UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y VISUALIZACIÓN DEL CONSORCIO MICROBIANO DEL KÉFIR DE ORIGEN MEXICANO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MARTHA ESTEFANÍA VÁZQUEZ CRUZ

DIRIGIDA POR

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2015

REPOSITORIO INSTITUCIONAL DGBSDI-UAQ

La presente obra está bajo la licencia:
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es

CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.

NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .

SinDerivadas — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad, o derechos morales pueden limitar la forma en que utilice el material.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y VISUALIZACIÓN DEL CONSORCIO MICROBIANO DEL KÉFIR DE ORIGEN MEXICANO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MARTHA ESTEFANÍA VÁZQUEZ CRUZ

DIRIGIDA POR

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SINODALES

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ _____

DIRECTOR

Dra. BLANCA GARCÍA ALMENDÁREZ _____

SINODAL

Dr. ALDO AMARO REYES _____

SINODAL

Dr. RAFAEL CAMPOS MONTIEL _____

SINODAL

It was like a new world opened to me, the world of science,
which I was at last permitted to know in all liberty.
– Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Josué López, por su incondicional apoyo, amistad y alegría.
A la Dra. Elvia Hernández, por su amabilidad y por motivarme a publicar.
Al Dr. Jorge Gracida por su asesoría durante la realización de mis experimentos.
A Daniel Guevara y Ma. Lourdes Vázquez, por la donación de gránulos.
Al Dr. Juan Caballero, por su ayuda en bioinformática.
Al Dr. Aldo Amaro, por su valiosa retroalimentación y observaciones de mi trabajo.
A la Dra. Susana Flores, por su apoyo sincero y cálida amistad durante estos años.
A Ángel Granados Arvizu, por su espontaneidad y buen humor en el laboratorio.
A Víctor Hernández, por su ayuda y paciencia con las lecturas de Nanodrop.
A Ivanna, Rodrigo, Teresita y todos los chicos del Laboratorio de Biotecnología de Alimentos.
Al Dr. Gerardo Nava y a sus alumnos, Ricardo Ahumada y Yajaira.
A Lourdes Morales, por las enseñanzas de vida y sobretodo de carácter.
A Libby, por los momentos de pláticas en la oficina y por sus buenos consejos.
A la Dra. Angelina Rodríguez por ser un ejemplo a seguir como persona, mujer y científica.
A todos los maestros ejemplares que compartieron un poco de su conocimiento y pasión, gracias por sembrar el espíritu del amor por la ciencia en todos y cada uno de sus alumnos. Me siento afortunada de haber contado con maestros como ustedes, quienes forjar a los futuros profesionistas de nuestro país. A la Dra. Laura Berúmen, el Dr. Sergio Romero Gómez, la Dra. Beatriz Mayorga, la Dra. Minerva Ramos Gómez, el Dr. Ramón Martínez Peniche.
A Carla, Fer, Mariana y Monsi, por haber formado parte de un camino de aventuras durante los años en que compartimos proyectos, desvelos, café, crepas, anécdotas, música, aprendizaje, desacuerdos, crecimiento, altibajos, estrés, llanto, buen humor, sonrisas y una linda amistad. La vida nos distancía pero los gratos recuerdos permanecen intactos.
Al Director de la Faculta de Química, el M.S.P. Sergio Pacheco, por su gran apoyo cuando salí del país en representación de mi estado y de mi universidad.
Al Rector de mi Alma Máter, el Dr. Gilberto Herrera Ruiz, por ser una fuente de inspiración en el hacer de las cosas, de mentalidad, de liderazgo y por impulsar la generación de conocimiento en beneficio de la sociedad.
A la Dra. Blanca García y a mi director de tesis, el Dr. Carlos Regalado, por ser ambos un modelo a seguir, por preocuparse por el futuro de sus estudiantes y por ser los pilares de la academia de Biotecnología en la Universidad.
A mi familia, faltan las palabras ya que sin ustedes nunca nada hubiera sido posible. A mi Padre, a mi Madre, a Bibi, a Lalo, y a mirruñis, mi leal acompañante. Gracias por tanto.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	
1.1 Demanda de productos saludables	1
1.2 Estilo de vida y hábitos alimenticios en el mundo globalizado	1
1.3 Obesidad en México	3
1.4 Probióticos	3
1.5 Kéfir	3
1.5.1 Particularidades	4
1.5.2 Producción de exopolisacáridos	6
1.5.3 Diversidad microbiana y estructura de la comunidad	6
1.5.4 Propiedades funcionales	9
1.5.5 Composición química	11
1.6 Diferencias entre kéfir y yogur	12
1.7 Kéfir en el mundo	12
1.7.1 Kéfir en México	14
1.7.1.1 Competencia en el mercado	14
1.7.1.2 Norma Mexicana para leches fermentadas	16
1.8 Propuesta de producto a base de kéfir	17
1.9 Identificación metagenómica de microorganismos	19
1.9.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	20
1.9.2 Amplificación del gen 16S rRNA para la identificación de bacterias	22
1.9.3 Amplificación de la región ITS para la identificación de levaduras	23

1.10 Bioinformática y análisis de secuencias 24
1.10.1 Similitud de secuencias 25
1.11 Filogenia 26
1.12 Microscopía electrónica de barrido 26
1.13 Hibridación fluorescente *in situ* 27
2. HIPÓTESIS 29
3. OBJETIVOS 30
3.1 General 30
3.2 Específicos 30
4. METODOLOGÍA 31
4.1 Materiales y métodos 31
4.1.1 Obtención de gránulos 31
4.2 Elaboración de kéfir 31
4.3 Preparación de las muestras 32
4.4 Extracción de DNA 34
4.4.1 Cuantificación de DNA 35
4.4.2 Visualización de DNA 35
4.5 Caracterización molecular 36
4.5.1 Amplificación de la región V4/V5 del gen 16S rRNA para identificación de bacterias 36
4.5.2 Amplificación de la región ITS1 para identificación de levaduras 37
4.5.3 Purificación de los productos de PCR 37
4.5.4 Visualización de los productos de PCR 38
4.5.5 Cuantificación de los productos de PCR 39
4.5.6 Secuenciación 39
4.5.6.1 Análisis comparativo de secuencias 39
4.5.6.2 Construcción de dendogramas 40
4.6 Visualización óptica mediante microscopía electrónica de barrido 41

4.6.1 Preparación de la muestra 41
4.6.2 Fijación 42
4.6.3 Pos-fijación 43
4.6.4 Preparación de OsO_4 al 2 % 43
4.6.5 Deshidratación 44
4.6.6 Secado a punto crítico 45
4.6.7 Recubrimiento con oro 46
4.6.8 Observación 46
4.7 Visualización mediante hibridación fluorescente *in situ* 47
5. RESULTADOS 50
5.1 Imágenes de hibridación fluorescente *in situ* 51
5.1.1 Identificación de bacterias con la sonda EUB 338 51
5.1.2 Identificación de levaduras con la sonda PF2 52
5.2 Imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) 55
5.3 Análisis molecular 65
5.3.1 Amplificación bacteriana 65
5.3.2 Amplificación de levaduras 67
5.4 Comunidades microbianas identificadas 68
5.4.1 Bacterias identificadas en los gránulos de kéfir 69
5.4.2 Bacterias identificadas en la bebida fermentada de kéfir 70
5.4.3 Levaduras identificadas en los gránulos de kéfir 70
5.4.4 Levaduras identificadas en la bebida de kéfir 71
5.5 Relación filogenética 71
6. DISCUSIÓN 75
6.1 Extracción de DNA y exopolisacáridos 75
6.2 Especificidad de los oligonucleótidos utilizados 75
6.3 Especies identificadas 76
6.4 Relación filogenética 77
6.5 Distribución de los microorganismos en los gránulos de kéfir 78

6.6 Relación simbiótica e interacciones en el kéfir 79
6.7 Análisis de comunidades microbianas complejas 79
6.8 Factores que influyen en la identificación de las especies microbianas del kéfir 80
6.8.1 Condiciones de fermentación 80
6.8.2 Abundancia variable de especies 80
6.8.3 Ausencia de especies contaminantes 80
6.9 Comparación de resultados con reportes recientes 81
7. CONCLUSIONES 83
8. REFERENCIAS 84
ANEXOS 94

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición química del kéfir	7
2	Microbiota bacteriana reportada en distintos lotes de kéfir	9
3	Especies bacterianas aisladas de kéfir reportadas por diversos grupos de investigación	10
4	Especies de levaduras aisladas de kéfir reportadas por diversos grupos de investigación	13
5	Composición nutricional del kéfir	15
6	Bebidas lácteas fermentadas disponibles en el mercado	18
7	Oligonucleótidos utilizados para PCR	36
8	Región amplificada para la identificación de bacterias	38
9	Región amplificada para la identificación de levaduras	40
10	Sondas utilizadas para la identificación de bacterias y levaduras en los gránulos de kéfir mediante hibridación fluorescente *in situ*	49
11	Resumen del análisis de secuencias, bacterias identificadas en los gránulos y en la bebida fermentada de kéfir	68
12	Resumen del análisis de secuencias, levaduras identificadas en los gránulos y en la bebida de kéfir	70
13	Bacterias y levaduras que recientemente se han encontrado en kéfir	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Gránulos de kéfir	5
2	Estructura primaria de la molécula de kefirano	7
3	Efectos probióticos del kéfir	11
4	Micrografía electrónica de la superficie de gránulos de kéfir	12
5	Lifeway® Technologies, principal marca de kéfir a nivel mundial	16
6	Diagrama esquemático que resume algunas de las propiedades funcionales que han sido reportadas en el kéfir	19
7	Regiones variables y conservadas en el gen 16S rRNA bacteriano, localización de oligonucleótidos para su secuenciación	23
8	Organización de los genes ribosomales y regiones blanco para oligonucleótidos en la amplificación de levaduras	25
9	Gránulos de kéfir en reactor de 1 L. Adición de leche pasteurizada e incubación a temperatura ambiente para iniciar fermentación	32
10	A) Gránulos de kéfir después de 24 h de fermentación y filtración B) Bebida de kéfir con consistencia líquida y presencia de burbujas por la liberación de CO_2	33
11	Homogenización de los gránulos de kéfir con el equipo Seward, Mod. Stomacher® 400 circulator	34
12	Columnas “PowerBead Tube” de MOBIO® con muestras de kéfir	34
13	A) Muestras de kéfir durante extracción de DNA B) Muestras en incubación en hielo, como parte del protocolo de aislamiento de DNA	35
14	A) Equipo homogenizador PowerLyzer® utilizado en el protocolo de extracción para lisar las células B) Muestras de DNA de kéfir listas para almacenamiento a -4 ºC	35

15	Componentes de la reacción en cadena de la polimerasa: dNTP mix, $MgCl_2$, oligonucleótidos ITS1F e ITS2 para amplificación de levaduras, TAQ pol y muestras de DNA íntegro	37
16	Purificación de fragmentos a partir de gel agarosa utilizando el el paquete “PureLink PCR Purification Kit®” de invitrogen	38
17	Sistema horizontal de electroforesis utilizado para visualizar los productos de PCR en gel de agarosa al 1 % (p/v)	39
18	Gránulo de kéfir previo a preparación para microscopía electrónica de barrido	41
19	A) Fijación con glutaraldehído al 2.5 % (v/v) B) Muestras de gránulos de kéfir después de la fijación	42
20	Estructura química del tetróxido de osmio (OsO_4)	43
21	A) Manipulación del empaque de tetróxido de osmio B) Manejo de OsO_4 en campana utilizando equipo de protección	44
22	A) Cristales de tetróxido de osmio en disolución 24 h B) Oscurecimiento de gránulos de kéfir por efecto de la posfijación	45
23	A) Muestra de gránulos de kéfir durante deshidratación B) Muestras durante secado a punto crítico	46
24	Recubrimiento con partículas de oro	46
25	Microscopio electrónico de barrido Carl Zeiss (Mod. AG - EVO® 50) y colocación de muestras en el microscopio	47
26	Visualización de las muestras en el microscopio de fluorescencia. Búsqueda del filtro y objetivo adecuado para una mejor observación	49
27	Polímero de kefirano que nubla la visualización de los microorganismos	50
28	Hibridación de la sonda EUB338 con la región 16S rRNA bacteriana. Se observan las bacterias emitiendo fluoresceína. Magnificación 63X	51
29	Hibridación de la sonda EUB338 con la región 16S rRN de las	51

bacterias presentes. Se observa la emisión de fluoresceína. Magnificación 63X
30 Hibridación de la sonda EUB338 con la región 16S rRNA de las bacterias presentes. Se observa la emisión de fluoresceína. Magnificación 20X y 40X 52
31 Emisión de fluoresceína por la hibridación de la sonda EUB338. Bacterias presentes en el borde del portaobjetos. Magnificación 20X y 40X 52
32 Las levaduras muestran fluorescencia roja. Magnificación 20X 53
33 Hibridación de la sonda PF2 con la región 18S rRNA de levaduras presentes. Se observa la emisión del fluoróforo rojo texas. Magnificación 40X 53
34 Hibridación de la sonda PF2 con la región 18S rRNA de las levaduras presentes. Magnificación 40X 54
35 Identificación y visualización de las levaduras dentro de su microhábitat en los gránulos de kéfir. Magnificación 20X 54
36 Imagen macroscópica de gránulos de kéfir. Superficie irregular y multilobular. Presentan elasticidad y textura viscosa 55
37 Micrografía electrónica de la superficie externa del gránulo de kéfir. Aumento 48X 56
38 Micrografía electrónica de la superficie externa del gránulo de kéfir. Aumento 122X 57
39 Superficie externa del gránulo de kéfir. Aumento 1,300X 57
40 Superficie externa del gránulo de kéfir. Aumento 2,270X. Se observa material fibrilar (polímero de kefirano) 58
41 Superficie externa del gránulo de kéfir. Aumento 2,520X y 2,920X. Se observa material fibrilar (polímero de kefirano) 58
42 Superficie externa del gránulo de kéfir. Aumento 4,160X. Se observa material fibrilar (polímero de kefirano) 59
43 Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 4,340X. 59

