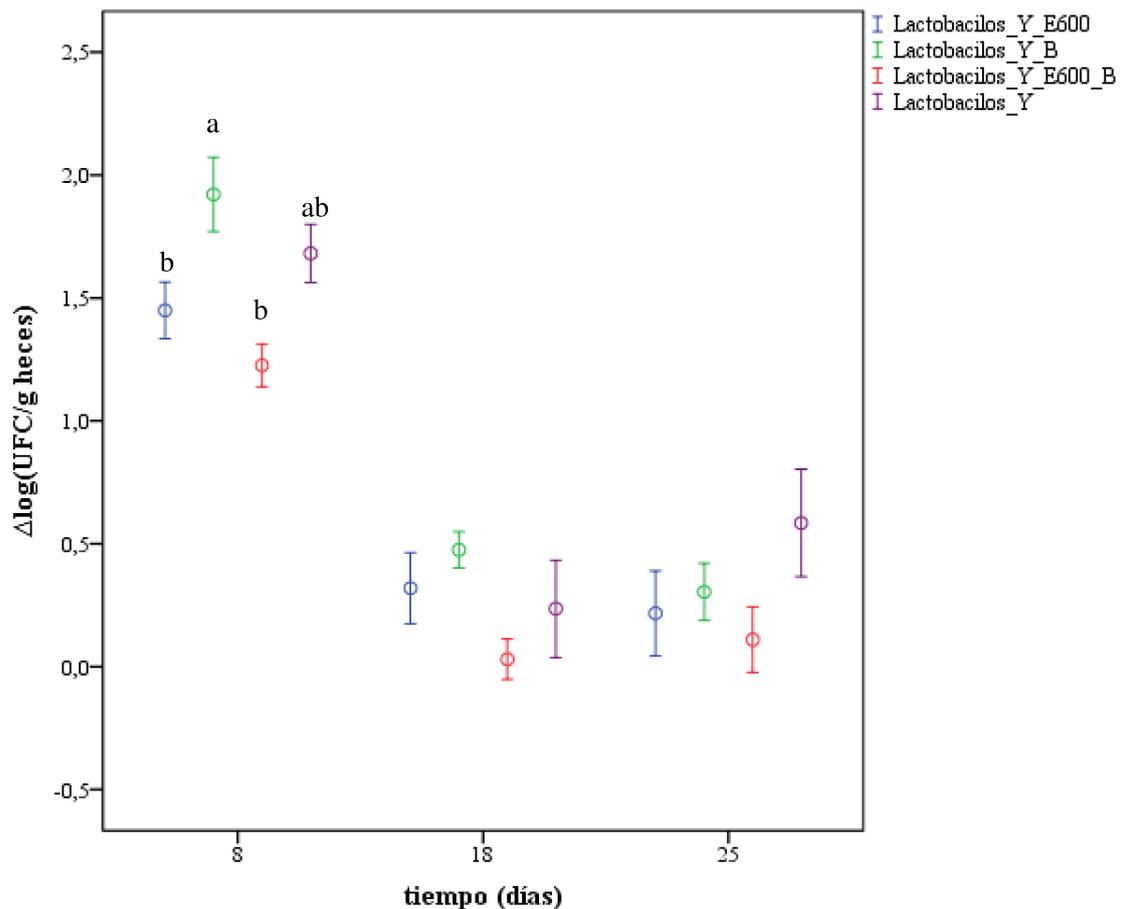


Figura 6. 12. Variación en la estimación mediante qPCR de los niveles del género *Lactobacillus* en heces de ratones con respecto al tiempo inicial ($\log_{i,t_f}(\text{UFC/g heces}) - \log_{i,t_0}(\text{UFC/g heces})$), para cada ratón i , siendo t_f 8, 18 o 25 días). Y-E600: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS a una concentración de 600 mg/L; Y-B: ratones que recibieron yogur con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 a una concentración de 5×10^8 UFC/mL; Y-E600-B: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, ambas a los niveles detallados anteriormente; Y: grupo control que recibió sólo yogur. Se presentan promedios \pm SEM. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) para cada tiempo evaluado.

6.3.4.3. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta en heces

Los productos principales que resultan del catabolismo de los carbohidratos por la actividad metabólica de las bacterias intestinales son tres ácidos grasos de cadena corta: acetato, propionato y butirato. El lactato, aunque no es considerado un SCFA, es también producido por algunos integrantes de la microbiota, tales como BAL, bifidobacterias y proteobacterias pero, bajo condiciones fisiológicas normales, no se acumula en el colon debido a la presencia de otras especies como, por ejemplo, *Eubacterium hallii*, que lo metabolizan y transforman en distintos SCFA (El Aidy y col., 2013; Flint y col., 2015). El SCFA más abundante en el colon es el acetato y representa, en general, más de la mitad de los SCFA detectados en las heces (Louis y col., 2007). Los sustratos prebióticos son capaces de promover selectivamente el crecimiento

de microorganismos beneficiosos e inducir cambios en las concentraciones de SCFA en individuos saludables (Lecerf y col., 2012). Por esta razón, su cuantificación en las heces (como una medida de su concentración en el tracto gastrointestinal) es un indicador de las modificaciones en la microbiota que pueden haber ocurrido por acción de alguna sustancia prebiótica.

En este trabajo se analizaron las concentraciones de los ácidos láctico, acético, propiónico y butírico en las heces de los ratones a los distintos tiempos de tratamiento, para evaluar el efecto de la administración de yogures adicionados de EPS y/o de la cepa probiótica *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.

En la Figura 6.13 se pueden ver los resultados obtenidos para el ácido láctico o lactato que, si bien no es considerado un SCFA, sus niveles estarían relacionados con el metabolismo de las BAL y otras bacterias intestinales. En este caso la interacción entre los factores tiempo y tratamiento fue significativa ($p < 0,05$), por lo que sólo se analizaron las diferencias entre tratamientos a cada tiempo estudiado. A los 8 días el grupo Y-B presentó concentraciones significativamente mayores que el grupo Y-E600; sin embargo, ninguna fue distinta del grupo control. A los 18 días no se observaron diferencias entre los cuatro tratamientos, mientras que a los 25 días el grupo Y presentó niveles de ácido láctico mayores ($p < 0,05$) que los grupos que recibieron la bifidobacteria, sola o conjuntamente con el EPS (Y-B e Y-E600-B). Esto sugiere que para el tratamiento con la bifidobacteria, a pesar de alcanzar concentraciones de ácido láctico elevadas a los 8 días cuando se administra individualmente, al final del tratamiento el nivel de este ácido se reduce significativamente con respecto al grupo control, ya sea en combinación o no con el EPS de *L. fermentum* Lf2.

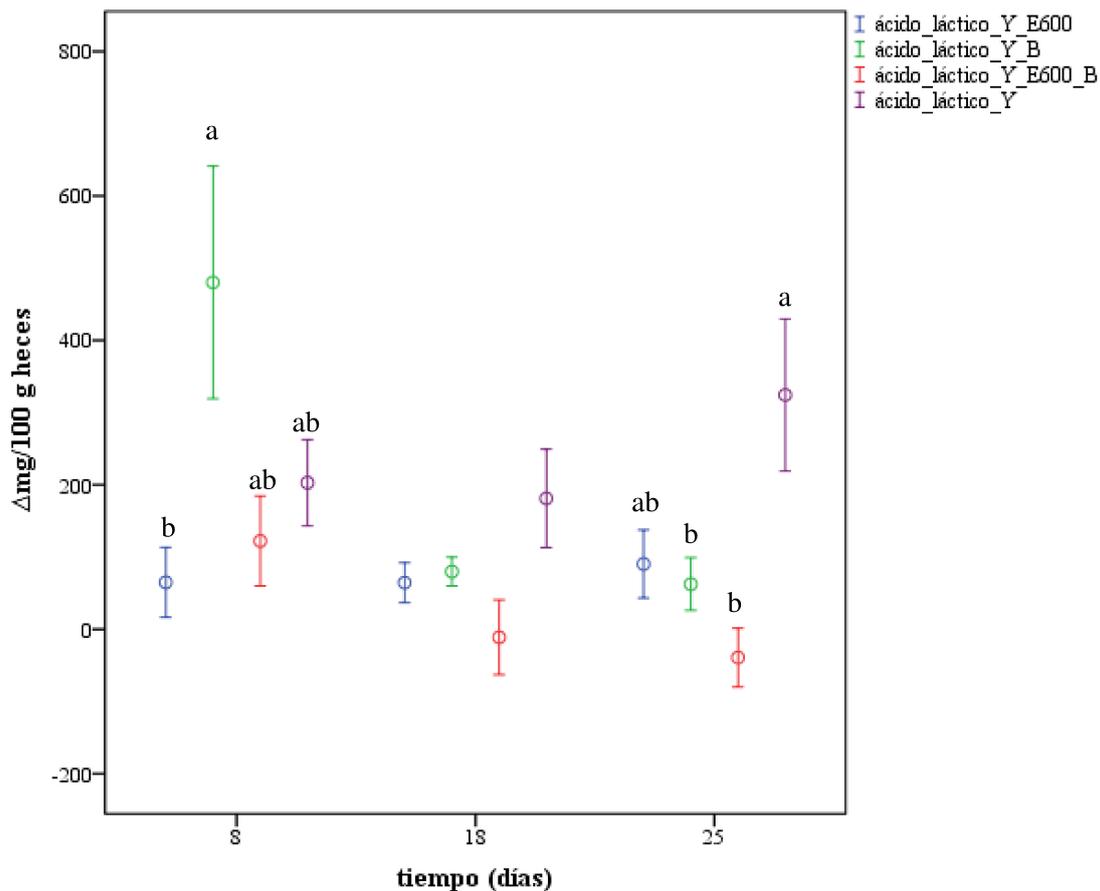


Figura 6. 13. Variación de la concentración de ácido láctico en heces de ratones con respecto al tiempo inicial (mg/100 g heces i_{t_f} – mg/100 g heces i_{t_0} , para cada ratón i , siendo t_f 8, 18 o 25 días). Y-E600: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS a una concentración de 600 mg/L; Y-B: ratones que recibieron yogur con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 a una concentración de 5×10^8 UFC/mL; Y-E600-B: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, ambas a los niveles detallados anteriormente; Y: grupo control que recibió sólo yogur. Se presentan promedios \pm SEM. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) para cada tiempo evaluado.

Con respecto al ácido acético (Figura 6.14), sólo el factor tiempo tuvo influencia significativa, específicamente para el tratamiento con EPS, viéndose su concentración incrementada en el tiempo y resultando significativamente superior a tiempo final ($p < 0,05$) con respecto a los 8 días. Esto sugiere que el aumento en las concentraciones de este ácido con el tiempo se relaciona con el tratamiento con EPS únicamente. Para los demás tratamientos no se observaron modificaciones significativas durante los 25 días de intervención.

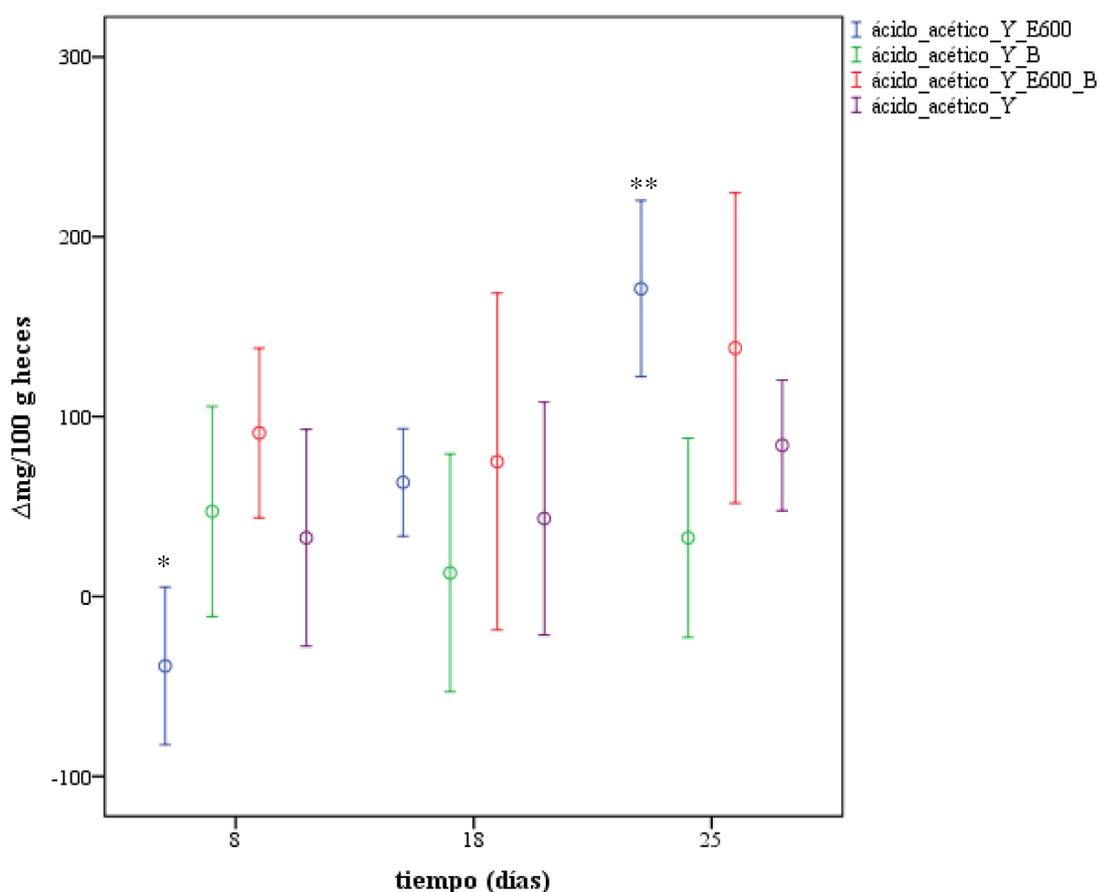


Figura 6. 14. Variación de la concentración de ácido acético en heces de ratones con respecto al tiempo inicial (mg/100 g heces $_{i,t_f}$ – mg/100 g heces $_{i,t_0}$, para cada ratón i , siendo t_f 8, 18 o 25 días). Y-E600: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS a una concentración de 600 mg/L; Y-B: ratones que recibieron yogur con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 a una concentración de 5×10^8 UFC/mL; Y-E600-B: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, ambas a los niveles detallados anteriormente; Y: grupo control que recibió sólo yogur. Se presentan promedios \pm SEM. Los asteriscos representan diferencias ($p < 0,05$) entre los distintos tiempos para cada tratamiento.

En el caso del ácido propiónico, a pesar de observarse una tendencia similar a la descrita anteriormente para ácido acético para el grupo Y-E600 (Figura 6.15), la influencia de los factores tiempo y tratamiento no llegó a ser significativa ($p > 0,05$).

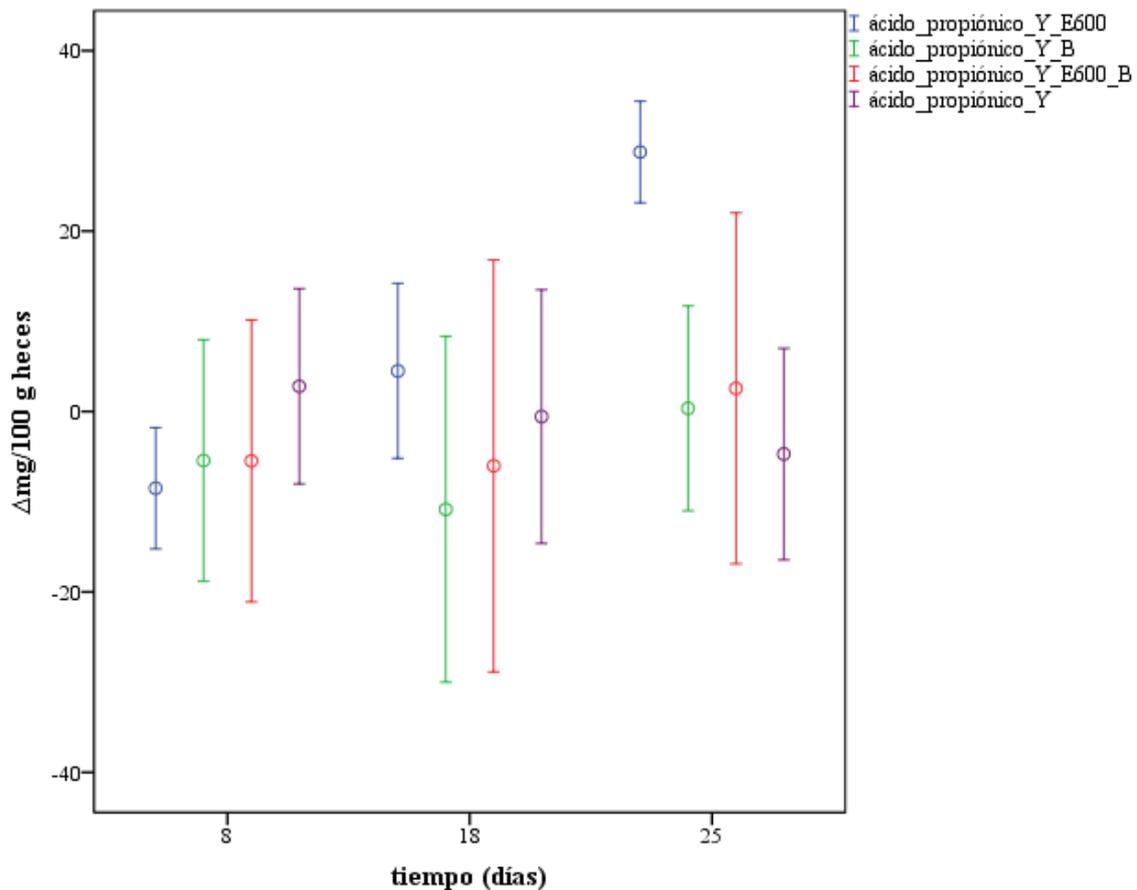


Figura 6. 15. Variación de la concentración de ácido propiónico en heces de ratones con respecto al tiempo inicial (mg/100 g heces i_{t_f} – mg/100 g heces i_{t_0} , para cada ratón i , siendo t_f 8, 18 o 25 días). Y-E600: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS a una concentración de 600 mg/L; Y-B: ratones que recibieron yogur con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 a una concentración de 5×10^8 UFC/mL; Y-E600-B: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, ambas a los niveles detallados anteriormente; Y: grupo control que recibió sólo yogur. Se presentan promedios \pm SEM.

Finalmente, cuando se analizaron los niveles de ácido butírico (Figura 6.16) y de la suma de los ácidos butírico, propiónico y acético (ácidos totales, Figura 6.17), se observa el mismo comportamiento que para el ácido acético, siendo sólo el factor tiempo significativo para el grupo Y-E600, el cual presentó un aumento ($p < 0,05$) en su concentración a los 25 días en relación al valor registrado a 8 días de administración de yogur adicionado de EPS. Este resultado nuevamente pone en evidencia que el tratamiento que favorece la producción individual de los ácidos acético, butírico y la suma de los tres SCFA, es aquel en el que el yogur se adicionó exclusivamente con EPS de *L. fermentum* Lf2, y no cuando el EPS está combinado con la bifidobacteria.

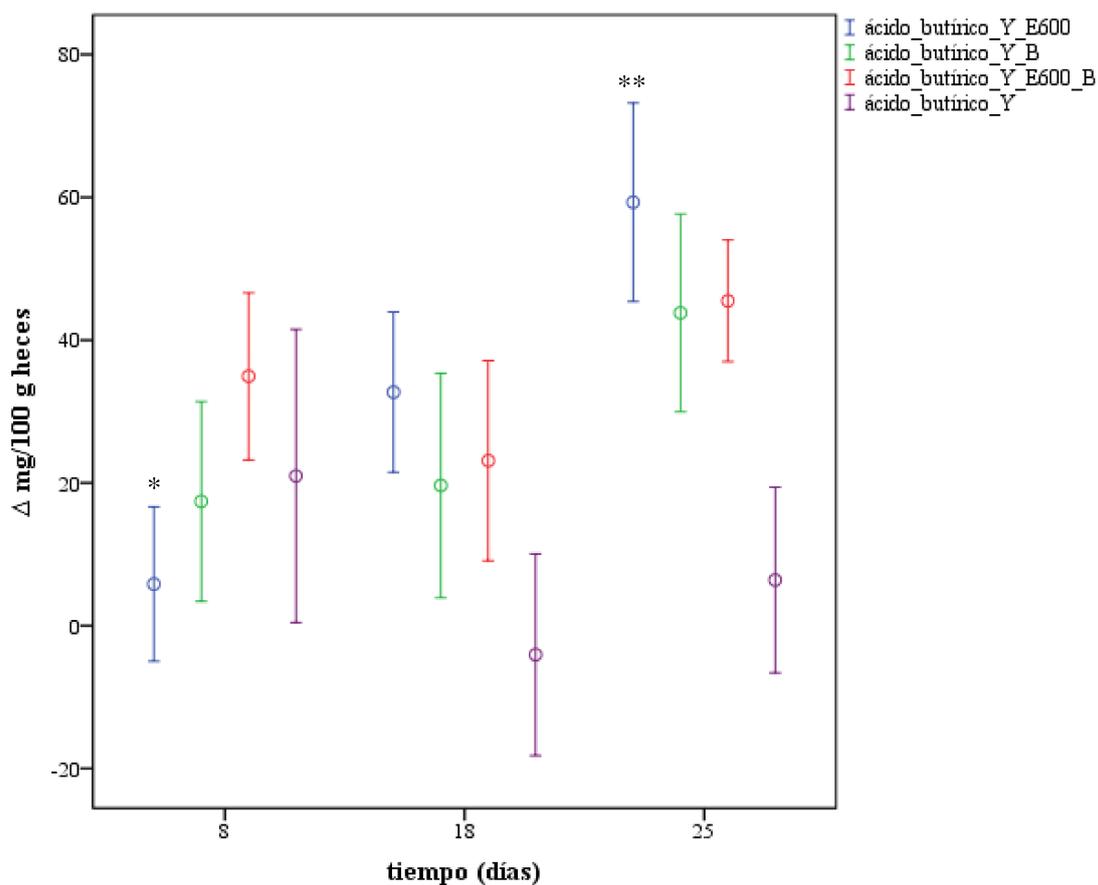


Figura 6. 16. Variación de la concentración de ácido butírico en heces de ratones con respecto al tiempo inicial (mg/100 g heces $_{i,t_f}$ – mg/100 g heces $_{i,t_0}$, para cada ratón i , siendo t_f 8, 18 o 25 días). Y-E600: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS a una concentración de 600 mg/L; Y-B: ratones que recibieron yogur con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 a una concentración de 5×10^8 UFC/mL; Y-E600-B: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, ambas a los niveles detallados anteriormente; Y: grupo control que recibió sólo yogur. Se presentan promedios \pm SEM. Los asteriscos representan diferencias ($p < 0,05$) entre los distintos tiempos para cada tratamiento.

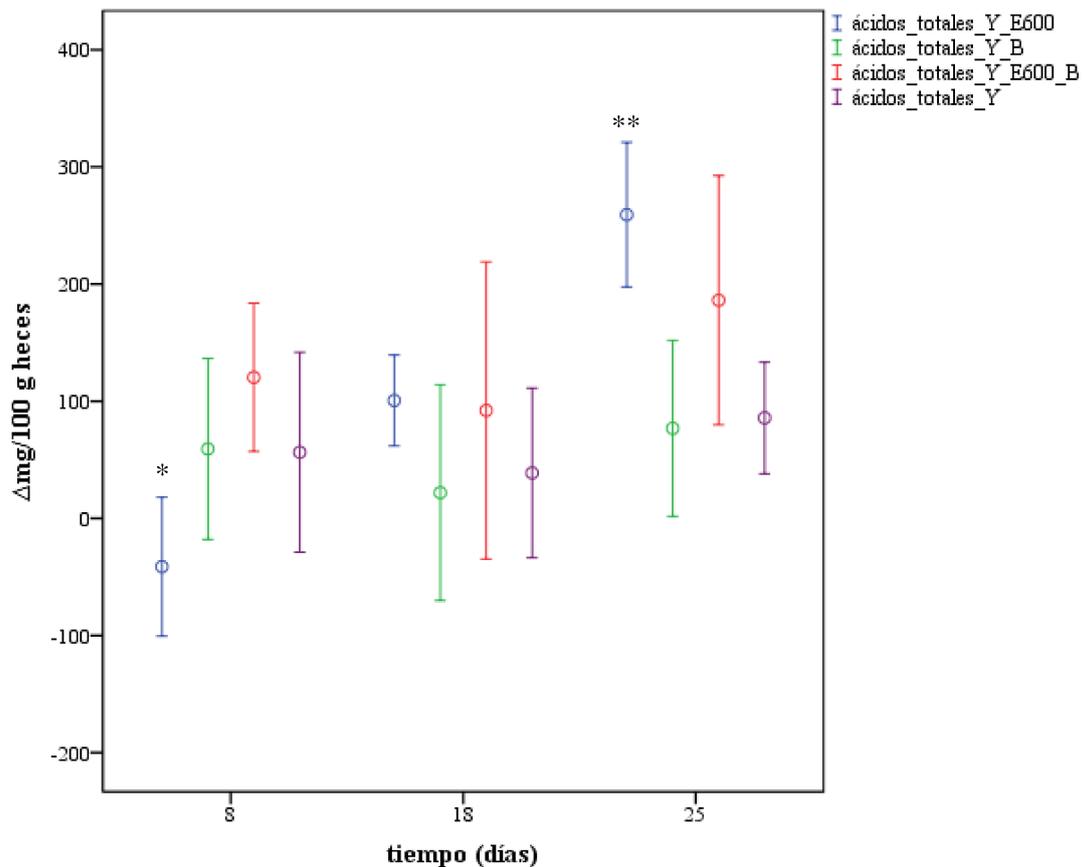


Figura 6. 17. Variación de la concentración de la suma de los ácidos butírico, propiónico y acético (SCFA totales) en heces de ratones con respecto al tiempo inicial (mg/100 g heces $_{i,t_f}$ – mg/100 g heces $_{i,t_0}$, para cada ratón i , siendo t_f 8, 18 o 25 días). Y-E600: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS a una concentración de 600 mg/L; Y-B: ratones que recibieron yogur con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 a una concentración de 5×10^8 UFC/mL; Y-E600-B: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, ambas a los niveles detallados anteriormente; Y: grupo control que recibió sólo yogur. Se presentan promedios \pm SEM. Los asteriscos representan diferencias ($p < 0,05$) entre los distintos tiempos para cada tratamiento.

Se ha demostrado que las bifidobacterias pueden proteger al hospedador frente a infecciones enteropatógenicas a través de la producción de acetato (Fukuda y col., 2011). Además, tanto este ácido como el propionato son producidos principalmente por especies pertenecientes al filo *Bacteroidetes*, mientras que el butirato es producido mayoritariamente por el metabolismo de algunos integrantes del filo *Firmicutes* (Walker y col., 2005). El acetato se ha relacionado con la reducción del apetito, mediante la interacción con el sistema nervioso central (Frost y col., 2014) y se ha demostrado que los tres SCFA (acetato, butirato y propionato) poseen propiedades antiinflamatorias intestinales (Tedelind y col., 2007), beneficiando la salud digestiva. El butirato se asocia a diversos efectos beneficiosos para la salud ya que promueve la motilidad del colon, reduce la inflamación, aumenta la irrigación visceral, induce apoptosis e inhibe la progresión de células tumorales, siendo todas estas

propiedades beneficiosas para la prevención del cáncer colorrectal (Canani y col., 2011; Keku y col., 2015; Leonel y Alvarez-Leite, 2012; Zhang y col., 2010). En los últimos años se ha prestado una mayor atención a los metabolismos del propionato y butirato, habiéndose encontrado una conexión entre niveles bajos de bacterias productoras de estos ácidos y algunas enfermedades en las que se desarrollan procesos inflamatorios, como colitis ulcerosa y asma (Ríos-Covián y col., 2016), lo que pone en evidencia el beneficio que representa su aumento sobre la salud del consumidor.

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis a partir de la estimación por qPCR de los niveles de diferentes grupos microbianos y la cuantificación de SCFA en heces se muestran resumidamente en la Tabla 6.3, a los fines de facilitar su interpretación y análisis.

Tabla 6. 3. Resumen de los resultados obtenidos (estimación por qPCR de los niveles de diferentes grupos bacterianos y cuantificación de SCFA en heces) para el estudio *in vivo* del rol prebiótico/simbiótico del EPS de *L. fermentum* Lf2, combinado con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.

Grupo microbiano	Diferencias encontradas
Microbiota total	↓ a los 25 días para Y en comparación a los demás tiempos
<i>B. catenulatum</i>	YE600 < Y a los 18 días
<i>B. animalis</i>	YB, YE600B > Y a los 8 días YE600B > Y a los 18 días YE600B > YE600 a los 25 días
<i>Bifidobacterium</i>	YE600B > YE600 a los 25 días ↑ YE600 a los 25 días en comparación a los 18 días ↑ YE600B a los 25 días en comparación al resto de los tiempos ↑ Y a los 25 días en comparación a los 18 días
<i>C. coccoides</i>	YE600B > YE600 a los 8 días ↑ YE600 a los 18 y 25 días en comparación a los 8 días ↑ YE600B a los 18 días en comparación a los 8 días
<i>C. leptum</i>	No se vieron diferencias significativas
Enterobacterias	No se vieron diferencias significativas
<i>Streptococcus</i>	YE600B > YE600 a los 25 días
<i>Lactobacillus</i>	YB > YE600, YE600B a los 8 días
Ácidos orgánicos	Diferencias encontradas
Ácido láctico	YB > YE600 a los 8 días Y > YB, YE600B a los 25 días
Ácido acético	↑ YE600 a los 25 días en comparación a los 8 días
Ácido propiónico	No se vieron diferencias significativas
Ácido butírico	↑ YE600 a los 25 días en comparación a los 8 días
SCFA totales (ácidos acético+ propiónico+ butírico)	↑ YE600 a los 25 días en comparación a los 8 días

Debido a que existe evidencia de que el lactato puede convertirse en butirato y propionato por la acción de la microflora intestinal (Bourriaud y col., 2005), posiblemente y para el grupo que recibió sólo EPS, esta conversión se vio favorecida por acción de este polisacárido, reduciendo los niveles de lactato a tiempo final (en relación al grupo control,

aunque no significativamente) y aumentando, consecuentemente, la concentración final de ácidos propiónico y butírico como se observó en este estudio.

Los niveles estimados para *C. leptum* y *C. coccooides* (especies pertenecientes a los clusters IV y XIVa de *Clostridium*, respectivamente), se vieron favorecidos en el tiempo (*C. coccooides* evidenció un aumento significativo y *C. leptum* una tendencia a aumentar durante el tratamiento) por el consumo de EPS, ya sea en forma individual o combinado con la bifidobacteria. Ambas especies han sido descritas como componentes esenciales de la microbiota intestinal humana (Duncan y col., 2002; Lay y col., 2005), responsables de la síntesis de grandes cantidades de butirato que no sólo se utiliza como fuente principal de energía de las células epiteliales del colon (Barcenilla y col., 2000; Duncan y col., 2002), sino que también inhibe la expresión de mRNA de citoquinas proinflamatorias en la mucosa (Segain y col., 2000). Además, la disminución de estas especies ha sido relacionada con una mayor incidencia de la enfermedad de Crohn (Manichanh y col., 2006), afectando negativamente la salud. De este modo, teniendo en cuenta estos antecedentes, a partir de nuestros resultados se podrían correlacionar los aumentos detectados por qPCR para ambas especies y el incremento detectado en la concentración final de ácido butírico en heces. Ambos resultados impactarían favorablemente sobre la salud del consumidor, evidenciando un rol funcional del EPS en estudio.

Halmos y col. (2015) compararon el efecto de dos dietas sobre 33 individuos (27 con síndrome de intestino irritable y 6 saludables), la dieta australiana y una baja en oligo-, di-, mono-sacáridos fermentables y polioles (las dietas sólo se diferenciaban en las proporciones de estos componentes) y observaron un aumento de la abundancia relativa del cluster XVIa de *Clostridium* (productores de butirato) para la dieta australiana, mientras que para la otra dieta se verificó una disminución de la abundancia bacteriana total. Por otro lado, Majid y col. (2011) compararon el efecto entre una fórmula enteral estándar y una enriquecida con FOS y fibra sobre 41 pacientes hospitalizados bajo nutrición enteral por 12 días y vieron que con la administración de la fórmula enriquecida aumentaron significativamente los niveles fecales de butirato. Lecerf y col. (2012) realizaron un estudio sobre 60 voluntarios saludables y jóvenes quienes consumieron tres tipos de dietas: una rica en xilo-oligosacáridos (XOS), otra rica en XOS e inulina, y una tercera rica en maltodextrina (placebo), durante 4 semanas. Para la dieta rica en XOS observaron un aumento de bifidobacterias y butirato en heces, pero una disminución en los niveles de acetato, mientras que para la dieta de los dos polisacáridos los niveles de este ácido se mantuvieron, y se vieron aumentados los SCFA en general, en

comparación con el grupo placebo, resultado similar a lo observado con nuestro modelo murino para el grupo Y-E600 a lo largo del tiempo.

En un revisión de den Besten y col. (2013) se describió la relación entre los SCFA y la microbiota intestinal, junto con su impacto en el metabolismo. Según este trabajo, el filo *Bacteroidetes* estaría relacionado con la producción de acetato y propionato, mientras que el filo *Firmicutes* estaría más vinculado a la síntesis de butirato. A nivel del intestino grueso, los colonocitos presentan gran afinidad por el butirato y lo utilizan como fuente de energía, mientras que el remanente de butirato sería metabolizado por los hepatocitos, previniendo concentraciones tóxicas (Bloemen y col., 2010). Con respecto a su influencia en el metabolismo, en dicho *review* se asocian los SCFA a la prevención de obesidad inducida por la dieta, favoreciendo la oxidación de ácidos grasos (AG) en varios tejidos, y disminuyendo el almacenamiento de grasa en el tejido adiposo. Asimismo, favorecerían el metabolismo de la glucosa, normalizando sus niveles en plasma y disminuirían el colesterol. En un trabajo reciente de Bourassa y col. (2016) se propone que una dieta rica en fibra podría inducir un aumento de butirato y tener efectos positivos en el cerebro. Las bacterias de los géneros *Clostridium*, *Eubacterium* y *Butyrivibrio* son capaces de producir butirato, el cual, como se mencionó anteriormente, sirve como fuente energética para colonocitos. Según este informe, el butirato favorece la acetilación de histonas (Sharma y col., 2015) previniendo la muerte neuronal y, por ende, enfermedades como Alzheimer, Huntington, Parkinson (St. Laurent y col., 2013). Además, favorece el aprendizaje y la memoria, y disminuye el daño causado por accidentes cerebrovasculares isquémicos (Kim y col., 2007). En un *review* reciente, Fluitman y col. (2017) indicaron que el butirato favorece la proliferación y diferenciación celular (Frankel y col., 1994), la apoptosis celular reduciendo la formación de tumores (Clarke y col., 2012) y disminuye el estrés oxidativo en la pared intestinal (Hamer y col., 2009). Todos estos efectos contribuyen a la salud de la mucosa, siendo el butirato unos de los SCFA que más influye en la barrera intestinal. Además, los SCFA totales podrían regular el apetito indirectamente mediante hormonas, o bien actuando directamente sobre el hipotálamo (Fluitman y col., 2017).