Microorganismos inmovilizados en la matriz de polisacárido y proteína
44 Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 4,910X. Alta densidad celular. Se observa que diversas especies coexisten en una asociación simbiótica dentro de los gránulos de kéfir 60
45 Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 5,010X. Abundantes lactobacilos y pocas levaduras 60
46 Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 5,120X. Se observa el polímero de kefirano 61
47 Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 6,700X. Se observa el polímero de kefirano 61
48 Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 7,280X. Se observan lactobacilos y un par de levaduras embebidas en material fibrilar (polímero de kefirano) 62
49 Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 7,450X. Se observan lactobacilos y un par de levaduras embebidas en material fibrilar (polímero de kefirano) 62
50 Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 8,600X. Se observan lactobacilos en material fibrilar (polímero de kefirano) 63
51 Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 11,770X. Observación de levaduras 63
52 Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 17,110X. Se observan lactobacilos cortos y largos así como material fibrilar 64
53 Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 18,950X. Se observan lactobacilos cortos y largos así como material fibrilar 64
54 Muestras de la extracción de DNA visualizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) 65
55 Productos de la amplificación de la región V4-V5 del gen 16S rRNA de la población bacteriana en la bebida de kéfir 66
56 Imagen de gel de agarosa correspondiente a la amplificación de 66

la región V4-V5 del gen 16S rRNA de la población bacteriana en gránulos de kéfir

57 Imagen de gel de agarosa correspondiente a la amplificación de la región intergénica ITS1 rRNA de levaduras en muestras de bebida fermentada de kéfir 67

58 Amplificación de la región intergénica ITS1 rRNA de levaduras utilizando los oligonucleótidos universales ITS1F e ITS2 en muestras de gránulos de kéfir 67

59 Alineamiento de la secuencia bacteriana del gen 16S rRNA respecto a *Lactobacillus kefiranofaciens* 69

60 Alineamiento de la secuencia de levadura obtenida de la región ITS1 respecto a *Kazachstania unispora* 71

61 Construcción del árbol filogenético de la población bacteriana del kéfir, basado en el análisis de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood Phylogenetic Tree) (MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 72

62 Representación circular del árbol filogenético de la población bacteriana del kéfir 73

63 Construcción del árbol filogenético de la población de levaduras del kéfir, basado en el análisis de máxima verosimilitud 73

64 Representación circular del árbol filogenético de la población de levaduras del kéfir 74

RESUMEN

El kéfir es una bebida fermentada, que muestra una simbiosis entre bacterias y levaduras. Es considerado un alimento probiótico, aunque presenta poblaciones microbianas variables dependiendo de su origen geográfico. En México no existe un producto comercial a base de kéfir, ni estudios reportados en gránulos de origen mexicano. El objetivo del presente trabajo fue identificar las especies microbianas en los gránulos y en la bebida fermentada de kéfir. Se preparó kéfir a partir de gránulos de la ciudad de Querétaro, Qro. y de Dolores Hidalgo, Gto. Se realizó la extracción de DNA genómico y se caracterizó a las bacterias presentes mediante la amplificación de la región V4-V5 del gen 16S rRNA; en el caso de levaduras se utilizó la región ITS1 como marcador molecular. Se realizó un análisis bioinformático de similitud de secuencias, identificándose 6 especies de bacterias (*Lactobacillus kefiranofaciens, Lb. kefiranofaciens subs. kefirgranum, Lb. helveticus, Acetobacter syzygii, Ac. pasteurianus* y *Ac. ghanensis*) y 4 de levaduras: *Kazachstania unisporus, Saccharomyces cerevisiae, S. unisporus* y *Kazachstania servazz*i. Se observó la relación filogenética entre estas especies mediante la construcción de dendogramas. Por otra parte, se visualizó mediante microscopía electrónica de barrido e hibridación fluorescente *in situ*, la distribución e interacción de las bacterias y levaduras presentes. El presente estudio permitió identificar y visualizar el consorcio microbiano del kéfir de origen mexicano. El desarrollo y comercialización de una bebida a base de kéfir, podría tener un rol importante en el mercado nacional así como impactar de manera positiva la salud de la población mexicana.

1. ANTECEDENTES

1.1 Demanda de productos saludables

Hoy en día la población comienza a optar por alternativas saludables en alimentación, a raíz del acceso a la información y a una mayor adquisición de conocimiento que resulta en un incremento favorable de concientización social. Los consumidores demandan alimentos de mayor calidad, alternativas a las bebidas con saborizantes y colorantes artificiales en exceso, mismos que en los últimos años han mostrado ser perjudiciales para la salud. Se reporta información que valida la importancia de volver a las costumbres alimenticias antiguas, así como el impacto positivo de realizar actividad física y mantener un estilo de vida saludable. En el mercado internacional, el futuro de la industria alimentaria se encuentra dirigido a los productos saludables.

1.2 Estilo de vida y hábitos alimenticios en el mundo globalizado

En las últimas décadas el número de enfermedades crónicas que aquejan a la población mundial ha ido en aumento. Se ha demostrado que el origen de varios trastornos se encuentra en los altos niveles de estrés y al actual estilo de vida. En un mundo globalizado, caótico y cada vez más acelerado, la productividad exigida en la vida laboral es mayor y el tiempo con el que se cuenta para realizar actividades del día a día parece menor. Ello desemboca en que las personas hagan a un lado la actividad física por falta de tiempo, optando además, por el consumo de comida “rápida” en lugar de elaborar alimentos caseros con mayor densidad nutricional.

La irregularidad en el patrón de comidas, el consumo elevado de bebidas con contenido alcohólico, el seguimiento de dietas nutricionalmente inadecuadas, la elevada incidencia de los trastornos de la conducta alimentaria, entre otros hábitos, tienen un impacto negativo en la salud de la población mundial.

1.3 Obesidad en México

México ocupa el primer lugar mundial en obesidad infantil, y el segundo en obesidad en adultos, precedido sólo por los Estados Unidos. Problema que está presente no sólo en la infancia y la adolescencia, sino también en población en edad preescolar (UNICEF, 2015).

Datos del ENSANUT (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición) indican que uno de cada tres adolescentes de entre 12 y 19 años presenta sobrepeso u obesidad. Para los escolares, la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad ascendió un promedio del 26 % para ambos sexos, lo cual representa más de 4.1 millones de escolares conviviendo con este problema (ENSANUT, 2012).

La principal causa a la que se atribuye son los malos hábitos en la alimentación, que lleva hacia una prevalencia del sobrepeso de un 70 % en la edad adulta. A largo plazo, la obesidad favorece la aparición de enfermedades tales como diabetes, infartos, altos niveles de colesterol o insuficiencia renal, entre otros.

Actualmente, la diabetes es el mayor problema al que se enfrenta el sistema nacional de salud, es la principal causa de muerte en adultos, la primera causa de demanda de atención médica y la enfermedad que consume el mayor porcentaje de gastos en las instituciones públicas. (UNICEF, 2015).

Se prevé que para el año 2025 se duplique a 300 millones el número de personas con diabetes relacionada con la obesidad y tres cuartas partes de ese aumento corresponde al mundo en desarrollo (Organización para la Alimentación y la Agricultura: FAO, 2015). La experiencia ha demostrado que una correcta alimentación previene los problemas de sobrepeso y obesidad. Se requiere de la investigación así como el desarrollo de productos que ofrezcan alternativas saludables a la población.

1.4 Probióticos

El desarrollo de alimentos funcionales es una de las áreas de investigación de mayor relevancia en la actualidad. Está adquiriendo, además, gran importancia económica debido a la creciente demanda por parte de los consumidores que buscan productos con efectos benéficos para la salud y con características sensoriales y reológicas atractivas. De acuerdo a la definición establecida por la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), los probióticos se definen como microorganismos vivos que tras ser administrados en las cantidades adecuadas, proporcionan un beneficio a la salud del huésped.

Los probióticos pueden son preparados de células microbianas o de componentes de células microbianas que tienen un efecto benéfico en la salud y bienestar del huésped que los ingiere (Salminen, 1999). Un probiótico mejora al menos una de las tres funciones principales de la microbiota normal del tracto gastrointestinal: resistencia a colonización, inmunomodulación o contribución nutricional, cuando este es ingerido ya sea por un humano o por un animal (Martín, 2004).

De acuerdo a previas definiciones, un probiótico debe de tener como mínimo las siguientes características: 1) debe de encontrarse vivo al momento de ser administrado, 2) debe haber pasado por una evaluación rigurosa que sustente los beneficios a la salud, 3) debe ser un microorganismo o un conjunto de microorganismos bien definidos taxonómicamente en cuanto a género y especie, y 4) debe de ser seguro su uso para los fines deseados (FAO, 2006).

1.5 Kéfir

La palabra kéfir viene del turco “Keif”, que significa sentirse bien, haciendo alusión a la sensación de bienestar después de ser ingerido. El kéfir es una bebida láctea fermentada, originaria de Europa del Este, que se obtiene mediante fermentación láctica y alcohólica (Assadi y col., 2000; Yaman y col., 2006). Se cree que se

originó en las montañas caucásicas de Rusia hace cientos de años y ha sido consumido por personas alrededor del mundo tanto en el pasado como en la actualidad (Garrote y col., 1997).

El cultivo iniciador de kéfir, en forma de gránulos, es incorporado a la leche, llevándose a cabo el proceso de fermentación ácido láctica y alcohólica, el kéfir es recuperado a partir de una matriz granulosa, utilizándose para el siguiente proceso de fermentación (Witthun y col., 2004). El kéfir y los productos relacionados con el mismo están comercializándose recientemente como productos nutraceúticos. Sus atributos nutricionales son atractivos debido a que contiene nutrientes vitales y péptidos bioactivos.

Debido a que el kéfir contiene una mezcla de bacterias probióticas y levaduras (Farnworth, 2005; Lopitz, 2006), es considerada como un producto funcional que ha demostrado poseer efectos benéficos para la salud humana, teniendo un alto valor nutricional, biológico y dietético. El kéfir es conocido por su capacidad de disminuir el riesgo de enfermedades crónicas y se recomienda su consumo a pacientes que presentan hipertensión, alergias, enfermedades gastrointestinales y metabólicas (Zubillaga y col., 2001; Otles y Cagindi, 2003).

De acuerdo con Ahmed y col. (2013), el kéfir es benéfico para la alimentación de niños pequeños, fortaleciendo su sistema inmune y promoviendo su incremento de peso. Además, su facilidad para ser digerido ha hecho que se recomiende el kéfir como un alimento benéfico para personas convalecientes o de edad avanzada (Ahmed y col., 2013).

1.5.1 Particularidades del kéfir

El kéfir es una bebida a base de leche, producto tanto de fermentación láctica como alcohólica, lo cual le otorga características particulares. Uno de sus atributos es la presencia de dióxido de carbono (CO_2) que es producido por las levaduras que

habitan dentro de los gránulos, otorgándole a la bebida una consistencia espumosa. Existen 2 tipos de fermentados de kéfir, el de leche que es el más usual y el de agua que implica la fermentación de agua azucarada. El inóculo utilizado para preparar kéfir es muy singular, se trata de una simbiosis de microorganismos (levaduras y bacterias) atrapados en una matriz de polisacáridos, formando masas del tamaño de granos de arroz o más grandes, que reciben el nombre de gránulos de kéfir (Figura 1). Así, el inóculo se encuentra inmovilizado en un soporte producido por él mismo y permite su reutilización, retirándolo por filtración para volver a ser usado en otro lote.