En un estudio con ratas obesas tratadas con un suplemento dietario con inulina, se observó un aumento notable en el nivel de ácido propiónico en la vena porta y una disminución en la acumulación de triglicéridos en el hígado (Daubioul y col., 2002). Un resultado similar se observó en hamsters tratados con diferentes dosis de inulina (8, 12 y 16%). Las concentraciones de colesterol y triglicéridos en plasma fueron significativamente menores para todos los niveles de inulina estudiados con respecto a los hamsters alimentados con la dieta estándar (Trautwein y col., 1998). Huazano-García y López (2013) describieron que existe una relación entre la

estructura de fructanos (largo de cadena y ramificaciones) con la producción de SCFA. Ellos observaron que los fructanos ramificados indujeron mayores niveles de SCFA que los polisacáridos lineales. Existe evidencia que indica que el extracto crudo de EPS de *L. fermentum* Lf2 está integrado por dos fracciones de polisacáridos de alto y mediano PM, ambos con ramificaciones en su estructura (capítulo 3).

Recientemente, Lu y col. (2016) encontraron que, al suplementar la dieta de ratones con SCFA (acetato, propionato, butirato o una mezcla de los tres), disminuyó la ganancia de peso durante la administración de una dieta rica en grasa y se vieron aumentadas tanto la hidrólisis de triglicéridos como la oxidación de ácidos grasos. Además, observaron que disminuyó el nivel de población bacteriana integrante de filo *Firmicutes* (dentro del cual se encuentran los lactobacilos, estreptococos y clostridios, entre otros) y aumentó el del filo *Bacteroidetes* (filo al cual pertenece el género *Bacteroides*).

A partir de los resultados de nuestro ensayo, al realizar el análisis de componentes principales (Figura 6.18) se pueden visualizar conjuntamente las observaciones descriptas anteriormente, tanto para los grupos bacterianos estudiados (se incluyeron 8 en este análisis) como para los niveles de los cuatro ácidos orgánicos (incluyendo el ácido láctico) en función del tratamiento, a los 25 días. En la Figura 6.18 se presentan los gráficos de *loading* y *scores* para los dos primeros componentes principales (CP). Se puede observar que las variables de todos los grupos bacterianos impactan fundamentalmente sobre el CP1, a excepción de las enterobacterias y lactobacilos, que tienen influencia sobre el CP2. En cambio, en el eje del CP2 se observa una influencia principalmente de los ácidos orgánicos.

En el semiplano negativo del CP1, que se caracteriza por las variables *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *B. animalis*, *B. catenulatum* y *C. coccoides*, se agruparon las muestras Y-E600-B e Y-B. En general, las muestras YE600-B fueron agrupadas a una distancia mayor que las Y-B desde el origen, indicando que esas variables tienen un efecto mayor sobre las muestras a las que se les adicionó conjuntamente EPS y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.

En el semiplano positivo del CP2, caracterizado por las variables ácido láctico, enterobacterias y *Lactobacillus*, se agruparon fundamentalmente las muestras control Y. Finalmente, en el semiplano negativo del CP2, caracterizado por los ácidos butírico, acético y propiónico, fueron agrupadas las muestras Y-E600 y, en menor medida, las muestras Y-E600-B e Y-B.

Según este análisis, se puede concluir entonces, que el tratamiento con EPS exclusivamente causó un mayor impacto sobre la concentración de los SCFA en las heces de los animales tratados mientras que el tratamiento con la combinación de ambos ingredientes,

Y-E600-B, tuvo una influencia más marcada sobre la población de bifidobacterias, principalmente, y sobre el género *Streptococcus* y la especie *C. coccoides*, a los 25 días. El grupo Y-B presentó, en cambio, un comportamiento intermedio, ubicándose en el centro del plano, y el grupo control (que recibió solo yogur) se relacionó con las variables enterobacterias, *Lactobacillus* y ácido láctico, como se indicó anteriormente.

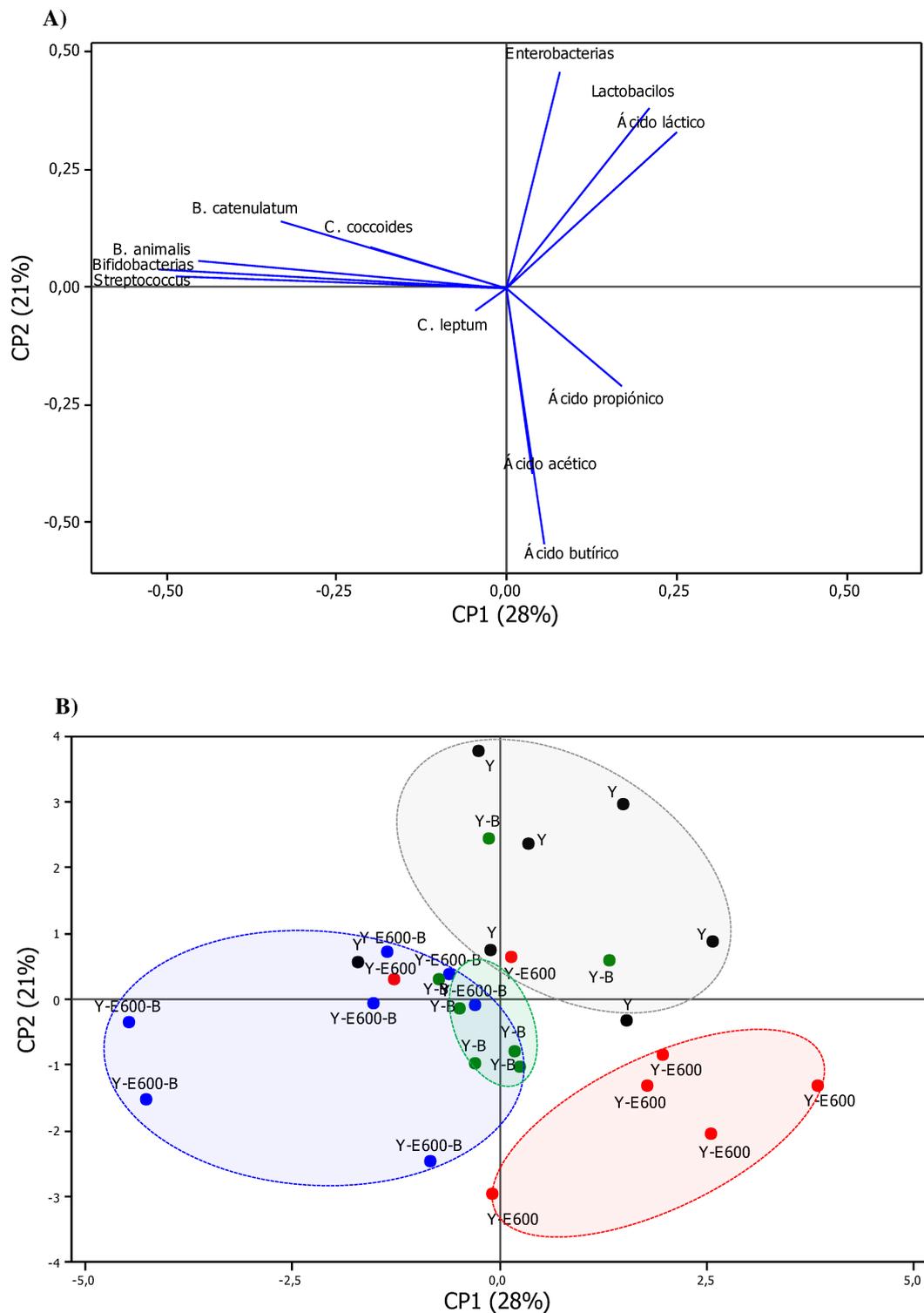


Figura 6. 18. Gráficos de *loading* (A) y *scores* (B) para CP1 vs. CP2 del análisis de componentes principales de los ácidos orgánicos y grupos bacterianos en las heces de ratones a los 25 días tratamiento. Referencias: Y (ratones que recibieron yogur, grupo control), Y-B (ratones que recibieron yogur y *B. animalis* INL1 a una dosis de $1,5 \times 10^8$ UFC/ratón/día), Y-E600 (ratones que recibieron yogur con 600 mg/L de EPS), Y-E600-B (ratones que recibieron yogur con bifidobacterias y EPS a los niveles descriptos anteriormente).

6.3.4.4. Determinación de citoquinas e IgA en intestino delgado

La cuantificación del nivel de las diferentes citoquinas (IL-10, IL-6, IFN- γ y TNF- α) en tejido de intestino delgado se muestra en la Figura 6.19. Los dos grupos que recibieron extracto de EPS (Y-E600 e Y-E600-B) presentaron valores mayores para la citoquina reguladora IL-10, aunque estas diferencias no fueron significativas al compararlas con los otros dos grupos. Para las citoquinas proinflamatorias IL-6, IFN- γ y TNF- α no se observaron diferencias significativas entre los 4 grupos.

En la Figura 6.20 se pueden ver las concentraciones de IgA-s en fluido intestinal, para la cual tampoco se detectaron diferencias significativas entre tratamientos. Si consideramos que, según lo descrito para el primer ensayo *in vivo* de este capítulo (capacidad inmunomoduladora) se evidenció un aumento significativo de IgA a los 15 días de tratamiento en comparación al control, cuando el EPS se agregó al yogur a la mitad de concentración usada en el presente ensayo, se podría suponer que el pico máximo de estimulación mediada por IgA tiene lugar en un tiempo de tratamiento más corto, anterior a los 25 días de tratamiento. En el trabajo de de Moreno de LeBlanc y col. (2008) se estudió el efecto de la administración prolongada (98 días) de una leche fermentada con probióticos comerciales sobre los niveles de células IgA⁺ en ratones BALB/c. Observaron que el número de células no cambió significativamente en el grupo control durante el tiempo experimental, mientras que el número de células IgA⁺ en los intestinos aumentaron para el grupo tratado, especialmente al comienzo del tratamiento en intestino delgado, presentando un pico entre los 2 y 5 días.

Roller y col. (2004) encontraron resultados distintos a los descriptos. Estudiaron en ratas (durante 4 semanas) el efecto de tres suplementos sobre una dieta rica en grasas: uno consistía en el agregado de probióticos (*L. rhamnosus* GG y *B. lactis* Bb12), otro en inulina enriquecida en oligofruktosa y el último era una combinación de ambos. Este último suplemento aumentó los niveles de IgA-s en el íleon en comparación con el control alimentado sólo con la dieta rica en grasa. El suplemento con prebióticos mejoró la producción de IL-10 en las placas de Peyer como así también la producción de IgA-s en ciego, con respecto al grupo control. En general, vieron que la combinación de probióticos con prebióticos tiene efectos distintos en comparación con sus efectos individuales, pero no resulta necesariamente en un efecto sinérgico. Hosono y col. (2003), en cambio, analizaron la influencia inmunológica causada en ratones BALB/c por la administración oral de FOS, en concentraciones desde 0 a 7,5%, durante 6 semanas (un período mucho más prolongado al evaluado en nuestro ensayo). Para el grupo que recibió una dosis de 2,5%, la IgA fecal aumentó significativamente. La secreción de IgA en las placas de Peyer aumentó de manera dosis-dependiente y las células T CD4⁺ de las placas de Peyer

incrementaron la producción de IFN- γ , IL-10, IL-5 e IL-6 en los ratones tratados con respecto al control. En cambio, Salazar y col. (2014) obtuvieron resultados similares a los descritos en nuestro ensayo. En ese trabajo evaluaron la respuesta inmune desencadenada por dos cepas de las especies *B. animalis* y *B. longum* EPS⁺ en ratas Wistar al ser tratadas durante 24 días con dichas cepas (10^9 UFC/día, resuspendidas en leche descremada). Determinaron los niveles de las citoquinas IFN- γ , IL-1 α , IL-4, IL-10 y TNF- α en sangre, y no detectaron diferencias significativas con respecto al grupo control. Los niveles de IgA en heces tampoco evidenciaron diferencias entre los grupos. Sólo observaron diferencias para la citoquina TGF- β , ya que aumentó su concentración en los grupos tratados. Evaluaron además la relación IgG/IgA en sangre y vieron que el vehículo utilizado, la leche descremada, con o sin bifidobacterias, presentó una mayor relación IgG/IgA, en comparación con el grupo control no intubado, por lo que concluyeron que la leche de vaca indujo una respuesta sistémica humoral. Ellos justificaron la falta de diferencia entre los niveles de la mayoría de las citoquinas evaluadas explicando que el modelo experimental fue realizado con ratas “naïve” saludables, lo cual también puede explicar lo observado en nuestro trabajo.

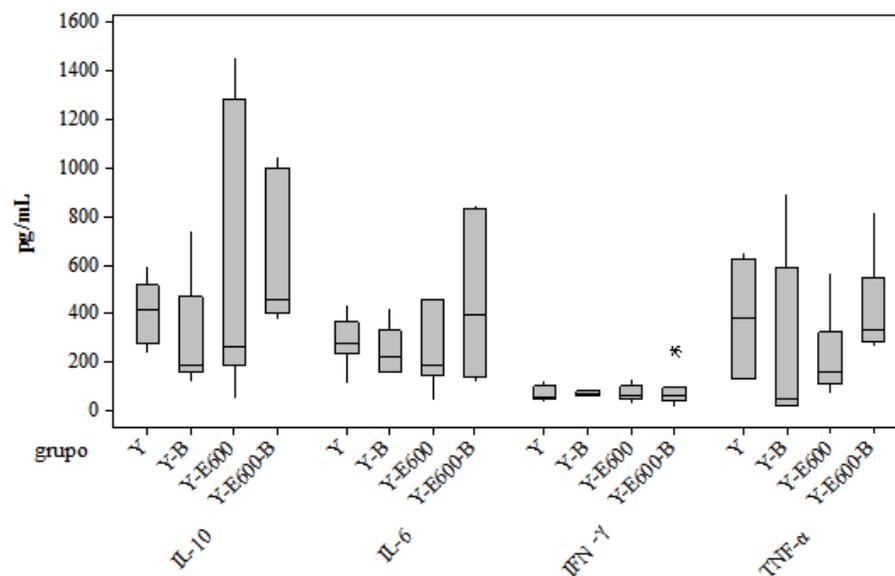


Figura 6. 19. Gráfico de caja que representa las determinaciones de las citoquinas IL-10, IL-6, IFN- γ y TNF- α en intestino delgado luego de finalizar el tratamiento (25 días). Y-E600: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS; Y-B: ratones que recibieron yogur con *B. animalis* INL1; Y-E600-B: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS y bifidobacteria; Y: grupo control, recibió sólo yogur. Las barras negras dentro de cada caja señalan la mediana y los asteriscos valores atípicos.

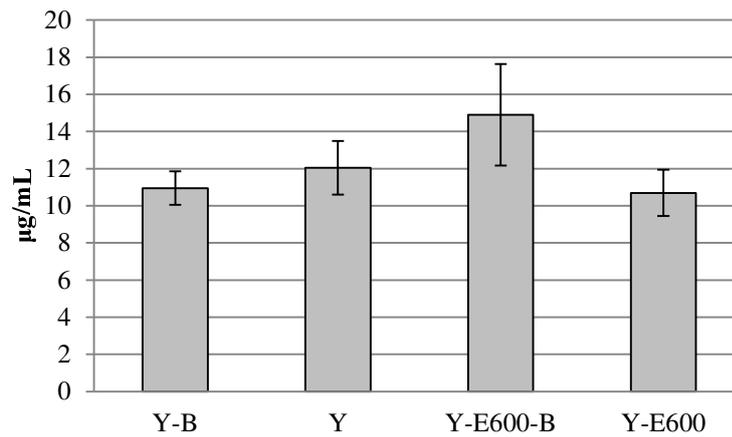


Figura 6. 20. Concentraciones de IgA secretoria en fluido intestinal para los 4 grupos. Y-E600: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS; Y-B: ratones que recibieron yogur con *B. animalis* INL1; Y-E600-B: ratones que recibieron yogur con extracto de EPS y bifidobacteria; Y: grupo control, recibió sólo yogur. Se presentan promedios \pm SEM.

6.3.4.5. Análisis de cortes histológicos

Con el análisis de histología (Figura 6.21) se comprobó que ninguno de los tratamientos aplicados provocó daños a nivel de la mucosa intestinal ya que se observó una morfología normal tanto del intestino delgado como grueso (no se muestra) de todos los ratones. Ninguno de los tejidos exhibió signos de inflamación ni infiltración linfocitaria hacia la mucosa y submucosa.

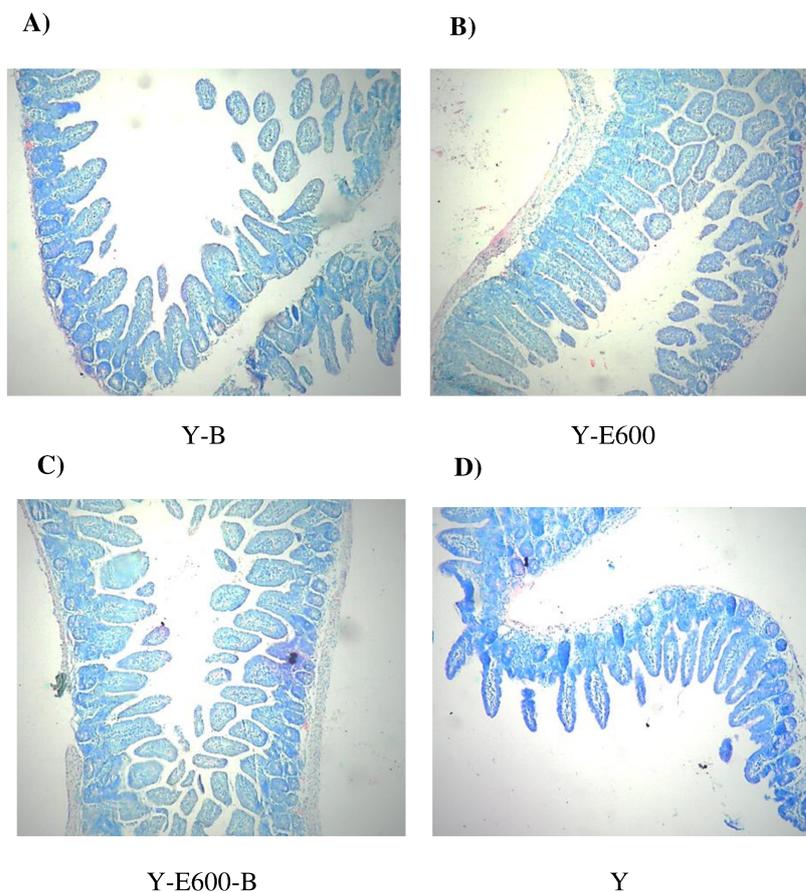


Figura 6. 21. Secciones histológicas del intestino delgado (tinción con May Grünwald Giemsa, 10X) de ratones que recibieron: a) yogur con *B. animalis* INL1 (Y-B, $1,5 \times 10^8$ UFC/ratón/día); b) yogur con extracto de EPS a una concentración de 600 mg/L (Y-E600); c) yogur con extracto de EPS y bifidobacteria (Y-E600-B); d) sólo yogur (Y, grupo control).

6.4. Conclusiones parciales

En base a los resultados obtenidos se puede asegurar que el extracto de EPS de *L. fermentum* Lf2 es capaz de actuar como un ingrediente funcional a través de diversos roles, demostrados en esta Tesis mediante distintos ensayos *in vivo*: rol protector frente a una infección por *Salmonella*, rol inmunomodulador mediante el aumento de los niveles de IgA intestinal y rol prebiótico mediante un aumento de los niveles de SCFA en heces en el tiempo, acompañado de un incremento en el nivel de grupos bacterianos productores de estos ácidos beneficiosos para la salud (*cluster* XIVa de *Clostridium*, también conocido como grupo *C. coccoides*). Cuando este EPS se combinó con la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 se observó un efecto bifidogénico, especialmente relacionado con la especie *B. animalis* (no detectado al administrar el probiótico en forma individual), reflejando un posible sinergismo entre ambos

ingredientes, poniendo en evidencia un posible rol simbiótico. Todas estas observaciones para el extracto crudo de EPS de *L. fermentum* Lf2 se ajustan a las respuestas esperables para exopolisacáridos con sus características químicas y estructurales (un extracto integrado mayoritariamente por dos EPS ramificados, con PM promedio inferior a 10^3 kDa).

De este modo, y teniendo en cuenta las modificaciones texturales descritas previamente cuando se lo agrega a un yogur, resultaría factible proponer el uso de este extracto de EPS como ingrediente tecnofuncional para el diseño de nuevos alimentos funcionales.

*Capítulo 7: Identificación de genes de *L. fermentum* Lf2 relacionados a la síntesis de EPS. Construcción de una cepa knockout para la enzima pGT*

7.1. Introducción

Como ya hemos indicado anteriormente, no es muy abundante la información disponible en la bibliografía sobre cepas de la especie *L. fermentum* y su capacidad de producción de EPS, y sólo 9 genomas completos fueron informados (NCBI Genomes database). De estos genomas, 5 presentaron > 80% de identidad con las dos glicosiltransferasas cebadoras publicadas en NCBI para esta especie por BLASTx (enzima clave para la síntesis de HePs), mientras que 3 presentaron > 80% de identidad con sólo una de estas dos enzimas (con número de acceso CDN_25885.1), en todos los casos en el ADN cromosómico de estas cepas. El trabajo más relevante sobre esta especie ha sido publicado por Dan y col. (2009), quienes caracterizaron parcialmente el *cluster* genético involucrado en la síntesis de EPS de *L. fermentum* TDS030603, el cual se localiza en el cromosoma. Esta cepa es la que ha sido más ampliamente estudiada desde su capacidad de síntesis de EPS (Fukuda y col., 2010; Gerwig y col., 2013; Leo y col., 2007; Shi y col., 2014) e incluso, muy recientemente, se publicó la secuencia de su genoma completo (Aryantini y col., 2017). Para este caso, el *cluster* genético (20,25 kpb) resultó muy similar desde el punto de vista funcional a los descriptos para HePs de otras BAL (Jolly y Stingle, 2001), demostrándose que está ubicado en el cromosoma y codifica para un regulador transcripcional, cinco proteínas putativas de la maquinaria de secreción de EPS, cinco glicosiltransferasas, una proteína hipotética y ocho elementos transposables (Aryantini y col., 2017). Shi y col. (2014) optimizaron las condiciones de producción de EPS para esta cepa, utilizando un medio químicamente definido (rendimiento de 199 ± 23 mg/L, 48 h, aerobiosis, 30 °C, pH libre, 5% m/v de glucosa y 1% m/v de citrato de amonio) y analizaron, además, los niveles de expresión de mRNA de los genes *epsB*, *epsE*, y *epsG*, que resultaron significativamente mayores (2,0; 2,0 y 1,5 veces, respectivamente) que en condiciones no optimizadas. El primer gen (*epsB*) codifica para una enzima que interviene en la polimerización y determinación del largo de cadena del EPS, mientras que el segundo y tercero (*epsE*, y *epsG*) codifican para glicosiltransferasas.

Algunos estudios han intentado vincular los roles de los diversos genes involucrados en la biosíntesis de EPS y el rendimiento del polisacárido. Por ejemplo, cuando el gen *epsD*, que codifica para la *priming glicosyltransferase* (pGT) de la cepa *Lc. lactis* NIZO B40, se reemplazó por un gen de resistencia a eritromicina, su habilidad de producir EPS se perdió (van Kranenburg y col., 1999). Al complementar con genes que codifican la *priming glicosyltransferase* involucrados en la biosíntesis de EPS de *L. lactis* y *S. pneumoniae*, se pudo restablecer y hasta aumentar la producción de EPS en esta cepa de *Lc. lactis*, ya que la cepa salvaje producía 113 mg/L, mientras que la cepa modificada producía 133 mg/L. Levander y

col. (2002) informaron que la sobreexpresión homóloga del gen UDP-glucosapirifosforilasa, en combinación con el gen codificante de fosfoglucomutasa, incrementó el rendimiento en la producción de EPS de *S. thermophilus* LY03, desde 0,17 a 0,31 g/mol. Lebeer y col. (2009) obtuvieron, a partir de *L. rhamnosus* GG (una de las cepas probióticas más ampliamente estudiada) la cepa *knockout* para el gen *welE* que codifica para la pGT, observando que no perdió totalmente su capacidad de producción de EPS pero la cantidad de polisacáridos disminuyó 3 veces en comparación con la cepa *wildtype*, inhibiendo la producción de heteropolisacáridos ricos en galactosa de alto peso molecular y aumentando la de los polisacáridos ricos en glucosa. Este tipo de manipulaciones genéticas no se ha llevado a cabo en cepas de *L. fermentum* productoras de EPS.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo de Tesis surgió el interés de construir una cepa isogénica de *L. fermentum* Lf2, que resulte incapaz de producir EPS, para estudiar los mecanismos moleculares implicados en su síntesis y, asimismo, por la utilidad de disponer de una cepa EPS⁻, especialmente para el diseño de futuros ensayos de funcionalidad. Por estas razones se propuso secuenciar el genoma bacteriano de *L. fermentum* Lf2, con el fin de analizar y caracterizar el/los *cluster/s* genético/s responsable/s de la producción de EPS y encontrar la ubicación de la enzima clave en el proceso (pGT) en el caso de HePS, ya que se ha descrito que el bloqueo de ese gen puede eliminar el fenotipo *ropy* (van Kranenburg y col., 1999).

Es importante remarcar que, al momento de iniciar esta actividad no teníamos evidencia de la síntesis simultánea de, al menos, un HePS y un HoPS por parte de la cepa en estudio. Preliminarmente, se había determinado la presencia de los monómeros mayoritarios en la fracción cruda (glucosa y galactosa en proporción 2:1) y, por otro lado, se había detectado por PCR y secuenciado un fragmento del genoma (460 bp) correspondiente al gen *epsC* descrito en *L. fermentum* TDS030603 (Dan y col., 2009) integrante del *cluster* responsable de la síntesis de HePS. Por esta razón, la actividad de caracterización de los genes involucrados en la síntesis de EPS para *L. fermentum* Lf2 se abordó considerando exclusivamente la presencia de uno o más *clusters* vinculados con la producción de heteropolisacáridos.

7.2. Materiales y métodos

1.2.1. Secuenciación y análisis bioinformáticos

El genoma de la cepa *L. fermentum* Lf2 fue secuenciado en la *University College Cork* (UCC, Cork, Irlanda), bajo la supervisión del Prof. Paul O'Toole de la *School of Microbiology & APC Microbiome Institute*. El ADN genómico se purificó a partir de una colonia de un cultivo

puro (kit GenElute, Sigma Aldrich) y el genoma se secuenció en una plataforma Ion Torrent PGM, generando 1 millón de lecturas (longitud de lecturas de 2 x 300 bp). El Sr. Hugh Harris, bajo la supervisión del Prof. O'Toole, realizó los análisis bioinformáticos correspondientes. Se generó un informe de la calidad de las lecturas MiSeq *pair-ended* utilizando FASTQC. Las lecturas se ensamblaron usando Velvet (v1.2.10) con $kmer = 91$ y los parámetros *cov_cutoff* y *exp_cov* configurados en 'auto'. Los pequeños *contigs* no se excluyeron del ensamblaje ya que un subconjunto de estos representaba genes para transposasas. Los *contigs* de *L. fermentum* Lf2 fueron reordenados y reorientados en relación con la secuencia completa del genoma de *L. fermentum* CECT 5713 usando Mauve. Los genes completos y parciales se predijeron utilizando tres *softwares*: Glimmer3 (v3.02), MetaGene y Genemark HMM (v1.1), y aunque un gen haya sido predicho únicamente por un *software*, se incluyó de todas maneras para minimizar predicciones falsas negativas. La búsqueda de secuencias proteicas para cada gen se llevó a cabo comparando contra una variedad de bases de datos con el fin de otorgar una anotación funcional. Los genes se anotaron usando BLASTp (2.2.26+) contra una versión local de la base de datos no redundante NCBI 2016 donde la función se transfirió desde la referencia al gen de *L. fermentum* Lf2 si el porcentaje de identidad (% ID) era ≥ 30 , la longitud de alineación entre el gen de referencia y el de consulta era ≥ 50 % y la puntuación de BLAST ≥ 60 %. Las regiones intergénicas se examinaron usando BlastXtract. Los tRNAs se identificaron con tRNA-scan y los sitios de unión ribosomal con RBSfinder. También se realizó la anotación de los genes a través de Interproscan, con las bases de datos de pFAM, TigrFAM, PIR, HAMAP, PROSITE, PRINTS, PRODOM, PANTHER, SUPERFAMILY y GENE3. Además, los dominios transmembrana se identificaron con TMHMM y los péptidos señales con SignalP. La anotación automática se mejoró manualmente mediante el programa Artemis. La comparación con los genomas de referencia completos ayudó a identificar los operones que podían contener uniones de *contigs* en el ensamblaje del genoma de *L. fermentum* Lf2. Los archivos GFF legibles por Artemis se generaron usando un *script* interno. Luego se realizó una inspección manual en busca de genes que podrían estar relacionados a la síntesis de EPS.

Para analizar dichos genes, se utilizó una base de datos de genomas de *Lactobacillus* completos y *draft* de NCBI (2016). Los resultados de BLAST para los genes que codifican la pGT de *L. fermentum* Lf2, *clusters* relacionados a la síntesis de EPS y otros genes de interés se produjeron sin el uso de valores de corte. Posteriormente, se usaron el % ID, la longitud de alineación y la puntuación de BLAST para filtrar los resultados de BLAST a diversos valores de corte, seguidos de una inspección manual.

7.2.1. Microorganismos y condiciones de crecimiento

L. fermentum Lf2 se desarrolló y conservó rutinariamente, como se indicó anteriormente. Las cepas *E. coli* EC101 (Law y col., 1995) y *Lc. lactis* LL108 (Van Pijkeren y col., 2006) (ambas con gen *repA* integrado en su cromosoma) se usaron como cepas hospedadoras de los plásmidos y se desarrollaron rutinariamente en caldo LB (preparado a partir de sus componentes) y M17 con 0,5% de glucosa (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Reino Unido), respectivamente. *E. coli* EC101 se desarrolló a 37 °C con agitación constante en aerobiosis y *Lc. lactis* LL108 a 30 °C, sin agitación, con 5% CO₂, ambos durante 16 h (cultivos *o.n.*). Ambas cepas se conservaron a -80 °C en los medios descritos anteriormente adicionados de 15% de glicerol. Cuando fue necesario, el medio se suplementó con eritromicina (Em) para seleccionar colonias con pORI19, cloranfenicol (Cm) para seleccionar aquellas colonias con pVE6007, y/o kanamicina (Km) para la cepa *E. coli* EC101, por presentar resistencia a este antibiótico. Las concentraciones usadas dependieron de la cepa y se describen a continuación:

- *E. coli* EC101 (resistente a Km): 200 µg/mL de Em y 50 µg/mL de Km.
- *L. fermentum* Lf2: 5 µg/mL de Em y 5 µg/mL de Cm.
- *Lc. lactis* LL108: 5 µg/mL de Em y 10 µg/mL de Cm.

7.2.2. Manipulaciones de ADN

Los *primers* usados en este estudio (Tabla 7.1) fueron sintetizados por Eurofins Genomics (Ebersberg, Alemania). Para las reacciones de PCR se utilizó 2X Phusion Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) y la purificación de los productos de PCR se realizó con el kit correspondiente (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Las enzimas de restricción rápidas y la ligasa T4 para el clonado fueron de Thermo Fisher Scientific. La extracción de plásmidos se realizó con el kit de GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific) y para el caso de *Lc. lactis*, se incorporó lisozima (Sigma Aldrich) a una concentración de 30 mg/mL y las células se incubaron 30 min a 37 °C. Las reacciones de PCR a partir de colonias se llevaron a cabo con MyTaq Red Mix (Bioline, Londres, Reino Unido). Las condiciones aplicadas para cada reacción se pueden ver en la Tabla 7.2. Los *primers* se diseñaron con la herramienta de diseño de *primers* de NCBI.

Tabla 7. 1. *Primers* utilizados con sus secuencias, temperatura de *melting* (Tm) y longitud. En negrita se indican los sitios de restricción y la secuencia complementaria a la región de interés está subrayada en los primeros 6 *primers*.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Longitud (pb)
PGLF2_US_F_BamHI	CGCGGATCC <u>AGCTACGGTTGCAGATCAAGT</u>	70,9	30
PGLF2_DS_R_XbaI	CCCCGCTCTAGAT <u>TGGATTGATCAGGGACTACTG</u>	72,0	33
PGLF2_US_F_XbaI	ATCGCCCTCTAGA <u>AGCTACGGTTGCAGATCAAGT</u>	70,7	34
PGLF2_DS_R_BamHI	CGCGGATCCTGGATTGATCAGGGACTACTG	70,9	30
PGLF2_SOE_DS_F	TTCAGGAAGCTTTAAATAGGGGTGATGGGGCACGA <u>TAAA</u>	70,5	39
PGLF2_SOE_US_R	GCCCCATCACCCCTATTTAAAGCTTCCTGAATGTCC <u>CCA</u>	73,7	39
Overlap-SOE	GCCCCATCACCCCTATTTAAAGCTTCCTGAA		31
PGLF2_out_F	GCAAAAATGGCCCGTGAGTT	57,3	20
PGLF2_in_R	AGCCAACCCGTTCTTGCTTA	57,3	20
PGLF2_out_R	TGGTCCCCTGAACAAGTTGC	67,3	20
PGLF2_in_F	TGACATGAGCATGATCGGGC	59,4	20
PGLF2_F	GCGCAAATAGCAGGAACCAC	59,4	20
PGLF2_R	TCCGTAACTCTGGCCGTTTC	59,4	20
pORI19-F	TTCCGGCTCGTATGTTGTGT	59,7	20
pORI19-R	CGTTGTAAAACGACGGCCAG	60,1	20
pVE6007-F	GACGAAAGTCGAAGGGGGTT	66,3	20
pVE6007-R	ATCCGTGTCGTTCTGTCCAC	65,1	20
LF2_partemedial_F	CCCGGCAAACCCTAATTCAC	68,1	21
LF2_partemedial_R	AAGACGCTTACCGTGGATCAT	64,6	21

Tabla 7. 2. Condiciones utilizadas para las distintas reacciones.

Digestión	37 °C, 20'
Ligación	<i>o.n.</i> a T° ambiente
<p>SOE_PCR Phusion</p> <p>Master Mix A: 15 µl de agua libre de nucleasas y 25 µl de Phusion PCR mastermix 2X.</p> <p>Master Mix B: 15 µl de agua libre de nucleasas, 5 µl de los <i>primers</i> F y R 5 µM, 25 µl Phusion PCR mastermix 2X.</p>	<p>1) Se agregaron 40 µl de Master Mix A a 10 µl de los productos de PCR (con 0.1-10 ng).</p> <p>2) 1 x (98 °C, 30'')</p> <p>3) 10 x (98 °C, 10''); 63 °C, 20''); 72 °C, 1')</p> <p>4) 1 x (10 °C, 1'), agregar 50 µl Master Mix B</p> <p>5) 1 x (98 °C, 30'')</p> <p>6) 30 x (98 °C, 10''); 72 °C, 1')</p> <p>7) 1 x (72 °C, 10')</p> <p>8) 4 °C ∞</p>
<p>PCR Phusion</p>	<p>1) 1 x (98 °C, 30'')</p> <p>2) 5 x (98 °C, 10''); 62 °C, 20''); 72 °C, 30'')</p> <p>3) 30 x (98 °C, 10''); 72 °C, 30'')</p> <p>4) 1 x (72 °C, 10')</p> <p>5) 4 °C ∞</p>
<p>PCR a partir de colonias</p>	<p>1) 1 x (98 °C, 5')</p> <p>2) 30 x (95 °C, 15''); 55 °C, 15''); 72 °C, 15'')</p> <p>3) 1 x (72 °C, 7')</p> <p>4) 4 °C ∞</p>

7.2.3. Obtención de células electrocompetentes

Las células electrocompetentes se obtuvieron según Mason y col. (2005) y Thompson y Collins (1996). Para esto, se inocularon 47 mL de MRS- 0,3 M de sacarosa y 2% m/v de glicina atemperado a 37 °C con 3 mL de un cultivo *o.n.* de la cepa correspondiente (inóculo de 6% v/v). Se dejó desarrollar hasta obtener una D.O. cercana a 0,4 (a 600 nm). Luego se centrifugaron fracciones de 12 mL (todas las centrifugaciones se realizaron por 5 min, a 4200 g y 4 °C), se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de agua MilliQ fría (4°C). Este paso se repitió una vez más. En el próximo paso, las células centrifugadas se resuspendieron en 1 mL de EDTA 50 mM frío (4°C), se dejó en hielo 5 min y se volvió a centrifugar para volver a resuspender en 1 mL de agua MilliQ fría (4°C). Luego de la centrifugación, las células se resuspendieron en 1 mL de sacarosa 0,3 M (este paso se repitió 3 veces en total, resuspendiendo las células en el último paso en un volumen de 100 µl).

Para obtener células electrocompetentes de la cepa *E. coli* EC101 el protocolo consistió en inocular caldo LB (con 50 µg/mL de Km) 1% (v/v) de cultivo *o.n* de la cepa. Se incubó a 37 °C con agitación constante hasta llegar a una D.O. (600 nm) de 0,8, centrifugando las células a 4200 g a 4 °C por 15 min. Los pellets se lavaron dos veces con agua destilada estéril fría y una vez con glicerol frío estéril (10% v/v). Las células se resuspendieron en 1,5 mL de glicerol al 10% para finalmente alicuotirlas (100 µl/ependorf) y almacenarlas a -80 °C.

Finalmente, se agregó el plásmido (alrededor de 1 µg) y se incubó en hielo por 10 min, se pasó esta mezcla a cubetas de electroporación frías y se realizó la transformación (1700 V, 400 Ω, 25 µF para *L. fermentum* Lf2; 2500 V, 200 Ω y 25 µF para *E. coli*; y 2000 V, 200 Ω y

25 µF para *Lc. lactis*). Inmediatamente se agregaron 1900 µl del caldo correspondiente (MRS, M17-0,5% de glucosa o LB, para *L. fermentum*, *Lc. lactis* o *E. coli*, respectivamente) a temperatura ambiente y se incubó por 3 h (37 °C, 5% CO₂, salvo *E. coli* que se incubó en aerobiosis a 37 °C con agitación constante). Las células se diluyeron y plaquearon en agar selectivo (con el/los antibióticos/s correspondiente/s). La cantidad de ADN se cuantificó rutinariamente con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

7.2.4. Construcción de la mutante *knockout* para el gen que codifica la glicosiltransferasa cebadora (pGT1, ORF_119)

Como primer paso para esta construcción se amplificó la región *upstream* del gen que codifica para la pGT1 con los *primers* PGLF2_US_F_BamHI/XbaI y PGLF2_SOE_US_R (tamaño del producto esperado: 0,7 kb) y la región *downstream* con los *primers* PGLF2_SOE_DS_F y PGLF2_DS_R_XbaI/BamHI (0,8 kb). Una vez amplificadas estas dos regiones, se aplicó la estrategia de SOE-PCR (*Splicing by Overlap Extension PCR*) en las condiciones descritas en la Tabla 7.2 y eligiendo distintas combinaciones de los sitios de restricción. Se debe remarcar que luego de cada PCR los productos se purificaron como se detalló en la sección 7.2.2 y, rutinariamente, se verificaron los tamaños de los amplicones obtenidos en geles de agarosa al 1% (m/v). Una vez obtenido este fragmento (1,5 kb), se lo digirió con las enzimas de restricción *BamHI* y *XbaI* y se lo ligó al vector pORI19 previamente digerido con las mismas enzimas (los protocolos se indican en la Tabla 7.2). Posteriormente, la cepa *E. coli* EC101 se transformó con esta construcción y, bajo presión de dos antibióticos (Em para seleccionar aquellas que contenían la construcción y Km por presentar resistencia a este antibiótico), se seleccionaron las colonias resistentes y se realizó PCR de colonia con los *primers* pORI19_F y pORI19_R (que flanquean los sitios de restricción) para verificar que el plásmido portaba el fragmento deseado. Una vez identificadas las colonias con la construcción deseada, se procedió a extraer el ADN plasmídico y transformar *Lc. lactis* LL108, seleccionando las colonias de interés en agar M17 con Em y Cm. Posteriormente, y mediante PCR a partir de colonias, se detectó y aisló aquella colonia con la construcción de interés. Luego se extrajo el ADN plasmídico, se transformó la cepa *L. fermentum* Lf2 pVE6007⁺ y se plaqueó en medio agar MRS con Cm y Em, para detectar por PCR (a partir de colonias), aquellos transformantes con ambos plásmidos, pVE6007 y pORI19 con el fragmento de interés. Con el fin de que la cepa pierda el plásmido *helper* pVE6007 y pueda darse la primera recombinación de pORI19 en el cromosoma bacteriano, se hicieron pasajes sucesivos a 37 °C y 40 °C y se aislaron colonias sensibles a Cm y resistentes a Em, para comprobar mediante PCR la pérdida

de pVE6007. Luego de verificar que se produjo la primera recombinación mediante PCR y el uso de los *primers* pORI19_F y PGLF2_out_R (el primero específico del plásmido y el segundo de una región del genoma de *L. fermentum* Lf2), se hicieron pasajes sucesivos a 37 °C, sin presión de antibióticos, para facilitar la segunda recombinación en la que se perdió el plásmido junto con el gen *target*, en este caso codificante de la glicosiltransferasa cebadora. Regularmente, se aislaron las colonias no resistentes a Em y se chequeó, mediante PCR, la ausencia del plásmido y del gen *target* con los *primers* PGLF2_F y PGLF2_R. Un esquema simplificado de este procedimiento se puede ver en la Figura 7.1.

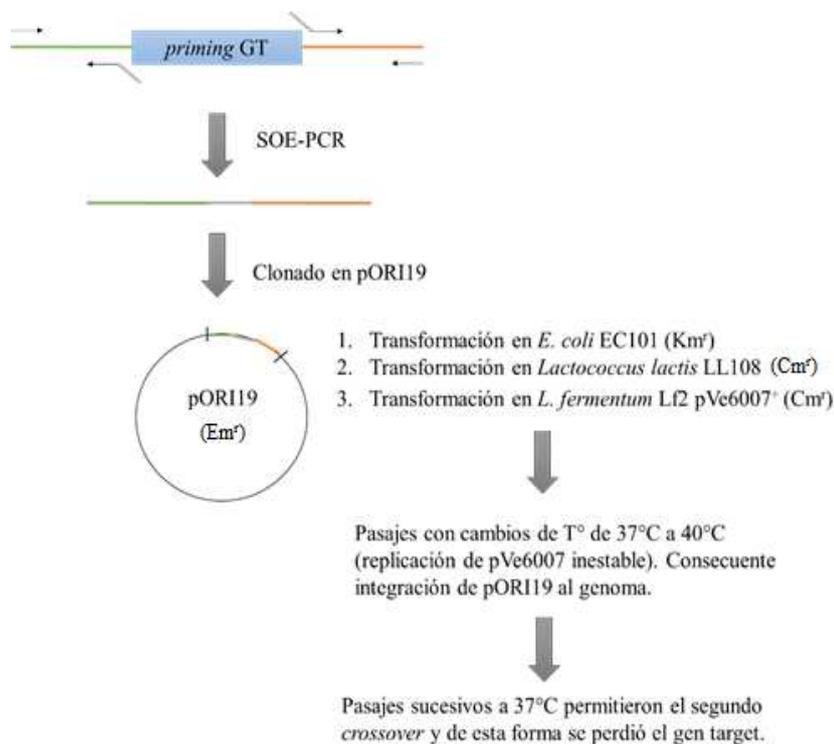


Figura 7. 1. Esquema simplificado de la construcción de la mutante KO para la *priming glycosyltransferase* de *L. fermentum* Lf2.

7.3. Resultados y discusión

7.3.1. Secuenciación y análisis bioinformáticos

De la secuencia del genoma de *L. fermentum* Lf2 se obtuvo un total de 272 *contigs*, con una cobertura de nucleótidos y un N50 de 58,1 y 32605, respectivamente, y un porcentaje de lecturas usadas en el ensamblaje de 84,8. El tamaño N50 se calcula ordenando todos los *contigs* de mayor a menor, y determinando el conjunto mínimo de *contigs* cuyo tamaño total sea el 50%

de todo el genoma. A partir de la secuencia obtenida se analizaron los genes relacionados a la síntesis de EPS con el fin de estudiar la organización espacial de dichos genes y sus funciones.

Mediante la búsqueda de genes que podrían estar relacionados a la síntesis de polisacáridos en el genoma de *L. fermentum* Lf2, se detectaron 3 *clusters* que podrían estar involucrados en la síntesis de EPS, según las funciones encontradas por BLASTx en la base de datos de proteínas de NCBI. Como se puede ver en la Tabla 7.3, los ORF indican que estos *clusters* se encontrarían en regiones distantes a lo largo del genoma. El primero de ellos, el *cluster* 1, está integrado por 8 genes, dentro de los cuales algunos de ellos están relacionados a la regulación de este proceso: el regulador transcripcional y las proteínas tirosin-quinasa y tirosin-fosfatasa (Lebeer y col., 2009). Además, el ORF_119 corresponde a la glicosiltransferasa cebadora, enzima clave para el comienzo de la síntesis de heteropolisacáridos, y que cataliza la unión de azúcares activados a un *carrier* lipídico. Los *clusters* 2 y 3 están formados por 15 y 5 ORF, respectivamente, y se encuentran en sentido inverso al *cluster* 1, indicando una transcripción bidireccional. Es importante señalar que en el *cluster* 2 también se ha encontrado otra glicosiltransferasa cebadora (ORF_1945). En la base de datos de proteínas de NCBI están identificadas sólo 2 pGT para esta especie, una (número de acceso CDN26049.1) con alto porcentaje de similitud con el ORF_119 del *cluster* 1 (96%), y otra (número de acceso CDN25885.1) altamente similar (99%) al ORF_1945 de *L. fermentum* Lf2 del *cluster* 2 (Tabla 7.3). Estas proteínas fueron encontradas como las más similares a los ORF mencionados, encabezando la lista resultante para cada uno de ellos, respectivamente. También se ha descrito la presencia de dos genes que codifican para pGT en el genoma de la cepa *B. longum* subsp. *longum* NCC2705 (Hidalgo-Cantabrana y col., 2014b), un gen denominado *undecaprenyl-phosphate sugar phosphotransferase (rfbP)* y otro *galactosyltransferase (cpsD)*, que codifican para proteínas de 573 aminoácidos (número de acceso NP_695455) y 514 aminoácidos (número de acceso NP_695447), respectivamente. El porcentaje de similitud entre ellas fue de un 38%, y ambas presentaron bajo porcentaje de identidad en comparación con cualquiera de las dos pGT de *L. fermentum* Lf2 (<50%). El porcentaje de similitud entre las dos pGT de *L. fermentum* Lf2 también fue bajo, de un 43%. Otra cepa que presentó ambas pGT analizada en ese trabajo fue *B. animalis* subsp. *lactis* DSM10140. Por lo que sabemos, es la primera vez que se encuentran dos genes que codifican para pGT en el género *Lactobacillus*. Se sabe además que no siempre los *clusters* asociados a la síntesis de EPS presentan una organización ordenada. En ese mismo trabajo (Hidalgo-Cantabrana y col., 2014b) no se encontró una organización funcional-estructural consenso entre las especies que analizaron de bifidobacterias.

No es la primera vez que se encuentra un *cluster* bidireccional, ya que Fanning y col. (2012) describieron la presencia de uno para la cepa *B. breve* UCC2003. El *locus* comprendía una región de 25,6 kb que contenía 20 genes relacionados a la síntesis de EPS y dos secuencias codificantes para transposasas. La mayoría de los genes se ubicaban en dos operones distintos, adyacentes pero orientados de manera opuesta entre sí. Ellos explican que la transcripción alternada de cada mitad del *cluster* parece ser el resultado de una reorientación del promotor. Además, lograron obtener una mutante insercional en el gen que codifica la pGT y como resultado, la cepa perdió su capacidad de producir EPS.

Dan y col. (2009) describieron parte del *cluster* de *L. fermentum* TDS030603, el cual consistía en 11,9 kpb y se localizaba en el ADN cromosómico. Encontraron 13 ORF, de los cuales 6 se relacionaban a la síntesis de EPS, 5 eran similares a genes de transposasas de otros lactobacilos y 2 no se relacionaban funcionalmente. Según estos autores, numerosos rearrreglos ocurrirían en este *cluster*, lo que da indicio de un *cluster* más desordenado que los publicados para este género. Muy recientemente, a partir del genoma completo de esta cepa, informaron un tamaño algo mayor (20,25 kpb) y la presencia de un regulador transcripcional análogo al LytR de *L. rhamnosus* GG, cinco proteínas involucradas en la secreción del EPS (una tirosin-protein kinasa, una tirosin-protein fosfatasa, Wzx, Wzy, Wzz) cinco glicosiltransferasas putativas, una proteína hipotética y ocho elementos transposables (Aryantini y col., 2017).

A partir de estos resultados, y con el objetivo de comparar la localización de los tres *clusters* detectados en *L. fermentum* Lf2 con otros genomas bacterianos, se procedió a seleccionar aquellos que presenten, al menos, genes con 70% de similitud con, por un lado, la pGT correspondiente al ORF_119 (pGT1), y por otro, la pGT correspondiente al ORF_1945 (pGT2) mediante BLASTx. Los resultados de estas preselecciones se pueden ver en las Tablas 7.4 y 7.5, respectivamente. Para la primera selección (Tabla 7.4), se obtuvieron secuencias con dichas características en el genoma de 6 cepas pertenecientes a las especies *L. fermentum*, *L. buchneri*, *L. reuteri* y *L. vaginalis*. Para la otra selección, basada en la búsqueda de pGT2, se hallaron 10 secuencias pertenecientes a *L. antri*, *L. fermentum*, *L. mucosae*, *L. oris* y *L. vaginalis* (Tabla 7.5).

Tabla 7. 3. Clusters que podrían participar en la síntesis de EPS de la cepa *L. fermentum* Lf2. En negrita se destacan pGT1 (ORF_119) y pGT2 (ORF_1945).

cluster	ORF	nombre según BLASTx	valor e	%ID	número de acceso
1	114	transcriptional regulator [<i>Lactobacillus fermentum</i>]	0	99	WP_014562086.1
	115	capsular polysaccharide biosynthesis protein CpsC [<i>Lactobacillus fermentum</i>]	7E-167	96	WP_015638463.1
	116	possible protein-tyrosine kinase [<i>Lactobacillus fermentum</i>]	1E-155	91	BAI67352.1
	117	possible protein-tyrosine-phosphatase	0	97	BAI67353.1
	118	epimerase [<i>Lactobacillus fermentum</i>]	0	98	WP_035437030.1
	119	priming glycosyltransferase [<i>Lactobacillus fermentum</i>]	3E-147	96	CDN26049.1
	120	IS30 family transposase [<i>Lactobacillus fermentum</i>]	6E-153	93	WP_015638565.1
	121	transposase, Mutator family [<i>Lactobacillus fermentum</i> 28-3-CHN]	5E-170	99	EEX24742.1
2	1837	Polysaccharide biosynthesis protein [<i>Lactobacillus fermentum</i> CECT 5716]	0	99	ADJ41448.1
	1893	MULTISPECIES: glycosyl transferase [<i>Lactobacillus</i>]	0	100	WP_003684207.1
	1895	glycosyltransferase [<i>Lactobacillus fermentum</i>]	0	99	KRN11017.1
	1925	glycosyltransferase, group 2 family protein [<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931]	0	99	EEI22980.1
	1926	MULTISPECIES: galactofuranosyltransferase [<i>Lactobacillus</i>]	0	99	WP_003684167.1
	1928	glycosyltransferase, group 2 family protein [<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931]	0	100	EEI22977.1
	1939	acyltransferase [<i>Lactobacillus fermentum</i>]	0	99	WP_069775701.1
	1940	flippase [<i>Lactobacillus fermentum</i>]	0	100	WP_004563040.1
	1941	MULTISPECIES: UDP-galactopyranose mutase [<i>Lactobacillus</i>]	0	100	WP_003684138.1
	1942	chain length determinant protein [<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931]	2,00E-144	100	EEI23011.1
	1943	oligosaccharide repeat unit polymerase Wzy [<i>Lactobacillus fermentum</i>]	0	98	KRN15303.1
	1944	exopolysaccharide biosynthesis protein [<i>Lactobacillus fermentum</i>]	0	99	WP_012391550.1
	1945	priming glycosyltransferase [<i>Lactobacillus fermentum</i>]	2E-154	99	CDN25885.1

	1952	phosphatidylglycerol--membrane-oligosaccharide glycerophosphotransferase [Lactobacillus fermentum]	4E-87	100	WP_035431257.1
	1953	phosphatidylglycerol--membrane-oligosaccharide glycerophosphotransferase [Lactobacillus fermentum]	0	93	WP_003684124.1
3	2721	glycosyltransferase CpsIVJ [Lactobacillus vaginalis]	8E-152	63	WP_003717201.1
	2722	putative lipopolysaccharide 1,6-galactosyltransferase [Lactobacillus vaginalis DSM 5837 = ATCC 49540]	5E-99	61	EEJ39993.1
	2723	exopolysaccharide polymerization protein [Lactobacillus vaginalis]	6E-152	67	WP_003717951.1
	2724	glycosyl transferase [Lactobacillus fermentum]	6,00E-78	49	WP_069775931.1
	2725	glycosyltransferase family 1 protein [Lactobacillus frumenti]	7,00E-128	54	WP_057750923.1

Tabla 7. 4. Selección de genomas que contengan el ORF_119 de *L. fermentum* Lf2 con, al menos, 70% similitud y 160 aminoácidos de la enzima codificada por este gen (pGT1). *GT gene*: glycosyltransferase gene, %ID: % identity, align. length: alignment length.

<i>genome</i>	<i>GT gene</i>	<i>% ID</i>	<i>align. length</i>	<i>genome start</i>	<i>genome end</i>	<i>GT gene start</i>	<i>GT gene end</i>	<i>e-value</i>	<i>genome contig length</i>	<i>GT gene length</i>
Lactobacillus_buchneri_NRR1_B_30929	cluster1_orf_119	74,67	229	48210	47527	1	229	4,00E-114	52697	229
Lactobacillus_fermentum_F6	cluster1_orf_119	89,52	229	107614	108300	1	229	2,00E-122	2064620	229
Lactobacillus_reuteri_CF48_3A	cluster1_orf_119	71,22	205	31824	32438	25	229	7,00E-100	52705	229
Lactobacillus_reuteri_I5007	cluster1_orf_119	72,2	205	886257	886871	25	229	6,00E-101	1947706	229
Lactobacillus_reuteri_SD2112	cluster1_orf_119	71,22	205	109515	108901	25	229	3,00E-98	2264399	229
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540	cluster1_orf_119	75	160	65	544	70	229	1,00E-92	823	229

En la Tabla 7.6 se pueden ver los resultados obtenidos al comparar los 3 *clusters* identificados en *L. fermentum* Lf2 con los genomas seleccionados según pGT1 de la Tabla 7.4 y, en general, se observa que los genes de los *clusters* 1 y 2 aparecen con más frecuencia que aquellos del *cluster* 3, para el cual sólo un gen mostró similitud (perteneciente a *L. vaginalis* ATCC 49540). La última columna nos indica la longitud del *contig*, por lo que, si se repite dicha longitud se considera que se hace referencia al mismo *contig* ya que es prácticamente improbable que existan dos *contigs* con exactamente la misma longitud. Una buena referencia para evaluar la localización de estos *clusters* podría ser el genoma de *L. fermentum* F6, ya que se trata de un genoma completo de un único *contig*. Se puede apreciar que, en general, los genes correspondientes al *cluster* 1 están también cercanos entre sí en *L. fermentum* F6, alrededor de la posición 100000 del genoma, a excepción de los ORF 120 y 121, que se identificaron con, al menos, 70% de similitud en varias regiones a lo largo del genoma. Para el caso de *L. buchneri* NRRL B-30929, los ORF 118 y 119 se encontraron codificados en un plásmido. En *L. reuteri* CF48-3A, sólo los ORF 119 y 120 del *cluster* 1 se encontraron en su genoma y sólo 3 del *cluster* 2, todos en posiciones variables del genoma y en distintos *contigs*. En la cepa de *L. reuteri* I5007 se puede ver un solo *contig* debido a que se trata de un genoma completo, y presenta sólo 3 genes del *cluster* 1, incluida la pGT1, y 4 genes del *cluster* 2. Las posiciones son variables entre ellos, y especialmente el ORF 120 presenta similitud (mayor de 70%) con varios genes de esa cepa, incluidos algunos en plásmidos. Para la cepa *L. reuteri* SD2112 se puede ver que todos los genes están ubicados en el mismo *contig* y muestra 2 ORF del *cluster* 1 y 3 del *cluster* 2 en posiciones no adyacentes, pero aquellos del *cluster* 2 se encuentran en posiciones cercanas, alrededor de la ubicación 300000. Finalmente, la cepa *L. vaginalis* ATCC 49540 presenta sólo la pGT1 del primer *cluster*, 6 ORF del *cluster* 2 y el ORF 2724 del *cluster* 3. Los genes del *cluster* 2 se encuentran en el mismo *contig* y en posiciones cercanas, comenzando alrededor de la ubicación 600000, mientras que los ORF 119 y 2724 no pertenecen al mismo *contig*.

En la Tabla 7.7 se muestran los genomas que presentan genes codificantes para la pGT2 con una similitud de, al menos, 70%. En este caso volvemos a ver que del *cluster* 3, sólo el ORF 2724 está presente en *L. vaginalis* ATCC 49540. *L. antri* DSM 16041 no presenta muchos de los ORF pertenecientes a los 3 *clusters* encontrados en *L. fermentum* Lf2, sólo 1 ORF del *cluster* 1 correspondiente a una transposasa, y 4 del *cluster* 2. En *L. fermentum* 283 CHN los ORF 114 a 117 del *cluster* 1 se encuentran en el mismo *contig*, mientras que los ORF 120 y 121 se distribuyen en distintos *contigs*. Todos los ORF correspondientes al *cluster* 2 se hallan en el mismo *contig* de esta cepa, salvo el ORF 1837.

Para *L. fermentum* ATCC 14931, los ORF del *cluster* 1 se hallan en el mismo *contig*, mientras que los del *cluster* 2 se encuentran todos en otro *contig*, a excepción nuevamente de ORF 1837.

La cepa *L. fermentum* CECT 5716 es muy similar a *L. fermentum* Lf2 en el sentido que presenta muchos de los genes relacionados a la síntesis de EPS, aunque no presente el ORF 119 correspondiente a la pGT1. Se encontraron muchos genes similares a los ORF 120 y 121, que codifican transposasas. Para esta cepa todos los genes se hallan en el mismo *contig* ya que se dispone de su genoma completo. Los ORF 114 a 117 se encuentran próximos entre sí (alrededor de la posición 100000), al igual que los del *cluster* 2 (aproximadamente entre las posiciones 1500000-1600000).

L. fermentum F6 es la cepa que mayor similitud presenta con nuestra cepa en estudio, y posee ambas pGT. Los ORF 114 a 119 se encuentran próximos entre sí, alrededor de la posición 100000, mientras que los ORF del *cluster* 2 se encuentran entre las posiciones 1400000-1600000. Nuevamente, los ORF 120 y 121 se encuentran distribuidos a lo largo del genoma.

L. fermentum IFO 3956 posee un único *contig* correspondiente a su genoma completo. Los ORF 114 a 117 se encuentran próximos entre sí, alrededor de la posición 100000, mientras que los ORF 120 y 121 se encuentran distribuidos a lo largo del genoma con similitud a varios genes de esta cepa. Los ORF del *cluster* 2 se hallan entre las posiciones 1500000-1600000, aproximadamente. *L. mucosae* LM1 177 presenta solo el ORF 120 del *cluster* 1, con similitud con 3 genes de esta cepa. Los ORF 1893-1895, 1940-1941 y 1944-1945 comparten el mismo *contig* entre cada pareja. La cepa *L. oris* F0423 presenta varios genes con similitud a ORF 120 de *L. fermentum* Lf2, y del *cluster* 2, los ORF 1893-1895 comparten el mismo *contig*, al igual que los ORF 1941-1944-1945. En *L. oris* PB013 se observa una disposición de ORF similar al caso de *L. oris* F0423 ya que los ORF 1893 y 1895 se encuentran en el mismo *contig*, como los ORF 1941, 1944 y 1945. La primera no presenta genes similares a los del *cluster* 1 y 3 de *L. fermentum* Lf2, mientras que la segunda del *cluster* 1 solo presenta similitud con el ORF 120. *L. vaginalis* ATCC 49540 presenta el ORF correspondiente a la pGT1 del *cluster* 1, es decir que tienen genes con alta similitud a las dos pGT identificadas en *L. fermentum* Lf2. Los ORF del *cluster* 2 comparten el mismo *contig*, y del *cluster* 3 presenta el ORF 2724, correspondiente a una glicosiltransferasa.

En la Tabla 7.8 se pueden ver los BLAST realizados entre cada gen relacionado a la síntesis de polisacáridos y los genes de los genomas preseleccionados para la pGT1. Para la cepa *L. buchneri* NRRL B30929 los ORF 118 y 119 están adyacentes entre sí, en los ORF 62 y 61, respectivamente. Del *cluster* 2 y 3 no se han encontrado genes similares en esta cepa.

Es curioso que en la cepa *L. fermentum* F6, los ORF 114 al 119 se encuentran adyacentes en el genoma, ubicándose en los ORF 118 a 123, respectivamente. En cambio, para el caso de los ORF 120 y 121, se han encontrado varios genes con alta similitud ubicados en distintos sitios a lo largo del genoma de *L. fermentum* F6. Con respecto al *cluster 2*, no todos los ORF están adyacentes como en *L. fermentum* Lf2, pero están muy cercanos entre sí, entre los ORF 1952 y 2094. Los únicos consecutivos fueron los ORF 1940 y 1941, y 1944 y 1945.

La cepa *L. reuteri* CF48 3A sólo presenta los ORF 119 y 120 del *cluster 1*, y no son consecutivos entre sí, y del *cluster 2* presenta 3 ORF que tampoco están en posiciones adyacentes. En la cepa *L. reuteri* I5007 se encuentran los ORF 119, 120 y 121, hallándose 5 genes muy similares al correspondiente al ORF 120 de *L. fermentum* Lf2. Con respecto al *cluster 2*, hay 4 ORF que se encuentran muy cercanos entre sí en esta cepa, ubicándose entre los ORF 626 y 698. En *L. reuteri* SD2112, el ORF 119 correspondiente a la pGT1 se encuentra casi en la misma posición, ya que en esta cepa corresponde al ORF 118, el ORF 120 en cambio se encuentra corriente abajo más alejado, y presenta 2 genes muy similares. Con respecto al *cluster 2*, presenta 3 ORF los cuales también se hallan presentes en la cepa *L. reuteri* I5007 (1837, 1895 y 1941). Estos 3 genes se ubican en posiciones cercanas, entre los ORF 318 y 395.

L. vaginalis ATCC 49540 presenta del *cluster 1* sólo el ORF 119, pero corriente abajo (ORF 1898). Con respecto al *cluster 2*, presenta 6 ORF muy próximos entre sí, abarcando entre los ORF 605 y 667. Esta cepa es la única que presentó un gen correspondiente al *cluster 3*, ORF 2724, que se ubica en el ORF 1914 de esta cepa.

En la Tabla 7.9 se propone el mismo análisis, pero para los genomas preseleccionados según la presencia y similitud con la pGT2 (ORF 1945) de la cepa en estudio.

La cepa *L. antri* DSM 16041 presenta solo el ORF 120 del *cluster 1*, y 4 ORF correspondientes al *cluster 2*, ubicados en posiciones cercanas, desde el ORF 2163 al 2255, y estando los ORF 1944 y 1945 adyacentes como en *L. fermentum* Lf2 (aunque en orden inverso).

Para la cepa *L. fermentum* 283 CHN se encontraron los ORF 114, 115, 116, 117, 120 y 121 del *cluster 1*. Los ORF 114 al 117 se ubican en forma adyacente al igual que en *L. fermentum* Lf2, con las posiciones ORF 989 a 992, respectivamente, mientras que los demás ORF se encuentran distantes en distintas posiciones. En cambio, se encontraron 13 ORF del *cluster 2*, los cuales, excepto el ORF 1837, se encuentran en posiciones muy próximas entre sí, desde el ORF 1316 al 1375. Los ORF 1952 y 1953 de *L. fermentum* Lf2 son similares al mismo ORF en *L. fermentum* 283 CHN, ORF 1316. *L. fermentum* ATCC 14931 presenta los ORF 114 a 117 de *L. fermentum* Lf2 también en forma adyacente, abarcando los ORF 1049 al 1052. Del *cluster 2* presenta 12 ORF muy próximos entre sí, como en *L. fermentum* Lf2, ubicados entre

los ORF 2228 al 2282, con excepción nuevamente del ORF 1837 que se encuentra corriente arriba en el ORF 1921. Tanto en la cepa *L. fermentum* 283 CHN como en *L. fermentum* ATCC 14931, los genes correspondientes al *cluster 2* cercanos entre sí están ubicados en orden inverso con respecto a *L. fermentum* Lf2.

Para *L. fermentum* CECT 5716, al igual que lo visto en *L. fermentum* 283 CHN, los ORF 114 a 117 de *L. fermentum* Lf2 se encuentran en forma adyacente desde los ORF 154 a 157, respectivamente. En cambio, los ORF 120 y 121 tienen similitudes con muchos genes de esta cepa, encontrándose a lo largo de todo el genoma de *L. fermentum* CECT 5716. Del *cluster 2* se encontraron 10 genes similares, cercanos entre sí, que abarcan los ORF 2285 al 2441, esta vez en el mismo orden que *L. fermentum* Lf2. Nuevamente, los ORF 1952 y 1953 son similares al mismo ORF en esta cepa, el 2441.

Como ya se indicó para análisis anteriores, *L. fermentum* F6 es la cepa más parecida a *L. fermentum* Lf2, y los ORF 114 a 119 se ubican en los ORF 118 a 123, también en forma adyacente en *L. fermentum* F6. Los ORF 120 y 121 son similares a numerosos genes de esta cepa, y se ubican en distintas posiciones en el genoma, lo cual tiene sentido al considerar que estos genes codifican transposasas. Del *cluster 2* fue posible encontrar 10 genes, ubicados próximos entre sí (ORF 1952 a 2094) y con el mismo orden que el observado para *L. fermentum* Lf2.

L. fermentum IFO 3956 presenta los ORF 114 a 117 de *L. fermentum* Lf2 también en forma adyacente, entre los ORF 126 a 129. Los ORF 120 y 121 nuevamente encuentran similitud con varios genes del genoma de *L. fermentum* IFO 3956, y se distribuyen en distintas partes a lo largo de su genoma. Con respecto al *cluster 2*, 10 ORF de *L. fermentum* Lf2 se encontraron próximos entre sí, abarcando las posiciones ORF 2002 a 2143, en el mismo orden en ambas cepas. Los ORF 1952 y 1953 tienen similitud con el mismo ORF de *L. fermentum* IFO 3956 (ORF 2143), por lo que probablemente se traten del mismo gen.

La cepa *L. mucosae* LM1 sólo presenta el ORF 120 del *cluster 1*, similar a 3 genes de esta cepa. Del *cluster 2* se encontraron 7 genes, de los cuales los ORF 1893 y 1895 de *L. fermentum* Lf2 están adyacentes en los ORF 1226 y 1227. Los ORF 1940 y 1941 se encuentran adyacentes entre sí, al igual que los ORF 1944 y 1945 de *L. fermentum* Lf2, ubicándose en los ORF 898 y 899, y 911 y 912, respectivamente, en *L. mucosae* LM1.

L. oris F0423 presenta del *cluster 1* sólo el ORF 120, con similitud a varios genes de esta cepa a lo largo de su genoma. Del *cluster 2* vuelven a ser consecutivos los ORF 1893 y 1895, y 1944 y 1945 de *L. fermentum* Lf2, ubicándose en los ORF 2574 y 2573 (en orden

inverso), y 1952 y 1951, respectivamente, en *L. oris* F0423. El gen con similitud al ORF 1941 de *L. fermentum* Lf2 se encuentra próximo a estos últimos, ubicándose en el ORF 1961.

L. oris PB013 sólo presenta similitudes con el *cluster 2* de *L. fermentum* Lf2, siendo los ORF 1893 y 1895 adyacentes nuevamente, al igual que 1944 y 1945. El ORF 1941 se encuentra también cercano a estos últimos, en la posición ORF 1464, entre ambos pares de genes.

L. vaginalis ATCC 49540 presenta, del *cluster 1*, la pGT1 correspondiente al ORF 119, solamente. Del *cluster 2* se encuentran 6 genes, muy próximos entre sí, abarcando desde el ORF 605 a 667, pero en orden inverso al visto en *L. fermentum* Lf2. Esta cepa es la única que presentó algunos de los genes del *cluster 3*, el correspondiente al ORF 2724, ubicado en el ORF 1914 de *L. vaginalis* ATCC 49540.

Tabla 7. 5. Selección de genomas que contengan el ORF 1945 de *L. fermentum* Lf2 con al menos 70% similitud y 150 aminoácidos de la enzima codificada por este gen (pGT2). *GT gene: glycosyltransferase gene*, % ID: % identity, align. length: alignment length.