La matriz está formada por un polisacárido de glucosa y galactosa, que recibe el nombre de kefirano, constituido en un 24 % por carbohidratos y en un 13 % por proteína. La bebida de kéfir presenta una acidez de 0.7 % a 1 % debido al ácido láctico y un contenido de etanol del 1 %. Contiene además, diacetilo, acetaldehído y acetoína los cuales contribuyen a su sabor característico (Cuadro 1).

El kéfir difiere de otros productos fermentados debido a que no es resultado de la actividad metabólica de una sola especie o de un par de especies, es resultado del metabolismo de una gran cantidad de especies microbianas (Farnworth, 2008). La población provee la síntesis de metabolitos bioactivos que son esenciales para el crecimiento de los gránulos y para la inhibición de otros microorganismos patógenos.

Figura 1**.** Gránulos de kéfir.

1.5.2 Producción de exopolisacáridos (EPS)

La microflora de los gránulos de kéfir se encuentra en una matriz de proteínas y polisacáridos (La Riviere y col., 1967; Marshall y col., 1984; Bottazzi y col., 1994). Algunas especies de bacterias ácido lácticas se caracterizan por producir polisacáridos extracelulares (EPS) lo cual contribuye a la textura de los gránulos y al fermentado (Yokoi y col., 1990). El polisacárido producido por los microorganismos de los gránulos se conoce como kefirano (Figura 2). Las vías metabólicas que llevan a la producción de kefirano aún no se entienden completamente, sin embargo, se sabe que está compuesto por unidades repetidas de glucogalactano al igual que D-glucosa y D-galactosa (La Riviere y Kooiman, 1967; Mukai y col., 1992; Piermaria, 2008). Su peso molecular es de 1,000 - 4,000 kDa (Yokoi y col., 1990).

El kefirano puede afectar las propiedades reológicas, por ejemplo, se ha reportado que mejora la textura y la sensación en la boca. Además, de acuerdo con Vinderola y col. (2005) presenta propiedades inmunoestimulatorias, antimutagénicas y actúa como compuesto prebiótico.

1.5.3 Diversidad microbiana y estructura dinámica de la comunidad

Los gránulos del kéfir contienen una mezcla compleja de microorganismos por lo cual son considerados una estructura dinámica. Se cree que las bacterias y levaduras se encuentran en una relación simbiótica en la cual comparten sus bioproductos como fuerte de energía, o como estimulantes de crecimiento para sobrevivir o multiplicarse en el mismo entorno (Lopitz y col., 2006).

Estudios han revelado la presencia de *Kluveromyces, Saccharomyces, Candida* y *Torulaspora* (Lin y col., 1999; Simova y col., 2002; Loretan y col., 2003). Estudios basados en análisis molecular han identificado a *Kazachstania* (Zhon y col., 2009; Magalhaes y col., 2011; Gao y col., 2012). *Lb. kefiranofaciens* y la levadura *C. kéfir.*

Cuadro 1. Composición química del kéfir.

Compuesto	Cantidad
Valor de pH	4.0 - 4.5
Materia grasa	Depende de la fuente de la leche (cabra, vaca, yegua) 3.5g / 100 g
Proteína	3 - 3.4 g / 100 g
Lactosa	2 - 3.5 g / 100 g
Ácido láctico	0.6 - 1 %
Ácidos orgánicos	Los principales ácidos que contiene son el acético, fórmico, succínico, caproíco, caprílico, laúrico.
Etanol	0.5 – 2 %
CO_2	0.08 - 0.2 %
Vitaminas	Tiamina, piridoxina, ácido fólico
Compuestos aromáticos	Acetaldehído, diacetilo, acetona

se han reportado como flora dominante, también se ha identificado a *L. mesenteroides ss. mesenteroides*, *L. mesenteroides ss. cremoris*, *Lb. brevis* y *L. casei ss. casei,* entre otros (Cheirslip y col., 2003).

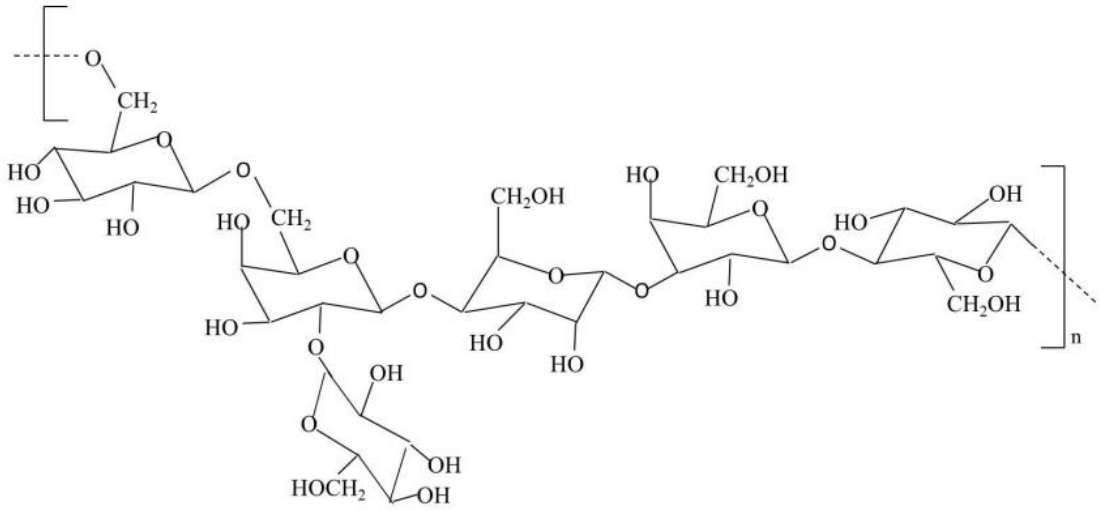


Figura 2. Estructura primaria de la molécula de kefirano (Micheli y col., 1999).

Algunas especies de levaduras, además de producir estimulantes que activan a las bacterias ácido-lácticas, también metabolizan una porción del ácido láctico de su entorno. El etanol y dióxido de carbono es producido por ellas. Las bacterias en el kéfir, contribuyen a la producción de ácido láctico, el cual preserva la leche, producen también varios compuestos antimicrobianos que a su vez otorgan sabores característicos (v.g. acetaldehído). Así mismo, metabolitos (v.g. polisacáridos extracelulares), aminoácidos libres y vitaminas (Guzel-Seydim, 2011).

Los microorganismos compiten unos con otros, un ejemplo de ello es en contra de patógenos potenciales, permitiendo que el kéfir sea un sistema ecológico libre de patógenos (Lopitz y col., 2006). La población microbiana produce ácido láctico y sustancias antimicrobianas que previenen la proliferación de agentes de deterioro en el kéfir (Santos y col., 2003; Farnworth, 2005).

La presencia de microorganismos se puede observar tanto en los gránulos como en la bebida de kéfir después del proceso de fermentación (Chen y col., 2008). Witthuhn y col. (2004) concluyeron que los valores variaban entre $6.4x10^4$ y $8.5x10^8$ UFC/g para las especies bacterianas y de $1.5x10^5$ a $3.7x10^8$ UFC/g para las especies de levaduras, utilizando distintos medios selectivos.

La diversidad microbiana del kéfir puede cambiar de acuerdo con el método de cultivo, el origen de los gránulos y la leche utilizada (Schoever, 2003; Ninane y col., 2005). Esta diversidad junto con las interacciones entre los microorganismos, pueden determinar las propiedades probióticas y terapéuticas del producto final.

El estudio de las especies bacterianas con propiedades benéficas para el ser humano es un tema de suma importancia para la salud pública y en la industria alimentaria. En los Cuadros 2 y 3 se muestran las principales especies de bacterias que han sido reportadas en el kéfir por distintos grupos de investigación. En el Cuadro 4 se observan las levaduras que han sido identificadas.

Cuadro 2. Microbiota bacteriana reportada en distintos lotes de kéfir (Dobson y col., 2011).

Lactobacilos	Otras bacterias
L. acidophilus	*Lactococcus lactis subsp. cremoris*
L. brevis	*Lactococcus lactis subsp. lactis*
L. casei subsp. casei	*Streptococcus thermophilus*
L. paracaseri subsp. paracase	*Streptococcus durans*
L. fermentum	*Enterococcus durans*
L. delbrueckii subsp. Bulgaricus	*Leuconostoc. mesenteroides subsp.*
L. helveticus	*cremoris*
L. kefiri	*Leuconostoc mesenteroides subsp.*
L. kefiranofaciens subsp. kefiranofaciens	*mesenteroides*
L. kefiranofaciens subsp. kefirgranum	*Acetobacter aceti*
L. delbrueckii subsp. lactis	
L. parakefiri	
L. plantarum	

1.5.4 Propiedades funcionales

La principal virtud del kéfir se centra en su capacidad de regenerar la flora intestinal, logrando una mejor asimilación de los alimentos y regulando la función intestinal. Facilita además, la digestión de la leche, ya que durante la fermentación del kéfir, las bacterias descomponen la lactosa en galactosa y glucosa por la actividad de la enzima β-galactosidasa, favoreciendo la mejora de los síntomas de intolerancia a lactosa en las personas que lo padecen. Se produce también, la síntesis de vitaminas del complejo B siendo una fuente importante de potasio, fósforo, calcio y vitaminas.

Se ha reportado que consumir kéfir de manera constante puede ayudar a combatir la anemia, la fatiga y agotamiento crónico; además de prevenir la osteoporosis, arteriosclerosis y cálculos renales. Facilita la secreción salivar y aumenta la de los

Cuadro 3. Especies bacterianas aisladas de gránulos de kéfir por diversos grupos de investigación (Ünsal, 2008).

Diversidad Bacteriana	Referencias
Bacterias ácido-lácticas	
Lactococci	Yüksekdag y col., 2004
Lactococcus cremoris	Witthuhn y col., 2004, Garrote y col., 1996
Lactococcus lactis subsp.	Simova y col., 2002, Chen y col., 2008 Mainville y col., 2005
Streptococci	
Streptococcus durans	Yüksekdag y col., 2004
Streptococcus thermophilus	Simova y col., 2002, Yüksekdag y col., 2004
Lactobacilli	
Lb. fermentum subsp.	Witthuhn y col., 2004
Lb. delbrueckii subsp.	Witthuhn y col., 2004, Simova y col., 2002
Lb. kefiranofaciens	Vancanneyt y col., 2004, Santos y col., 2003, Chen y col., 2008, Garrote y col., 1996, Mainville y col., 2005
Lb. plantarum	Witthuhn y col., 2004, Santos y col., 2003
Lb. helveticum	Simova y col., 2002
Lb. brevis	Simova y col., 2002, Witthuhn y col., 2004,
Lb. casei subsp.	Simova y col., 2002
Lb. kefiri	Garbers y col., 2004, Mainville y col., 2005 Heo y col., 2006
Lb. gallinarum	Garbers y col., 2004
Lb. acidophilus	Santos y col., 2003
Lb. curvatus	Witthuhn y col., 2004
Lb. fermentum	Witthuhn y col., 2004
Lb. crispatus	Garbers y col., 2004
Enterococci	
Enterococcus ssp.	García-Fontan y col., 2005
Bacterias ácido acéticas	
Acetobacter aceti	Angulo y col., 1993, Marshall, 1993
Otras bacterias	
Leuconostoc mesenteroides subsp.	Witthuhn y col., 2004, Chen y col., 2008, Mainville y col., 2005
Leuconostoc lactis subsp.	Witthuhn y col., 2004

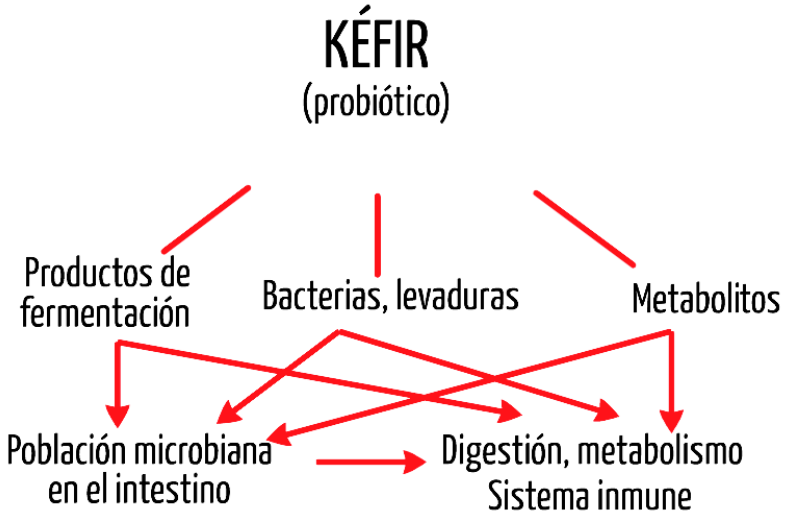


Figura 3. Efectos probióticos del kéfir.

jugos digestivos. Se favorece la solubilización y absorción intestinal de minerales y se pueden sintetizar algunas vitaminas (ácido fólico y niacina). Se estimula el peristaltismo, se previenen úlceras estomacales, colitis ulcerosa y estreñimiento (Hertzler, 2003). La hipercolesterolemia es el principal factor de riesgo en la enfermedad coronaria. Se ha propuesto el consumo de probióticos como una alternativa para reducir el colesterol sérico en personas con hipercolesterolemia o para mantenerlo en niveles normales en individuos sanos (Taranto y col., 1998).

1.5.5 Composición química

La composición química del kéfir fue descrita en Polonia en el año 2002 y se encuentra basada en la propuesta Estándar A-11 para leches fermentadas, establecida por la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés) de Naciones Unidas, así como por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se han estudiado los componentes nutricionales basados en porcentajes, gramos y miligramos por cada 100 gramos de fermentado kéfir (Cuadro 5).

1.6 Diferencias entre kéfir y yogur

Algunos piensan que el fermentado de kéfir es igual o muy parecido al yogur. Sin embargo, existe una diferencia crucial. En los gránulos de kéfir se lleva a cabo una fermentación lacto-alcohólica, se transforma la lactosa en ácido láctico y se produce CO_2 y etanol; mientras que para la elaboración de yogur ocurre únicamente la fermentación láctica sin producción de alcohol ni de CO_2.

Por otra parte, el yogur favorece la flora intestinal pero el kéfir es considerado como un auténtico regenerador de la misma, contribuyendo a la depuración del organismo, de este modo, la absorción y asimilación de nutrientes es más completa y se pueden sintetizar componentes necesarios como la vitamina B y K.

Otra gran diferencia, además de sus características organolépticas particulares, es que el kéfir tiene una tensión de cuajo muy baja. La leche kefirada es menos densa que el yogur, esto quiere decir que la cuajada se fragmenta muy fácilmente en partículas muy pequeñas, mientras que el cuajo del yogur se mantiene cohesionado, o bien, se deshace en pedazos. El pequeño tamaño de las partículas en la cuajada de kéfir facilita su digestión al presentar una mayor superficie sobre la cual actúan los agentes de la digestión.

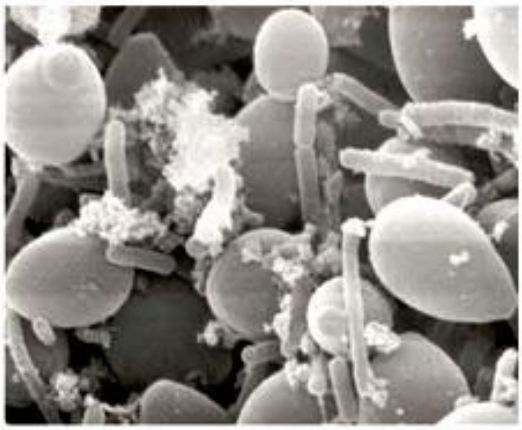


Figura 4. Micrografía electrónica de la superficie de gránulos de kéfir.

Cuadro 4. Especies de levaduras encontradas en los gránulos de kéfir por diversos grupos de investigación.

Levaduras	Referencias
Kluyveromyces marxianus	Koreleva, 1991; Lin y col., 1999; Simova y col., 2002; Wyder y Puhan, 1997; Yoshida y Toyoshima., 1994; Engel y col., 1986; Garrote y col., 2001; Angulo y col., 1993; Rohm y col., 1992; Ottogalli y col., 1973
Saccharomyces sp.	Garrote y col., 2001
Saccharomyces cerevisiae	Koreleva., 1991; Rosi, 1978; Douset y Caillet, 1993; Simova y col., 2002; Angulo y col., 1993; Rohm y col., 1992; Engel y col., 1986
Saccharomyces unisporus	Wyder y Puhan., 1997; Pintado y col., 1996; Engel y col., 1986; Angulo y col., 1993
Saccharomyces exiguus	lwasawa y col., 1982
Saccharomyces turicensis	Wyder y Puhan, 1997
Saccharomyces delbrueckii	Koreleva, 1991; Wyder y Puhan, 1997; Angulo y col., 1993
Saccharomyces dairensis	Rohm y col., 1992
Torulaspora delbrueckii	Koreleva, 1991; Wyder y Puhan, 1997; Angulo y col., 1993
Brettanomyces anomalus	Wyder y Puhan, 1997
Issatchenkia occidentalis	Engel y col., 1986
Candida friedrichii	Rohm y col., 1992
Candida pseudotropicalis	Ottogalli y col., 1973
Candida tenuis	Ottogalli y col., 1973
Candida inconspicua	Simova y col., 2002
Candida maris	Simova y col., 2002
Candida lambica	Engel y col., 1986
Candida tannotelerans	Dousset y Caillet, 1993
Candida valida	Dousset y Caillet, 1993
Candida kefir	Koreleva, 1991; Engel y col., 1986; Rohm y col., 1992
Candida holmii	Engel y col, 1986; Angulo y col., 1993
Pichia fermentans	Lin y col., 1999; Angulo y col., 1993; Rohm y col., 1992

1.7 Kéfir en el mundo

En otros países y principalmente en Estados Unidos, se comercializan todo tipo de productos a base de kéfir, desde una amplia variedad de bebidas para niños hasta helados de distintos sabores, kéfir bajo en grasa y orgánico. La marca líder en la venta de kéfir es Lifeway Foods (Figura 5). Esta exitosa marca estadounidense controla entre el 95-97 % del mercado del kéfir, registrando ingresos de 80 millones de dólares en el año 2012.

1.7.1 Kéfir en México

El México, a los gránulos de kéfir se les conoce comúnmente como búlgaros. Muchas personas principalmente adultos mayores, han consumido kéfir y lo han utilizado tradicionalmente de generación en generación, para mejorar su digestión y algunas mujeres con fines de adelgazamiento. La realidad es que el potencial benéfico del kéfir es sumamente subestimado y no existe difusión acerca de sus beneficios. No se encuentran reportes de investigaciones en kéfir mexicano, tampoco existe un producto comercial.

1.7.1.1 Competencia en el mercado

Como se mencionó previamente, la comercialización de kéfir en nuestro país es nula. Únicamente existen leches fermentadas con adición de cultivos lácticos, el mejor ejemplo de ello es la marca Yakult®, con su producto clásico para beber Soful®, considerados alimentos lácteos fermentados con *Lactobacillus casei shirota* y *Streptococcus thermophillus*. En el Cuadro 6 se muestra una compilación con las bebidas fermentadas que se comercializan actualmente en México, así como los microorganismos que contienen estos productos. Cabe mencionar que el alimento con un mayor número de microorganismos vivos es de la marca Danone y contiene cuatro variedades: *Bifidobacterium, Streptococcus, Lactococcus y Lactobacillus*.

Cuadro 5. Composición nutricional del kéfir.

Minerales	miligramos por cada 100 g
Calcio	120
Fósforo	100
Magnesio	12
Potasio	150
Sodio	50
Cloro	100
Aminoácidos	g por cada 100 g
Triptófano	0.05
Fenilalanina, Tirosina	0.35
Leucina	0.34
Isoleucina	0.21
Treonina	0.17
Metionina, Cistina	0.12
Lisina	0.27
Valina	0.22
Vitaminas	mg por cada 100 g
A	0.06
Caroteno	0.02
Tiamina	0.02
B2	0.17
B6	0.05
B12	0.005
Ácido fólico	0.0095
Niacina	0.09
C	1
D	0.08
E	0.11
Ácido láctico (g por cada 100g)	0.8
Etanol	0.9
Colesterol	0.005
Elementos Traza	0.04
Hierro	mg por cada 100 g
Cobre	0.012
Molibdeno	0.0055
Zinc	0.36
Magnesio	0.005

Figura 5. Lifeway® Technologies principal marca de kéfir a nivel mundial.

Se ha reportado desde hace más de 3 décadas que los gránulos de kéfir contienen una simbiosis de múltiples microorganismos benéficos, esto implicaría que un producto a base de kéfir mexicano ejercería una ventaja frente a otras bebidas fermentadas.

1.7.1.2 Norma Mexicana para leches fermentadas

La legislación mexicana no tiene una definición específica sobre el kéfir, sin embargo, por ser leche fermentada se puede considerar dentro del proyecto de norma PROY-NOM-185-SSA1-2000, publicada por el Diario Oficial de la Federación el 24 de abril del 2000 en donde se específica lo siguiente: Se considera leche fermentada, al producto lácteo obtenido de la fermentación de la leche mediante la acción de microorganismos específicos cuyo resultado sea la reducción del pH, adicionado o no de ingredientes opcionales y aromatizantes, sometido o no a tratamiento térmico después de la fermentación. Las leches cultivadas o fermentadas y acidificadas, además de cumplir con lo establecido en el reglamento, deben ajustarse a las siguientes especificaciones:

a. No deben contener más del 2 % de alcohol en volumen.

b. Las leches fermentadas y las leches acidificadas deben tener una acidez titulable de no menos de 0.5 % expresada como ácido láctico.

c. La prueba de la fosfatasa debe ser máximo de 4 UFC/g.

d. En las leches cultivadas o fermentadas no se permite la adición de conservadores, solo puede aceptarse la presencia del ácido sórbico y sus sales de sodio y potasio, dióxido de azufre y ácido benzóico como efecto de transferencia de los ingredientes opcionales, debiendo cumplir en proporción con los límites establecidos para cada uno de ellos o dentro de un máximo de 50 mg/kg (solo o mezclado) en el producto final.

e. En la elaboración de las leches fermentadas aromatizadas se permite el empleo de los saborizantes que contempla el reglamento, de acuerdo con las buenas prácticas de manufactura, además de lo establecido en el punto cuarto del acuerdo por el que se determinan las sustancias permitidas como aditivos y coadyuvantes.

f. Colorantes, que procedan exclusivamente de sustancias aromatizantes por efecto de transferencia.

1.8 Propuesta de producto mexicano a base de kéfir

Posterior al presente trabajo de tesis, se realizará una propuesta de desarrollo producto de una bebida comercial a base de kéfir mexicano y frutos naturales. El diseño de imagen y presentación del producto se encuentra en el Anexo XI. Descripción: Bebida láctea a base de kéfir adicionada con frutas naturales. Características: Producto de consumo inmediato, alimento funcional probiótico. Su consumo regular es benéfico para la salud. Bebida refrescante, ligera y nutritiva. Puede ser consumido sin problemas por personas intolerantes a la lactosa. Además provee beneficios para personas con sobrepeso y con problemas gastrointestinales. Ayuda al sistema inmunológico y aporta vitamina B. El mercado al que será dirigido incluye a personas con problemas gastrointestinales, con intolerancia a la lactosa, personas con problemas cardiovasculares, sobrepeso, personas con interés en el

Cuadro 6. Bebidas lácteas fermentadas disponibles en el mercado nacional.

Marca / Contenido Neto	Contenido promedio de proteína / grasa	Tipo	Cantidad (UFC/g o ml)
Activia Danone 150 g	3.9 % / 3.7 %	*Bifidobacterium bifidum essensis, lactococcus lactis, streptococcus thermophiles, lactobacillus bulgaricus*	72–100 X 10^6
Activia Danone 250 g	2.6 % / 3.1 %	*Bifidobacterium bifidum essensis, lactococcus lactis, streptococcus thermophilus, lactobacillus bulgaricus*	29–250 X 10^6
Actimel Danone 100 g	2.6 % / 1.6 %	*Lactobacillus casei defensis, streptococcus thermophilus, lactobacillus bulgaricus*	690–1200 X 10^6
Bio 4 LALA	2.8 % / 1.3 %	*Lactobacillus casei spp paracasei*	
Bonacult 120 ml	1.2 % / 0 %	*Lactobacillus casei rhamnosus*	38–190 X 10^3
Chamyto Néstle 76 ml	0.9 % / 0.1 %	*Lactobacillus johnsonii Lactobacillus helveticus*	6–12 X 10^6
Kul-tai Del Valle 80 ml	1.4 % / 0 %	*Lactobacillus bulgaricus, streptococcus thermophilus, bifidobacterium bifidum*	150,000 – 6 X10^6
LC1 Nestlé 110 g	2.6 % / 1.1 %	*Lactobacillus johnsonii, streptococcus thermophilus*	500–3200 X10^6
Sofúl 107 g	4.0 % / 2.1 %	*Lactobacillus casei shirota, streptococcus thermophilus*	160–380 X 10^6
Yakult 80 ml	1.1 % / 0.1 %	*Lactobacillus casei shirota*	230-420 X 10^6
Yolact	1.2 % / 0 %	*Lactobacillus sp*	1-6 X 10^6

consumo de productos saludables, así como deportistas de alto rendimiento y niños.