<i>genome</i>	<i>GT gene</i>	% ID	<i>align. length</i>	<i>genome start</i>	<i>genome end</i>	<i>GT gene start</i>	<i>GT gene end</i>	<i>e-value</i>	<i>genome contig length</i>	<i>GT gene length</i>
Lactobacillus_antri_DSM_16041	LF2_priming_G T	80,18	217	70142	70792	1	217	5,00E-114	171508	217
Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	LF2_priming_G T	100	217	225930	226580	1	217	2,00E-130	271221	217
Lactobacillus_fermentum_ATCC_149 31	LF2_priming_G T	100	217	40357	41007	1	217	6,00E-131	82348	217
Lactobacillus_fermentum_CECT_571 6	LF2_priming_G T	100	217	1620741	1620091	1	217	2,00E-129	2100449	217
Lactobacillus_fermentum_F-6	LF2_priming_G T	99,54	217	1577513	1576863	1	217	6,00E-129	2064620	217
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	LF2_priming_G T	99,54	217	1619559	1618909	1	217	6,00E-129	2098685	217
Lactobacillus_mucosae_LM1_177	LF2_priming_G T	80,18	217	18768	18118	1	217	1,00E-115	38776	217
Lactobacillus_oris_F0423	LF2_priming_G T	81,11	217	76223	76873	1	217	2,00E-114	150360	217
Lactobacillus_oris_PB013-T2-3	LF2_priming_G T	81,64	207	14981	14361	11	217	6,00E-110	56320	217
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_4954 0	LF2_priming_G T	76,04	217	617570	618220	1	217	6,00E-103	693865	217

Tabla 7. 6. Estudio de la localización de los genes de *L. fermentum* Lf2 en los contigs de los genomas seleccionados en la Tabla 7.4 (identidad (% ID) ≥ 70%, alineación ≥ 50%). *Ref: reference.*

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_buchneri_NRRL_B_30929_uid66205_complete	cluster1_orf_118	Lactobacillus_buchneri_NRRL_B-30929_plasmid_pLBUC01	73,63	311	1	311	49105	48173	1,00E-157	313	52697
Lactobacillus_buchneri_NRRL_B_30929_uid66205_complete	cluster1_orf_119	Lactobacillus_buchneri_NRRL_B-30929_plasmid_pLBUC01	74,67	229	1	229	48210	47527	3,00E-102	229	52697
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_114	Lactobacillus_fermentum_F-6	98,62	289	45	333	103496	104362	0	333	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_115	Lactobacillus_fermentum_F-6	96,09	256	1	256	104365	105129	7,00E-152	256	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_116	Lactobacillus_fermentum_F-6	94,25	226	1	226	105151	105828	4,00E-138	246	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_117	Lactobacillus_fermentum_F-6	97,66	256	1	256	105918	106685	6,00E-168	256	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_118	Lactobacillus_fermentum_F-6	97,44	313	1	313	106719	107657	0	313	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_119	Lactobacillus_fermentum_F-6	89,52	229	1	229	107614	108300	5,00E-121	229	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F-6	93,21	221	5	222	280403	281065	3,00E-140	222	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F-6	90,95	221	5	222	543743	544405	7,00E-136	222	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F-6	90,95	221	5	222	738661	739323	7,00E-136	222	2064620

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F-6	92,76	221	5	222	1071031	1071693	2,00E-135	222	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F-6	90,95	221	5	222	725753	725091	2,00E-134	222	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F-6	83,15	184	42	222	942857	943408	3,00E-104	222	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F-6	82,61	184	42	222	815736	816287	8,00E-103	222	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F-6	97,35	113	16	125	1081212	1080874	1,00E-66	222	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	99,13	231	1	231	1543198	1542506	3,00E-155	231	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	99,13	231	1	231	853032	853724	3,00E-155	231	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	99,13	231	1	231	870894	870202	5,00E-155	231	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	99,13	231	1	231	445654	444962	6,00E-155	231	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	99,13	231	1	231	1998749	1999441	1,00E-154	231	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	98,7	231	1	231	130069	129377	2,00E-154	231	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	98,27	231	1	231	1347954	1347262	4,00E-154	231	2064620

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	98,7	231	1	231	1049 856	1050 548	9,00E-154	231	20646 20
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	98,27	231	1	231	4528 48	4535 40	1,00E-153	231	20646 20
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	98,27	231	1	231	7539 97	7533 05	2,00E-153	231	20646 20
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	98,27	173	59	231	1204 84	1199 66	9,00E-129	231	20646 20
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	98,73	158	1	158	1928 978	1928 505	3,00E-101	231	20646 20
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1837	Lactobacillus_fermentum_F-6	99,82	548	1	548	1486 368	1484 725	0	548	20646 20
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_fermentum_F-6	100	341	1	341	1524 855	1523 833	0	341	20646 20
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_fermentum_F-6	99,3	428	1	428	1526 134	1524 851	0	428	20646 20
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1928	Lactobacillus_fermentum_F-6	84,97	326	2	327	1552 693	1551 716	2,00E-174	327	20646 20
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1940	Lactobacillus_fermentum_F-6	77,54	472	1	472	1569 095	1567 680	0	472	20646 20
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_fermentum_F-6	94,35	372	1	372	1570 219	1569 104	0	373	20646 20
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_fermentum_F-6	98,81	253	1	253	1576 848	1576 090	6,00E-170	253	20646 20

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_fermentum_F-6	99,54	217	1	217	1577 513	1576 863	1,00E-132	217	20646 20
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1952	Lactobacillus_fermentum_F-6	99,23	130	1	130	1580 651	1580 262	8,00E-83	130	20646 20
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1953	Lactobacillus_fermentum_F-6	78,29	525	1	524	1582 385	1580 811	0	530	20646 20
Lactobacillus_reuteri_CF48_3A_uid55541_draft	cluster1_orf_119	Lactobacillus_reuteri_CF48-3A	71,22	205	25	229	3182 4	3243 8	8,00E-91	229	52705
Lactobacillus_reuteri_CF48_3A_uid55541_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_CF48-3A	81,82	220	5	221	1222 17	1228 76	5,00E-121	222	15454 0
Lactobacillus_reuteri_CF48_3A_uid55541_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_CF48-3A	76,61	171	18	185	513	1	5,00E-93	222	513
Lactobacillus_reuteri_CF48_3A_uid55541_draft	cluster2_orf_1837	Lactobacillus_reuteri_CF48-3A	70,2	547	2	548	3115 2	3279 2	0	548	10161 6
Lactobacillus_reuteri_CF48_3A_uid55541_draft	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_reuteri_CF48-3A	72,63	391	19	409	3904	2735	0	428	13244
Lactobacillus_reuteri_CF48_3A_uid55541_draft	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_reuteri_CF48-3A	88,98	372	1	372	3651 0	3539 5	0	373	13466 5
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster1_orf_119	Lactobacillus_reuteri_I5007	72,2	205	25	229	8862 57	8868 71	3,00E-93	229	19477 06
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_I5007	92,31	221	5	222	5728 36	5734 98	6,00E-138	222	19477 06
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_I5007	92,31	221	5	222	1059 583	1060 245	6,00E-138	222	19477 06

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_I5007	90,5	221	5	222	1834 175	1834 837	6,00E-135	222	19477 06
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_I5007	90,5	221	5	222	1813 232	1812 570	7,00E-135	222	19477 06
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_I5007	90,5	221	5	222	1438 45	1445 07	7,00E-135	222	19477 06
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_I5007	90,5	221	5	222	2289 09	2295 71	7,00E-135	222	19477 06
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_I5007	90,5	221	5	222	2788 11	2794 73	7,00E-135	222	19477 06
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_I5007	90,5	221	5	222	1228 738	1228 076	7,00E-135	222	19477 06
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_I5007	90,5	221	5	222	1005 279	1005 941	7,00E-135	222	19477 06
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_I5007	90,5	221	5	222	9141 22	9134 60	7,00E-135	222	19477 06
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_I5007	90,5	221	5	222	4437 34	4430 72	7,00E-135	222	19477 06
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_I5007	90,5	221	5	222	4080 99	4074 37	7,00E-135	222	19477 06
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_I5007	90,05	221	5	222	2867 11	2860 49	2,00E-134	222	19477 06
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_I5007_plasmid_pLRI01	90,5	221	5	222	2388 2	2454 4	7,00E-135	222	53021

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_I5007_plasmid_pLRI01	90,5	221	5	222	52281	52943	7,00E-135	222	53021
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_reuteri_I5007	72,73	231	1	231	1721357	1722049	1,00E-117	231	1947706
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster2_orf_1837	Lactobacillus_reuteri_I5007	70,74	540	9	548	692558	694177	0	548	1947706
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_reuteri_I5007	72,12	391	19	409	653843	655012	0	428	1947706
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster2_orf_1928	Lactobacillus_reuteri_I5007	80,38	316	7	322	628696	629643	1,00E-160	327	1947706
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_reuteri_I5007	88,98	372	1	372	616528	617643	0	373	1947706
Lactobacillus_reuteri_SD2112_uid55357_complete	cluster1_orf_119	Lactobacillus_reuteri_SD2112_chromosome	71,22	205	25	229	109515	108901	1,00E-90	229	2264399
Lactobacillus_reuteri_SD2112_uid55357_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_SD2112_chromosome	81,82	220	5	221	1341171	1340512	5,00E-121	222	2264399
Lactobacillus_reuteri_SD2112_uid55357_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_SD2112_chromosome	79,19	221	5	222	2218275	2218937	1,00E-114	222	2264399
Lactobacillus_reuteri_SD2112_uid55357_complete	cluster2_orf_1837	Lactobacillus_reuteri_SD2112_chromosome	70,2	547	2	548	295194	293554	0	548	2264399
Lactobacillus_reuteri_SD2112_uid55357_complete	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_reuteri_SD2112_chromosome	72,63	391	19	409	339158	337989	0	428	2264399
Lactobacillus_reuteri_SD2112_uid55357_complete	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_reuteri_SD2112_chromosome	88,98	372	1	372	390923	389808	0	373	2264399

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid 55515_draft	cluster1_orf _119	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540	74,1	166	64	229	47	544	6,00E- 92	229	823
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid 55515_draft	cluster2_orf _1893	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540	71,89	338	1	338	6911 50	6921 60	1,00E- 163	341	69386 5
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid 55515_draft	cluster2_orf _1895	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540	72,35	405	19	423	6899 14	6911 25	0	428	69386 5
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid 55515_draft	cluster2_orf _1928	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540	80,13	317	4	320	6495 95	6505 45	5,00E- 163	327	69386 5
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid 55515_draft	cluster2_orf _1941	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540	89,76	371	1	371	6234 97	6246 09	0	373	69386 5
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid 55515_draft	cluster2_orf _1944	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540	84,58	253	1	253	6182 35	6189 93	3,00E- 148	253	69386 5
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid 55515_draft	cluster2_orf _1945	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540	76,04	217	1	217	6175 70	6182 20	1,00E- 101	217	69386 5
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid 55515_draft	cluster3_orf _2724	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540	77,25	167	101	267	2	502	1,00E- 95	294	506

Tabla 7. 7. Estudio de la localización de los genes de *L. fermentum* Lf2 en los contigs de los genomas seleccionados en la Tabla 7.5 (identidad (% ID) \geq 70%, alineación \geq 50%). *Ref:* reference.

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_antri_DSM_16041_uid55491_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_antri_DSM_16041	84,65	215	5	216	237910	237269	2,00E-116	222	754183
Lactobacillus_antri_DSM_16041_uid55491_draft	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_antri_DSM_16041	72,49	338	1	338	168946	169956	3,00E-161	341	171508
Lactobacillus_antri_DSM_16041_uid55491_draft	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_antri_DSM_16041	84,45	373	1	373	78769	79884	0	373	171508
Lactobacillus_antri_DSM_16041_uid55491_draft	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_antri_DSM_16041	80,24	253	1	253	70815	71573	2,00E-142	253	171508
Lactobacillus_antri_DSM_16041_uid55491_draft	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_antri_DSM_16041	80,18	217	1	217	70142	70792	3,00E-109	217	171508
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster1_orf_114	Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	98,27	289	45	333	352143	353009	0	333	361758
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster1_orf_115	Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	96,88	256	1	256	353012	353779	8,00E-154	256	361758
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster1_orf_116	Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	96,46	226	1	226	353799	354476	3,00E-142	246	361758
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster1_orf_117	Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	98,83	256	1	256	354566	355333	2,00E-170	256	361758
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	79,42	243	5	222	186821	186093	5,00E-127	222	271221
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	81,52	184	42	222	311050	310499	7,00E-102	222	367310

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid408_99_draft	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	99,13	231	1	231	152	844	2,00E-172	231	903
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid408_99_draft	cluster2_orf_1837	Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	99,64	548	1	548	26861	28504	0	548	139896
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid408_99_draft	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	100	341	1	341	268336	269358	0	341	271221
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid408_99_draft	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	100	428	1	428	267057	268340	0	428	271221
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid408_99_draft	cluster2_orf_1925	Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	99,67	303	1	303	246212	247120	0	303	271221
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid408_99_draft	cluster2_orf_1926	Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	99,14	350	1	350	245145	246194	0	350	271221
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid408_99_draft	cluster2_orf_1928	Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	99,69	327	1	327	242345	243325	0	327	271221
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid408_99_draft	cluster2_orf_1940	Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	100	472	1	472	230421	231836	0	472	271221
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid408_99_draft	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	100	373	1	373	229297	230415	0	373	271221
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid408_99_draft	cluster2_orf_1943	Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	100	407	1	407	227367	228587	0	407	271221
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid408_99_draft	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	99,21	253	1	253	226595	227353	4,00E-171	253	271221
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid408_99_draft	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	100	217	1	217	225930	226580	4,00E-133	217	271221

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid408_99_draft	cluster2_orf_1952	Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	100	130	1	130	222793	223182	9,00E-84	130	271221
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid408_99_draft	cluster2_orf_1953	Lactobacillus_fermentum_28-3-CHN	79,05	525	1	524	221059	222633	0	530	271221
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid5_5497_draft	cluster1_orf_114	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931	98,62	289	45	333	165009	165875	0	333	219560
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid5_5497_draft	cluster1_orf_115	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931	97,27	256	1	256	165878	166645	7,00E-155	256	219560
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid5_5497_draft	cluster1_orf_116	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931	94,69	226	1	226	166664	167341	7,00E-140	246	219560
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid5_5497_draft	cluster1_orf_117	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931	95,31	256	1	256	167422	168189	6,00E-164	256	219560
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid5_5497_draft	cluster2_orf_1837	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931	99,82	548	1	548	28612	30255	0	548	170480
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid5_5497_draft	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931	100	341	1	341	79470	80492	0	341	82348
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid5_5497_draft	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931	99,3	428	1	428	78191	79474	0	428	82348
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid5_5497_draft	cluster2_orf_1925	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931	98,68	303	1	303	59136	60044	0	303	82348
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid5_5497_draft	cluster2_orf_1926	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931	99,71	350	1	350	58069	59118	0	350	82348
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid5_5497_draft	cluster2_orf_1928	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931	100	327	1	327	55269	56249	0	327	82348

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid5 5497_draft	cluster2_orf_1940	Lactobacillus_fermentum_AT CC_14931	99,79	472	1	472	44848	46263	0	472	82348
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid5 5497_draft	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_fermentum_AT CC_14931	100	373	1	373	43724	44842	0	373	82348
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid5 5497_draft	cluster2_orf_1943	Lactobacillus_fermentum_AT CC_14931	99,51	407	1	407	41794	43014	0	407	82348
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid5 5497_draft	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_fermentum_AT CC_14931	98,81	253	1	253	41022	41780	2,00E-170	253	82348
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid5 5497_draft	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_fermentum_AT CC_14931	100	217	1	217	40357	41007	3,00E-133	217	82348
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid5 5497_draft	cluster2_orf_1952	Lactobacillus_fermentum_AT CC_14931	100	130	1	130	37220	37609	5,00E-84	130	82348
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid5 5497_draft	cluster2_orf_1953	Lactobacillus_fermentum_AT CC_14931	92,94	524	1	524	35489	37060	0	530	82348
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16 2003_complete	cluster1_orf_114	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	99,65	289	45	333	10932 4	11019 0	0	333	210044 9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16 2003_complete	cluster1_orf_115	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	98,83	256	1	256	11019 3	11096 0	9,00E-157	256	210044 9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16 2003_complete	cluster1_orf_116	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	95,58	226	1	226	11098 0	11165 7	3,00E-140	246	210044 9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16 2003_complete	cluster1_orf_117	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	96,88	256	1	256	11174 5	11251 2	2,00E-167	256	210044 9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16 2003_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	91,4	221	5	222	20323 60	20330 22	7,00E-137	222	210044 9

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	90,95	221	5	222	18168_4	18102_2	4,00E-135	222	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	90,48	210	16	222	12163_21	12156_92	9,00E-127	222	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	82,07	184	42	222	87423_7	87478_8	1,00E-102	222	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	84,62	143	16	155	16174_59	16178_87	1,00E-90	222	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	99,13	231	1	231	20407_38	20400_46	2,00E-155	231	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	99,13	231	1	231	19731_69	19724_77	2,00E-155	231	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	99,13	231	1	231	10835_0	10904_2	4,00E-155	231	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	99,13	231	1	231	20170_61	20177_53	4,00E-155	231	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	98,7	231	1	231	80909_2	80978_4	8,00E-155	231	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	98,7	231	1	231	77229_2	77298_4	2,00E-154	231	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	98,27	231	1	231	13815_46	13808_54	2,00E-153	231	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	98,27	231	1	231	79188_1	79257_3	4,00E-153	231	210044_9

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	98,19	221	1	221	16733_82	16727_20	2,00E-145	231	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	93,07	231	1	231	17718_23	17711_40	5,00E-143	231	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	97,48	119	113	231	12033_43	12036_99	9,00E-130	231	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	93,8	129	103	231	20271_92	20275_78	2,00E-128	231	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	98,91	183	49	231	16726_30	16720_82	4,00E-120	231	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	97,22	180	53	231	16649_53	16654_92	2,00E-114	231	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster2_orf_1837	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	99,63	537	1	537	15316_01	15299_91	0	548	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	100	341	1	341	15689_33	15679_11	0	341	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	97,9	429	1	428	15702_15	15689_29	0	428	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster2_orf_1928	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	95	320	1	320	15949_52	15939_93	0	327	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster2_orf_1940	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	72,55	470	3	472	16071_83	16057_74	0	472	210044_9
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid16_2003_complete	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_fermentum_CE CT_5716	95,63	229	129	349	16079_55	16072_69	3,00E-141	373	210044_9

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716	99,6	253	1	253	1620076	1619318	1,00E-171	253	2100449
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716	100	217	1	217	1620741	1620091	4,00E-133	217	2100449
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster2_orf_1952	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716	99,23	130	1	130	1623878	1623489	3,00E-83	130	2100449
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster2_orf_1953	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716	78,86	525	1	524	1625612	1624038	0	530	2100449
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_114	Lactobacillus_fermentum_F-6	98,62	289	45	333	103496	104362	0	333	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_115	Lactobacillus_fermentum_F-6	96,09	256	1	256	104365	105129	7,00E-152	256	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_116	Lactobacillus_fermentum_F-6	94,25	226	1	226	105151	105828	4,00E-138	246	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_117	Lactobacillus_fermentum_F-6	97,66	256	1	256	105918	106685	6,00E-168	256	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_118	Lactobacillus_fermentum_F-6	97,44	313	1	313	106719	107657	0	313	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_119	Lactobacillus_fermentum_F-6	89,52	229	1	229	107614	108300	5,00E-121	229	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F-6	93,21	221	5	222	280403	281065	3,00E-140	222	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F-6	90,95	221	5	222	543743	544405	7,00E-136	222	2064620

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F-6	90,95	221	5	222	738661	739323	7,00E-136	222	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F-6	92,76	221	5	222	1071031	1071693	2,00E-135	222	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F-6	90,95	221	5	222	725753	725091	2,00E-134	222	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F-6	83,15	184	42	222	942857	943408	3,00E-104	222	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F-6	82,61	184	42	222	815736	816287	8,00E-103	222	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F-6	97,35	113	16	125	1081212	1080874	1,00E-66	222	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	99,13	231	1	231	1543198	1542506	3,00E-155	231	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	99,13	231	1	231	853032	853724	3,00E-155	231	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	99,13	231	1	231	870894	870202	5,00E-155	231	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	99,13	231	1	231	445654	444962	6,00E-155	231	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	99,13	231	1	231	1998749	1999441	1,00E-154	231	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	98,7	231	1	231	130069	129377	2,00E-154	231	2064620

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	98,27	231	1	231	1347954	1347262	4,00E-154	231	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	98,7	231	1	231	1049856	1050548	9,00E-154	231	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	98,27	231	1	231	452848	453540	1,00E-153	231	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	98,27	231	1	231	753997	753305	2,00E-153	231	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	98,27	173	59	231	120484	119966	9,00E-129	231	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F-6	98,73	158	1	158	1928978	1928505	3,00E-101	231	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1837	Lactobacillus_fermentum_F-6	99,82	548	1	548	1486368	1484725	0	548	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_fermentum_F-6	100	341	1	341	1524855	1523833	0	341	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_fermentum_F-6	99,3	428	1	428	1526134	1524851	0	428	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1928	Lactobacillus_fermentum_F-6	84,97	326	2	327	1552693	1551716	2,00E-174	327	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1940	Lactobacillus_fermentum_F-6	77,54	472	1	472	1569095	1567680	0	472	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_fermentum_F-6	94,35	372	1	372	1570219	1569104	0	373	2064620

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_fermentum_F-6	98,81	253	1	253	1576848	1576090	6,00E-170	253	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_fermentum_F-6	99,54	217	1	217	1577513	1576863	1,00E-132	217	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1952	Lactobacillus_fermentum_F-6	99,23	130	1	130	1580651	1580262	8,00E-83	130	2064620
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1953	Lactobacillus_fermentum_F-6	78,29	525	1	524	1582385	1580811	0	530	2064620
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_114	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	97,92	289	45	333	108933	109799	0	333	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_115	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	96,09	256	1	256	109802	110569	2,00E-153	256	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_116	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	92,04	226	1	226	110589	111266	2,00E-135	246	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_117	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	96,09	256	1	256	111353	112120	6,00E-166	256	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	91,4	221	5	222	1215419	1214757	1,00E-136	222	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	91,4	221	5	222	1616250	1616912	2,00E-135	222	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	91,4	221	5	222	181259	180597	2,00E-135	222	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	90,5	221	5	222	2030935	2031597	5,00E-135	222	2098685

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	83,15	184	42	222	873520	874071	1,00E-103	222	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	72	125	98	222	881878	882252	7,00E-55	222	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	98,7	231	1	231	2039310	2038618	8,00E-155	231	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	98,7	231	1	231	1672167	1671475	8,00E-155	231	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	98,7	231	1	231	771681	772373	8,00E-155	231	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	98,7	231	1	231	808420	809112	8,00E-155	231	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	98,7	231	1	231	791230	791922	1,00E-154	231	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	98,7	231	1	231	2015652	2016344	1,00E-154	231	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	98,7	231	1	231	2025472	2026164	1,00E-154	231	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	98,7	231	1	231	107958	108650	1,00E-154	231	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	99,13	231	1	231	1971776	1971084	2,00E-154	231	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	98,27	231	1	231	1202086	1202778	1,00E-153	231	2098685

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	98,27	231	1	231	1380512	1379820	2,00E-153	231	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	90,29	206	26	231	1671470	1670868	3,00E-120	231	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	97,22	180	53	231	1663755	1664294	2,00E-114	231	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster2_orf_1837	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	100	548	1	548	1530496	1528853	0	548	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	100	341	1	341	1567797	1566775	0	341	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	98,83	428	1	428	1569076	1567793	0	428	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster2_orf_1928	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	93,12	320	1	320	1593803	1592844	0	327	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster2_orf_1940	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	72,46	472	1	472	1606037	1604622	0	472	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	98,93	373	1	373	1607161	1606043	0	373	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	99,6	253	1	253	1618894	1618136	1,00E-171	253	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	99,54	217	1	217	1619559	1618909	2,00E-132	217	2098685
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster2_orf_1952	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	98,46	130	1	130	1622696	1622307	4,00E-82	130	2098685

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid5886_5_complete	cluster2_orf_1953	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956	78,48	525	1	524	1624430	1622856	0	530	2098685
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_mucosae_LM1_177	89,59	221	5	222	252726	252064	9,00E-134	222	299357
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_mucosae_LM1_177	80,09	221	5	222	49604	48942	1,00E-117	222	90322
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_mucosae_LM1_177	77	200	5	204	8739	8140	3,00E-101	222	17168
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_mucosae_LM1_177	73,37	338	1	338	2747	1737	4,00E-167	341	23677
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_mucosae_LM1_177	73,41	410	17	419	3979	2756	0	428	23677
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster2_orf_1928	Lactobacillus_mucosae_LM1_177	79,94	314	7	320	4736	5677	5,00E-165	327	7433
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster2_orf_1940	Lactobacillus_mucosae_LM1_177	75,42	472	1	472	5620	4205	0	472	38776
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_mucosae_LM1_177	84,72	373	1	373	6745	5627	0	373	38776
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_mucosae_LM1_177	84,68	372	1	372	52654	53769	0	373	55710
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_mucosae_LM1_177	80,31	254	1	253	18099	17338	1,00E-139	253	38776
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_mucosae_LM1_177	80,18	217	1	217	18768	18118	6,00E-110	217	38776
Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_oris_F0423	88,89	225	1	222	20530	21204	2,00E-135	222	62603
Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_oris_F0423	89,14	221	5	222	368612	367950	1,00E-132	222	402405
Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_oris_F0423	89,14	221	5	222	98481	99143	1,00E-132	222	402405
Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_oris_F0423	89,14	221	5	222	111250	110588	1,00E-132	222	402405
Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_oris_F0423	89,14	221	5	222	43443	42781	1,00E-132	222	151456
Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_oris_F0423	92,86	182	5	183	110443	109898	3,00E-110	222	211289

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_oris_F0423	70,97	341	1	341	10244	11263	3,00E-165	341	17702
Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_oris_F0423	72,24	389	20	408	9012	10175	0	428	17702
Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_oris_F0423	84,72	373	1	373	83837	84952	0	373	150360
Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_oris_F0423	79,88	169	1	169	76896	77402	2,00E-120	253	150360
Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_oris_F0423	81,11	217	1	217	76223	76873	6,00E-110	217	150360
Lactobacillus_oris_PB013_T2_3_uid60565_draft	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_oris_PB013-T2-3	70,67	341	1	341	26302	27321	5,00E-165	341	28863
Lactobacillus_oris_PB013_T2_3_uid60565_draft	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_oris_PB013-T2-3	72,49	389	20	408	25070	26233	0	428	28863
Lactobacillus_oris_PB013_T2_3_uid60565_draft	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_oris_PB013-T2-3	84,72	373	1	373	5441	4326	0	373	56320
Lactobacillus_oris_PB013_T2_3_uid60565_draft	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_oris_PB013-T2-3	83	253	1	253	14338	13580	1,00E-143	253	56320
Lactobacillus_oris_PB013_T2_3_uid60565_draft	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_oris_PB013-T2-3	79,72	217	1	217	15011	14361	9,00E-108	217	56320
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft	cluster1_orf_119	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540	74,1	166	64	229	47	544	6,00E-92	229	823
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540	71,89	338	1	338	691150	692160	1,00E-163	341	693865
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540	72,35	405	19	423	689914	691125	0	428	693865

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species and strain</i>	<i>% ID</i>	<i>alignment length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid555_15_draft	cluster2_orf_1928	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540	80,13	317	4	320	649595	650545	5,00E-163	327	693865
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid555_15_draft	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540	89,76	371	1	371	623497	624609	0	373	693865
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid555_15_draft	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540	84,58	253	1	253	618235	618993	3,00E-148	253	693865
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid555_15_draft	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540	76,04	217	1	217	617570	618220	1,00E-101	217	693865
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid555_15_draft	cluster3_orf_2724	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540	77,25	167	101	267	2	502	1,00E-95	294	506

Tabla 7. 8. Análisis de los genes contenidos en los genomas seleccionados en la Tabla 7.4 en comparación con los de *L. fermentum* Lf2 (identidad (% ID) \geq 70%, alineación \geq 50%). Ref: reference.

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species, strain and gene</i>	<i>% ID</i>	<i>alig leng th</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e- value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_buchneri_NRRL_B_30929_uid66205_complete	cluster1_orf_118	Lactobacillus_buchneri_NRRL_B_30929_uid66205_complete_orf_62	73,63	311	1	311	5	315	1,00E-175	313	316
Lactobacillus_buchneri_NRRL_B_30929_uid66205_complete	cluster1_orf_119	Lactobacillus_buchneri_NRRL_B_30929_uid66205_complete_orf_61	74,67	229	1	229	1	228	2,00E-125	229	228
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_114	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_118	97,6	334	1	333	1	334	0	333	334
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_115	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_119	96,09	256	1	256	1	255	0	256	255
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_116	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_120	94,37	231	1	231	1	231	6,00E-158	246	246
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_117	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_121	97,66	256	1	256	1	256	0	256	256
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_118	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_122	97,44	313	1	313	1	313	0	313	313
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_119	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_123	89,52	229	1	229	1	229	4,00E-135	229	229
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_349	93,21	221	5	222	87	307	6,00E-156	222	307
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_885	90,95	221	5	222	87	307	5,00E-151	222	307
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_641	90,95	221	5	222	87	307	5,00E-151	222	307

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species, strain and gene</i>	<i>% ID</i>	<i>align length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_858	90,58	191	35	222	1	191	1,00E-127	222	191
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_1202	83,15	184	42	222	5	188	1,00E-111	222	188
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_1079	99,13	231	1	231	59	289	3,00E-173	231	289
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_1771	98,27	231	1	231	53	283	5,00E-172	231	283
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_524	99,13	231	1	231	107	337	5,00E-172	231	337
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_1050	99,13	231	1	231	165	395	2,00E-171	231	395
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2042	99,13	231	1	231	165	395	2,00E-171	231	395
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1837	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_1952	99,82	548	1	548	1	548	0	548	548
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2017	100	341	1	341	1	341	0	341	341
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2019	99,3	428	1	428	1	428	0	428	428
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1928	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2054	85,67	321	3	323	1	321	0	327	321
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1940	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2078	77,54	472	1	472	1	472	0	472	476

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species, strain and gene</i>	<i>% ID</i>	<i>align length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2079	94,35	372	1	372	1	372	0	373	372
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2086	98,81	253	1	253	1	253	0	253	253
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2087	99,54	217	1	217	1	217	4,00E-160	217	217
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1952	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2094	99,23	130	1	130	850	979	2,00E-85	130	979
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1953	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2094	77,99	527	1	526	272	798	0	530	979
Lactobacillus_reuteri_CF48_3A_uid55541_draft	cluster1_orf_119	Lactobacillus_reuteri_CF48_3A_uid55541_draft_orf_1410	71,22	205	25	229	14	218	1,00E-109	229	218
Lactobacillus_reuteri_CF48_3A_uid55541_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_CF48_3A_uid55541_draft_orf_1284	81,82	220	5	221	100	319	6,00E-134	222	320
Lactobacillus_reuteri_CF48_3A_uid55541_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_CF48_3A_uid55541_draft_orf_2290	74,72	178	14	188	1	178	2,00E-93	222	182
Lactobacillus_reuteri_CF48_3A_uid55541_draft	cluster2_orf_1837	Lactobacillus_reuteri_CF48_3A_uid55541_draft_orf_818	70,2	547	2	548	3	549	0	548	549
Lactobacillus_reuteri_CF48_3A_uid55541_draft	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_reuteri_CF48_3A_uid55541_draft_orf_1875	72,8	386	24	409	1	385	0	428	405
Lactobacillus_reuteri_CF48_3A_uid55541_draft	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_reuteri_CF48_3A_uid55541_draft_orf_688	88,98	372	1	372	5	376	0	373	376
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete	cluster1_orf_119	Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete_orf_909	72,2	205	25	229	14	218	1,00E-112	229	218

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species, strain and gene</i>	<i>% ID</i>	<i>align length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid20867_7_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete_orf_1086	92,31	221	5	222	100	320	7,00E-153	222	320
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid20867_7_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete_orf_584	92,31	221	5	222	100	320	7,00E-153	222	320
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid20867_7_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete_orf_2136	90,5	221	5	222	87	307	6,00E-150	222	307
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid20867_7_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete_orf_2106	90,5	221	5	222	87	307	6,00E-150	222	307
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid20867_7_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete_orf_1249	90,5	221	5	222	87	307	6,00E-150	222	307
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid20867_7_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete_orf_1756	72,73	231	1	231	175	405	7,00E-129	231	406
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid20867_7_complete	cluster2_orf_1837	Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete_orf_698	70,74	540	9	548	14	553	0	548	553
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid20867_7_complete	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete_orf_662	72,28	386	24	409	1	385	0	428	405
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid20867_7_complete	cluster2_orf_1928	Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete_orf_637	80,38	316	7	322	11	326	0	327	329
Lactobacillus_reuteri_I5007_uid20867_7_complete	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_reuteri_I5007_uid208677_complete_orf_626	88,98	372	1	372	5	376	0	373	376
Lactobacillus_reuteri_SD2112_uid55357_complete	cluster1_orf_119	Lactobacillus_reuteri_SD2112_uid55357_complete_orf_118	71,22	205	25	229	14	218	1,00E-109	229	218
Lactobacillus_reuteri_SD2112_uid55357_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_SD2112_uid55357_complete_orf_1367	81,82	220	5	221	100	319	7,00E-134	222	320

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species, strain and gene</i>	<i>% ID</i>	<i>align length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e-value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_reuteri_SD2112_uid55357_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_reuteri_SD2112_uid55357_complete_orf_2286	79,49	117	5	121	88	204	9,00E-63	222	208
Lactobacillus_reuteri_SD2112_uid55357_complete	cluster2_orf_1837	Lactobacillus_reuteri_SD2112_uid55357_complete_orf_318	70,2	547	2	548	3	549	0	548	549
Lactobacillus_reuteri_SD2112_uid55357_complete	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_reuteri_SD2112_uid55357_complete_orf_356	72,8	386	24	409	1	385	0	428	405
Lactobacillus_reuteri_SD2112_uid55357_complete	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_reuteri_SD2112_uid55357_complete_orf_395	88,98	372	1	372	5	376	0	373	376
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft	cluster1_orf_119	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft_orf_1898	73,26	172	58	229	13	184	1,00E-95	229	184
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft_orf_667	71,89	338	1	338	1	337	0	341	341
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft_orf_666	72,35	405	19	423	6	409	0	428	415
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft	cluster2_orf_1928	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft_orf_632	80,13	317	4	320	1	317	0	327	320
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft_orf_612	89,76	371	1	371	1	371	0	373	372
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft_orf_606	84,58	253	1	253	1	253	1,00E-165	253	253
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft_orf_605	76,04	217	1	217	1	217	4,00E-118	217	217
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft	cluster3_orf_2724	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft_orf_1914	78,98	157	101	257	4	160	2,00E-91	294	177

Tabla 7. 9. Análisis de los genes contenidos en los genomas seleccionados en la Tabla 7.5 en comparación con los de *L. fermentum* Lf2 (identidad (% ID) ≥ 70%, alineación ≥ 50%). *Ref:* reference.