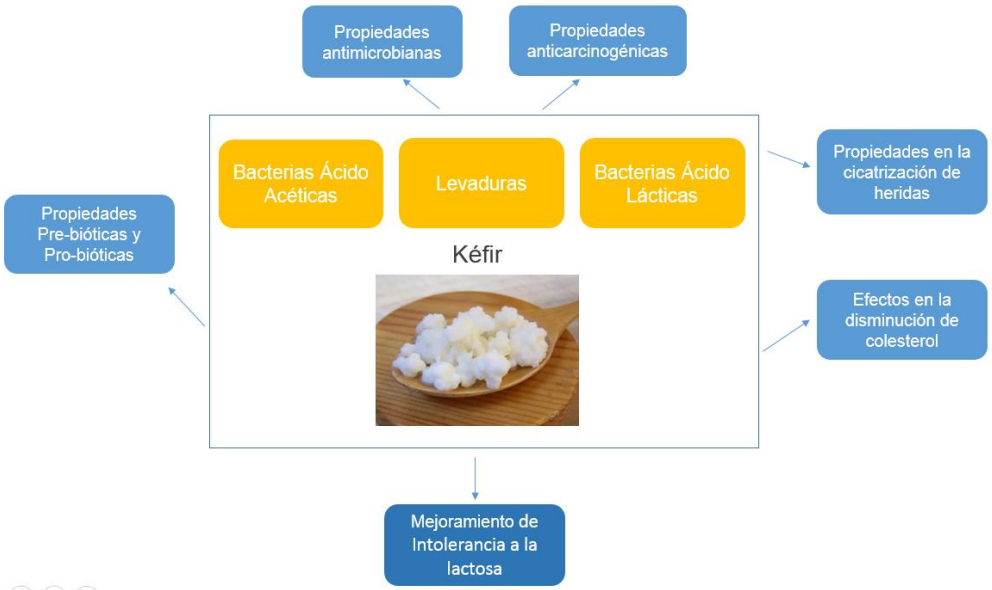


Figura 6. Diagrama esquemático que resume algunas de las propiedades funcionales que han sido reportadas en el kéfir (adaptado de Zeynep y col., 2011).

1.9 Identificación metagenómica

Durante décadas, el cultivo de microorganismos en cultivo puro fue la única manera de caracterización e identificación. Los métodos moleculares de hoy en día ofrecen nuevas oportunidades para capturar e identificar comunidades microbianas dentro de un entorno complejo, permitiendo sobrellevar las dificultades y limitaciones relacionadas con las técnicas de cultivo. La investigación genómica de las especies que por su naturaleza presentan un crecimiento lento o requerimientos especiales de cultivo, se logra ahora mediante el aislamiento directo de DNA genómico total y análisis de sus secuencias, permitiendo así, evitar los pasos necesarios en el aislamiento de cultivos puros (Wolfgang y Schmitz, 2004).

El término metagenómica fue definido por primera vez por Handelsman y col. (2004). Los términos genómica ambiental, genómica de comunidades, ecogenómica y genómica de poblaciones microbianas, son utilizados como sinónimos de metagenómica. Las investigaciones genómicas no solo permiten

elucidar la dinámica ecológica microbiana, sino también la evolución de especies y sus propiedades fisiológicas (Chivian y Arkin, 2006). El material genético se extrae a partir de la comunidad microbiana, mediante métodos físicos (sonicación, microesferas) o químicos (lisis alcalina). La extracción genera millones de fragmentos de DNA genómico. Las muestras de DNA aislado se fragmentan con enzimas de restricción o se amplifica una región particular mediante reacción en cadena del a polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos para un gen en específico.

Los métodos más utilizados para la identificación de poblaciones microbianas presentes en el kéfir sin necesidad de realizar cultivos son: PCR-DGGE (electroforesis en gel desnaturalizante) y en los últimos años, pirosecuenciación (Chen y col., 2008; Wang y col., 2008; Leite y col., 2012).

1.9.1 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR, se utiliza para obtener copias de un determinado segmento de una molécula de DNA (Brown, 2007). La PCR permite purificar con rapidez segmentos específicos de DNA, pero se debe conocer por lo menos parte de la secuencia de este fragmento. Una DNA polimerasa termoestable (*T. aquaticus*) realiza copias reiteradas de una secuencia diana y de las copias fabricadas en ciclos previos de la reacción. Comenzando con solo una molécula diana aislada, se pueden fabricar más de 250 millones de copias durante 30 ciclos de una PCR.

Para efectuar un experimento de PCR, se mezcla el DNA diana con *Taq* DNA polimerasa, un par de oligonucleótidos cebadores y una provisión de nucleótidos. La cantidad de DNA diana puede ser muy pequeña, porque la PCR es sumamente sensible y trabajará con tan solo una molécula inicial aislada. Se requieren los cebadores para comenzar las reacciones de síntesis de DNA que llevará a cabo la *Taq* polimerasa. Estos se deben unir al DNA diana a uno y otro lado del segmento

que va a ser copiado, por lo cual se deben conocer las secuencias de estos sitios de unión, de modo de poder sintetizar cebadores de las secuencias adecuadas.

La reacción comienza sometiendo la mezcla a 94 ºC. A esta temperatura, se rompen los enlaces de hidrógeno que mantienen unidos a los dos polinucleótidos de la doble cadena, por lo que el DNA se desnaturaliza en moléculas de una sola cadena. Después se reduce la temperatura a 50 ºC - 60 ºC, lo que determina cierta reunión de las cadenas simples del DNA diana, pero también permite que los cebadores se unan a sus posiciones de hibridación. Entonces puede comenzar la síntesis de DNA, se eleva la temperatura a 72 ºC que es la óptima para que la *Taq* polimerasa funcione.

Cuando se repite el ciclo de desnaturalización-hibridación-síntesis, los productos actúan como moldes para la nueva síntesis de DNA. En ciclos subsecuentes, ocurre un incremento exponencial en el número de copias de la secuencia de DNA diana; teóricamente, el número de copias de la secuencia blanco se duplica en cada ciclo de la PCR. Por supuesto que el proceso no es 100 % eficiente y por lo general es necesario llevar a cabo más ciclos, entre 25 y 40 dependiendo de la concentración inicial de DNA diana, de su pureza, de las condiciones y de la aplicación para la que se requiera el producto (McPherson, 2006).

La especificidad y eficiencia de la PCR implica que con un bajo número de moléculas diana (unos pocos nano gramos), se pueden amplificar convirtiéndose en una cantidad muy grande de DNA que por lo general es de 1 microgramo o más, lo cual permite llevar a cabo una amplia variedad de análisis posteriores. Los resultados de una PCR se pueden determinar de varias maneras. Por lo general, se analizan los productos mediante electroforesis en gel de agarosa, que revelará una sola banda si la PCR ha trabajado del modo esperado y ha amplificado un solo segmento del DNA diana (Brown, 2007).

1.9.2 Amplificación del gen 16S rRNA para la identificación de bacterias

A mediados de 1970, Carl Woese y sus colaboradores comenzaron a trabajar armando la información y una base de datos sobre la secuencia del 16S rRNA, para obtener información filogenética de microorganismos. A mediados de 1980, definieron al gen 16S rRNA como un “cronómetro evolutivo”. Debido a que todos los seres vivos contienen rRNA, se cree que este se remonta a las formas de vida más antiguas y que puede ser utilizado para reflejar las relaciones evolutivas entre las especies de la tierra (Pace, 1997).

Woese consideraba como cronómetro a una molécula cuya secuencia cambiaba aleatoriamente a lo largo del tiempo. El ribosoma de los procariotas tiene dos subunidades, la subunidad pequeña de 16S (Figura 7) y la subunidad grande, que contiene coeficientes de sedimentación 23S y 5S. Los ácidos nucleicos ribosomales se encuentran en cada célula existente, y en particular las células bacterianas en crecimiento, contienen entre 10^4 y 10^5 copias de rRNA 5S, 16S y 23S (Pace, 1997).

Los genes 16S y 23S contienen varios motivos de secuencias conservadas que reflejan el origen filogenético de los microorganismos (Bergey, 2005). El RNA ribosomal es utilizado o considerado como un cronómetro molecular para la identificación filogenética de especies porque son las moléculas más abundantes en todas las células existentes y tienen una función fundamental: la síntesis de proteínas.

Son moléculas que consisten de regiones alternadas que van desde regiones universalmente conservadas hasta regiones hipervariables al nivel de secuencia de nucleótidos, lo anterior en todos los dominios filogenéticos (Amann, 1995). Algunas partes de estas regiones conservadas probablemente se remontan al mundo de RNA, en donde ocurrieron todas las reacciones bioquímicas debido al RNA (Smit y col., 2007). Para la amplificación de bacterias, el objetivo principal es el gen 16S rRNA o cualquiera de las regiones variables (V1-V9) del gen 16s rRNA (Cárdenas y

Tiedje, 2008), para los cuales se utilizan oligonucleótidos universales (Figura 8). El análisis comparativo de secuencias de los genes 16S rRNA permite identificar poblaciones microbianas ya que contienen motivos conservados en su secuencia que reflejan el origen filogenético de microorganismos (Bosshard y col., 2003; Cai y col., 2003; Mincer, 2005). Existen diez regiones variables (nombradas como V) que pueden utilizarse para la identificación de especies microbianas y su relación filogenética, de manera más precisa que nunca (Woese, 1987).

El tamaño de la subunidad 16S ribosomal es de aproximadamente 1500 nucleótidos y el de la 23S es de 3000 nucleótidos. Los resultados del análisis de secuenciación parcial o total de estas subunidades, representan información confiable para determinar las relaciones filogenéticas entre especies. Los oligonucleótidos se utilizan como anclas filogenéticas y reconocen regiones conservadas en el DNA genómico.

1.9.3 Amplificación de la región ITS para la identificación de levaduras

Los genes ribosomales son en general el blanco más utilizado en la amplificación e identificación de levaduras: regiones 5.8S, 18S o SSU (Subunidad Pequeña) y 26S o LSU (Subunidad Larga). Entre estas regiones se encuentran los espacios intergénicos (ITS; Intergenic Transcribed Spacers) y los externos (ETS).

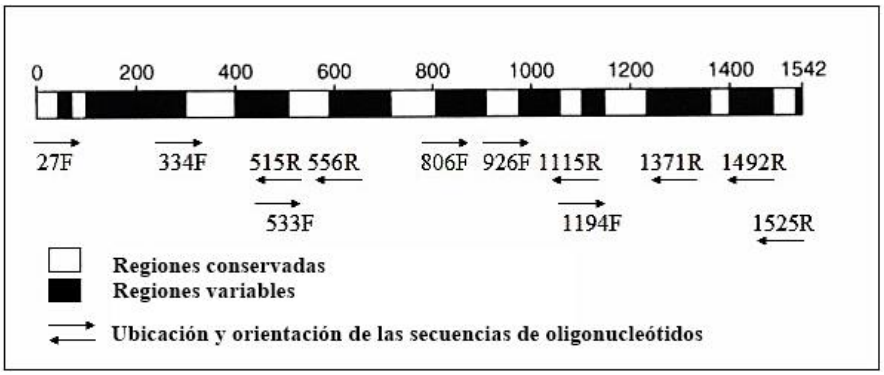


Figura 7. Regiones variables y conservadas en el gen 16S rRNA de bacterias y localización de oligonucleótidos para su secuenciación (adaptado de Cai y col., 2003).