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species, strain and gene</i>	<i>% ID</i>	<i>alignm ent length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e- value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. lengt h</i>
Lactobacillus_antri_DSM_16041_uid55491_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_antri_DSM_16041_uid55491_draft_orf_262	84,65	215	5	216	87	300	3,00E-129	222	306
Lactobacillus_antri_DSM_16041_uid55491_draft	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_antri_DSM_16041_uid55491_draft_orf_2255	72,49	338	1	338	2	338	4,00E-179	341	344
Lactobacillus_antri_DSM_16041_uid55491_draft	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_antri_DSM_16041_uid55491_draft_orf_2172	84,45	373	1	373	1	372	0	373	372
Lactobacillus_antri_DSM_16041_uid55491_draft	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_antri_DSM_16041_uid55491_draft_orf_2164	80,24	253	1	253	1	253	4,00E-159	253	253
Lactobacillus_antri_DSM_16041_uid55491_draft	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_antri_DSM_16041_uid55491_draft_orf_2163	80,18	217	1	217	28	244	1,00E-130	217	244
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster1_orf_114	Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft_orf_989	98,5	333	1	333	1	333	0	333	333
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster1_orf_115	Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft_orf_990	96,88	256	1	256	1	256	0	256	256
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster1_orf_116	Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft_orf_991	96,46	226	1	226	1	226	2,00E-158	246	246
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster1_orf_117	Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft_orf_992	98,83	256	1	256	1	256	0	256	256
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft_orf_1267	93,89	131	5	132	87	217	4,00E-86	222	222
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft_orf_445	75,94	133	42	171	5	137	2,00E-68	222	137

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species, strain and gene</i>	<i>% ID</i>	<i>alignm ent length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e- value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. lengt h</i>
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft_orf_2706	99,13	231	1	231	54	284	8,00E-173	231	284
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster2_orf_1837	Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft_orf_2181	99,64	548	1	548	1	548	0	548	548
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft_orf_1375	100	341	1	341	1	341	0	341	341
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft_orf_1374	100	428	1	428	1	428	0	428	428
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster2_orf_1925	Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft_orf_1342	99,67	303	1	303	1	303	0	303	303
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster2_orf_1926	Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft_orf_1341	99,14	350	1	350	1	350	0	350	350
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster2_orf_1928	Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft_orf_1339	99,69	327	1	327	1	327	0	327	327
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster2_orf_1940	Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft_orf_1326	100	472	1	472	1	472	0	472	472
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft_orf_1325	100	373	1	373	1	373	0	373	373
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster2_orf_1943	Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft_orf_1323	100	407	1	407	1	407	0	407	407
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft_orf_1322	99,21	253	1	253	1	253	0	253	253
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft_orf_1321	100	217	1	217	1	217	7,00E-161	217	217

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species, strain and gene</i>	<i>% ID</i>	<i>alignm ent length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e- value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. lengt h</i>
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster2_orf_1952	Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft_orf_1316	100	130	1	130	850	979	2,00E-86	130	979
Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft	cluster2_orf_1953	Lactobacillus_fermentum_28_3_CHN_uid40899_draft_orf_1316	78,75	527	1	526	272	798	0	530	979
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft	cluster1_orf_114	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft_orf_1049	97,91	335	1	333	1	335	0	333	335
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft	cluster1_orf_115	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft_orf_1050	97,27	256	1	256	1	256	0	256	256
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft	cluster1_orf_116	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft_orf_1051	94,81	231	1	231	1	231	7,00E-160	246	245
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft	cluster1_orf_117	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft_orf_1052	95,31	256	1	256	1	256	0	256	256
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft	cluster2_orf_1837	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft_orf_1921	99,82	548	1	548	1	548	0	548	548
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft_orf_2282	100	341	1	341	1	341	0	341	341
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft_orf_2281	99,3	428	1	428	1	428	0	428	428
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft	cluster2_orf_1925	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft_orf_2253	98,68	303	1	303	1	303	0	303	303
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft	cluster2_orf_1926	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft_orf_2252	99,71	350	1	350	1	350	0	350	350
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft	cluster2_orf_1928	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft_orf_2250	100	327	1	327	1	327	0	327	327

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species, strain and gene</i>	<i>% ID</i>	<i>alignm ent length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e- value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. lengt h</i>
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft	cluster2_orf_1940	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft_orf_2239	99,79	472	1	472	1	472	0	472	472
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft_orf_2238	100	373	1	373	1	373	0	373	373
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft	cluster2_orf_1943	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft_orf_2236	99,51	407	1	407	1	407	0	407	407
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft_orf_2235	98,81	253	1	253	1	253	0	253	253
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft_orf_2234	100	217	1	217	1	217	7,00E-161	217	217
Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft	cluster2_orf_1952	Lactobacillus_fermentum_ATCC_14931_uid55497_draft_orf_2228	100	130	1	130	288	417	6,00E-91	130	417
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster1_orf_114	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete_orf_154	99,7	333	1	333	1	333	0	333	333
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster1_orf_115	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete_orf_155	98,83	256	1	256	1	256	0	256	256
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster1_orf_116	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete_orf_156	94,37	231	1	231	1	231	9,00E-158	246	247
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster1_orf_117	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete_orf_157	96,88	256	1	256	1	256	0	256	256
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete_orf_3059	91,4	221	5	222	100	320	2,00E-151	222	320
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete_orf_280	90,95	221	5	222	87	307	3,00E-150	222	307

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species, strain and gene</i>	<i>% ID</i>	<i>alignm ent length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e- value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. lengt h</i>
Lactobacillus_fermentum_CECT_57 16_uid162003_complete	cluster1_o rf_120	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_ui d162003_complete_orf_1776	90	210	16	222	4	213	3,00E -141	222	213
Lactobacillus_fermentum_CECT_57 16_uid162003_complete	cluster1_o rf_120	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_ui d162003_complete_orf_1213	82,07	184	42	222	5	188	1,00E -109	222	188
Lactobacillus_fermentum_CECT_57 16_uid162003_complete	cluster1_o rf_120	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_ui d162003_complete_orf_2431	90,91	132	28	156	3	134	1,00E -81	222	140
Lactobacillus_fermentum_CECT_57 16_uid162003_complete	cluster1_o rf_121	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_ui d162003_complete_orf_3038	99,13	231	1	231	1	231	4,00E -173	231	231
Lactobacillus_fermentum_CECT_57 16_uid162003_complete	cluster1_o rf_121	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_ui d162003_complete_orf_152	99,13	231	1	231	136	366	1,00E -171	231	366
Lactobacillus_fermentum_CECT_57 16_uid162003_complete	cluster1_o rf_121	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_ui d162003_complete_orf_3069	99,13	231	1	231	165	395	2,00E -171	231	395
Lactobacillus_fermentum_CECT_57 16_uid162003_complete	cluster1_o rf_121	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_ui d162003_complete_orf_2979	99,13	231	1	231	165	395	2,00E -171	231	395
Lactobacillus_fermentum_CECT_57 16_uid162003_complete	cluster1_o rf_121	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_ui d162003_complete_orf_1117	98,7	231	1	231	165	395	7,00E -171	231	395
Lactobacillus_fermentum_CECT_57 16_uid162003_complete	cluster1_o rf_121	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_ui d162003_complete_orf_1066	98,7	231	1	231	165	395	1,00E -170	231	395
Lactobacillus_fermentum_CECT_57 16_uid162003_complete	cluster1_o rf_121	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_ui d162003_complete_orf_2059	98,27	231	1	231	165	395	2,00E -169	231	395
Lactobacillus_fermentum_CECT_57 16_uid162003_complete	cluster1_o rf_121	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_ui d162003_complete_orf_1094	98,27	231	1	231	165	395	5,00E -169	231	395

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species, strain and gene</i>	<i>% ID</i>	<i>alignm ent length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e- value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. lengt h</i>
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete_orf_2516	98,19	221	1	221	165	385	2,00E-160	231	391
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete_orf_2647	92,64	231	1	231	136	363	6,00E-157	231	363
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete_orf_2515	98,91	183	49	231	4	186	7,00E-135	231	186
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete_orf_2503	98,2	167	65	231	1	167	2,00E-121	231	167
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster2_orf_1837	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete_orf_2285	99,63	537	1	537	1	537	0	548	543
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete_orf_2357	100	341	1	341	1	341	0	341	341
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete_orf_2359	97,9	429	1	428	1	429	0	428	429
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster2_orf_1928	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete_orf_2395	92,5	320	1	320	1	320	0	327	326
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster2_orf_1940	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete_orf_2413	72,09	455	18	472	1	455	0	472	459
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete_orf_2414	96,77	217	133	349	1	217	1,00E-152	373	222
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete_orf_2433	99,6	253	1	253	1	253	0	253	253
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete_orf_2434	100	217	1	217	1	217	8,00E-161	217	217

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species, strain and gene</i>	<i>% ID</i>	<i>alignm ent length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e- value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. lengt h</i>
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster2_orf_1952	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete_orf_2441	99,23	130	1	130	835	964	4,00E-86	130	964
Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete	cluster2_orf_1953	Lactobacillus_fermentum_CECT_5716_uid162003_complete_orf_2441	78,56	527	1	526	257	783	0	530	964
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_114	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_118	97,6	334	1	333	1	334	0	333	334
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_115	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_119	96,09	256	1	256	1	255	0	256	255
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_116	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_120	94,37	231	1	231	1	231	6,00E-158	246	246
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_117	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_121	97,66	256	1	256	1	256	0	256	256
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_118	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_122	97,44	313	1	313	1	313	0	313	313
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_119	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_123	89,52	229	1	229	1	229	4,00E-135	229	229
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_349	93,21	221	5	222	87	307	6,00E-156	222	307
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_885	90,95	221	5	222	87	307	5,00E-151	222	307
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_641	90,95	221	5	222	87	307	5,00E-151	222	307
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_858	90,58	191	35	222	1	191	1,00E-127	222	191

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species, strain and gene</i>	<i>% ID</i>	<i>alignm ent length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e- value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. lengt h</i>
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_1202	83,15	184	42	222	5	188	1,00E-111	222	188
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_984	81,55	168	42	206	5	172	2,00E-98	222	172
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_1079	99,13	231	1	231	59	289	3,00E-173	231	289
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_1771	98,27	231	1	231	53	283	5,00E-172	231	283
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_524	99,13	231	1	231	107	337	5,00E-172	231	337
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_1050	99,13	231	1	231	165	395	2,00E-171	231	395
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2042	99,13	231	1	231	165	395	2,00E-171	231	395
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2679	99,13	231	1	231	165	395	6,00E-171	231	395
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_159	98,7	231	1	231	165	395	1,00E-170	231	395
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_1344	98,7	231	1	231	165	395	7,00E-170	231	395
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_533	98,27	231	1	231	165	395	1,00E-169	231	395
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_909	98,27	231	1	231	165	395	2,00E-169	231	395

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species, strain and gene</i>	<i>% ID</i>	<i>alignm ent length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e- value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. lengt h</i>
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_140	98,2	167	65	231	1	167	4,00E-122	231	167
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2591	98,73	158	1	158	165	322	1,00E-111	231	322
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1837	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_1952	99,82	548	1	548	1	548	0	548	548
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2017	100	341	1	341	1	341	0	341	341
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2019	99,3	428	1	428	1	428	0	428	428
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1928	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2054	85,67	321	3	323	1	321	0	327	321
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1940	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2078	77,54	472	1	472	1	472	0	472	476
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2079	94,35	372	1	372	1	372	0	373	372
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2086	98,81	253	1	253	1	253	0	253	253
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2087	99,54	217	1	217	1	217	4,00E-160	217	217
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1952	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2094	99,23	130	1	130	850	979	2,00E-85	130	979
Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete	cluster2_orf_1953	Lactobacillus_fermentum_F6_uid203391_complete_orf_2094	77,99	527	1	526	272	798	0	530	979

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species, strain and gene</i>	<i>% ID</i>	<i>alignm ent length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e- value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. lengt h</i>
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_114	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_126	98,2	333	1	333	1	333	0	333	333
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_115	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_127	96,09	256	1	256	1	256	0	256	256
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_116	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_128	91,77	231	1	231	1	231	2,00E-153	246	247
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_117	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_129	96,09	256	1	256	1	256	0	256	256
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_1573	91,4	221	5	222	87	307	7,00E-152	222	307
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_2133	91,4	221	5	222	10	230	2,00E-151	222	230
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_240	91,4	221	5	222	10	230	2,00E-151	222	230
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_2723	90,5	221	5	222	87	307	6,00E-150	222	307
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_120	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_1082	83,15	184	42	222	5	188	1,00E-111	222	201
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_2649	99,13	231	1	231	1	231	4,00E-173	231	231
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_125	98,7	231	1	231	136	366	5,00E-171	231	366
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_2733	98,7	231	1	231	165	395	7,00E-171	231	395

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species, strain and gene</i>	<i>% ID</i>	<i>alignm ent length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e- value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. lengt h</i>
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_2214	98,7	231	1	231	165	395	7,00E-171	231	395
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_1009	98,7	231	1	231	165	395	7,00E-171	231	395
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_960	98,7	231	1	231	165	395	7,00E-171	231	395
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_2716	98,7	231	1	231	165	395	2,00E-170	231	395
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_2704	98,7	231	1	231	165	395	2,00E-170	231	395
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_985	98,7	231	1	231	165	395	2,00E-170	231	395
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_1808	98,27	231	1	231	165	395	2,00E-169	231	395
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_1562	98,27	231	1	231	165	395	2,00E-169	231	395
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_2213	98,91	183	49	231	4	186	7,00E-135	231	186
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster1_orf_121	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_2201	98,2	167	65	231	1	167	2,00E-121	231	167
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster2_orf_1837	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_2002	100	548	1	548	1	548	0	548	548
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_2062	100	341	1	341	1	341	0	341	341

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species, strain and gene</i>	<i>% ID</i>	<i>alignm ent length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e- value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. length</i>
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_2064	98,83	428	1	428	1	428	0	428	428
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster2_orf_1928	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_2098	93,12	320	1	320	1	320	0	327	326
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster2_orf_1940	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_2116	72,46	472	1	472	1	472	0	472	476
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_2117	98,93	373	1	373	1	373	0	373	373
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_2135	99,6	253	1	253	1	253	0	253	253
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_2136	99,54	217	1	217	1	217	5,00E-160	217	217
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster2_orf_1952	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_2143	98,46	130	1	130	850	979	8,00E-85	130	979
Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete	cluster2_orf_1953	Lactobacillus_fermentum_IFO_3956_uid58865_complete_orf_2143	78,18	527	1	526	272	798	0	530	979
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft_orf_1593	89,59	221	5	222	87	307	2,00E-148	222	307
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft_orf_476	80,09	221	5	222	87	307	2,00E-130	222	307
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft_orf_406	77	200	5	204	87	286	5,00E-112	222	288
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft_orf_1226	73,37	338	1	338	1	337	0	341	340

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species, strain and gene</i>	<i>% ID</i>	<i>alignm ent length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e- value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. lengt h</i>
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft_orf_1227	73,41	410	17	419	10	417	0	428	418
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster2_orf_1928	Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft_orf_2288	79,94	314	7	320	11	324	0	327	331
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster2_orf_1940	Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft_orf_898	75,42	472	1	472	1	472	0	472	474
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft_orf_899	84,72	373	1	373	1	373	0	373	373
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft_orf_266	84,68	372	1	372	1	372	0	373	372
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft_orf_911	80,31	254	1	253	1	254	8,00E-156	253	256
Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_mucosae_LM1_uid86029_draft_orf_912	80,18	217	1	217	9	225	1,00E-131	217	225
Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft_orf_2050	88,89	225	1	222	83	307	2,00E-150	222	307
Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft_orf_2529	89,14	221	5	222	87	307	3,00E-147	222	307
Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft_orf_2222	89,14	221	5	222	87	307	3,00E-147	222	307
Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft_orf_2206	89,14	221	5	222	87	307	3,00E-147	222	307
Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft_orf_1620	89,14	221	5	222	87	307	3,00E-147	222	307

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species, strain and gene</i>	<i>% ID</i>	<i>alignm ent length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e- value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. lengt h</i>
Lactobacillus_oris_F0423_uid17984_1_draft	cluster1_orf_120	Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft_orf_146	92,86	182	5	183	87	268	1,00E-122	222	271
Lactobacillus_oris_F0423_uid17984_1_draft	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft_orf_2574	70,97	341	1	341	2	341	0	341	344
Lactobacillus_oris_F0423_uid17984_1_draft	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft_orf_2573	72,24	389	20	408	2	389	0	428	410
Lactobacillus_oris_F0423_uid17984_1_draft	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft_orf_1961	84,72	373	1	373	1	372	0	373	372
Lactobacillus_oris_F0423_uid17984_1_draft	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft_orf_1952	79,88	169	1	169	1	169	2,00E-102	253	172
Lactobacillus_oris_F0423_uid17984_1_draft	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_oris_F0423_uid179841_draft_orf_1951	81,11	217	1	217	1	217	4,00E-132	217	217
Lactobacillus_oris_PB013_T2_3_uid60565_draft	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_oris_PB013_T2_3_uid60565_draft_orf_1116	70,67	341	1	341	2	341	0	341	344
Lactobacillus_oris_PB013_T2_3_uid60565_draft	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_oris_PB013_T2_3_uid60565_draft_orf_1115	72,49	389	20	408	2	389	0	428	410
Lactobacillus_oris_PB013_T2_3_uid60565_draft	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_oris_PB013_T2_3_uid60565_draft_orf_1464	84,72	373	1	373	1	372	0	373	372
Lactobacillus_oris_PB013_T2_3_uid60565_draft	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_oris_PB013_T2_3_uid60565_draft_orf_1475	83	253	1	253	1	253	2,00E-160	253	253
Lactobacillus_oris_PB013_T2_3_uid60565_draft	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_oris_PB013_T2_3_uid60565_draft_orf_1476	79,72	217	1	217	1	217	2,00E-129	217	217
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft	cluster1_orf_119	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft_orf_1898	73,26	172	58	229	13	184	1,00E-95	229	184

<i>genome</i>	<i>EPS gene</i>	<i>species, strain and gene</i>	<i>% ID</i>	<i>alignm ent length</i>	<i>query start</i>	<i>query end</i>	<i>ref. start</i>	<i>ref. end</i>	<i>e- value</i>	<i>query length</i>	<i>ref. lengt h</i>
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft	cluster2_orf_1893	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft_orf_667	71,89	338	1	338	1	337	0	341	341
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft	cluster2_orf_1895	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft_orf_666	72,35	405	19	423	6	409	0	428	415
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft	cluster2_orf_1928	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft_orf_632	80,13	317	4	320	1	317	0	327	320
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft	cluster2_orf_1941	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft_orf_612	89,76	371	1	371	1	371	0	373	372
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft	cluster2_orf_1944	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft_orf_606	84,58	253	1	253	1	253	1,00E-165	253	253
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft	cluster2_orf_1945	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft_orf_605	76,04	217	1	217	1	217	4,00E-118	217	217
Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft	cluster3_orf_2724	Lactobacillus_vaginalis_ATCC_49540_uid55515_draft_orf_1914	78,98	157	101	257	4	160	2,00E-91	294	177

7.3.2. Construcción de la mutante *knockout* para el gen que codifica la glicosiltransferasa cebadora (pGT1, ORF_119)

Para esta actividad, se optó por seleccionar el gen que codifica para la pGT1 porque, al momento de construir la mutante, sólo se contaba con la secuencia parcial de este gen (sin conocer aún la secuencia nucleotídica de los demás genes que integran el *cluster 1*), no había indicios de la existencia del gen codificante para pGT2 y sólo se disponía como evidencia de la síntesis de, al menos, un HePS por parte de la cepa en estudio (y no de HoPS). Esta enzima, la pGT, es esencial para la biosíntesis de HePS ya que, como se mencionó en el capítulo 1, cataliza el primer paso de biosíntesis a través de la formación de un enlace fosfoanhídrido entre un hexosa-1-fosfato y un transportador lipídico undecaprenil fosfato. Siguiendo la estrategia SOE-PCR, a partir de la cepa *L. fermentum* Lf2 (*wt*) fue posible obtener la mutante *knockout* (KO) para la enzima glicosiltransferasa cebadora (pGT1, ORF 119), cuya ausencia en el cromosoma fue confirmado por secuenciación, amplificando con los *primers* PGLF2_out_F y PGLF2_out_R (indicados en color verde, Figura 7.2) en primer lugar. Por tratarse de un fragmento muy extenso (aproximadamente 2,5 kbp) se realizó una segunda amplificación de un fragmento interno con los *primers* LF2_partemedio_F y LF2_partemedio_R (indicados en color rojo, Figura 7.2) para completar la secuencia de la parte intermedia. En la Figura 7.3 se pueden ver los amplicones de la primer PCR y, como se esperaba de acuerdo a la secuencia original, en la cepa *wt* se obtuvo un fragmento de alrededor de 2,45 kpb, mientras que para la KO este fragmento fue de menor tamaño, 1,75 kpb, aproximadamente. Esta diferencia de tamaño se puede justificar por la pérdida del gen codificante para la pGT, cuyo tamaño es de alrededor de 700 pb. En la Figura 7.4 se pueden apreciar los alineamientos BLAST realizados entre la región del gen *pGT1* y las secuencias obtenidas para la primera PCR con los *primers* PGLF2_out_F y PGLF2_out_R. Se puede ver que, aunque la primera secuenciación no llegó a cubrir el fragmento completo, existe una parte del gen *pGT1* que está presente en la cepa *wt* y no en la mutante. Posteriormente, se procedió a realizar la segunda PCR con los *primers* para la parte media, mostrándose en la Figura 7.5 los productos resultantes de esta amplificación. Al igual que en el análisis previo, se evidencia una diferencia de tamaños entre los productos resultantes para la cepa *wt* (de alrededor de 1,5 kpb) y la cepa mutante (de aproximadamente 0,75 kpb), similar al tamaño del gen codificante para la enzima pGT1. Finalmente, estos productos se secuenciaron y, como se esperaba, el gen *pGT1* fue sólo detectado para la cepa *wt*, estando ausente en la mutante, salvo por sus 19 nucleótidos finales (Figura 7.6).

gcgatcaggtttgcggcactagaagccgacgactgtgtactgtgacgaagaaggccgctatctctgttagaatgccaagtgtgggtgcccacgttgcttgaactcctgc
 agcacgggtgacccggtaattgccaccggagcgtaacccctatttggatgatccaagtattctgaggcgcttttgaacagggtgcttgaccacactgacggcgcttctacatggcacc
 ttggcaagaagattgaagatttaacgaccggcctaattgaagcgggacgggacgatcttgcactcggacgcccacgcccagcccgccgactacgagttaaatgagggacta **gcaaaaatggc**
ccgtgagtttgatccgcaactgggtgaacactaccgccaatgccaagcggtaattaacggtagcagcttccgatgaagtggaacaactgaagaagaacgtaggtttgggttttagtaaaaca
 ggaatcatggaggacaacatcttagttaaagcactggtcactggggggcggtatttggatccaatctagtaactctgttagttaaagggtatcaagtagctgattgatcctatccatg
 ggagtgaaggctaactgactcgggtgagatcaagttgattccatgaacatgacgtgctgacatgaattatgactcattcttgatgaagacttgactacattactatttagctgaggtgta
 gtgtagctgattcggggaacggcctgtaaacgaccagggtgaaccaagaatcagtggtatgattggaatcactacgggtaaaaggaatcaacaaagaatcctgtttacctctcggcagc
 ggtatcggtaactatccgaattaccgaagcgagaagacgcccagtgcaaccattaaccatacgcagtagataagtagcttcggaacgattacaattgattatggtgactatacggattatca
 accgtggccgtccgattctcaatggttgggtc **ccggcaaaaacctaatcacc**cgattctgggtgactatcgattgtgacgaactgtctgtaaaggatcagcagtttactctgtacgggatgggagtc
 agacgcgggactttatcactgtaaagacattgtaacgcgttatttcttagtgaggcaaaaatagttatgggttataacattggttacgggaagaacacgcattgctagacgtaacaggatgt
 ttgaagaagcggccgggaaaaagttgaagattcaattgcggaagcacgaaatggggacattcaggaagcttggcagatattaccgtttaaaggaattaggtttaaagcaaatgggggttagaaa
 atggacttagggaatacgggaatacagatgggaaaaataatagtaaggcgaataagcaggaaaccctacgaatacttagaccgattgggtaaccaatcccaatgaagaaaatgggtgga
 aacgatttgggatacatcttggctaatgggttaatcagtagtccgttcatcttgggtggtatataaaatcagtcgaaggacggatcttttaagcaagaacgggttggctacatggg
 aaagaacttgatgttatcaagttacggtcaatgcgaagcagtagcagaagcgaagcgggctgtggtggcccaaaaaaatgaccacgggtaactgctgacggctttagcgaagacggcga
 tcatgaactaccacagtttgggaattttaaagggtgacatgagcatgacggccacggcggcagagttacggaaaagttctataaacagtgccgaaatcccaacgcttggcagat
 tatccggggatcaggttatcccaagtaattggggctatgatattcccagaagaaaagtgctacagtagataattactatgaaaactactcattaccttggacataaagattgccttagagac
 gatcaaaacgatttcacgggtgagggggcagcataaaagaaatagattgataaaacaggaagtagtttatgagtaacggtaaatctctgcttttctgactgctgctggtttacaagaaggaga
 gaccggcatttttagataaaggcagattgcaagaataaactgaaacaaattgtaacgcagattaccgaaaagatcctcaatcgggtgttcccaattaaacattgagtggtcggcaattcaaatacca
 gttaatgtaattcaattcatcggtaattcctcaatcgggtgaccttgggaatgaagcggcgtagtagctggttacggttttcaattataccggttcatgtggtgaataagcatggcaaaaataaac
 tgagtaccagtttccgttcaattgctgtagtagtgaaactttacc **tgatccacggttaagcgtctt**gagcttctgtaagttgactaagtagcgttgatcagctgacgacatccgacatggag
 ccgtttaaacaattgtagcagcactctacgttccaaaaagtagccacagcttgacttactgtttaccagaagtagcgttatcagctcaaatggccgaatctctgaggttctgactttagggcgg
 ctctcaatggagcggcgtgactgaaactaccgctttctttagcagatgacgacgaattccatgatcaggcaaatcgggtaactgtatcaagccatcctgtatcaatccagttatagaaccgtctt
 taggcaatccccaccatgg **gcaactgttcaggggacca**ctnnnnncacacacttaataaagtggtg **gnnnn**ncatccgtttagcatcggtaattcttaaaccgcccaaatcatgcattt
 taaaccgataaaaacgacaattcaaacggcccttgacacatcactaagcggacggaacacctgggtgaagagttccacgagcgaattcaagtactcacagtagctgtgtgttctcgatgcta
 ctacattccgttacggctggtaccgttgaacgagaagccgttaacgtagcgtatcgaattcgaagtagcggcgttaaggaagttctgactacagtagcaccacagcagaacggagccgcttggct
 tgaactactccaggattacgcgacgggggataaagatattcagttgtatcgcgacgggttagtgactcaactctgattgaggtaactaccgcaggcgaagttcaacgggtgctgggtcca
 cgacagcgaaccttttaggttagcttgcgaacacgacgcagggagattatcaccgactttaggctattcggcaagcagagaacctacaagccgcaaaagaacgattagcggctttagctgta
 gttggagtcagttataagcagcaatcaagaatctagtcgaatggaggatctattcagcttctcagtttccaactgcgatcctgacagcactcaatgagtgcttcaataagag
 cctgaagaagatggtccgactgaagagcagttcccaaacgaaggagccctgatcgtttatcatgacgcaagtagtgagtagacaacgataaattgagaatcagcagatcgggattcaaggact
 gtcaaacacgcttgattcagttttagaattgccaatt

Figura 7. 2. Región de la glicosiltransferasa cebadora ubicada entre las posiciones nucleotídicas 98031 y 101867 del genoma de *L. fermentum* Lf2 (en color violeta y subrayada, correspondiente al ORF 119, 690 pb). En rojo se muestran los *primers* diseñados para secuenciar la región intermedia (PGLF2_partemedia_F y PGLF2_partemedia_R, producto de 1,48 kpb), y en verde los *primers* PGLF2_out_F y PGLF2_out_R (producto de 2,55 kpb).

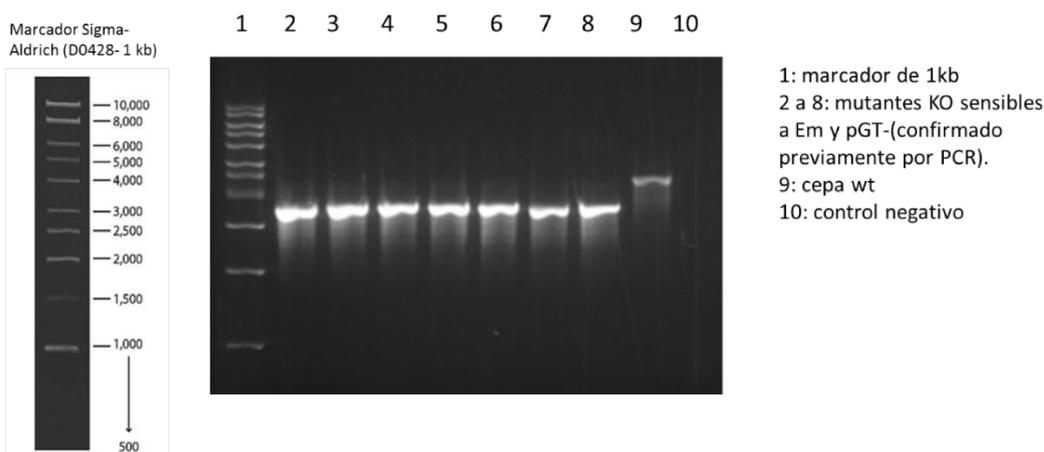


Figura 7. 3. Electroforesis en gel de agarosa (1% m/v) para los productos de amplificación por PCR obtenidos con los *primers* LF2_out_F y LF2_out_R usando ADN del genoma de *L. fermentum* Lf2 como molde. KO: mutantes *knockout* para la glicosiltransferasa cebadora; pGT1: glicosiltransferasa cebadora (por sus siglas en inglés); wt: cepa *wildtype*.

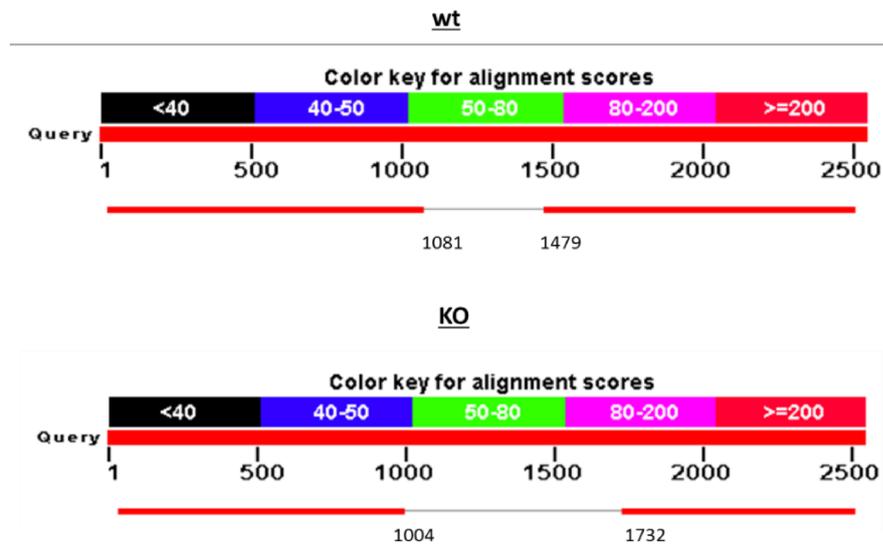


Figura 7. 4. Resultados de los alineamientos BLAST obtenidos por comparación de las secuencias de los productos de PCR obtenidos con los *primers* PGLF2_out_F y PGLF2_out_R con la región del gen que codifica la pGT1 en el genoma de *L. fermentum* Lf2. Se muestran los resultados para la cepa *wt* y mutante (KO).

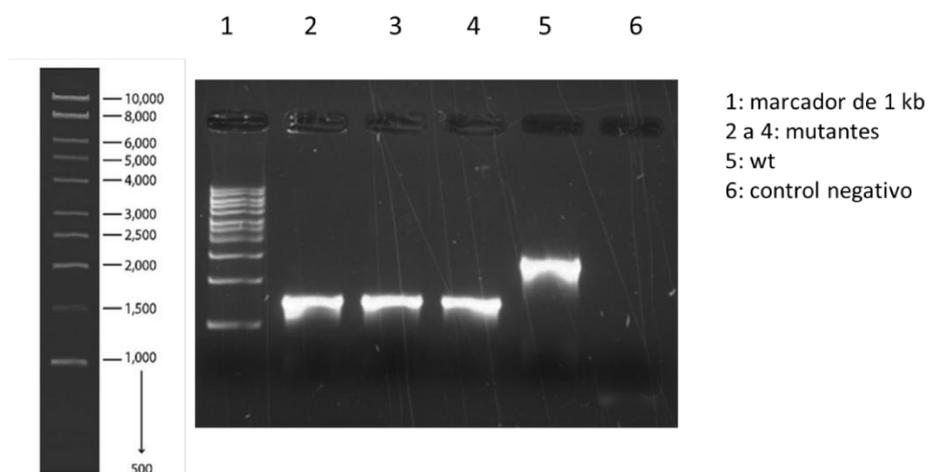


Figura 7. 5. Electroforesis en gel de agarosa (1% m/v) para los productos de PCR obtenidos para la cepa *wildtype* (*wt*) y mutantes KO para la pGT1 de *L. fermentum* Lf2 usando los *primers* PGLF2_partemedial_F y PGLF2_partemedial_R.

```

ccggcaaaaccctaattcacgctattctgggtgatactatcgattgtgacgaactgtctgttaaaggatcagcagtttactctgtacgg
ggatggggagtcagacgcgggactttatctacgtaaagacattgttaacgcgttgattttcattagtgaggcaacaataatgta
tggggtttataacattggttacgggaagaaacacgcattgctagacgtaacaggatgtttgaagaagcggccgggaaaaa
gttgaagattcaattgccaagcacgaaatggggacattcaggaagcttggcagatattaccggttaaaggaattaggtttaa
aagcaaatgggggttagaaaatggacttagggaatactgggaatgacagatggagaaaataaataagtaaggcgcaaatagcagg
aaccacctacgaatacttagaccgattggtgaaccaatccaatgaa gaaaatgggtggaaaacgattttgggatatcattttggctt
aattgggttaatcatcagattccgttcattttgttttgggatcattattaaattaacgtcgaaggaccgatctttttaagcaagaacg
ggttggctacatgggaaagaactttgatgttatcaagttacgggcaatgcgaaacgatgcagaagctaaga cggggctgtgtggccc
aaaaaaaaatgaccacgggtaactcgggtcggacggttatgcgaaagacgcggatcgaacta cca cagttttggaatgtttaaag
ggtgacatgagcatgatcgggcca ccccggaaacggccagagttaacggaaaagtctataaacagtgccagaatttcgcaacgct
tgcggtattaccggggttacaggttatgcccaagtaaatgggggctatgatatccccaagaagaaagtgccacctagataattact
atattgaaaactactcattacctttgacattaaagattgccttagagacgatcaaacgatgttcaaggatgagggacagataaaa
aagaatagattgataaaacaggaagtagtttatgagtaacggtaatttctgcttttctgtactgtcgggtttacaag
aaggagagacccgcatttttagataaaggcagattgcaagaataactgaacaatttagtaacgcagattacgcaaaaa
gatcacaatcgggttgcaccaatttaaacattgagtggtcgcaattcaaataccagtttaattgaaatcatcatcggtaa
tctcatcaatcgggtgacctttgggaatgaagcggcgtagtactcggttacggttttcattattaccggttcattgtggtgataa
gcattgggcaaaaataaacctgagtagcagtttgccgttcaattgtctgatagttagtaacttttaccatgataccgtaagcgt
ctt

```

Figura 7. 6. Secuencia nucleotídica de la región del gen que codifica para la pGT1 (glicosiltransferasa cebadora): en verde se destacan las regiones comunes para la cepa *wt* y el producto obtenido al amplificar la mutante KO con los *primers* PGLF2_partemedi_a_F y PGLF2_partemedi_a_R (indicados en rojo). En subrayado se señala el gen que codifica para la pGT (en la cepa *wt*) y en amarillo, la región genómica ausente en la cepa KO.

La mayoría de las veces, las mutaciones que perturban la actividad de pGT suprimen completamente o disminuyen fuertemente la formación de EPS (Horn y col., 2013; Remus y col., 2012; Schaffner y col., 2014; Yother, 2011). Sin embargo, en algunos casos, se sugirió que ciertos fenómenos de complementación intracromosómica son capaces de restaurar el paso inicial y mantener la síntesis de EPS (Goudenège y col., 2014; Remus y col., 2012).

En nuestro trabajo, la cepa mutante KO conservó el fenotipo filante y el rendimiento obtenido en la producción de EPS fue prácticamente el mismo entre la mutante y la *wt*. Además, según resultados recientes obtenidos a partir de los espectros H¹-RMN para ambas (resultados no mostrados), no existen diferencias en la composición de los EPS secretados al medio (dos polisacáridos mayoritarios, un HoPS y un HePS de alto y mediano PM, respectivamente, con proporciones relativas similares). A partir de estos resultados es posible plantear la siguiente hipótesis: al eliminar el gen codificante para la pGT1, se eliminaría la capacidad de sintetizar una heteropolisacárido capsular (CPS) que posiblemente produce *L. fermentum* Lf2 y que no está presente en la fracción polisacáridica secretada al medio de cultivo. Este supuesto surge de la reciente evidencia en el *cluster* 1, de un gen que codificaría para una proteína CpsC (correspondiente al ORF 115) involucrada en la biosíntesis de un polisacárido capsular. De este modo, la mutante KO posiblemente haya perdido la capacidad de sintetizar este CPS, sin perder

la de sintetizar ninguno de los EPS identificados en el extracto crudo, si bien, al momento de la escritura de este trabajo, no se ha podido demostrar experimentalmente.