La región ITS o espacio intergénico de los genes codificados por el ribosoma, es un marcador comúnmente utilizado para la identificación molecular de varios grupos de fungi. Las regiones ITS tienen tasas evolutivas altas y están flanqueadas por regiones altamente conservadas con sitios blanco adecuados para oligonucleótidos universales (Begerow y col., 2010). Recientemente, la región ITS fue seleccionada como “código de barras” universal para el reino fungi (Schoch y col., 2012). El primer ITS1F es por lo general combinado con el ITS2 para amplificar la region ITS1 del operon de rRNA (Op De Beeck, 2014).

De igual manera se encuentran los espacios intergénicos o NTS que separan las unidades codificantes. Tanto los genes ribosomales como los ITS y NTS representan herramientas poderosas para establecer relaciones filogenéticas y para identificar especies fúngicas, debido a que son secuencias semiconservadas.

1.10 Bioinformática y análisis de secuencias

La bioinformática es una fusión de ciencia y tecnología que está enfocada al desarrollo de buscadores y a la aplicación de herramientas computacionales que permitan expandir la información biológica así como almacenar, organizar, analizar y visualizar de mejor manera tan amplia cantidad de información. La disciplina de la bioinformática se centra en el análisis de secuencias y genómica funcional.

Los algoritmos computacionales y bases de datos son las principales herramientas para el análisis de secuencias. El internet es de suma importancia ya que en él se accede a la información de secuencias y a programas computacionales, además de que se integran distintos tipos de recursos e información relacionada con biología molecular. Existen tres bases de datos principales, las cuales son de dominio público: The DNA Data Bank of Japan (DDBJ), European Molecular Biology Laboratory (EMBL) y GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information). Estas tres organizaciones forman parte de la Colaboración Internacional de Bases de Datos de Secuencias de Nucleótidos e intercambian

información diariamente, asegurando una cobertura global y consenso entre las tres bases de datos. Actualmente se incluyen aproximadamente 108 millones de secuencias de 260,000 organismos, cabe mencionar que en los últimos años han tenido un crecimiento exponencial en cuanto a cantidad de información. El papel de las bases de datos es el de proveer libre acceso a las secuencias de ácidos nucleicos y de proteínas que han sido publicadas por la comunidad científica, con información respecto al autor, fuente bibliográfica, organismo entre otras características importantes.

1.10.1 Similitud de secuencias

La relación entre dos secuencias dadas está determinadas por el número y el carácter de las diferencias que se han acumulado en las bases a través del curso de la evolución. Estos datos primarios se utilizan para analizar la diversidad filogenética de acuerdo a criterios como variabilidad y similitud. La manera más sencilla de encontrar las similitudes entre secuencias genéticas es utilizando un programa bioinformático que buscará secuencias similares a través de la red, en las bases de datos internacionales de ácidos nucleicos. El algoritmo Herramienta de Búsqueda de Alineamientos Básico Local (BLAST; Basic Local Alignment Search Tool) fue desarrollado en 1989 en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), dentro de los Institutos de Salud (NIH; National Institutes of Health) de Estados Unidos y permite realizar alineamientos entre secuencias.

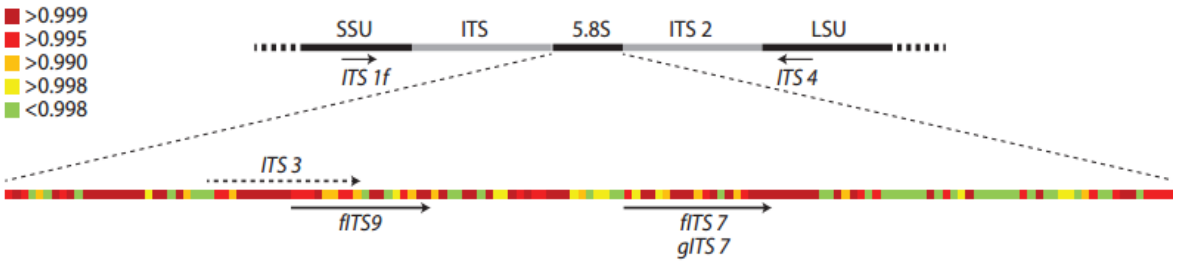


Figura 8. Organización de los genes ribosomales y regiones blanco para oligonucleótidos en la amplificación de secuencias de levaduras (Ihrmark, 2012).

Se utilizan métodos estadísticos para comparar una secuencia de DNA o proteína denominada “query sequence”, con millones de secuencias depositadas en la base de datos elegida. Después de una amplia búsqueda, como resultado se muestran aquellas secuencias que presentan un nivel significativo de similitud. BLAST es un conjunto complejo de programas con funciones, aplicaciones y estadística sofisticada, sin embargo su uso se encuentra bastante estandarizado.

1.11 Filogenia

En los términos más generales, un árbol filogenético es una representación esquemática de entidades biológicas que están conectadas por descendencia común, pueden ser especies o grupos taxonómicos mayores (Gregory, 2008). Hoy en día, la mayoría de árboles filogenéticos e crean a partir de datos moleculares ya sea DNA, RNA o proteínas. Se tiene a utilizar DNA cuando se analizan especies cercanamente emparentadas, porque proveen mayor información (las cadenas de DNA son más largas que las cadenas de aminoácidos). En cuanto a su anatomía, un árbol filogenético contiene varios componentes. Los nodos terminales o puntas, que representan las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUS) o taxones. Cada uno de estos nodos terminales se encuentran unidos mediante ramas a un nodo interno, el cual representa al ancestro común entre los nodos terminales. De tal manera que los nodos terminales representan el presente, mientras que los nodos internos representan el pasado. La importancia de un árbol filogenético yace en la topología, es decir, cómo están unidas las ramas o el patrón de ramificación, lo que representa la relación evolutiva entre los distintos taxones (Mendoza, 2012).

1.12 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM; Scanning Electron Microscopy) es una técnica utilizada para caracterizar la morfología superficial de distintos tipos de materiales, mediante un haz de electrones de alta energía en lugar de un haz de luz para formar una imagen ampliada. Las imágenes de microscopía de barrido

proporcionan una imagen tridimensional de la superficie de la muestra con un nivel de detalle y profundidad de campo muy superiores a la microscopía óptica convencional. Los electrones interactúan con la muestra produciendo señales que contienen información acerca de la superficie topográfica de la muestra. Los tipos de señales que se producen incluyen a los electrones secundarios (para imágenes de alta resolución), electrones retrodispersadores (imágenes de composición y topografía de la superficie), rayos X y fotones de varios niveles de energía. Para la microscopía Electrónica de Barrido, los especímenes deben tener conductividad eléctrica al menos en la superficie. En el caso del área de alimentos, la mayoría de los materiales analizados no son conductores por lo que se requiere realizar un recubrimiento con un material conductor que por lo general es oro. Se deposita en la muestra mediante vacío (Bhandari, 2012).

Debido a que el equipo trabaja mediante vacío, se requiere una etapa de deshidratación durante la preparación de la muestra. Esto es particularmente importante cuando se observan moléculas altamente hidratadas, como en el caso de polisacáridos. Con el fin de evitar alteraciones morfológicas por la deshidratación, las muestras se fijan con glutaraldehído en agua o en amortiguador y posteriormente se lleva a cabo un procedimiento de pos-fijación con tetróxido de osmio (Hassan y col., 2003). La deshidratación se realiza incrementando la concentración de etanol o de acetona. Este procedimiento ha permitido la observación de hidrolizados de proteína (Liu y Guo, 2008) y formación de biopelículas bacterianas en superficies de acero (Rieu y col., 2008), entre otros estudios. Se pueden realizar estudios de morfología de zonas microscópicas de distintos materiales, además del procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas.

1.13 Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

La hibridación fluorescente *in situ* es una técnica que detecta secuencias de ácidos nucleicos en células o tejidos preservados mediante el empleo de una sonda

marcada con un fluorocromo, la cual va dirigida hacia un lugar específico del cromosoma y que emite fluorescencia que puede ser observada por medio de un microscopio. La importancia de FISH radica en la capacidad que tiene la sonda de DNA de detectar una región específica del ácido nucleico de la célula microbiana y ser visualizada por microscopía de epifluorescencia.

Las células se tratan de modo que la sonda entra en contacto con el ribosoma diana en la célula *(in situ).* Esta técnica se utiliza para determinar la identidad, la abundancia y actividad relativa de microorganismos en un ambiente y puede utilizarse para detectar bacterias sin que estas hayan sido cultivadas. Es importante que el DNA debe desnaturalizarse para que la sonda pueda hibridar, por ello las sondas y las muestras son desnaturalizadas mediante temperatura. El rRNA microbiano puede utilizarse como sitio diana de la sonda de hibridación, esto puede ser más ventajoso que una DNA diana por dos razones. La primera es que hay muchas más copias de rRNA en la célula que copias de genes codificados por los ribosomas (rDNA), lo que aumenta la sensibilidad del ensayo. En segundo lugar, la presencia de rRNA señala la presencia de un organismo viable ya que la detección del DNA, en particular por métodos como PCR, puede hacerse incluso cuando el organismo no es viable (Koneman y col., 2006).

La hibridación fluorescente *in situ* se ha desarrollado en los últimos años siendo una técnica nueva. El RNA ribosomal representa un válido índice de viabilidad celular, ya que las moléculas de RNA se encuentran en gran cantidad en las células viables. Las células microbianas se tratan inicialmente con un fijador que por lo general es formaldehido y se inmovilizan en laminillas. La técnica de FISH ha permitido visualizar la distribución espacial y temporal de microbios en entornos acuáticos, en el ambiente y en ecosistemas en alimentos. (Bouvier y Giorgio, 2003). Se ha utilizado para estudiar la estructura de la comunidad bacteriana del queso Stilton (Ercolini y col., 2003).

2. HIPÓTESIS

La amplificación de las subunidades 16S ribosomal de bacterias, así como la región intergénica 1 de levaduras, permitirá identificarlas si se encuentran presentes en el consorcio microbiano del kéfir. La visualización mediante microscopía electrónica de barrido en conjunto con hibridación fluorescente *in situ,* mostrará la distribución e interacción de las bacterias y levaduras embebidas en el polímero de kefirano de los gránulos del kéfir.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Identificar las especies microbianas comprendidas en los gránulos y en la bebida fermentada de kéfir.

3.2 Específicos

- Extraer el DNA genómico de los gránulos y de la bebida fermentada de kéfir.
- Identificar a las bacterias presentes en el kéfir mediante la amplificación de la región V4-V5 del gen 16S rRNA.
- Identificar a las levaduras presentes en el kéfir mediante la amplificación de la región ITS1.
- Secuenciar los fragmentos de DNA amplificados y realizar un análisis bioinformático de similitud de secuencias.
- Visualizar mediante microscopía electrónica de barrido e hibridación fluorescente *in situ* la distribución e interacción de las bacterias y levaduras presentes en el consorcio microbiano del kéfir.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales y Métodos

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Molecular así como en el laboratorio de Biotecnología de Alimentos, en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

4.1.1 Obtención de gránulos

Los gránulos de kéfir fueron obtenidos mediante donación en la ciudad de Querétaro, Querétaro y en Dolores Hidalgo, Guanajuato.

4.2 Elaboración de kéfir

Se pasteurizó leche entera de vaca y se adicionó un volumen de inóculo de 1 % (p/v), aproximadamente 2 g de gránulos de kéfir en un reactor de vidrio de 1 L. El tiempo de fermentación para la obtención del kéfir fue de 24 h, aunque en ocasiones se permitió transcurrir 48 y hasta 72 h, manteniendo el cultivo a 25 ºC en una zona cálida.

Al transcurrir las 24 h, se realizó la filtración, separando los gránulos de la bebida de kéfir con ayuda de un colador. Los gránulos fueron colocados nuevamente en el frasco de vidrio para iniciar otra fermentación (Figura 9). Este procedimiento se repitió durante un periodo de aproximadamente doce meses, con el fin de mantener el cultivo en condiciones óptimas para el momento en que se requirieran las muestras.

Se transfirieron muestras de gránulos de kéfir y de bebida fermentada al laboratorio de Biotecnología Molecular, en donde fueron almacenadas a 4 ºC en tubos Falcon, para el procedimiento de extracción de DNA. De acuerdo con la revisión bibliográfica, se optó por realizar todos los experimentos con muestras en fresco.

Las muestras de gránulos y bebida fermentada (Figura 10) almacenadas por 2 días o más, no fueron utilizadas. Únicamente se trabajó con muestras obtenidas el mismo día.

4.3 Preparación de la muestras

En base a una recopilación y elección de protocolos reportados, como paso inicial en la preparación de la muestra y previo a la extracción, los gránulos fueron sometidos a varios lavados en agua destilada estéril para eliminar restos de leche. Se homogenizaron 10 g de gránulos de kéfir en 90 ml de solución salina estéril al 0.9 % (p/v), utilizando el homogenizador Seward Stomacher® Mod. 400 circulator (Figura 11), hasta que no se observaron partículas de gránulos (Wang y col, 2008). En intentos posteriores se utilizó el homogenizador digital Ultra-Turrax (IKA) a 6,500 rpm durante 1 min.

Se tomó 1 ml del homogenizado en tubos Eppendorf y se centrifugó a 5000 *x g* durante 10 min. El paquete celular fue lavado 3 veces con agua destilada estéril, posteriormente se realizó una ligera agitación mecánica y centrifugación 10 min a 13 000 *x g*. Se re-suspendió en amortiguador de lisis TES (Tris 25 mM EDTA 10 mM y sacarosa 50 mM) (J.T. Baker®) y se adicionaron 150 µl de SDS al 20 % (p/v). Se incubó durante 5 min.

Figura 9. Gránulos de kéfir en reactor de 1 L. Adición de leche pasteurizada e incubación a temperatura ambiente para iniciar fermentación.

Figura 10. A) Gránulos de kéfir después de 24 h de fermentación y filtración B) Bebida de kéfir con consistencia líquida y presencia de burbujas por la liberación de CO_2.

Se incorporaron 500 µl de la solución homogenizada a las columnas del kit de extracción para iniciar el protocolo. En el caso de la bebida fermentada, se tomaron directamente 500 µl de kéfir (Marsh y col., 2013; Wang y col., 2014; Garofalo y col., 2015). Con el fin de optimizar la extracción, se realizaron además, experimentos con sonicación de las muestras previo a iniciar el protocolo de extracción, durante 0, 5 y 10 min en conjunto con la adición de amortiguador de lisis (Anexo X), cambiando las variables y en búsqueda de las condiciones óptimas.

Fue necesario realizar cambios a la cantidad de muestra inicial para optimizar la extracción, se colocó únicamente un gránulo de kéfir en 1 ml de solución salina estéril en un tubo Eppendorf. Se agitó mecánicamente durante 3 min seguido de una centrifugación a 5,000 *x g* durante 3 min para cada muestra. Finalmente, las pastillas celulares se lavaron dos veces con citrato de sodio (J.T. Baker®) al 2 %

(p/v) y se tomaron 500 µl para incorporarlas a las columnas Power Bead (MOBIO®, Carlsbad, USA) e iniciar el protocolo de extracción.

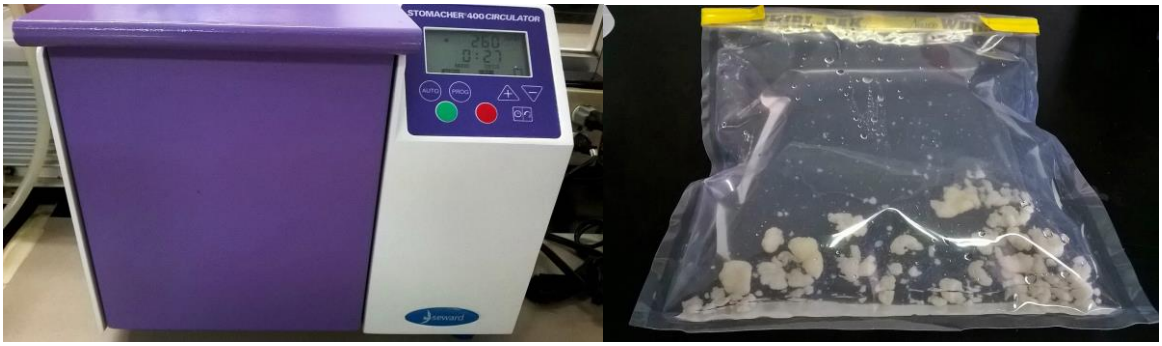


Figura 11. Homogenización de los gránulos de kéfir con el equipo Seward Stomacher® 400 circulator.

4.4 Extracción de DNA

El DNA microbiano se aisló utilizando el paquete Power Soil DNA Isolation kit (MOBIO®, Carlsbad, USA). Con este kit se ocasiona una fuerte lisis celular, combinando métodos mecánicos eficientes para lisar células bacterianas (Schloss y col., 2005) junto con métodos químicos. Se utilizaron 500 µl de homogenizado de gránulos y de bebida de kéfir para cada muestra, las pastillas celulares se procesaron de acuerdo a las indicaciones y recomendaciones del kit para lograr la extracción (Figura 12).

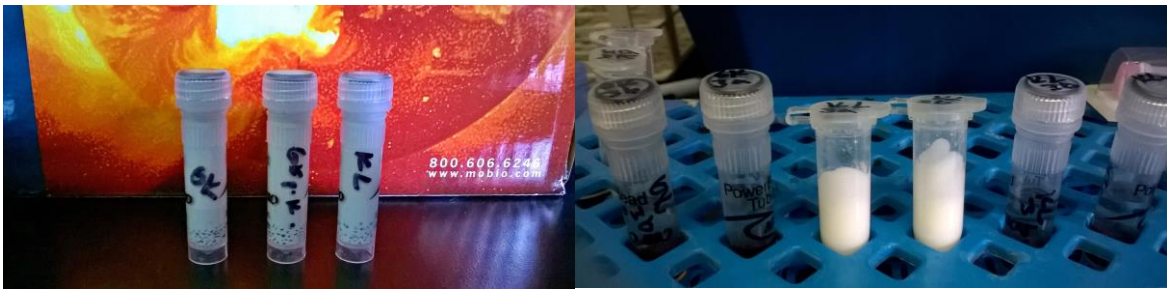


Figura 12. Columnas “PowerBead Tube” de MOBIO® Laboratories con muestras de kéfir.

4.4.1 Cuantificación de DNA

Una vez finalizado el protocolo de extracción, se cuantificaron las muestras con el equipo NanoDrop (Themo Fisher, Mod. ND-1000). Se verificó su pureza y se seleccionaron las muestras que presentaron mejores lecturas de absorbancia (260 nm y 280 nm), así como una concentración adecuada de DNA para ser utilizadas posteriormente en las reacciones de PCR.

4.4.2 Visualización de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa

Se verificó la integridad del DNA extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) en amortiguador TAE 1X (Anexo X). Se reveló el gel y se analizaron las bandas correspondientes a cada muestra.

Figura 13. A) Muestras de kéfir durante extracción de DNA B) Muestras en incubación en hielo, como parte del protocolo de aislamiento de DNA.

Figura 14. A) Equipo Homogenizador PowerLyzer® utilizado en el protocolo de extracción para lisar las células B) Muestras de DNA de kéfir listas para almacenamiento a -4 ºC.

4.5 Caracterización molecular

4.5.1 Amplificación de la región V4/V5 del gen 16S ribosomal para la identificación de bacterias

La región variable V4-V5 del gen 16S rRNA de bacterias fue amplificada mediante reacción en cadena de la polimerasa, utilizando los oligonucleótidos universales V1 y V5 (Cuadro 7) reportados por Marsh y colabores en el año 2013. El programa de PCR fue el siguiente: Desnaturalización a 94 ºC durante 2 min, 35 ciclos de 94 ºC por 1 min, 52 ºC durante 1 min y 72 ºC por 1 min. Finalmente, se llevó a cabo una extensión final a 72 ºC durante 2 min.

Se utilizó el termociclador (BioRad, Mod. MJ mini™) y el paquete de TAQ DNA polimerasa recombinante de la marca Invitrogen. Para cada reacción de PCR se utilizaron 1.25 µl de H_2O, 2.5 µl de amortiguador PCR 10X, 0.75 µl de $MgCl_2$ 50 mM, 0.5 µl de mezcla de dNTP's 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 µl de oligonucleótidos V1V5 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) a una concentración de 0.2 mM, 3 µl de DNA (dilución 1:10) y 1 µl de Taq DNA polimerasa 5 U/µl (dilución 1:10) (Figura 15).

El volumen final de reacción fue estandarizado en 25 µl. Se analizó la integridad y la cantidad del DNA amplificado y se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v). En ambos geles se verificó el tamaño del fragmento esperado de 408 pares de bases.

Cuadro 7. Oligonucleótidos utilizados para PCR.

Oligonucleótido	Referencias
V1	Marsh y col., 2013
V5	
ITS1F	
ITS2	

4.5.2 Amplificación de la región ITS1 para identificación de levaduras

Se utilizaron los oligonucleótidos universales ITS1F sentido e ITS2 antisentido buscando amplificar la región intergénica 1, también llamada espaciador transcrito interno ITS1, tal como lo reporta Marsh y col. (2013). Esta región se encuentra presente de manera universal en el genoma de las levaduras, es una región no codificadora e hipervariable, permitiendo un reconocimiento a nivel interespecífico.

El programa de PCR para la amplificación de la región ITS1 se ejecutó mediante un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 4 min, posteriormente fueron programados 35 ciclos de 94 °C a 30 s, alineamiento a 50 °C por 1 min y elongación a 72 °C durante 1.5 min. Al final se realizó un paso de extensión final a 72 °C durante 10 min (Marsh y col., 2013).

Figura 15. Componentes de la reacción en cadena de la polimerasa: mezcla de dNTP's, $MgCl_2$, oligonucleótidos ITS1F e ITS2 para amplificación de levaduras, TAQ polimerasa y muestras de DNA íntegro.

4.5.3 Purificación de los productos de PCR

La mezcla de PCR debe ser purificada con objeto de eliminar subproductos, oligonucleótidos y dNTP's que pudieran interferir con la secuenciación. Los amplicones se purificaron con el paquete PureLink® Quick Gel Extraction & PCR

Purification Combo Kit (Invitrogen, Carlbad, USA). En el caso de la amplificación de levaduras, fue necesario purificar a partir de los fragmentos ge de agarosa debido a la presencia de una banda inespecífica que no fue posible eliminar. Se siguieron las instrucciones y sugerencias de acuerdo con el paquete de purificación (Figura 16).

Cuadro 8. Región amplificada para la identificación de bacterias.

Oligonucleótidos	Referencias
V1	Marsh y col., 2013
V5	

4.5.4 Visualización de los productos de PCR

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en amortiguador TAE 1X para corroborar la integridad y tamaño de los amplicones. Para la preparación del gel, se adicionaron 0.5 g de agarosa en 50 ml de amortiguador TAE 1X. Se calentó la solución durante 30 s en el microondas y

Figura 16. Purificación de fragmentos a partir de gel agarosa utilizando el paquete “PureLink PCR Purification Kit” de invitrogen.

observando el grado de disolución, se agitó gentilmente. Se repitió el calentamiento durante 30 s hasta que se observó una solución clara y libre de partículas. Una vez atemperada la solución, se adicionaron 0.5 µl de bromuro de etidio con cuidado y utilizando guantes en todo momento. Se colocó el gel de agarosa solidificado dentro de la cámara y se cargaron las muestras de DNA en los pocillos, utilizando el colorante “Orange G Loading Dye”. Se conectó el sistema horizontal de electroforesis (Figura 17) y se aplicó un voltaje de 80 V para obtener una buena resolución de las bandas.

4.5.5 Cuantificación de los productos de PCR

Los productos de PCR ya purificados, se cuantificaron utilizando el equipo NanoDrop, midiendo absorbancia en el rango de A_{260}/A_{280}. La lectura de absorbancia adecuada debe de oscilar entre 1.8 y 1.9, indicando así ser una muestra de DNA bien purificado que puede secuenciarse.

4.5.6 Secuenciación

Los fragmentos fueron secuenciados (MCLAB, San Francisco, California, E.U.A.) en un equipo ABI 3730XL en ambas direcciones, sentido y antisentido, con los oligonucleótidos V1-V5 e ITS1F-ITS2.

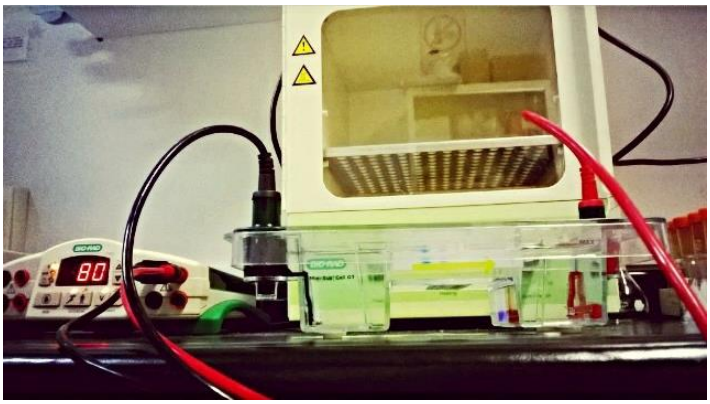


Figura 17. Sistema horizontal de electroforesis utilizado para visualizar los productos de PCR en gel de agarosa al 1% (p/v).