Resultados similares a los nuestros se obtuvieron en un trabajo reciente de Dimopoulou y col. (2017) para la especie *Oenococcus oeni*, una de las especies que dirige la fermentación maloláctica en vinos. La mayoría de las cepas de esta especie producen polisacáridos capsulares, que podrían protegerlas del ambiente hostil implicado en la producción de vinos, y en los genomas de esta especie se han encontrado varios genes que codifican pGT. Estos autores describieron la presencia de dos *clusters*: el primero llamado *eps1*, se encontró en todas las cepas examinadas mientras que el segundo, llamado *eps2*, estuvo presente en el 75% de las cepas examinadas. Cada *cluster* contaba con los genes necesarios para establecer una vía de biosíntesis de HePS completa: una pGT, glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de unidades repetitivas, una flipasa que externaliza la unidad repetitiva completa, una polimerasa que ensambla las unidades repetitivas para formar el polímero fuera de la célula y varias proteínas de regulación. En nuestro caso, los *clusters* no cuentan con todas las enzimas necesarias para establecer una vía biosintética de HePS por sí solos. El *cluster eps2* encontrado para *Oenococcus oeni* mostró estar implicado en la síntesis de un polisacárido capsular compuesto por galactosa, ramnosa y glucosa, mientras que la función de *eps1* no se conoce todavía (Dimopoulou y col., 2014). Luego de analizar las secuencias de más de 50 cepas de esta especie, en este trabajo se centraron en el estudio de dos pGT, WoaA (codificada por un gen ubicado en el *cluster 1*) y WobA (codificada por un gen en el *cluster 2*). Ellos proponen que en bacterias de esta especie deficientes en WobA, WoaA podría complementar esta deficiencia y mantener la formación de EPS, gracias a su dualidad en la especificidad por los sustratos (gluco- y galactosil- transferasa). En un trabajo previo, Dimopoulou y col. (2014), a partir del análisis de 50 genomas de la especie *Oenococcus oeni*, ya habían estudiado la presencia de distintos *locus* relacionados a la síntesis de EPS: los dos *clusters* (*eps1* y *eps2*), 3 genes aislados codificantes de glucósido-hidrolasas (*dsrO*, *dsrV* y *levO*), y 3 genes codificantes para glicosiltransferasas (*gtf*, *it3*, *it4*). Los genes aislados estaban presentes o ausentes dependiendo de la cepa, y los *clusters* diferían entre las cepas estudiadas. Identificaron 3 vías biosintéticas que eran activas y complementarias: una dependiente de Wzy (en el *cluster 2*) que permite la producción de HePS compuestos por glucosa, galactosa y ramnosa (principalmente capsulares), otra para la síntesis de β -glucanos en la que interviene Gtf (libres y asociados a las células, relacionados con el fenotipo *ropy*, y una vía para la síntesis de HoPS a partir de sacarosa (α -glucanos y β -fructanos) mediante glucósido-hidrolasas. Ellos vieron que los genes dedicados al metabolismo de EPS se distribuían a lo largo de todo el cromosoma, de un modo similar a lo

observado para *L. fermentum* Lf2. El rol del *cluster* 1 y de los genes aislados *it3* e *it4* no pudieron ser dilucidados en este estudio. El hecho de que los 50 genomas estudiados presentaron genes involucrados en el metabolismo de EPS sugiere que estos polímeros son muy importantes para la adaptación de *O. oeni* a su nicho ecológico, especialmente los capsulares.

Por otro lado, Remus y col. (2012) describieron que la cepa *L. plantarum* WCFS1 presentó 4 *clusters* de genes asociados a la síntesis de polisacáridos en su genoma. Dos de estos *clusters* codificarían para todas las proteínas requeridas para la síntesis de polisacáridos capsulares (*cps2A-J* y *cps4A-J*), mientras que los demás carecían de los genes que codifican para las funciones de regulación y para la pGT (*cps1A-I* y *cps3A-J*). En este trabajo construyeron mutantes en los que se eliminó cada *cluster* individualmente o combinaciones de ellos, evaluando el impacto de estas mutaciones mediante análisis del transcriptoma. Sugirieron que, a pesar de que los *clusters* 1 y 3 estaban incompletos, las glicosiltransferasas codificadas podrían interaccionar con los azúcares-undecaprenilfosfatos derivados de otras vías, por ejemplo en las que intervienen los *clusters* completos 2 y 4. Además, la composición de los polisacáridos fue alterada para cada mutante de *L. plantarum*, indicando que todos los *clusters* eran activos. La cepa Δ *cps1A-I* produjo polisacáridos en igual cantidad que la *wt* y se caracterizaron por presentar masa molar reducida y no contenían ramnosa. Los mutantes sin *cps2A-J*, *cps3A-J* o *cps4A-J* produjeron niveles menores de polisacáridos, pero ni la masa molar ni la composición fue afectada, salvo para *cps2A-J* que presentó menor abundancia relativa de galactosa. Finalmente, en el mutante cuádruple, la cantidad de CPS se redujo fuertemente (aproximadamente un 90% con respecto a la *wt*). La mutación individual de cada *cluster* no llevó a diferencias fenotípicas en comparación con la *wt*, mientras que la delección de los 4 causó agregación y sedimentación rápida de las células.

7.4. Conclusiones parciales

En el presente capítulo se ha podido secuenciar preliminarmente el genoma de *L. fermentum* Lf2 y dilucidar parcialmente la conformación de los posibles *clusters* genéticos que participarían en la síntesis de EPS. Se han descrito tres *clusters*, ubicados distantes entre sí, y teniendo el primero de ellos sentido opuesto a los otros dos. El primer *cluster* contiene 8 ORF, de los cuales uno es un regulador transcripcional, otro codifica para una proteína que participa en la síntesis de polisacáridos capsulares, dos son genes que codifican para enzimas que regularían la síntesis de EPS según modelos ya descritos, una tirosin-quinasa y una tirosin-fosfatasa. Los demás consisten en genes que codifican para una epimerasa, una *priming glycosyltransferase* (pGT1) y dos transposasas. El segundo *cluster* está formado por 15 ORF,

la mayoría de ellos consiste en genes que codifican para glicosiltransferasas, una flipasa que podría mediar el transporte del EPS en formación desde el interior al exterior de la bacteria, un gen que codifica para una proteína que determina el largo de la cadena, otro para una polimerasa que interviene en la formación de la unidad repetitiva, y genes que codifican para una proteína que participa en la polimerización y para otra pGT (pGT2) coincidiendo con las funciones descritas en la síntesis de heteropolisacáridos. Por último, el tercer *cluster* está formado por 5 ORF, y consta principalmente de genes codificantes para glicosiltransferasas y de un gen que codifica para una proteína que participa en la polimerización de EPS.

Como se puede ver, la organización de los genes que participan en la síntesis de EPS de esta cepa parece ser compleja, ya que se ubican a lo largo de todo el genoma y no coincide con lo informado hasta el momento, para otras cepas de esta especie bacteriana. Muchos de estos genes se han encontrado con alto grado de similitud en distintas especies de lactobacilos, tales como *L. reuteri*, *L. vaginalis*, *L. mucosae*, *L. oris*, *L. antri* y *L. buchneri*.

A pesar de la complejidad de su organización genética, fue posible obtener una mutante KO en la que se eliminó, mediante estrategias de PCR SOE, la enzima glicosiltransferasa cebadora pGT1 (ORF 119, *cluster* 1), cuya ausencia en el cromosoma fue confirmada por secuenciación.

Conclusiones generales

De entre las cepas de BAL productoras de EPS pertenecientes a la colección del INLAIN, este trabajo de Tesis abordó particularmente el estudio de *Lactobacillus fermentum* Lf2 y su extracto de EPS desde los más diversos aspectos (químico, estructural, tecnológico, funcional, genético), lo que permite plantear las siguientes conclusiones finales:

✓ Fue posible estudiar la producción de EPS crudo, encontrando las condiciones óptimas a escala laboratorio y obteniendo rendimientos que superan lo descrito en bibliografía para cepas de esta especie bacteriana (aproximadamente, 2g/L). Para completar dicha optimización, se desarrolla actualmente el estudio de nuevas variables siguiendo un diseño experimental central compuesto, a los fines de lograr aumentar aún más el rendimiento de EPS. Posteriormente se analizará la estructura y composición química del EPS producido bajo las condiciones óptimas de modo de poner en evidencia cómo las condiciones de desarrollo de *L. fermentum* Lf2 afectan la síntesis del EPS.

✓ A partir de la caracterización química y estructural del extracto purificado se puede concluir que el EPS está integrado, al menos, por dos polisacáridos ramificados, uno de alto PM compuesto por glucosa (β -glucano) cuya unidad repetitiva es un trisacárido (40%) y otro de PM medio compuesto por glucosa y galactosa (HePS) cuya unidad repetitiva es un disacárido (45%). También se pudieron identificar los enlaces que intervienen en cada EPS, tratándose en ambos casos de uniones relativamente flexibles. Asimismo, se detectó otro EPS de mediano PM que representa el 15% de la fracción, lo que destaca la gran complejidad de este material. El conocimiento, aunque parcial, de las características moleculares de los polisacáridos mayoritarios, permitió relacionar sus propiedades tecnológicas y funcionales demostradas con la estructura y tamaño de los polímeros presentes, ya que las interacciones entre estas moléculas y los constituyentes de la matriz alimentaria suelen ser las responsables de su respuesta tecnofuncional.

✓ Desde el punto de vista tecnológico, el EPS en estudio (como extracto crudo) es capaz de modificar las características de consistencia y dureza de yogures, aumentando su pseudoplasticidad, sin aportar caracteres indeseables y sin afectar en gran medida el grado de sinéresis. Esta respuesta tecnológica obedece a las interacciones entre las moléculas presentes en la matriz láctea y polisacáridos como los identificados en este extracto, ricos en enlaces glicosídicos $\alpha(1,6)$ y $\beta(1,3)$ que generan cadenas flexibles y poco rígidas, y que suelen actuar como espesantes ligeros sin afectar significativamente la viscosidad. El estudio de la interacción con la matriz alimenticia (en modelos más simples y posterior microscopía confocal de barrido, por ejemplo) así como la identificación integral de los polisacáridos presentes en este extracto aportarían las bases moleculares para comprender su influencia en los parámetros de textura.

✓ Cuando el extracto crudo se agregó a queso Cheddar elaborado con leche entera, se vio que este ingrediente no afectó negativamente la reología del producto obtenido, logrando quesos con idénticas características microbiológicas y fisicoquímicas que los quesos control, de modo que representa una matriz apta para el diseño de un queso Cheddar con nuevas propiedades funcionales (potencialmente inmunomodulador, prebiótico, o protector frente a patógenos).

✓ Considerando los diversos estudios de funcionalidad llevados a cabo (tanto *in vitro* como *in vivo*) se concluye que el extracto crudo de EPS actúa, en las dosis adecuadas, como un ingrediente alimentario funcional, habiendo demostrado en las condiciones experimentales diversos roles: rol protector frente a una infección por *Salmonella*, rol inmunomodulador mediante el aumento de los niveles de IgA intestinal, rol prebiótico mediante un aumento de los niveles de SCFA en heces en el tiempo, acompañado de un incremento en el nivel de grupos bacterianos productores de estos ácidos beneficiosos para la salud, y rol simbiótico cuando se lo administró combinadamente con la cepa probiótica *B. animalis* subsp. *lactis* INL1. En todos los modelos estudiados, las observaciones experimentales se correlacionaron con respuestas esperables para exopolisacáridos con las características químicas y estructurales de los EPS identificados mayoritariamente en el extracto crudo (dos EPS ramificados, con PM promedio inferior a 10^3 kDa). Estos resultados hablan de la versatilidad que puede tener este extracto desde el punto de vista funcional ya que, al aplicarse como un ingrediente alimentario natural, permitiría la elaboración de una amplia gama de alimentos funcionales novedosos, específicos para distintas poblaciones según su necesidad.

✓ A partir del conocimiento parcial del genoma de la cepa productora de EPS, *L. fermentum* Lf2, se puede asegurar que existen 3 *clusters* genéticos vinculados con la síntesis de HePS, identificando en los *clusters* 1 y 2 los genes que codifican para una glicosiltransferasa cebadora o pGT (enzima clave en la síntesis de HePS). Asimismo, fue factible construir una cepa mutante KO en la que se eliminó efectivamente el gen que codifica para la pGT1 (ORF 119, *cluster* 1), la cual presentó fenotipo filante. La caracterización química y estructural del EPS producido por esta cepa KO señaló ser idéntico al de la cepa *wt*.

Por todo lo expuesto, cabe remarcar la relevancia de *L. fermentum* Lf2, una cepa autóctona de nuestra región de influencia, aislada a partir de un evento negativo en la industria láctea. En base a los resultados de este trabajo de Tesis se han podido demostrar los muy diversos aspectos positivos de esta cepa, todos ellos vinculados a la producción de una combinación de EPS: por un lado, homo y heteropolisacáridos, y por otro, polisacáridos

capsulares y de tipo *slime*. Esta característica, inédita al menos para una cepa de *L. fermentum*, subraya la importancia de este trabajo completamente integrador, y que abre las perspectivas hacia numerosos estudios futuros, tanto básicos como aplicados.

Finalmente, el trabajo muestra la versatilidad de roles de las bacterias lácticas, que bajo una realidad pueden aparecer como alteradores pero que, cuando se profundiza su estudio, pueden revelar características tecnológicas y funcionales que determinan una importancia positiva en cuanto a sus posibles aplicaciones.

Referencias

- Abbas, A. K.; Lichtman, A. H. y Pillai, S. (2008) *Citocinas*. En: *Inmunología celular y molecular 6ª Edición* (Eds.: Abbas, A. K) Elsevier, Amsterdam, Países Bajos, p. 267-302.
- Abbad Andaloussi, S.; Talbaoui, H.; Marczak, R. y Bonaly, R. (1995) *Isolation and characterization of exocellular polysaccharides produced by Bifidobacterium longum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 995-1000.
- Ai, L.; Zhang, H.; Guo, B.; Chen, W.; Wu, Z. y Wu, Y. (2008) *Preparation, partial characterization and bioactivity of exopolysaccharides from Lactobacillus casei LC2W*. Carbohydr. Polym. 74: 353-357.
- Ale, E. C.; Perezlindo, M. J.; Burns, P.; Tabacman, E.; Reinheimer, J. A. y Binetti, A. G. (2016) *Exopolysaccharide from Lactobacillus fermentum Lf2 and its functional characterization as a yogurt additive*. J. Dairy Res. 83: 487-492.
- Amatayakul, T.; Halmos, A. L.; Sherkat, F. y Shah, N. P. (2006a) *Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios*. Int. Dairy J. 16: 40-51.
- Amatayakul, T.; Sherkat, F. y Shah, N. P. (2006b) *Syneresis in set yogurt as affected by EPS starter cultures and levels of solids*. Int. J. Dairy Technol. 59: 216-221.
- Amrouche, T.; Boutin, Y.; Prioult, G. y Fliss, I. (2006) *Effects of bifidobacterial cytoplasm, cell wall and exopolysaccharide on mouse lymphocyte proliferation and cytokine production*. Int. Dairy J. 16: 70-80.
- Andrews, A. T. (1983) *Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins*. J. Dairy Res. 50: 45-55.
- Aryantini, N. P. D.; Prajapati, J. B.; Urashima, T. y Fukuda, K. (2017) *Complete genome sequence of Lactobacillus fermentum MTCC 25067 (formerly TDS030603), a viscous exopolysaccharide-producing strain isolated from indian fermented milk*. Genome Announc. 5: e00091-17.
- Axelsson, L. (2004) *Lactic acid bacteria: classification and physiology*. En: *Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects* (Eds.: Salminen, S.; Wright, A. V. y Ouwehand, A.) Marcel Dekker, Nueva York, p. 1-66.
- Axelsson, L. y Ahrné, S. (2000) *Lactic acid bacteria*. En: *Applied microbial systematics* (Eds.: Priest, F. y Goodfellow, M.) Springer, Países Bajos, p. 367-388.
- Badel, S.; Bernardi, T. y Michaud, P. (2011) *New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides*. Biotechnol. Adv. 29: 54-66.
- Bajaj, I. B.; Survase, S. A.; Saudagar, P. S. y Singhal, R. S. (2007) *Gellan gum : fermentative*

- production, downstream processing and applications*. Food Technol. Biotechnol. 45: 341-354.
- Baker, G. C.; Smith, J. J. y Cowan, D. A. (2003) *Review and re-analysis of domain-specific 16S primers*. J. Microbiol. Methods 55: 541-555.
- Balzaretti, S.; Taverniti, V.; Guglielmetti, S.; Fiore, W.; Minuzzo, M.; Ngo, H. N.; Ngere, J. B.; Sadiq, S.; Humphreys, P. N. y Laws, A. P. (2017) *A novel rhamnose-rich hetero-exopolysaccharide isolated from Lactobacillus paracasei DG activates THP-1 human monocytic cells*. Appl. Environ. Microbiol. (aceptado).
- Barcenilla, A.; Pryde, S. E.; Martin, J. C.; Duncan, S. H.; Stewart, C. S.; Henderson, C. y Flint, H. J. (2000) *Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1654-1661.
- Barrangou, R.; Briczinski, E. P.; Traeger, L. L.; Loquasto, J. R.; Richards, M.; Horvath, P.; Coûté-Monvoisin, A. C.; Leyer, G.; Rendulic, S.; Steele, J. L.; Broadbent, J. R.; Oberg, T.; Dudley, E. G.; Schuster, S.; Romero, D. A. y Roberts, R. F. (2009) *Comparison of the complete genome sequences of Bifidobacterium animalis subsp. lactis DSM 10140 and Bl-04*. J. Bacteriol. 191: 4144-4151.
- Barrett, E.; Ross, R. P.; O'Toole, P. W.; Fitzgerald, G. F. y Stanton, C. (2012) *γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine*. J. Appl. Microbiol. 113: 411-417.
- Bartosch, S.; Fite, A.; Macfarlane, G. T. y McMurdo, M. E. T. (2004) *Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using Real-Time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 3575-3581.
- Becker, A.; Katzen, F.; Pühler, A. y Ielpi, L. (1998) *Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 145-52.
- Behare, P. V.; Singh, R.; Nagpal, R. y Rao, K. H. (2013) *Exopolysaccharides producing Lactobacillus fermentum strain for enhancing rheological and sensory attributes of low-fat dahi*. J. Food Sci. Technol. 50: 1228-1232.
- Bentley, S. D.; Aanensen, D. M.; Mavroidi, A.; Saunders, D.; Rabinowitsch, E.; Collins, M.; Donohoe, K.; Harris, D.; Murphy, L.; Quail, M. A.; Samuel, G.; Skovsted, I. C.; Kalltoft, M. S.; Barrell, B.; Reeves, P. R.; Parkhill, J. y Spratt, B. G. (2006) *Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes*. PLoS Genet. 2: e31.
- Bhowmik, T. y Marth, E. H. (1990) *β -Galactosidase of Pediococcus species: induction,*

- purification and partial characterization*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33: 317-323.
- Biavati, B. (2001) *Bifidobacteria*. En: *Microorganisms as health supporters* (Eds.: Biavati, B.; Bottazzi, V.; Morelli, L. y Schiavi, C.) Mofin-Alce, Novara, p. 10-33.
- Binetti, A. G.; Suárez, V. B.; Tailliez, P. y Reinheimer, J. A. (2007) *Characterization of spontaneous phage-resistant variants of Streptococcus thermophilus by randomly amplified polymorphic DNA analysis and identification of phage-resistance mechanisms*. Int. Dairy J. 17: 1115-1122.
- Bissett, D. L. y Anderson, R. L. (1974) *Lactose and D-galactose metabolism in group N streptococci: presence of enzymes for both the D-galactose 1-phosphate and D-tagatose 6-phosphate pathways*. J. Bacteriol. 117: 318-20.
- Björkroth, J.; Ridell, J. y Korkeala, H. (1996) *Characterization of Lactobacillus sake strains associating with production of ropy slime by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns*. Int. J. Food Microbiol. 31: 59-68.
- Blakesley, R. W. y Boezi, J. A. (1977). *A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue G250*. Anal. Biochem. 82: 580-582.
- Bleau, C.; Monges, A.; Rashidan, K.; Laverdure, J. P.; Lacroix, M.; Van Calsteren, M. R.; Millette, M.; Savard, R. y Lamontagne L. (2010) *Intermediate chains of exopolysaccharides from Lactobacillus rhamnosus RW-9595M increase IL-10 production by macrophages*. J. Appl. Microbiol. 108: 666-675.
- Bloemen, J. G.; Olde Damink, S. W. M.; Venema, K.; Buurman, W. A.; Jalan, R. y Dejong, C. H. C. (2010) *Short chain fatty acids exchange: Is the cirrhotic, dysfunctional liver still able to clear them?*. Clin. Nutr. 29: 365-369.
- Boels, I. C.; Kranenburg, R. van; Hugenholtz, J.; Kleerebezem, M. y de Vos, W. M. (2001) *Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria*. Int. Dairy J. 11: 723-732.
- Borda, M. A. (2011) *Formulación de una base de aderezo de ensaladas con características de alimentos funcionales*. Tesis de Maestría en Tecnología de los Alimentos (UTN, Buenos Aires).
- Bourassa, M. W.; Alim, I.; Bultman, S. J. y Ratan, R. R. (2016) *Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: Can a high fiber diet improve brain health?*. Neurosci. Lett. 625: 56-63.
- Bourne, M. C. (1978) *Texture Profile Analysis*. Food Technol. 32, 62-66, 72.
- Bourriaud, C.; Robins, R. J.; Martin, L.; Kozlowski, F.; Tenailleau, E.; Cherbut, C. y Michel,

- C. (2005) *Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident*. J. Appl. Microbiol. 99: 201-212.
- Brandtzaeg, P.; Bjerke, K.; Kett, K.; Kvale, D.; Rognum, T. O.; Scott, H.; Sollid, L. M. y Valnes, K. (1987) *Production and secretion of immunoglobulins in the gastrointestinal tract*. Ann. Allergy 59: 21-39.
- Bryan, B. A.; Linhardt, R. J. y Daniels, L. (1986) *Variation in composition and yield of exopolysaccharides produced by Klebsiella sp. strain K32 and Acinetobacter calcoaceticus BD4*. Appl. Environ. Microbiol. 51: 1304-1308.
- Bubb, W. A.; Urashima, T.; Fujiwara, R.; Shinnai, T. y Ariga, H. (1997) *Structural characterisation of the exocellular polysaccharide produced by Streptococcus thermophilus OR 901*. Carbohydr. Res. 301: 41-50.
- Buldo, P.; Benfeldt, C.; Folkenberg, D. M.; Jensen, H. B.; Amigo, J. M.; Sieuwerts, S.; Thygesen, K.; van den Berg, F. e Ipsen, R. (2016) *The role of exopolysaccharide-producing cultures and whey protein ingredients in yoghurt*. LWT - Food Sci. Technol. 72: 189-198.
- Burns, P.; Alard, J.; Hrdý, J.; Boutillier, D.; Páez, R.; Reinheimer, J.; Pot, B.; Vinderola, G. y Grangette C. (2017) *Spray-drying process preserves the protective capacity of a breast milk-derived Bifidobacterium lactis strain on acute and chronic colitis in mice*. Sci. Rep. 7: 43211.
- Calasso, M. y Gobetti, M. (2011) *Lactobacillus spp.: other species*. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences 2nd Edition* (Eds.: Fuquay, J. W.; Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H.) Elsevier, Amsterdam, Países Bajos, p. 125-132.
- Calhoun, P. (2015) *Exact: Unconditional Exact Test. R package version 1.6*. <http://CRAN.R-project.org/package=Exact>.
- Canani, R. B. (2011) *Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases*. World J. Gastroenterol. 17: 1519.
- Cerning, J. (1990) *Exocelular polysaccharides produced by lactic acid bacteria*. FEMS Microbiol. Rev. 87: 113-130.
- Cerning, J. (1995) *Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria*. Lait 75: 463-472.
- Cerning, J.; Bouillanne, C.; Landon, M. y Desmazeaud, M. (1992) *Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria*. J. Dairy Sci. 75: 692-699.
- Cerning, J.; Renard, C. M.; Thibault, J. F.; Bouillanne, C.; Landon, M.; Desmazeaud, M. y

- Topisirovic, L. (1994) *Carbon source requirements for exopolysaccharide production by Lactobacillus casei CG11 and partial structure analysis of the polymer*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3914-3919.
- Chabot, S.; Yu, H.-L.; De Léséleuc, L.; Cloutier, D.; Van Calsteren, M.-R.; Lessard, M.; Roy, D.; Lacroix, M. y Oth, D. (2001) *Exopolysaccharides from Lactobacillus rhamnosus RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- γ in mouse splenocytes*. Lait 81: 683-697.
- Chamberlain, E. K. (1996) *Characterization of heated and thermally processed cross-linked waxy maize starch utilizing particle size analysis, microscopy and rheology*. Tesis de Maestría (Cornell University, Ithaca, Nueva York).
- Cheirsilp, B.; Suksawang, S.; Yeesang, J.; y Boonsawang, P. (2018) *Co-production of functional exopolysaccharides and lactic acid by Lactobacillus kefiranofaciens originated from fermented milk, kefir*. J. Food Sci. Technol. 55(1): 331-340.
- Cherkaoui, A.; Hibbs, J.; Emonet, S.; Tangomo, M.; Girard, M.; Francois, P. Y Schrenzel J. (2010) *Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level*. J. Clin. Microbiol. 48: 1169-1175.
- Choi, S. S.; Kim, Y.; Han, K. S.; You, S.; Oh, S. y Kim, S. H. (2006) *Effects of Lactobacillus strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro*. Lett. Appl. Microbiol. 42: 452-458.
- Ciszek-Lenda, M.; Nowak, B.; Śróttek, M.; Gamian, A. y Marcinkiewicz, J. (2011). *Immunoregulatory potential of exopolysaccharide from Lactobacillus rhamnosus KL37. Effects on the production of inflammatory mediators by mouse macrophages*. Int. J. Exp. Pathol. 92: 382-391.
- Clarke, J. M.; Young, G. P.; Topping, D. L.; Bird, A. R.; Cobiac, L.; Scherer, B. L.; Winkler, J. G. y Lockett, T. J. (2012) *Butyrate delivered by butyrylated starch increases distal colonic epithelial apoptosis in carcinogen-treated rats*. Carcinogenesis 33: 197-202.
- Colby, S. M. y Russell, R. R. B. (1997) *Sugar metabolism by mutans streptococci*. J. Appl. Microbiol. 83: 80S-88S.
- Collins, M. D.; Samelis, J.; Metaxopoulos, J. y Wallbanks, S. (1993) *Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus Weissella for the Leuconostoc paramesenteroides group of species*. J. Appl. Bacteriol. 75: 595-603.
- Collins, M.; Williams, A. y Wallbanks, S. (1990) *The phylogeny of Aerococcus and*

- Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. FEMS Microbiol. Lett. 70: 255-262.
- Cooke, D. R.; Khosrowshahi, A. y McSweeney, P. L. H. (2013) *Effect of gum tragacanth on the rheological and functional properties of full-fat and half-fat Cheddar cheese*. Dairy Sci. Technol. 93: 45-62.
- Costa, N. E.; Hannon, J. A.; Guinee, T. P.; Auty, M. A. E.; McSweeney, P. L. H. y Beresford, T. P. (2010) *Effect of exopolysaccharide produced by isogenic strains of Lactococcus lactis on half-fat Cheddar cheese*. J. Dairy Sci. 93: 3469-3486.
- Costa, N. E.; O'Callaghan, D. J.; Mateo, M. J.; Chaurin, V.; Castillo, M.; Hannon, J. A.; McSweeney, P. L. H. y Beresford, T. P. (2012a) *Influence of an exopolysaccharide produced by a starter on milk coagulation and curd syneresis*. Int. Dairy J. 22: 48-57.
- Costa, N. E.; Wang, L.; Auty, M. E.; Hannon, J. A.; McSweeney, P. L. H. y Beresford, T. P. (2012b) *Rheological, microscopic and primary chemical characterisation of the exopolysaccharide produced by Lactococcus lactis subsp. cremoris DPC6532*. Dairy Sci. Technol. 92: 219-235.
- Cryan, J. F. y Dinan, T. G. (2012) *Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour*. Nat. Rev. Neurosci. 13: 701-712.
- D'Argenio, G. y Mazzacca, G. (1999) *Short-chain fatty acid in the human colon. Relation to inflammatory bowel diseases and colon cancer*. Adv. Exp. Med. Biol. 472: 149-158.
- Dabour, N.; Kheadr, E.; Benhamou, N.; Fliss, I. y LaPointe, G. (2006) *Improvement of texture and structure of reduced-fat Cheddar cheese by exopolysaccharide-producing lactococci*. J. Dairy Sci. 89: 95-110.
- Dan, T.; Fukuda, K.; Sugai-Bannai, M.; Takakuwa, N.; Motoshima, H. y Urashima, T. (2009) *Characterization and expression analysis of the exopolysaccharide gene cluster in Lactobacillus fermentum TDS030603*. Biosci Biotechnol Biochem 73: 2656-2664.
- Das, D.; Baruah, R. y Goyal, A. (2014) *A food additive with prebiotic properties of an α -D-glucan from Lactobacillus plantarum DM5*. Int. J. Biol. Macromol. 69: 20-26.
- Daubioul, C.; Rousseau, N.; Demeure, R.; Gallez, B.; Taper, H.; Declerck, B. y Delzenne, N. (2002) *Dietary fructans, but not cellulose, decrease triglyceride accumulation in the liver of obese Zucker fa/fa rats*. J. Nutr. 132: 967-973.
- de Moreno de LeBlanc, A.; Chaves, S.; Carmuega, E.; Weill, R.; Antóine, J. y Perdigón, G. (2008) *Effect of long-term continuous consumption of fermented milk containing probiotic bacteria on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages*. Immunobiology 213: 97-108.

- de Vrese, M. y Schrezenmeir, J. (2008) *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*. En: *Food biotechnology* (Eds.: Stahl, U.; Donalies, U. E. B. y Nevoigt, E.) Springer, Berlin, Heidelberg, p. 1-66.
- de Vries, W. y Stouthamer, A. H. (1967) *Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria*. J. Bacteriol. 93: 574-576.
- De Vuyst, L. y De Vin, F. (2007) *Exopolysaccharides from lactic acid bacteria*. Compr. Glycosci.: 477-519.
- De Vuyst, L.; De Vin, F.; Vaningelgem, F. y Degeest, B. (2001) *Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria*. Int. Dairy J. 11: 687-707.
- De Vuyst, L. y Degeest, B. (1999a) *Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: technological bottlenecks and practical solutions*. Macromol. Symp. 140: 31-41.
- De Vuyst, L. y Degeest, B. (1999b) *Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria*. FEMS Microbiol. Rev. 23: 153-177.
- De Vuyst, L.; Vanderveken, F.; Van De Ven, S. y Degeest, B. (1998) *Production by and isolation of exopolysaccharides from Streptococcus thermophilus grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis*. J. Appl. Microbiol. 84: 1059-1068.
- De Vuyst, L.; Zamfir, M.; Mozzi, F.; Adriany, T.; Marshall, V.; Degeest, B. y Vaningelgem, F. (2003) *Exopolysaccharide-producing Streptococcus thermophilus strains as functional starter cultures in the production of fermented milks*. Int. Dairy J. 13: 707-717.
- Degeest, B.; Mozzi, F. y De Vuyst, L. (2002) *Effect of medium composition and temperature and pH changes on exopolysaccharide yields and stability during Streptococcus thermophilus LY03 fermentations*. Int. J. Food Microbiol. 79: 161-174.
- Degeest, B. y de Vuyst, L. (1999) *Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by Streptococcus thermophilus LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2863-2870.
- Degnan, B. A. y Macfarlane, G. T. (1993) *Transport and metabolism of glucose and arabinose in Bifidobacterium breve*. Arch. Microbiol. 160: 144-51.
- de Klerk, H. C. y Smit, J. A. (1967) *Properties of a Lactobacillus fermenti bacteriocin*. J. Gen. Microbiol. 48: 309-316.
- den Besten, G.; van Eunen, K.; Groen, A. K.; Venema, K.; Reijngoud, D. J. y Bakker, B. M. (2013) *The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota,*

- and host energy metabolism*. J. Lipid Res. 54: 2325-2340.
- Dertli, E.; Colquhoun, I. J.; Gunning, A. P.; Bongaerts, R. J.; Le Gall, G.; Bonev, B. B.; Mayer, M. J. y Narbad A. (2013) *Structure and biosynthesis of two exopolysaccharides produced by Lactobacillus johnsonii FI9785*. J. Biol. Chem. 288: 31938-31951.
- Di Cagno, R.; De Pasquale, I.; De Angelis, M.; Buchin, S.; Rizzello, C. G. y Gobbetti, M. (2014) *Use of microparticulated whey protein concentrate, exopolysaccharide-producing Streptococcus thermophilus, and adjunct cultures for making low-fat Italian Caciotta-type cheese*. J. Dairy Sci. 97: 72-84.
- Dicks, L. M. T.; Dellaglio, F. y Collins, M. D. (1995) *Proposal to reclassify Leuconostoc oenos as Oenococcus oeni [corrig.] gen. nov., comb. nov.* Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 395-397.
- Dierksen, K. P.; Sandine, W. E. y Trempy, J. E. (1997) *Expression of ropy and mucoid phenotypes in Lactococcus lactis*. J. Dairy Sci. 80: 1528-1536.
- Dilna, S. V.; Surya, H.; Aswathy, R. G.; Varsha, K. K.; Sakthikumar, D. N.; Pandey, A. y Nampoothiria, K. M. (2015) *Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic Lactobacillus plantarum RJF4*. LWT - Food Sci. Technol. 64: 1179-1186.
- Dimopoulou, M.; Claisse, O.; Dutilh, L.; Miot-Sertier, C.; Ballestra, P.; Lucas, P. M. y Dols-Lafargue, M. (2017) *Molecular cloning, expression and characterization of Oenococcus oeni priming glycosyltransferases*. Mol. Biotechnol. 59: 323-333.
- Dimopoulou, M.; Vuillemin, M.; Campbell-Sills, H.; Lucas, P. M.; Ballestra, P.; Miot-Sertier, C.; Favier, M.; Coulon, J.; Moine, V.; Doco, T.; Roques, M.; Williams, P.; Petrel, M.; Gontier, E.; Moulis, C.; Remaud-Simeon, M. y Dols-Lafargue, M. (2014) *Exopolysaccharide (EPS) synthesis by Oenococcus oeni: from genes to phenotypes*. PLoS One 9: e98898.
- Doan, N. T. L.; Van Hoorde, K.; Cnockaert, M.; De Brandt, E.; Aerts, M.; Le Thanh, B. y Vandamme, P. (2012) *Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam*. Lett. Appl. Microbiol. 55: 265-273.
- Doleyres, Y.; Schaub, L. y Lacroix, C. (2005) *Comparison of the functionality of exopolysaccharides produced in situ or added as bioingredients on yogurt properties*. J. Dairy Sci. 88: 4146-4156.
- Donohoe, D. R.; Holley, D.; Collins, L. B.; Montgomery, S. A.; Whitmore, A. C.; Hillhouse, A.; Curry, K. P.; Renner, S. W.; Greenwalt, A.; Ryan, E. P.; Godfrey, V.; Heise, M. T.; Threadgill, D. S.; Han, A.; Swenberg, J. A.; Threadgill, D. W. y Bultman, S. J. (2014)

- A gnotobiotic mouse model demonstrates that dietary fiber protects against colorectal tumorigenesis in a microbiota- and butyrate-dependent manner.* *Cancer Discov.* 4: 1387-1397.
- Driehuis, F. y Oude Elferink, S. J. (2000) *The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review.* *Vet. Q.* 22: 212-216.
- Du Plessis, E. M. y Dicks, L. M. (1995) *Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus amylovorus, Lactobacillus gallinarum, Lactobacillus gasseri, and Lactobacillus johnsonii.* *Curr. Microbiol.* 31: 114-118.
- Duboc, P. y Mollet, B. (2001) *Applications of exopolysaccharides in the dairy industry.* *Int. Dairy J.* 11: 759-768.
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A. y Smith, F. (1956) *Colorimetric method for determination of sugars and related substances.* *Anal Chem* 28: 350-356.
- Duncan, S. H.; Barcenilla, A.; Stewart, C. S.; Pryde, S. E. y Flint, H. J. (2002) *Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA):Acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine.* *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5186-5190.
- Echarri, P. P.; Graciá, C. M.; Berruezo, G. R.; Vives, I.; Ballesta, M.; Solís, G.; Morillas, I. V.; Reyes-Gavilán, C. G.; Margolles, A. y Gueimonde, M. (2011) *Assessment of intestinal microbiota of full-term breast-fed infants from two different geographical locations.* *Early Hum. Dev.* 87: 511-513.
- Edwards, U.; Rogall, T.; Blöcker, H.; Emde, M. y Böttger, E. C. (1989) *Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA.* *Nucleic Acids Res.* 17: 7843-53.
- El Aidy, S.; Van den Abbeele, P.; Van de Wiele, T.; Louis, P. y Kleerebezem, M. (2013) *Intestinal colonization: How key microbial players become established in this dynamic process.* *BioEssays* 35(10): 913-923.
- Engesser, D. M. y Hammes, W. P. (1994) *Non-heme catalase activity of lactic acid bacteria.* *Syst. Appl. Microbiol.* 17: 11-19.
- Evans, J. B. (1986) *Genus Aerococcus.* En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2.* (Eds.: Sneath, P. H. A.; Mair, N. S.; Sharpe, M. E. y Holt, J. G.) Williams and Wilkins Co, Baltimore, p. 1080.
- Fanning, S.; Hall, L. J.; Cronin, M.; Zomer, A.; MacSharry, J.; Goulding, D.; Motherway, M. O.; Shanahan, F.; Nally, K.; Dougan, G. y van Sinderen, D. (2012) *Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune*

- modulation and pathogen protection*. Proc. Natl. Acad. Sci. 109: 2108-2113.
- FAO/WHO (2002) *Guidelines for evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London, Ontario, Canada.
- Felis, G. E.; y Dellaglio, F. (2007) *Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria*. Curr. Issues Intest. Microbiol. 8: 44-61.
- Fernández, M. y Zúñiga, M. (2006) *Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria*. Crit. Rev. Microbiol. 32: 155-183.
- Fields, R. (1971) *The measurement of amino groups in proteins and peptides*. Biochem. J. 124: 581-90.
- FIL-IDF (1982). *Formaggio e formaggio fuso. Determinazione della materia secca. Metodo di riferimento. N° 4:A*. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica, p. 184-188.
- FIL-IDF (1993). *Latte. Determinazione del tenore in azoto. Metodo di riferimento. N° 20:B*. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica, p. 74-107.
- FIL-IDF (1997). *Lait et produits laitiers. Détermination de la teneur en matière grasse*. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica.
- Flint, H. J.; Duncan, S. H.; Scott, K. P. y Louis, P. (2015) *Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism*. Proc. Nutr. Soc. 74: 13-22.
- Fluitman, K. S.; De Clercq, N. C.; Keijser, B. J. F.; Visser, M.; Nieuwdorp, M. y IJzerman, R. G. (2017) *The intestinal microbiota, energy balance, and malnutrition: emphasis on the role of short-chain fatty acids*. Expert Rev. Endocrinol. Metab. 12: 215-226.
- Folkenberg, D. M.; Dejmek, P.; Skriver, A. e Ipsen, R. (2005) *Relation between sensory texture properties and exopolysaccharide distribution in set and in stirred yoghurts produced with different starter cultures*. J. Texture Stud. 36: 174-189.
- Folkenberg, D. M.; Dejmek, P.; Skriver, A.; Skov Guldager, H. e Ipsen, R. (2006) *Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yoghurt cultures*. Int. Dairy J. 16: 111-118.
- Forsén, R.; Heiska, E.; Herva, E. y Arvilommi, H. (1987) *Immunobiological effects of Streptococcus cremoris from cultured milk 'viili'; application of human lymphocyte culture techniques*. Int. J. Food Microbiol. 5: 41-47.
- Fox, P. F. (1963) *Potentiometric Determination of Salt in Cheese*. J. Dairy Sci. 46: 744-745.
- Frankel, W. L.; Zhang, W.; Singh, A.; Klurfeld, D. M.; Don, S.; Sakata, T.; Modlin, I. y Rombeau, J. L. (1994) *Mediation of the trophic effects of short-chain fatty acids on the rat jejunum and colon*. Gastroenterology 106: 375-80.

- Friberg, S.; Larsson, K.; y Sjoblom, J. (2003) *Food Emulsions*. CRC Press, Nueva York.
- Frost, G.; Sleeth, M. L.; Sahuri-Arisoylu, M.; Lizarbe, B.; Cerdan, S.; Brody, L.; Anastasovska, J.; Ghourab, S.; Hankir, M.; Zhang, S.; Carling, D.; Swann, J. R.; Gibson, G.; Viardot, A.; Morrison, D.; Louise Thomas, E. y Bell, J. D. (2014) *The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism*. Nat. Commun. 5.
- Fukuda, K.; Shi, T.; Nagami, K.; Leo, F.; Nakamura, T.; Yasuda, K.; Senda, A.; Motoshima, H. y Urashima, T. (2010) *Effects of carbohydrate source on physicochemical properties of the exopolysaccharide produced by Lactobacillus fermentum TDS030603 in a chemically defined medium*. Carbohydr. Polym. 79: 1040-1045.
- Fukuda, S.; Toh, H.; Hase, K.; Oshima, K.; Nakanishi, Y.; Yoshimura, K.; Tobe, T.; Clarke, J. M.; Topping, D. L.; Suzuki, T.; Taylor, T. D.; Itoh, K.; Kikuchi, J.; Morita, H.; Hattori, M. y Ohno, H. (2011) *Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate*. Nature 469: 543-547.
- Gamar, L.; Blondeau, K. y Simonet, J. M. (1997) *Physiological approach to extracellular polysaccharide production by Lactobacillus rhamnosus strain C83*. J. Appl. Microbiol. 83: 281-287.
- Gancel, F. y Novel, G. (1994) *Exopolysaccharide production by Streptococcus salivarius ssp. thermophilus cultures. 1. Conditions of Production*. J. Dairy Sci. 77: 685-688.
- Gao, Z.; Yin, J.; Zhang, J.; Ward, R. E.; Martin, R. J.; Lefevre, M.; Cefalu, W. T. y Ye, J. (2009) *Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice*. Diabetes 58: 1509-1517.
- García-Ochoa, F.; Santos, V. E.; Casas, J. A. y Gómez, E. (2000) *Xanthan gum: production, recovery, and properties*. Biotechnol. Adv. 18: 549-79.
- Garza Garza, S. (1999) *Caracterización reológica y microbiológica, y cinéticas de deterioro en cremogenado de melocotón*. Tesis Doctoral (Universidad de Lleida, España).
- Gassem, M. A.; Schmidt, K. A. y Frank, J. F. (1997). *Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. J. Food Sci. 62: 171-173.
- Gatti, M.; Trivisano, C.; Fabrizi, E.; Neviani, E. y Gardini, F. (2004) *Biodiversity among Lactobacillus helveticus strains isolated from different natural whey starter cultures as revealed by classification trees*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 182-190.
- Gerwig, G. J.; Dobruchowska, J. M.; Shi, T.; Urashima, T.; Fukuda, K. y Kamerling, J. P. (2013) *Structure determination of the exopolysaccharide of Lactobacillus fermentum TDS030603- a revision*. Carbohydr. Res. 378: 84-90.

- Gibson, G. R.; Hutkins, R.; Sanders, M. E.; Prescott, S. L.; Reimer, R. A.; Salminen, S. J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K. S.; Cani, P. D.; Verbeke, K. y Reid, G. (2017) *Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics*. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol 14(8): 491-502.
- Gill, H. S. (1998). *Stimulation of the immune system by lactic cultures*. Int. Dairy J. 8: 535-544.
- Gindreau, E.; Walling, E. y Lonvaud-Funel, A. (2001) *Direct polymerase chain reaction detection of ropy *Pediococcus damnosus* strains in wine*. J. Appl. Microbiol. 90: 535-42.
- Giraffa, G. (2014) *Lactobacillus helveticus : importance in food and health*. Front. Microbiol. 5: 338.
- Giraffa, G.; Andrighetto, C.; Antonello, C.; Gatti, M.; Lazzi, C.; Marcazzan, G.; Lombardi, A. y Neviani, E. (2004) *Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* strains of dairy origin*. Int. J. Food Microbiol. 91: 129-139.
- Gómez-Gallego, C.; Collado, M. C.; Ilo, T.; Jaakkola, U. M.; Bernal, M. J.; Periago, M. J.; Salminen, S.; Ros, G. y Frias, R. (2012) *Infant formula supplemented with polyamines alters the intestinal microbiota in neonatal BALB/cOlaHsd mice*. J. Nutr. Biochem. 23: 1508-1513.
- Gösta Bylund, M. (2003) *Manual de las Industrias Lácteas*, AMV, Madrid, España.
- Goudenège, D.; Boursicot, V.; Versigny, T.; Bonnetot, S.; Ratiskol, J.; Siquin, C.; LaPointe, G.; Le Rous, F. y Delbarre-Ladrat, C. (2014) *Genome sequence of *Vibrio diabolicus* and identification of the exopolysaccharide HE800 biosynthesis locus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98: 10165-10176.
- Grobben, G. J.; Chin-Joe, I.; Kitzen, V. A.; Boels, I. C.; Boer, F.; Sikkema, J.; Smith, M. R. y de Bont, J. A. M. (1998) *Enhancement of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified defined medium*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 1333-1337.
- Grobben, G. J.; Sikkema, J.; Smith, M. R. y de Bont, J. A. M. (1995) *Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium*. J. Appl. Bacteriol. 79: 103-107.
- Gueimonde, M.; Debor, L.; Tölkö, S.; Jokisalo, E. y Salminen, S. (2006) *Quantitative assessment of faecal bifidobacterial populations by real-time PCR using lanthanide probes*. J. Appl. Microbiol. 102(4): 1116-1122.
- Gueimonde, M.; Tolkkö, S. y Korpimäki, T. (2004) *New real-time quantitative PCR procedure*

- for quantification of bifidobacteria in human fecal samples*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 4165-4169.
- Gunasekaran, S. y Ak, M. (2000) *Dynamic oscillatory shear testing of foods- selected applications*. Trends Food Sci. Technol. 11: 115-127.
- Haarman, M. y Knol, J. (2006) *Quantitative Real-Time PCR analysis of fecal Lactobacillus species in infants receiving a prebiotic infant formula*. Appl. Environ. Microbiol. 72: 2359-2365.
- Halmos, E. P.; Christophersen, C. T.; Bird, A. R.; Shepherd, S. J.; Gibson, P. R. y Muir, J. G. (2015) *Diets that differ in their FODMAP content alter the colonic luminal microenvironment*. Gut 64: 93-100.
- Hamer, H. M.; Jonkers, D. M. A. E.; Bast, A.; Vanhoutvin, S. A. L. W.; Fischer, M. A. J. G.; Kodde, A.; Troost, F. J.; Venema, K. y Brummer, R. J. (2009) *Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans*. Clin. Nutr. 28: 88-93.
- Hamet, M. F.; Medrano, M.; Pérez, P. F. y Abraham, A. G. (2016) *Oral administration of kefir exerts a bifidogenic effect on BALB/c mice intestinal microbiota*. Benef. Microbes 7: 237-246.
- Hamet, M. F.; Piermaria, J. A. y Abraham, A. G. (2015) *Selection of EPS-producing Lactobacillus strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks*. LWT - Food Sci. Technol. 63: 129-135.
- Hammes, W. y Vogel, R. (1995) *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Springer, Boston, MA.
- Han, X.; Yang, Z.; Jing, X.; Yu, P.; Zhang, Y.; Yi, H. y Zhang, L. (2016) *Improvement of the texture of yogurt by use of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria*. Biomed Res. Int. 2016.
- Hassan, A. N.; Ipsen, R.; Janzen, T. y Qvist, K. B. (2003) *Microstructure and rheology of yogurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides*. J. Dairy Sci. 86: 1632-1638.
- Hassan, N.; Awad, S. y Muthukumarappan, K. (2005) *Effects of exopolysaccharide-producing cultures on the viscoelastic properties of reduced-fat Cheddar cheese*. J. Dairy Sci. 88: 4221-4227.
- Heinemann, C.; van Hylckama Vlieg, J. E.; Janssen, D. B.; Busscher, H. J.; van der Mei, H. C. y Reid, G. (2000) *Purification and characterization of a surface-binding protein from Lactobacillus fermentum RC-14 that inhibits adhesion of Enterococcus faecalis 1131*. FEMS Microbiol. Lett. 190: 177-80.
- Hickey, M. W.; Hillier, A. J.; y Jago, G. R. (1986) *Transport and metabolism of lactose*,

- glucose, and galactose in homofermentative lactobacilli*. Appl. Environ. Microbiol. 51: 825-831.
- Hidalgo-Cantabrana, C.; Nikolic, M.; López, P.; Suárez, A.; Miljkovic, M.; Kojic, M.; Margolles, A.; Golic, N. y Ruas-Madiedo, P. (2014a) *Exopolysaccharide-producing Bifidobacterium animalis subsp. lactis strains and their polymers elicit different responses on immune cells from blood and gut associated lymphoid tissue*. Anaerobe 26: 24-30.
- Hidalgo-Cantabrana, C.; Sanchez, B.; Milani, C.; Ventura, M.; Margolles, A. y Ruas-Madiedo, P. (2014b) *Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in Bifidobacterium spp.* Appl. Environ. Microbiol. 80: 9-18.
- Holdsworth, S. D. (1971) *Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behaviour of fluid food products*. J. Texture Stud. 2: 393-418.
- Hongpattarakere, T.; Cherntong, N.; Wichienchot, S.; Kolida, S. y Rastall, R. A. (2012) *In vitro prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria*. Carbohydr. Polym. 87: 846-852.
- Hooper, L. V.; Midtvedt, T.; y Gordon, J. I. (2002) *How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine*. Annu. Rev. Nutr. 22: 283-307.
- Horn, N.; Wegmann, U.; Dertli, E.; Mulholland, F.; Collins, S. R. A.; Waldron, K. W.; Bongaerts, R. J.; Mayer, M. J. y Narbad, A. (2013) *Spontaneous mutation reveals influence of exopolysaccharide on Lactobacillus johnsonii surface characteristics*. PLoS One 8: e59957.
- Hoshino, K.; Takeuchi, O.; Kawai, T.; Sanjo, H.; Ogawa, T.; Takeda, Y.; Takeda, K. y Akira S. (1999) *Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product*. J. Immunol. 162: 3749-52.
- Hosono, A.; Ozawa, A.; Kato, R.; Ohnishi, Y.; Nakanishi, Y.; Kimura, T. y Nakamura, R. (2003) *Dietary fructooligosaccharides induce immunoregulation of intestinal IgA secretion by murine Peyer's Patch cells*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67: 758-764.
- Huazano-García, A. y López, M. G. (2013) *Metabolism of short chain fatty acids in the colon and faeces of mice after a supplementation of diets with agave fructans*. En: *Lipid Metabolism* (Eds.: Valenzuela Baez, R.) InTech, p. 163-182 (ISBN 978-953-51-0944-0).
- Humphreys, C. L. y Plunkett, M. (1969) *Yoghurt: A review of its manufacture*. Dairy Science Abstracts, 31: 607-622.

- Hutkins, R. W. y Morris, H. A. (1987) *Carbohydrate Metabolism by Streptococcus thermophilus: a review*. J. Food Prot. 50: 876-884.
- Ibáñez, R. A.; Waldron, D. S. y McSweeney, P. L. H. (2016) *Effect of pectin on the composition, microbiology, texture, and functionality of reduced-fat Cheddar cheese*. Dairy Sci. Technol. 96: 297-316.
- IDF (1997). *Dairy starter cultures of lactic acid bacteria (LAB) - standard of identity. IDF standard no. 149A*. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica.
- ISO (1988). *Sensory analysis, general guidance for the design of test rooms. International standard no. 8589*. International Organization for Standardization, Ginebra, Suiza.
- ISO (1993). *Sensory analysis, general guidance for the selection, training and monitoring assessors. Part 1: Selected assessors. International Standard No 8586-1*. International Organization for Standardization, Ginebra, Suiza.
- Jaros, D.; Seitler, K. y Rohm, H. (2008) *Enzymatic coagulation of milk: animal rennets and microbial coagulants differ in their gelation behaviour as affected by pH and temperature*. Int. J. Food Sci. Technol. 43: 1721-1727.
- Johnson, M. E.; Kapoor, R.; McMahon, D. J.; McCoy, D. R. y Narasimmon, R. G. (2009) *Reduction of sodium and fat levels in natural and processed cheeses: scientific and technological aspects*. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 8: 252-268.
- Jolly, L. y Stinglele, F. (2001) *Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria*. Int. Dairy J. 11: 733-745.
- Jolly, L.; Vincent, S. J. F.; Duboc, P. y Neeser, J.-R. (2002) *Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria*. Antonie Van Leeuwenhoek 82: 367-374.
- Kandler, O. (1983) *Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria*. Antonie Van Leeuwenhoek 49: 209-24.
- Kandler, O. y Weiss, N. (1986) *Regular, non-sporing gram-positive rods*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2* (Eds.: Sneath, P. H. A.; Mair, N. S.; Sharpe, M. E. y Holt, J. G.) Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 1208-1234.
- Keku, T. O.; Dulal, S.; Deveaux, A.; Jovov, B. y Han, X. (2015) *The gastrointestinal microbiota and colorectal cancer*. Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol. 308: G351-G363.
- Kim, H. J.; Rowe, M.; Ren, M.; Hong, J. S.; Chen, P.-S. y Chuang, D. M. (2007) *Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 321: 892-901.
- Kim, J. F.; Jeong, H.; Yu, D. S.; Choi, S. H.; Hur, C. G.; Park, M. S.; Yoon, S. H.; Kim, D. W.;

- Ji, G. E.; Park, H. S. y Oh, T. K. (2009) *Genome sequence of the probiotic bacterium Bifidobacterium animalis subsp. lactis AD011*. J. Bacteriol. 191: 678-679.
- Kimmel, S. A. y Roberts, R. F. (1998) *Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus RR*. Int. J. Food Microbiol. 40: 87-92.
- Kimmel, S.; Roberts, R. F. y Ziegler, G. R. (1998) *Optimization of exopolysaccharide production by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus RR grown in a semidefined medium*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 659-664.
- Kitazawa, H.; Toba, T.; Kumano, N.; Adachi, S. y Yamaguchi, T. (1991) *Antitumoral activity of slime-forming, encapsulated Lactococcus lactis subsp. cremoris isolated from scandinavian ropy sour milk, «viili»*. Anim. Sci. Technol. 62: 277-283.
- Kitazawa, H.; Harata, T.; Uemura, J.; Saito, T.; Kaneko, T. y Itoh, T. (1998) *Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Int. J. Food Microbiol. 40: 169-75.
- Kitazawa, H.; Itoh, T.; Tomioka, Y.; Mizugaki, M. y Yamaguchi, T. (1996) *Induction of IFN- γ and IL-1 α production in macrophages stimulated with phosphopolysaccharide produced by Lactococcus lactis ssp. cremoris*. Int. J. Food Microbiol. 31: 99-106.
- Koepsell, H.; Tsuchiya, H.; Hellman, N.; Kasenko, A.; Hoffman, C.; Sharpe, E. y Jackson, R. (1952) *Enzymatic synthesis of dextran. Acceptor specificity and chain initiation*. J. Biol. Chem. 200: 793-801.
- Kojic, M.; Vujcic, M.; Banina, A.; Cocconcelli, P.; Cerning, J. y Topisirovic, L. (1992) *Analysis of exopolysaccharide production by Lactobacillus casei CG11, isolated from cheese*. Appl. Environ. Microbiol. 58: 4086-8.
- Kontusaari, S. y Forsén, R. (1988) *Finnish fermented milk «viili»: involvement of two cell surface proteins in production of slime by Streptococcus lactis ssp. cremoris*. J. Dairy Sci. 71: 3197-3202.
- Korakli, M.; Gänzle, M. G. y Vogel, R. F. (2002) *Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by Lactobacillus sanfranciscensis*. J. Appl. Microbiol. 92: 958-965.
- Korakli, M. y Vogel, R. F. (2006) *Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycanucrases and therapeutic potential of their synthesised glycans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71: 790-803.
- Kullen, M. J.; Sanozky-Dawes, R. B.; Crowell, D. C. y Klaenhammer, T. R. (2000) *Use of the*

- DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the Lactobacillus acidophilus complex.* J. Appl. Microbiol. 89: 511-516.
- Kullisaar, T.; Songisepp, E.; Mikelsaar, M.; Zilmer, K.; Vihalemm, T. y Zilmer, M. (2003) *Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects.* Br. J. Nutr. 90: 449-56.
- Kuchroo, C. N. y Fox, P. F. (1982) *Soluble nitrogen in Cheddar cheese; comparison of extraction procedures.* Milchwissenschaft 37: 331-335.
- Law, J.; Buist, G.; Haandrikman, A.; Kok, J.; Venema, G. y Leenhouts, K. (1995) *A system to generate chromosomal mutations in Lactococcus lactis which allows fast analysis of targeted genes.* J. Bacteriol. 177: 7011-7018.
- Lawrence, R. C. y Thomas, T. D. (1979) *The fermentation of milk by lactic acid bacteria.* En: *Microbial Technology: Current State, Future Prospects* (Eds.: Bull, T.; Ellwood, D. C. y Ratledge, C.) University Press, Cambridge, p. 187-219.
- Laws, A.; Gu, Y. y Marshall, V. (2001a) *Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria.* Biotechnol. Adv. 19: 597-625.
- Laws, A. P. y Marshall, V. M. (2001b) *The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria.* Int. Dairy J. 11: 709-721.
- Lay, C.; Rigottier-Gois, L.; Holmstrom, K.; Rajilic, M.; Vaughan, E. E.; de Vos, W. M.; Collins, M. D.; Thiel, R.; Namsolleck, P.; Blaut, M. y Doré J. (2005) *Colonic microbiota signatures across five northern European countries.* Appl. Environ. Microbiol. 71: 4153-4155.
- Lebeer, S.; Claes, I. J. J.; Verhoeven, T. L. A.; Vanderleyden, J. y De Keersmaecker, S. C. J. (2011) *Exopolysaccharides of Lactobacillus rhamnosus GG form a protective shield against innate immune factors in the intestine.* Microb. Biotechnol. 4: 368-374.
- Lebeer, S.; Vanderleyden, J. y De Keersmaecker, S. C. J. (2008) *Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action.* Microbiol. Mol. Biol. Rev. 72: 728-764.
- Lebeer, S.; Verhoeven, T. L. A.; Francius, G.; Schoofs, G.; Lambrichts, I.; Dufrière, Y.; Vanderleyden, J. y De Keersmaecker, S. C. J. (2009). *Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in Lactobacillus rhamnosus GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase.* Appl. Environ. Microbiol. 75: 3554-3563.
- Lecerf, J.-M.; Dépeint, F.; Clerc, E.; Dugenet, Y.; Niamba, C. N.; Rhazi, L.; Cayzeele, A.;

- Abdelnour, G.; Jaruga, A.; Younes, H.; Jacobs, H.; Lambrey, G.; Abdelnour, A. M. y Pouillart, P. R. (2012) *Xylo-oligosaccharide (XOS) in combination with inulin modulates both the intestinal environment and immune status in healthy subjects, while XOS alone only shows prebiotic properties*. Br. J. Nutr. 108: 1847-1858.
- Lee, J. H.; Karamychev, V.; Kozyavkin, S.; Mills, D.; Pavlov, A.; Pavlova, N.; Polouchine, N. N.; Richardson, P. M.; Shakhova, V. V.; Slesarev, A. I.; Weimer, B. y O'Sullivan, D. J. (2008) *Comparative genomic analysis of the gut bacterium Bifidobacterium longum reveals loci susceptible to deletion during pure culture growth*. BMC Genomics 9: 247.
- Lemoine, J.; Chirat, F.; Wieruszeski, J. M.; Strecker, G.; Favre, N. y Neeser, J. R. (1997) *Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by Streptococcus thermophilus SFi39 and SFi12*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3512-3518.
- Leo, F.; Hashida, S.; Kumagai, D.; Uchida, K.; Motoshima, H.; Arai, I.; Asakuma, S.; Fukuda, K. y Urashima, T. (2007). *Studies on a neutral exopolysaccharide of Lactobacillus fermentum TDS030603*. J. Appl. Glycosci. 54: 223-229.
- Leonel, A. J. y Alvarez-Leite, J. I. (2012) *Butyrate*. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 15: 474-479.
- Levander, F.; Svensson, M. y Rådström, P. (2002) *Enhanced exopolysaccharide production by metabolic engineering of Streptococcus thermophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 784-90.
- Li, S.; Chen, T.; Xu, F.; Dong, S.; Xu, H.; Xiong, Y. y Wei, H. (2014a). *The beneficial effect of exopolysaccharides from Bifidobacterium bifidum WBIN03 on microbial diversity in mouse intestine*. J. Sci. Food Agric. 94: 256-264.
- Li, W.; Ji, J.; Chen, X.; Jiang, M.; Rui, X. y Dong, M. (2014b). *Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharides from Lactobacillus helveticus MB2-1*. Carbohydr. Polym. 102: 351-359.
- Liu, C. F.; Tseng, K. C.; Chiang, S. S.; Lee, B. H.; Hsu, W. H. y Pan, T. M. (2011) *Immunomodulatory and antioxidant potential of Lactobacillus exopolysaccharides*. J. Sci. Food Agric. 91: 2284-2291.
- Looijesteijn, P. J. y Hugenholtz, J. (1999) *Uncoupling of growth and exopolysaccharide production by Lactococcus lactis subsp. cremoris NIZO B40 and optimization of its synthesis*. J. Biosci. Bioeng. 88: 178-182.
- Looijesteijn, P. J.; Trapet, L.; De Vries, E.; Abee, T. y Hugenholtz, J. (2001) *Physiological function of exopolysaccharides produced by Lactococcus lactis*. Int. J. Food Microbiol.

- 64: 71-80.
- Looijesteijn, P. J.; van Casteren, W. H.; Tuinier, R.; Doeswijk-Voragen, C. H. y Hugenholtz, J. (2000) *Influence of different substrate limitations on the yield, composition and molecular mass of exopolysaccharides produced by Lactococcus lactis subsp. cremoris in continuous cultures*. J. Appl. Microbiol. 89: 116-22.
- López, P.; Monteserín, D. C.; Gueimonde, M.; de los Reyes-Gavilán, C. G.; Margolles, A.; Suárez, A. y Ruas-Madiedo, P. (2012) *Exopolysaccharide-producing Bifidobacterium strains elicit different in vitro responses upon interaction with human cells*. Food Res. Int. 46: 99-107.
- Louis, P.; Hold, G. L. y Flint, H. J. (2014) *The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer*. Nat. Rev. Microbiol. 12: 661-672.
- Louis, P.; Scott, K. P.; Duncan, S. H. y Flint, H. J. (2007) *Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine*. J. Appl. Microbiol. 102: 1197-1208.
- Low, D.; Ahlgren, J. A.; Horne, D.; McMahon, D. J.; Oberg, C. J. y Broadbent, J. R. (1998) *Role of Streptococcus thermophilus MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2147-2151.
- Lu, Y.; Fan, C.; Li, P.; Lu, Y.; Chang, X. y Qi, K. (2016) *Short chain fatty acids prevent high-fat-diet-induced obesity in mice by regulating g protein-coupled receptors and gut microbiota*. Sci. Rep. 6: 37589.
- Lyte, M. (2011) *Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics*. BioEssays 33: 574-581.
- Ma, L.; Drake, M. A.; Barbosa-Canovas, G. V. y Swanson, B. G. (1997) *Rheology of full-fat and low-fat cheddar cheeses as related to type of fat mimetic*. J. Food Sci. 62: 748-752.
- Macfarlane, G. T. y Macfarlane, S. (2012) *Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health*. J. AOAC Int. 95(1): 50-60.
- Maeda, H.; Zhu, X.; Omura, K.; Suzuki, S. y Kitamura, S. (2004a) *Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation*. Biofactors 22: 197-200.
- Maeda, H.; Zhu, X.; Suzuki, S.; Suzuki, K. y Kitamura, S. (2004b) *Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by Lactobacillus kefiranofaciens WT-2BT*. J. Agric. Food Chem. 52: 5533-5538.
- Majid, H. A.; Emery, P. W. y Whelan, K. (2011) *Faecal microbiota and short-chain fatty acids in patients receiving enteral nutrition with standard or fructo-oligosaccharides and*

- fibre-enriched formulas*. J. Hum. Nutr. Diet. 24: 260-268.
- Makarova, K.; Slesarev, A.; Wolf, Y.; Sorokin, A.; Mirkin, B.; Koonin, E.; Pavlov, A.; Pavlova, N.; Karamychev, V.; Polouchine, N.; Shakhova, V.; Grigoriev, I.; Lou Y.; Rohksar, D.; Lucas, S.; Huang, K.; Goodstein, D. M.; Hawkins, T.; Plengvidhya, V.; Welker, D.; Hughes, J.; Goh, Y.; Benson, A.; Baldwin, K.; Lee, J. H.; Díaz-Muñiz, I.; Dosti, B.; Smeianov, V.; Wechter, W.; Barabote, R.; Lorca, G.; Altermann, E.; Barrangou, R.; Ganesan, B.; Xie, Y.; Rawsthorne, H.; Tamir, D.; Parker, C.; Breidt, F.; Broadbent, J.; Hutkins, R.; O'Sullivan, D.; Steele, J.; Unlu, G.; Saier, M.; Klaenhammer, T.; Richardson, P.; Kozyavkin, S.; Weimer, B. y Mills, D. (2006) *Comparative genomics of the lactic acid bacteria*. Proc. Natl. Acad. Sci. 103: 15611-15616.
- Maldonado, J.; Cañabate, F.; Sempere, L.; Vela, F.; Sánchez, A. R.; Narbona, E.; López-Huertas, E.; Geerlings, A.; Valero, A. D.; Olivares, M. y Lara-Villoslada F. (2012) *Human milk probiotic Lactobacillus fermentum CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants*. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 54: 55-61.
- Manichanh, C. (2006) *Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach*. Gut 55: 205-211.
- Marshall, V. M. y Rawson, H. L. (1999) *Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt*. Int. J. Food Sci. Technol. 34: 137-143.
- Mason, C. K.; Collins, M. A. y Thompson, K. (2005) *Modified electroporation protocol for Lactobacilli isolated from the chicken crop facilitates transformation and the use of a genetic tool*. J. Microbiol. Methods 60: 353-363.
- Matsuda, K.; Tsuji, H.; Asahara, T.; Kado, Y. y Nomoto, K. (2007) *Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR*. Appl. Environ. Microbiol. 73: 32-39.
- Matsuki, T.; Watanabe, K.; Fujimoto, J.; Miyamoto, Y.; Takada, T.; Matsumoto, K.; Oyaizu, H. y Tanaka, R. (2002) *Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 5445-51.
- Matsuki, T.; Watanabe, K.; Fujimoto, J.; Takada, T. y Tanaka, R. (2004) *Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for Real-Time PCR analysis of predominant bacteria in human feces*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 7220-7228.

- Matur, E. y Eraslan, E. (2012) *The impact of probiotics on the gastrointestinal physiology*. En: *New Advances in the Basic and Clinical Gastroenterology* (Ed.: Brzozowski, T.) InTech, p. 51-74 (ISBN 978-953-51-0521-3).
- Maze, A.; O'Connell-Motherway, M.; Fitzgerald, G. F.; Deutscher, J. y van Sinderen, D. (2007) *Identification and characterization of a fructose phosphotransferase system in Bifidobacterium breve UCC2003*. Appl. Environ. Microbiol. 73: 545-553.
- McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (1997) *Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening*. Lait 77: 41-76.
- Mende, S.; Peter, M.; Bartels, K.; Rohm, H. y Jaros, D. (2013) *Addition of purified exopolysaccharide isolates from S. thermophilus to milk and their impact on the rheology of acid gels*. Food Hydrocoll. 32: 178-185.
- Mewis, J. (1979) *Thixotropy - a general review*. J. Nonnewton. Fluid Mech. 6: 1-20.
- Miao, M.; Bai, A.; Jiang, B.; Song, Y.; Cui, S. W. y Zhang, T. (2014). *Characterisation of a novel water-soluble polysaccharide from Leuconostoc citreum SK24.002*. Food Hydrocoll. 36: 265-272.
- Miao, M.; Ma, Y.; Huang, C.; Jiang, B.; Cui, S. W. y Zhang, T. (2015) *Physicochemical properties of a water soluble extracellular homopolysaccharide from Lactobacillus reuteri SK24.003*. Carbohydr. Polym. 131: 377-383.
- Miranda, R. O.; Carvalho, A. F. de y Nero, L. A. (2014) *Development of a selective culture medium for bifidobacteria, Raffinose-Propionate Lithium Mupirocin (RP-MUP) and assessment of its usage with PetrifilmTM Aerobic Count plates*. Food Microbiol. 39: 96-102.
- Mistry, V. V. (2001) *Low fat cheese technology*. Int. Dairy J. 11: 413-422.
- Monchois, V.; Willemot, R. M. y Monsan, P. (1999) *Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships*. FEMS Microbiol. Rev. 23: 131-51.
- Monsan, P.; Bozonnet, S.; Albenne, C.; Joucla, G.; Willemot, R.-M. y Remaud-Siméon, M. (2001) *Homopolysaccharides from lactic acid bacteria*. Int. Dairy J. 11: 675-685.
- Mozzi, F.; De Glori, G. S.; Oliver, G. y De Valdez, G. F. (1996). *Exopolysaccharide production by Lactobacillus casei under controlled pH*. Biotechnol. Lett. 18: 435-439.
- Mozzi, F.; De Giori, G. S.; Oliver, G. y De Valdez, G. F. (1994). *Effect of culture pH on the growth characteristics and polysaccharide production by Lactobacillus casei*. Milchwissenschaft 49(12): 667-669.
- Mozzi, F.; Oliver, G.; De Giori, G. S. y Font De Valdez, G. (1995) *Influence of temperature on the production of exopolysaccharides by thermophilic lactic acid bacteria*.

- Milchwissenschaft 50(2): 80-82.
- Mozzi, F.; Vaningelgem, F.; Hébert, E. M.; Van Der Meulen, R.; Moreno, M. R. F.; Font De Valdez, G. y De Vuyst, L. (2006) *Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers*. Appl. Environ. Microbiol. 72: 4431-4435.
- Mundt, J.O. (1986) *Enterococci*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2* (Eds.: Sneath, P. H. A.; Mair, N. S.; Sharpe, M. E. y Holt, J. G.) Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 1063-1065.
- Nagai, T.; Makino, S.; Ikegami, S.; Itoh, H. y Yamada, H. (2011) *Effects of oral administration of yogurt fermented with Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1 and its exopolysaccharides against influenza virus infection in mice*. Int. Immunopharmacol. 11: 2246-2250.
- Neve, H.; Geis, A. y Teuber, M. (1988) *Plasmid-encoded functions of ropY lactic acid streptococcal strains from Scandinavian fermented milk*. Biochimie 70: 437-42.
- Nikolic, M.; López, P.; Strahinic, I.; Suárez, A.; Kojic, M.; Fernández-García, M.; Topisirovic, L.; Golic, N. y Ruas-Madiedo P. (2012) *Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing Lactobacillus paraplantarum BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics*. Int. J. Food Microbiol. 158: 155-162.
- Nissen, H.; Holck, A. y Dainty, R. H. (1994) *Identification of Carnobacterium spp. and Leuconostoc spp. in meat by genus-specific 16S rRNA probes*. Lett. Appl. Microbiol. 19: 165-8.
- Nowak, B.; Ciszek-Lenda, M.; Śróttek, M.; Gamian, A.; Kontny, E.; Górska-Frączek, S. y Marcinkiewicz J. (2012) *Lactobacillus rhamnosus exopolysaccharide ameliorates arthritis induced by the systemic injection of collagen and lipopolysaccharide in DBA/1 mice*. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). 60: 211-220.
- Oberg, E. N.; Oberg, C. J.; Motawee, M. M.; Martini, S. y McMahon, D. J. (2015) *Increasing stringiness of low-fat mozzarella string cheese using polysaccharides*. J. Dairy Sci. 98: 4243-54.
- Oh, M. H.; Lee, S. G. y Paik, S.-Y. (2010) *Antiviral Activity of Lactobacillus spp. and polysaccharide*. J. Bacteriol. Virol. 40: 145.
- Orla-Jensen, S. (1943) *The lactic acid bacteria Vol 3*. Biologiske Skrifter Bind II, Kopenhagen.
- Ouwehand, A. C. y Conway, P. L. (1996) *Purification and characterization of a component produced by Lactobacillus fermentum that inhibits the adhesion of K88 expressing Escherichia coli to porcine ileal mucus*. J. Appl. Bacteriol. 80: 311-318.
- Palframan, R. J.; Gibson, G. R. y Rastall, R. A. (2003) *Carbohydrate preferences of*

- Bifidobacterium species isolated from the human gut*. Curr. Issues Intest. Microbiol. 4: 71-5.
- Pasteur, L. (1861) *Sur la fermentation visqueuse bulletin de la société de chimie*: 30–31
- Patten, D. A. y Collett, A. (2013) *Exploring the immunomodulatory potential of microbial-associated molecular patterns derived from the enteric bacterial microbiota*. Microbiol. (United Kingdom) 159: 1535-1544.
- Patten, D. A.; Leivers, S.; Chadha, M. J.; Maqsood, M.; Humphreys, P. N.; Laws, A. P. y Collett, A. (2014) *The structure and immunomodulatory activity on intestinal epithelial cells of the EPSs isolated from Lactobacillus helveticus sp. Rosyjski and Lactobacillus acidophilus sp. 5e2*. Carbohydr. Res. 384: 119-127.
- Peng, L.; Li, Z. R.; Green, R. S.; Holzman, I. R. y Lin, J. (2009) *Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of amp-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers*. J. Nutr. 139: 1619-1625.
- Peralta, G. H.; Wolf, I. V.; Perotti, M. C.; Bergamini, C. V. y Hynes, E. R. (2016) *Formation of volatile compounds, peptidolysis and carbohydrate fermentation by mesophilic lactobacilli and streptococci cultures in a cheese extract*. Dairy Sci. Technol. 96: 603-621.
- Perry, D. B.; McMahon, D. J. y Oberg, C. J. (1998) *Manufacture of low fat Mozzarella cheese using exopolysaccharide-producing starter cultures*. J. Dairy Sci. 81: 563-566.
- Peteán, M.; Beccaría, A.; Burns, P.; Sihufe, G.; Zacarías, M. F.; Binetti, A.; Reinheimer, J. y Vinderola, G. (2014) *Influence of technological variables on the functionality of the cell-free fraction of fermented buttermilk*. Int. J. Dairy Technol. 67: 39-46.
- Petry, S.; Furlan, S.; Crepeau, M. J.; Cerning, J. y Desmazeaud, M. (2000) *Factors affecting exocellular polysaccharide production by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus grown in a chemically defined medium*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3427-3431.
- Pham, P. L.; Dupont, I.; Roy, D.; Lapointe, G. y Cerning, J. (2000) *Production of exopolysaccharide by Lactobacillus rhamnosus R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2302-2310.
- Picard, F. J.; Ke, D.; Boudreau, D. K.; Boissinot, M.; Huletsky, A.; Richard, D.; Ouellette, M.; Roy, P. H. y Bergeron, M. G. (2004) *Use of tuf sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 streptococcal species*. J. Clin. Microbiol. 42: 3686-3695.
- Piermaria, J. A.; Pinotti, A.; Garcia, M. A. y Abraham, A. G. (2009) *Films based on kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization*.

- Food Hydrocoll. 23: 684-690.
- Pinches, A. y Pallent, L. J. (1986) *Rate and yield relationships in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media*. Biotechnol. Bioeng. 28: 1484-1496.
- Pokusaeva, K.; O'Connell-Motherway, M.; Zomer, A.; Fitzgerald, G. F. y van Sinderen, D. (2009) *Characterization of two novel α -glucosidases from Bifidobacterium breve UCC2003*. Appl. Environ. Microbiol. 75: 1135-1143.
- Polak-Berecka, M.; Waśko, A.; Sz wajgier, D. y Chomaz, A. (2013) *Bifidogenic and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by Lactobacillus rhamnosus E/N cultivated on different carbon sources*. Polish J. Microbiol. 62: 181-8.
- Poltorak, A. (1998) *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science 282: 2085-2088.
- Pons, M.; y Fiszman, S. M. (1996) *Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems*. J. Texture Stud. 27: 597-624.
- Postma, P. W.; Lengeler, J. W. y Jacobson, G. R. (1993) *Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria*. Microbiol. Rev. 57: 543-94.
- Pot, B.; Vandamme, P. y Kersters, K. (1993) *Analysis of electrophoretic whole cell protein fingerprints*. En: *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics* (Eds.: Goodfellow, M. y O'Donnell, A. G.) Wiley & Sons: Chichester, UK, p. 493-521.
- Premi, L.; Sandine, W. E. y Elliker, P. R. (1972) *Lactose-hydrolyzing enzymes of Lactobacillus species*. Appl. Microbiol. 24: 51-57.
- Qin, Q. Q.; Xia, B. S.; Xiong, Y.; Zhang, S. X.; Luo, Y. B. y Hao, Y. L. (2011) *Structural characterization of the exopolysaccharide produced by Streptococcus thermophilus 05-34 and its in situ application in yogurt*. J. Food Sci. 76: 1226-1230.
- Rao, V. S. R. (1998) *Conformation of carbohydrates*, CRC Press, Nueva York.
- Rühmann, B.; Schmid, J. y Sieber, V. (2015) *Methods to identify the unexplored diversity of microbial exopolysaccharides*. Front. Microbiol. 6.
- Rahimi, J.; Khosrowshahi, A.; Madadlou, A. y Aziznia, S. (2007) *Texture of low-fat Iranian White cheese as influenced by gum tragacanth as a fat replacer*. J. Dairy Sci. 90: 4058-70.
- Ramirez-Farias, C.; Slezak, K.; Fuller, Z.; Duncan, A.; Holtrop, G. y Louis, P. (2009) *Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of Bifidobacterium adolescentis and Faecalibacterium prausnitzii*. Br. J. Nutr. 101: 533.
- Rao, M. A. (2007) *Rheology of Fluid, Semisolid, and Solid Foods 3rd Edition* (Eds: Barbosa-

- Cánovas G. V.) Springer, Nueva York.
- Reid, G. y Burton, J. (2002) *Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria*. *Microbes Infect.* 4: 319-324.
- Reid, G.; Charbonneau, D.; Erb, J.; Kochanowski, B.; Beuerman, D.; Poehner, R. y Bruce, A. W. (2003) *Oral use of Lactobacillus rhamnosus GR-1 and L. fermentum RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35: 131-134.
- Reinheimer, J. A.; Quiberoni, A.; Tailliez, P.; Binetti, A. G. y Suárez, V. B. (1996) *The lactic acid microflora of natural whey starters used in Argentina for hard cheese production*. *Int. Dairy J.* 6: 869-879.
- Remus, D. M.; van Kranenburg, R.; van Swam, I. I.; Taverne, N.; Bongers, R. S.; Wells, M.; Bron, P. A. y Kleerebezem, M. (2012) *Impact of 4 Lactobacillus plantarum capsular polysaccharide clusters on surface glycan composition and host cell signaling*. *Microb. Cell Fact.* 11: 149.
- Rimada, P. S. y Abraham, A. G. (2006) *Kefiran improves rheological properties of glucono- δ -lactone induced skim milk gels*. *Int. Dairy J.* 16: 33-39.
- Rinne, M. M.; Gueimonde, M.; Kalliomäki, M.; Hoppu, U.; Salminen, S. J. y Isolauri, E. (2005) *Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 43: 59-65.
- Ríos-Covián, D.; Ruas-Madiedo, P.; Margolles, A.; Gueimonde, M.; De los Reyes-Gavilán, C. G. y Salazar, N. (2016) *Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health*. *Front. Microbiol.* 7: 1-9.
- Robijn, G. W.; Gutiérrez Gallego, R.; van den Berg, D. J.; Haas, H.; Kamerling, J. P. y Vliegthart, J. F. (1996a) *Structural characterization of the exopolysaccharide produced by Lactobacillus acidophilus LMG9433*. *Carbohydr. Res.* 288: 203-18.
- Robijn, G. W.; Wienk, H. L.; van den Berg, D. J.; Haas, H.; Kamerling, J. P. y Vliegthart, J. F. (1996b) *Structural studies of the exopolysaccharide produced by Lactobacillus paracasei 34-1*. *Carbohydr. Res.* 285: 129-39.
- Robinson, D. S.; Larché, M. y Durham, S. R. (2004) *Tregs and allergic disease*. *J. Clin. Invest.* 114: 1389-1397.
- Rodríguez, C.; Medici, M.; Mozzi, F. y de Valdez, G. F. (2010) *Therapeutic effect of Streptococcus thermophilus CRL 1190-fermented milk on chronic gastritis*. *World J. Gastroenterol.* 16: 1622-1630.

- Rodríguez, C.; Medici, M.; Rodríguez, A. V.; Mozzi, F. y Font de Valdez, G. (2009) *Prevention of chronic gastritis by fermented milks made with exopolysaccharide-producing Streptococcus thermophilus strains*. J. Dairy Sci. 92: 2423-2434.
- Rogosa, M.; Mitchell, J. A. y Wiseman, R. F. (1951) *A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli*. J. Bacteriol. 62: 132-133.
- Roller, M.; Rechkemmer, G. y Watzl, B. (2004) *Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics Lactobacillus rhamnosus and Bifidobacterium lactis modulates intestinal immune functions in rats*. J. Nutr. 134: 153-156.
- Rossetti, L. y Giraffa, G. (2005) *Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases*. J. Microbiol. Methods 63: 135-144.
- Ruas-Madiedo, P.; Abraham, A.; Mozzi, F.; Mayo, B.; López, P. y Pérez-Martínez, G. (2008) *Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria*. Mol. Asp. Lact. acid Bact. Tradit. new Appl. 661: 137-166.
- Ruas-Madiedo, P. y de los Reyes-Gavilán, C. G. (2005) *Invited Review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria*. J. Dairy Sci. 88: 843-856 .
- Ruas-Madiedo, P.; Gueimonde, M.; Margolles, A.; de los Reyes-Gavilán, C. G. y Salminen, S. (2006) *Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus*. J. Food Prot. 69: 2011-2015.
- Ruas-Madiedo, P.; Hugenholtz, J. y Zoon, P. (2002) *An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria*. Int. Dairy J. 12: 163-171.
- Ruas-Madiedo, P.; Sánchez, B.; Cantabrana, C.; Margolles, A. y Laws, A. (2012) *Exopolysaccharides from lactic acid bacteria and bifidobacteria*. En: *Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology Second Edition* (Eds.: Hui, y. H. y Özgül Evranuz, E.), CRC Press, Nueva York, p. 125-152.
- Ruijsenaars, H. J.; Stinglele, F. y Hartmans, S. (2000) *Biodegradability of food-associated extracellular polysaccharides*. Curr. Microbiol. 40: 194-199.
- Ryan, P. M.; Burdíkuvá, Z.; Beresford, T.; Auty, M. A. E.; Fitzgerald, G. F.; Ross, R. P.; Sheehan, J. J. y Stanton, C. (2015a) *Reduced-fat Cheddar and Swiss-type cheeses harboring exopolysaccharide-producing probiotic Lactobacillus mucosae DPC 6426*. J. Dairy Sci. 98: 8531-8544.
- Ryan, P. M.; Ross, R. P.; Fitzgerald, G. F.; Caplice, N. M. y Stanton, C. (2015b) *Sugar-coated: exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications*. Food Funct. 6: 679-693.

- Salama, M.; Sandine, W. y Giovannoni, S. (1991) *Development and application of oligonucleotide probes for identification of Lactococcus lactis subsp. cremoris*. 57: 1313-1318.
- Salazar, N.; Binetti, A.; Gueimonde, M.; Alonso, A.; Garrido, P.; González del Rey, C.; González, C.; Ruas-Madiedo, P. y de los Reyes-Gavilán, C. G. (2011). *Safety and intestinal microbiota modulation by the exopolysaccharide-producing strains Bifidobacterium animalis IPLA R1 and Bifidobacterium longum IPLA E44 orally administered to Wistar rats*. Int. J. Food Microbiol. 144: 342-351.
- Salazar, N.; Gueimonde, M.; Hernández-Barranco, A. M.; Ruas-Madiedo, P. y De Los Reyes-Gavilán, C. G. (2008) *Exopolysaccharides produced by intestinal Bifidobacterium strains act as fermentable substrates for human intestinal bacteria*. Appl. Environ. Microbiol. 74: 4737-4745.
- Salazar, N.; Gueimonde, M.; de los Reyes-Gavilán, C. G. y Ruas-Madiedo, P. (2016) *Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and bifidobacteria as fermentable substrates by the intestinal microbiota*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 56: 1440-1453.
- Salazar, N.; López, P.; Garrido, P.; Moran, J.; Cabello, E.; Gueimonde, M.; Suárez, A.; González, C.; de los Reyes-Gavilán, C. G. y Ruas-Madiedo, P. (2014) *Immune modulating capability of two exopolysaccharide-producing bifidobacterium strains in a wistar rat model*. Biomed Res. Int. 2014.
- Salminen, S.; von Wright, A. y Ouwehand, A. (2004) *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects 3rd Edition*, CRC, New York.
- Sambrook, J. y Russell, D. (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd Edition*, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Santini, Z. G.; Alsina, D. A.; Athaus, R.; Meinardi, C.; Freyre, M.; Díaz, J. R. y González, C. (2007) *Evaluación de la textura en quesos de oveja. Aplicaciones del análisis factorial discriminante*. FAVE Sección Ciencias Agrar. 5: 7.
- Sarikaya, H.; Aslim, B. y Yuksekdog, Z. (2017) *Assessment of anti-biofilm activity and bifidogenic growth stimulator (BGS) effect of lyophilized exopolysaccharides (l-EPSs) from Lactobacilli strains*. Int. J. Food Prop. 20: 362-371.
- Savadogo, A.; Ouattara, C. a T.; Savadogo, P. W.; Barro, N.; Ouattara, A. S. y Traoré, A. S. (2004) *Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples*. African J. Biotechnol. 3: 189-194.

- Scardovi, V. (1984) *Genus Bifidobacterium Orla-Jensen, 1924*. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol I* (Eds.: Krieg, N. R. y Holt, J. G.) The William & Wilkins Co., Baltimore, p. 1418-1434.
- Scardovi, V. y Trovatielli, L. D. (1965) *The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus Bifidobacterium*. Ann. Microbiol. Enzimol. 15: 19-29.
- Schaffner, T. O.; Hinds, J.; Gould, K. A.; Wüthrich, D.; Bruggmann, R.; Küffer, M.; Mühlemann, K.; Hilty, M. y Hathaway, L. J. (2014) *A point mutation in cpsE renders Streptococcus pneumoniae nonencapsulated and enhances its growth, adherence and competence*. BMC Microbiol. 14: 210.
- Schell, M. A.; Karmirantzou, M.; Snel, B.; Vilanova, D.; Berger, B.; Pessi, G.; Zwahlen, M. C.; Desiere, F.; Bork, P.; Delley, M.; Pridmore, R. D. y Arigoni F. (2002) *The genome sequence of Bifidobacterium longum reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract*. Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 14422-14427.
- Segain, J. P.; Raingeard de la Blétière, D.; Bourreille, A.; Leray, V.; Gervois, N.; Rosales, C.; Ferrier, L.; Bonnet, C.; Blottière, H. M. y Galmiche, J. P. (2000) *Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease*. Gut 47: 397-403.
- Sela, D. A.; Chapman, J.; Adeuya, A.; Kim, J. H.; Chen, F.; Whitehead, T. R.; Lapidus, A.; Rokhsar, D. S.; Lebrilla, C. B.; German, J. B.; Price, N. P.; Richardson, P. M y Mills, D. A. (2008) *The genome sequence of Bifidobacterium longum subsp. infantis reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome*. Proc. Natl. Acad. Sci. 105: 18964-18969.
- Şengül, N.; Aslím, B.; Uçar, G.; Yücel, N.; Işık, S.; Bozkurt, H.; Sakaoğullari, Z. y Atalay, F. (2006) *Effects of exopolysaccharide-producing probiotic strains on experimental colitis in rats*. Dis. Colon Rectum 49: 250-258.
- Shakeel-Ur-Rehman; McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (1998) *Protocol for the manufacture of miniature cheeses*. Lait 78: 607-620.
- Sharma, S.; Taliyan, R. y Singh, S. (2015) *Beneficial effects of sodium butyrate in 6-OHDA induced neurotoxicity and behavioral abnormalities: Modulation of histone deacetylase activity*. Behav. Brain Res. 291: 306-314.
- Sharpe, M. E. (1979) *Identification of the lactic acid bacteria*. En: *Identification Methods for Microbiologists. 2nd Edition* (Eds.: Skinner, F. A. y Lovelock, D. W.), Academic Press, London, p. 246–255.
- Shi, T.; Aryantini, N. P. D.; Uchida, K.; Urashima, T. y Fukuda, K. (2014) *Enhancement of*

- exopolysaccharide production of Lactobacillus fermentum TDS030603 by modifying culture conditions*. Biosci. Microbiota Food Health. 33: 85-90.
- Shu, C. H. y Yang, S. T. (1990) *Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of Xanthomonas campestris*. Biotechnol. Bioeng. 35: 454-468.
- Sidebotham, R. (1974) *Dextrans*. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 30, 371-444.
- Siezen, R. J.; Tzeneva, V. A.; Castioni, A.; Wels, M.; Phan, H. T. K.; Rademaker, J. L.; Starrenburg, M. J.; Kleerebezem, M.; Molenaar, D.; van Hylckama Vlieg, J. E. (2010) *Phenotypic and genomic diversity of Lactobacillus plantarum strains isolated from various environmental niches*. Environ. Microbiol. 12: 758-773.
- Silvi, S.; Verdenelli, M. .; Orpianesi, C. y Cresci, A. (2003) *EU project Crownalife: functional foods, gut microflora and healthy ageing*. J. Food Eng. 56: 195-200.
- Sjöberg, A. y Hahn-Hägerdal, B. (1989) *Beta-glucose-1-phosphate, a possible mediator for polysaccharide formation in maltose-assimilating Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1549-54.
- Sousa, M.; Ardö, Y. y McSweeney, P. L. (2001) *Advances in the study of proteolysis during cheese ripening*. Int. Dairy J. 11: 327-345.
- St. Laurent, R.; O'Brien, L. M. y Ahmad, S. T. (2013) *Sodium butyrate improves locomotor impairment and early mortality in a rotenone-induced Drosophila model of Parkinson's disease*. Neuroscience 246: 382-390.
- Stephen, T. L.; Groneck, L. y Kalka-Moll, W. M. (2010) *The modulation of adaptive immune responses by bacterial zwitterionic polysaccharides*. Int. J. Microbiol. 2010: 917075.
- Stinglele, F. y Neeser, J. (1996) *Identification and characterization of the eps (Exopolysaccharide) gene cluster from Streptococcus thermophilus Sfi6*. J. Bacteriol. 178: 1680.
- Sutherland, I. W. (1972) *Bacterial exopolysaccharides*. Adv. Microb. Physiol. 8: 143-213.
- Szczesniak, A. S. (2002) *Texture is a sensory property*. Food Qual. Prefer. 13: 215-225.
- Tamime, A. Y. y Deeth, H. C. (1980) *Yogurt: Technology and Biochemistry*. J. Food Prot. 43: 939-977.
- Tattiyakul, M. (1997). *Studies on granule growth kinetics and characteristics of tapioca starch dispersion during gelatinization using particle size analysis and rheological methods*. Tesis de Maestría (Cornell University).
- Tedelind, S.; Westberg, F.; Kjerrulf, M. y Vidal, A. (2007) *Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory*

- bowel disease*. World J. Gastroenterol. 13: 2826.
- Teegarden, D. (2004) *Polymer Chemistry: Introduction to an Indispensable Science* (Eds.: Cocke, A.; Cusick, J y Smith, B.), NSTA Press, Arlington, Virginia.
- Terzaghi, B. E. y Sandine, W. E. (1975) *Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages*. Appl. Microbiol. 29: 807-13.
- Therneau, T. (2015) *A Package for Survival Analysis in S_*. version 2.38. <http://CRAN.R-project.org/package=survival>
- Thomas, T. D.; Turner, K. W. y Crow, V. L. (1980) *Galactose fermentation by Streptococcus lactis and Streptococcus cremoris: pathways, products, and regulation*. J. Bacteriol. 144: 672-82.
- Thompson, J. (1988) *Lactic acid bacteria: model systems for in vivo studies of sugar transport and metabolism in gram-positive organisms*. Biochimie 70: 325-36.
- Thompson, J. y Chassy, B. M. (1981) *Uptake and metabolism of sucrose by Streptococcus lactis*. J. Bacteriol. 147: 543-551.
- Thompson, K. y Collins, M. A. (1996) *Improvement in electroporation efficiency for Lactobacillus plantarum by the inclusion of high concentrations of glycine in the growth medium*. J. Microbiol. Methods 26: 73-79.
- Torino, M. I.; de Valdez, G. F. y Mozzi, F. (2015) *Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages*. Front. Microbiol. 6: 1-16.
- Torino, M. I.; Mozzi, F. y Font De Valdez, G. (2005) *Exopolysaccharide biosynthesis by Lactobacillus helveticus ATCC 15807*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 68: 259-265.
- Torino, M. I.; Sesma, F. y Font De Valdez, G. (2000) *Semi-defined media for the exopolysaccharide (EPS) production by Lactobacillus helveticus ATCC 15807 and evaluation of the components interfering with the EPS quantification*. Milchwissenschaft. 55. 314-319.
- Torino, M. I.; Taranto, M. P.; Sesma, F. y De Valdez, G. F. (2001) *Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by Lactobacillus helveticus ATCC 15807 in response to environmental pH*. J. Appl. Microbiol. 91: 846-852.
- Trautwein, E. A.; Rieckhoff, D. y Erbersdobler, H. F. (1998) *Dietary inulin lowers plasma cholesterol and triacylglycerol and alters biliary bile acid profile in hamsters*. J. Nutr. 128: 1937-43.
- Truusalu, K.; Naaber, P.; Kullisaar, T.; Tamm, H.; Mikelsaar, R.; Zilmer, K. y Mikelsaar, M. (2004) *The influence of antibacterial and antioxidative probiotic lactobacilli on gut mucosa in a mouse model of Salmonella infection*. Microb. Ecol. Health Dis. 16: 180-

- 187.
- Tuinier, R.; van Casteren, W. H. M.; Looijesteijn, P. J.; Schols, H. A.; Voragen, A. G. J. y Zoon, P. (2001) *Effects of structural modifications on some physical characteristics of exopolysaccharides from Lactococcus lactis*. Biopolymers 59: 160-166.
- Tuinier, R.; Zoon, P.; Olieman, C.; Cohen Stuart, M. A.; Fleer, G. J. y de Kruif, C. G. (1999) *Isolation and physical characterization of an exocellular polysaccharide*. Biopolymers 49: 1-9.
- Tynkkynen, S.; Satokari, R.; Saarela, M.; Mattila-Sandholm, T. y Saxelin, M. (1999) *Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of Lactobacillus rhamnosus and L. casei strains*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3908-14.
- van den Berg, D.; Robijn, G. W.; Janssen, A. C.; Giuseppin, M.; Vreeker, R.; Kamerling, J. P.; Vliegthart, J.; Ledebor, A. M y Verrips, C. T. (1995) *Production of a novel extracellular polysaccharide by Lactobacillus sake 0-1 and characterization of the polysaccharide*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2840-2844.
- van den Broek, L. A. M.; Hinz, S. W. A.; Beldman, G.; Vincken, J. P. y Voragen, A. G. J. (2008) *Bifidobacterium carbohydrases-their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics*. Mol. Nutr. Food Res. 52: 146-163.
- Van Dyk, J. S.; Low Ah Kee, N.; Frost, C. L. y Pletschke, B. I. (2012) *Extracellular polysaccharide production in Bacillus licheniformis SVD1 and its immunomodulatory effect*. BioResources 7(4): 4976-4993.
- Vanegas Pérez, L. (2009). *Evaluación del efecto del uso de hidrocoloides en la reología de un complemento nutricional líquido*. Tesis de maestría en Ingeniería Química (Universidad Nacional de Colombia).
- Van Geel-Schutten, G. H.; Faber, E. J.; Smit, E.; Bonting, K.; Smith, M. R.; Ten Brink, B.; Kamerling, J. P.; Vliegthart, J. F. y Dijkhuizen, L. (1999). *Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the Lactobacillus reuteri wild-type strain and by mutant strains*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3008-3014.
- van Hijum, S. A. F. T.; Kralj, S.; Ozimek, L. K.; Dijkhuizen, L. y van Geel-Schutten, I. G. H. (2006) *Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70: 157-176.
- van Kranenburg, R.; Marugg, J. D.; van Swam, I. I.; Willem, N. J. y de Vos, W. M. (1997) *Molecular characterization of the plasmid-encoded eps gene cluster essential for*

- exopolysaccharide biosynthesis in Lactococcus lactis*. Mol. Microbiol. 24: 387-97.
- van Kranenburg, R.; Vos, H. R.; van Swam, I. I.; Kleerebezem, M. y de Vos, W. M. (1999) *Functional analysis of glycosyltransferase genes from Lactococcus lactis and other gram-positive cocci: complementation, expression, and diversity*. J. Bacteriol. 181: 6347-53.
- Van Pijkeren, J. P.; Canchaya, C.; Ryan, K. A.; Li, Y.; Claesson, M. J.; Sheil, B.; Steidler, L.; O'Mahony, L.; Fitzgerald, G. F.; van Sinderen, D. y O'Toole, P. W. (2006) *Comparative and functional analysis of sortase-dependent proteins in the predicted secretome of Lactobacillus salivarius UCC118*. Appl. Environ. Microbiol. 72: 4143-4153.
- Vaningelgem, F.; Zamfir, M.; Adrian, T. y De Vuyst, L. (2004). *Fermentation conditions affecting the bacterial growth and exopolysaccharide production by Streptococcus thermophilus ST 111 in milk-based medium*. J. Appl. Microbiol. 97: 1257-1273.
- Vauterin, L.; Swings, J. y Kersters, K. (1993) *Protein electrophoresis and classification*. En *Handbook of New Bacterial Systematics* (Eds.: Goodfellow, M. y O'Donnell, A.G.) Academic Press: London, p. 251-280.
- Vedamuthu, E. R. y Neville, J. M. (1986) *Involvement of a plasmid in production of ropiness (mucoidness) in milk cultures by Streptococcus cremoris MS*. Appl. Environ. Microbiol. 51: 677-82.
- Ventura, M.; O'Flaherty, S.; Claesson, M. J.; Turrone, F.; Klaenhammer, T. R.; van Sinderen, D. y O'Toole, P. W. (2009) *Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics*. Nat. Rev. Microbiol. 7: 61-71.
- Ventura, M.; van Sinderen, D.; Fitzgerald, G. F. y Zink, R. (2004) *Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria*. Antonie Van Leeuwenhoek 86: 205-223.
- Vinderola, C. G.; Duarte, J.; Thangavel, D.; Perdigon, G.; Farnworth, E. y Matar, C. (2005) *Immunomodulating capacity of kefir*. J. Dairy Res. 72: 195-202.
- Vinderola, G.; Perdigon, G.; Duarte, J.; Farnworth, E.; y Matar, C. (2006) *Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by Lactobacillus kefirianofaciens on the gut mucosal immunity*. Cytokine 36: 254-260.
- Vreeker, R.; Pleijsier, M. T. y Ledebor, A. M. (2000) *Functional properties of exocellular polysaccharides in dairy based foods*. En: *Supramolecular and Colloidal Structures in Biomaterials and Biosubstrates (Proceedings of the Fifth Royal Society- Unilever Indo-UK Forum in Materials Science and Engineering)*, Mysore, India, p. 425-435.
- Wachi, S.; Kanmani, P.; Tomosada, Y.; Kobayashi, H.; Yuri, T.; Egusa, S.; Shimazu, T.; Suda, Y.; Aso, H.; Sugawara, M.; Saito, T.; Mishima, T.; Villena, J. y Kitazawa H. (2014)

- Lactobacillus delbrueckii TUA4408L and its extracellular polysaccharides attenuate enterotoxigenic Escherichia coli- induced inflammatory response in porcine intestinal epitheliocytes via Toll-like receptor-2 and 4.* Mol. Nutr. Food Res. 58: 2080-2093.
- Walker, A.; Cerdeño-Tárraga, A. y Bentley, S. (2006) *Faecal matters.* Nat. Rev. Microbiol. 4: 572-573.
- Walker, A. W.; Duncan, S. H.; McWilliam Leitch, E. C.; Child, M. W. y Flint, H. J. (2005) *pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon.* Appl. Environ. Microbiol. 71: 3692-3700.
- Wang, K.; Li, W. L.; Rui, X.; Chen, X. G.; Jiang, M. y Dong, M. (2014) *Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from Lactobacillus plantarum 70810.* Int. J. Biol. Macromol. 63: 133-139.
- Watson, K. G. y Holden, D. W. (2010) *Dynamics of growth and dissemination of Salmonella in vivo.* Cell. Microbiol. 12: 1389-1397.
- Welman, A. D. y Maddox, I. S. (2003) *Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges.* Trends Biotechnol. 21: 269-274.
- Welsh, J. y McClelland, M. (1990) *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers.* Nucleic Acids Res. 18: 7213-8.
- Willers, J.; Weiler, E. y Kolb, C. (1995) *Stimulation of the same B-cell population by thymus-independent dextran and by thymus-dependent oligosaccharide-carrier.* Scand. J. Immunol. 42: 345-52.
- Wolf, G.; Strahl, A.; Meisel, J. y Hammes, W. P. (1991) *Heme-dependent catalase activity of lactobacilli.* Int. J. Food Microbiol. 12: 133-140.
- Wu, C. Y.; Liang, Z. C.; Lu, C. P. y Wu, S. H. (2008) *Effect of carbon and nitrogen sources on the production and carbohydrate composition of exopolysaccharide by submerged culture of Pleurotus citrinopileatus.* J. Food Drug Anal. 16: 61-67.
- Yadav, V.; Prappulla, S. G.; Jha, A. y Poonia, A. (2011) *A novel exopolysaccharide from probiotic Lactobacillus fermentum CFR 2195: Production, purification and characterization Bacterial strains.* Biotechnol. Bioinforma. Bioeng. 1: 415-421.
- Yamamoto, Y.; Murosaki, S.; Yamauchi, R.; Kato, K. y Sone, Y. (1994) *Structural study on an exocellular polysaccharide produced by Lactobacillus helveticus TY1-2.* Carbohydr. Res. 261: 67-78.
- Yang, T.; Wu, K.; Wang, F.; Liang, X.; Liu, Q.; Li, G. y Li, Q. (2014) *Effect of exopolysaccharides from lactic acid bacteria on the texture and microstructure of*

- buffalo yoghurt*. *Int. Dairy J.* 34: 252-256.
- Yang, Z.; Staaf, M.; Huttunen, E. y Widmalm, G. (2000) *Structure of a viscous exopolysaccharide produced by Lactobacillus helveticus K16*. *Carbohydr. Res.* 329: 465-469.
- Yasuda, E.; Serata, M. y Sako, T. (2009) *Suppressive effect on activation of macrophages by Lactobacillus casei strain Shirota genes determining the synthesis of cell wall-associated polysaccharides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 1221-1221.
- Yother, J. (2011) *Capsules of Streptococcus pneumoniae and other bacteria: Paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation*. *Annu. Rev. Microbiol.* 65: 563-581.
- Zacarías, M. F.; Binetti, A.; Laco, M.; Reinheimer, J. y Vinderola, G. (2011) *Preliminary technological and potential probiotic characterisation of bifidobacteria isolated from breast milk for use in dairy products*. *Int. Dairy J.* 21: 548-555.
- Zacarías, M. F.; Reinheimer, J.; Forzani, L.; Grangette, C. y Vinderola, G. (2014) *Mortality and translocation assay to study the protective capacity of Bifidobacterium lactis INLI against Salmonella Typhimurium infection in mice*. *Benef. Microbes* 5: 427-436.
- Zannini, E.; Waters, D. M.; Coffey, A. y Arendt, E. K. (2016) *Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100: 1121-1135.
- Zhang, L.; Folkenberg, D. M.; Amigo, J. M. y Ipsen, R. (2016) *Effect of exopolysaccharide-producing starter cultures and post-fermentation mechanical treatment on textural properties and microstructure of low fat yoghurt*. *Int. Dairy J.* 53: 10-19.
- Zhang, Y.; Li, S.; Zhang, C.; Luo, Y.; Zhang, H. y Yang, Z. (2011) *Growth and exopolysaccharide production by Lactobacillus fermentum F6 in skim milk*. *African J. Biotechnol.* 10: 2080-2091.
- Zhang, Y.; Zhou, L.; Bao, Y. L.; Wu, Y.; Yu, C. L.; Huang, Y. X.; Sun, Y.; Zheng, L. H. y Li, Y. X. (2010) *Butyrate induces cell apoptosis through activation of JNK MAP kinase pathway in human colon cancer RKO cells*. *Chem. Biol. Interact.* 185: 174-181.
- Zisu, B. y Shah, N. P. (2003) *Effects of pH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of exopolysaccharides by Streptococcus thermophilus 1275*. *J. Dairy Sci.* 86: 3405-3415.
- Zisu, B. y Shah, N. P. (2005) *Textural and functional changes in low-fat Mozzarella cheeses in relation to proteolysis and microstructure as influenced by the use of fat replacers, pre-acidification and EPS starter*. *Int. Dairy J.* 15: 957-972.
- Zisu, B. y Shah, N. P. (2007) *Texture characteristics and pizza bake properties of low-fat*

- Mozzarella cheese as influenced by pre-acidification with citric acid and use of encapsulated and ropy exopolysaccharide producing cultures.* Int. Dairy J. 17: 985-997.
- Zivkovic, M.; Hidalgo-Cantabrana, C.; Kojic, M.; Gueimonde, M.; Golic, N. y Ruas-Madiedo, P. (2015) *Capability of exopolysaccharide-producing Lactobacillus paraplantarum BGCG11 and its non-producing isogenic strain NB1, to counteract the effect of enteropathogens upon the epithelial cell line HT29-MTX.* Food Res. Int. 74: 199-207.
- Zoon, P.; van Vliet, T. y Walstra, P. (1988) *Rheological properties of rennet-induced skim milk gels 2. the effect of temperature.* Neth. Milk Dairy J. 42: 271-294.
- Zoumpopoulou, G.; Foligne, B.; Christodoulou, K.; Granette, C.; Pot, B. y Tsakalidou, E. (2008). *Lactobacillus fermentum ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and Salmonella infection in murine models.* Int. J. Food Microbiol. 121: 18-26.