4.5.6.1 Análisis comparativo de secuencias

Se analizaron los resultados de secuenciación de las muestras de DNA de gránulos y de bebida fermentada de kéfir. Se visualizaron los cromatogramas y las secuencias obtenidas se introdujeron en el banco de datos de nucleótidos del NCBI. Para el análisis comparativo de las secuencias bacterianas, se realizó una búsqueda especializada mediante la opción “Targeted Loci BLAST”, la cual permite dirigir la búsqueda hacia secuencias de rRNA bacterianas de la subunidad 16S.

Se analizó a detalle toda la información arrojada por el programa BLAST, los alineamientos, la similitud de bases, el porcentaje de homología y se identificaron las especies de bacterias y levaduras que presentaron un mayor valor de similitud con nuestras secuencias de interés. Cabe notar que de los resultados obtenidos, mismos que fueron muy amplios, se eligieron únicamente las especies que correspondían con el valor más alto (Max Score) para cada búsqueda en cada una de las muestras y de ambas secuencias (sentido y antisentido).

4.5.6.2 Construcción de dendogramas

Una vez realizado el análisis bioinformático y posterior a haber ordenado la información de las especies identificadas, se construyeron dos árboles filogenéticos (dendogramas) con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Se utilizaron tanto las secuencias de las bacterias y levaduras identificadas, así como nuestras secuencias problema, para realizar un alineamiento múltiple.

Cuadro 9. Región amplificada para la identificación de levaduras.

Oligonucleótidos	Región amplificada	Referencias
ITS1F ITS2	Región intergénica ITS1 (410 pares de bases)	Marsh y col., 2013

Con ello fue posible construir los árboles filogenéticos en base al método de Máxima Similitud (ML; Maximum Likelihood). Se construyeron árboles tradicionales en forma rectangular y en representación circular. Finalmente, se interpretó la información de ambos dendogramas en búsqueda de analizar las relaciones filogenéticas entre estas especies.

4.6 Visualización óptica mediante microscopía electrónica de barrido

Se visualizaron muestras de gránulos de kéfir (porción interna y externa) mediante microscopía electrónica de barrido. Esta técnica se basa en la interacción de un haz de electrones sobre la superficie de la muestra. El haz realiza un barrido sobre la superficie y al incidir origina electrones secundarios que son captados por un detector. Esto da lugar a una señal eléctrica que es ampliada y posteriormente transmitida a un monitor.

Figura 18. Gránulo de kéfir previo a preparación para microscopía electrónica de barrido.

4.6.1 Preparación de la muestra

Se tomó una muestra de un gránulo (Figura 18) y se realizaron incisiones con ayuda de pinzas y de un bisturí hasta obtener un tamaño de 10 mm = 1 cm (Las muestras deben de tener un grosor adecuado para que los electrones puedan atravesarlas y formar adecuadamente la imagen). Se obtuvo una muestra de la porción externa y una muestra de la porción interna de los gránulos.

4.6.2 Fijación

La fijación se realiza con el fin de preservar las características estructurales y bioquímicas de las células en la muestra, en este caso de gránulos. En microscopía electrónica se utilizan fijadores de tipo aldehído (paraformaldehído y glutaraldehído), ya que permiten una mejor conservación ultraestructural. Normalmente se combinan aldehídos con tetróxido de osmio. El glutaraldehido debe formar parte de cualquier solución fijadora de las células o de especímenes que van a ser fijados, postfijados y deshidratados para posteriormente ser analizados con el microscopio electrónico.

Para prepar la solución fijadora se utilizó glutaraldehído al 2.5 % (v/v) adicionado con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7. Se agregaron 40 ml de agua destilada a 10 ml de glutaraldehido al 25 % para obtener una solución al 5 %. Posteriormente, al adicionar 50 ml de amortiguador fosfatos 0.1 M obtenemos 100 ml de la solución requerida al 2.5 %.

Figura 19. A) Fijación con glutaraldehído al 2.5 % B) Muestras de gránulos de kéfir después de la fijación.

Se sumergieron las dos muestras de kéfir (porción interna y porción externa) en la solución fijadora de glutaraldehído durante cuatro horas dentro de una campana de extracción. Al finalizar la fijación, se realizaron tres lavados de 10 min con amortiguador fosfatos para remover los remanentes de glutaraldehído. Con esto se protegen las estructuras celulares durante la deshidratación (Figura 19).

4.6.3 Pos-fijación

El tetróxido de osmio (OsO_4) actúa como fijador y confiere un mejor contraste a las estructuras celulares, además las preserva bien. La fijación previa con glutaraldehído facilita la penetración del tetróxido de osmio. Es necesaria la preparación de una solución, es por esto que hay que tener sumo cuidado en esta preparación a partir de cristales, ya que el tetróxido de osmio es sumamente volátil en disolución y los gases que emite son extremadamente tóxicos al contacto con mucosas (nariz y ojos). Además, es corrosivo al contacto con la piel.

4.6.4 Preparación de solución concentrada de OsO_4 al 2 %

Se disolvieron 0.25 g de cristales de OsO_4 (Sigma Aldrich México) en 12.5 ml de agua destilada. Se mantuvieron en disolución durante 24 h ya que la solubilidad de los cristales de OsO_4 en agua a temperatura ambiente es extremadamente lenta. Una vez con la solución preparada, se sumergieron las muestras durante 2 h utilizando la campana de extracción en todo momento. El tetróxido de osmio se encuentra en un empaque de plástico con espuma negra dentro para restringir el movimiento. Al interior se encuentra otro frasco de vidrio sellado y dentro de él, se encuentra envuelta en un papel negro, la ampolleta de vidrio con un par de cristales de tetróxido de osmio. Su etiqueta indica que es sumamente tóxico, corrosivo y volátil a temperatura ambiente. Para evitar el contacto con el tetróxido de osmio se utilizó en todo momento mascareta, guantes, bata y suma precaución en su manipulación (Figura 21).

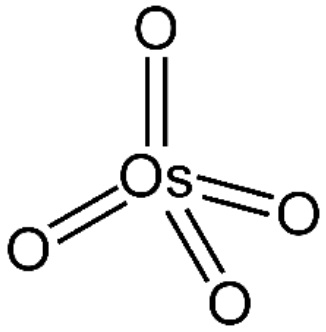


Figura 20. Estructura química del tetróxido de osmio.

Después de una extensa investigación para elegir el método más seguro al momento de manipular OsO_4, se optó por una técnica que utilizaba un laboratorio en Estados Unidos. Se utilizaron 3 frascos de cristal, uno dentro del otro y cada uno de ellos rodeado de una cama de algodón con el fin de restringuir cualquier movimiento de los contenedores. Se colocó un matraz de 120 ml con agua dentro de la campana, se rompió la ampolleta, disolviendo ahí mismo los cristales de OsO_4 junto con los restos de la ampolleta, para evitar tener cualquier tipo de contacto con el tetróxido. Se colocó un tapón esmerilado recubierto con múltiples capas de papel para film. Este primer contenedor, con los cristales en disolución (el tiempo de disolución promedio del tetróxido de osmio en agua es de 14 h), se colocó en un segundo contenedor de vidrio. Se recubrió con parafilm y se colocó en un tercer contenedor. De igual manera se recubrieron todos los bordes de la tapa. Se colocó una cantidad considerable de algodón para restringir el movimiento dentro de los tres contenedores. El recipiente final se recubrió con papel aluminio para evitar su exposición a la luz. Finalmente, se colocó en refrigeración.

4.6.5 Deshidratación

Se sumergieron las muestras en distintas concentraciones de etanol para deshidratar. Se realizó mediante un gradiente de etanol, incrementando la concentración del 10 % (v/v) al 100 % (Figura 23). Se sumergieron 10 min en cada solución. Se mantuvo 24 h en la concentración final de etanol anhidro al 100 % (v/v) para continuar con el secado a punto crítico.

Figura 21. A) Manipulación del empaque de tetróxido de osmio B) Manejo de OsO_4 en campana utilizando equipo de protección.

Figura 22. A) Cristales de tetróxido de osmio en disolución 24 h
B) Oscurecimiento de gránulos de kéfir por efecto de la posfijación con OsO_4.

4.6.6 Secado a punto crítico

El secado a punto crítico es un método para secar tejidos sin que estos colapsen o deformen su estructura original. Especialmente en el caso en el que se busca observar bacterias. El punto crítico consiste en extraer completamente el líquido intracelular y extracelular con poca alteracion de las estructuras, mediante una combinación de presión y tempratura. Esto con el fin de que todo el líquido pase a gas sin atravesar las superficies celulares, evitando efectos de arrastre y tensión superficial tras la evaporación.

El etanol utilizado durante el último paso de la deshidratación, aún presente en la muestra, es sustituido por dióxido de carbono líquido, mismo que se transforma en gas bajo las condiciones de temperatura y presión, siendo eliminado paulatinamente. Ésta técnica evita casi por completo los efectos de tensión superficial. El secado se produjo a una temperatura de 31 °C y a una presión de 73 atm en el equipo de Secado Punto Crítico (SCP) Mod. Samdri®-PVT-3D. Se observó una reducción considerable del tamaño de la muestra respecto a su diámetro original, debido a la presión sometida.

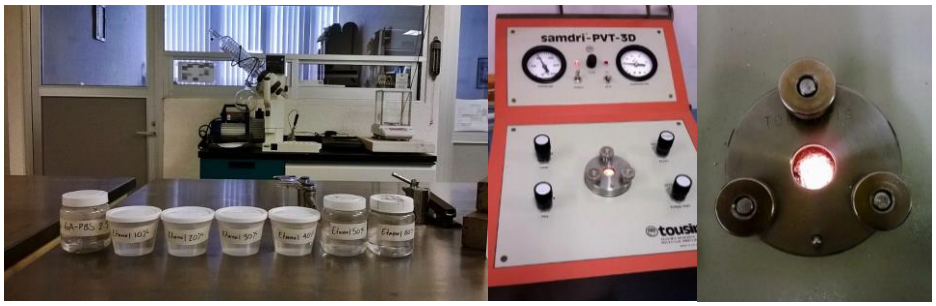


Figura 23. A) Muestra de gránulos de kéfir durante deshidratación B) Muestras durante secado a punto crítico.

4.6.7 Recubrimiento con oro

Las células o muestras deben de tener una superficie conductora de la electricidad y el calor que facilite su carga durante el barrido, para lo que se emplean metales como el oro. El oro permite asegurar la conductividad eléctrica de la muestra. La cantidad de metal depositado sobre la superficie de la muestra es sumamente importante para obtener un resultado satisfactorio. Una capa delgada de metal produce efectos de destello al ser observada, mientras que un exceso ocultará detalles de la muestra.

4.6.8 Observación

El equipo utilizado fue un microscopio electrónico de barrido (Carl Zeiss Mod. AG - EVO® 50) (Figura 25) de la facultad de Ciencias Naturales (FCN) de la UAQ. Las amplificaciones del microscopio electrónico de barrido rebasan los 100,000 aumentos y permiten reconocer la composición elemental de una muestra y la distribución de los elementos dentro de la misma.

Figura 24. Recubrimiento con partículas de oro.

Figura 25. Microscopio electrónico de barrido Carl Zeiss (Mod. AG - EVO® 50) y colocación de muestras en el microscopio.

4.7 Visualización mediante hibridación fluorescente *in situ*

Preparación de tejido: el procedimiento para preparar el tejido está determinado por la naturaleza del mismo y los requerimientos específicos del experimento. En este caso se buscó obtener fragmentos muy pequeños de distintos gránulos de kéfir de aproximadamente 1 milímetro. Se realizaron distintos cortes de la sección interna y externa con un bisturí estéril y se colocaron al centro de las laminillas, ejerciendo presión con un cubreobjetos de manera que la superficie fuera lo más regular y delgada posible para obtener una correcta visualización en el microscopio.

Fijación: la fijación es un paso crítico para obtener buenos resultados. Se fijaron las muestras mediante entrecruzamiento, cubriendo los portaobjetos con aproximadamente 10 volúmenes de formaldehido al 3.7 % (v/v) diluido en amortiguador fosfatos. Las muestras se mantuvieron incubando toda la noche para lograr la adhesión de las células a la superficie de los portaobjetos, mismos que se colocaron dentro de cajas de Petri estériles en refrigeración, con el fin de aislar las muestras de partículas de polvo u otra posible contaminación del ambiente.

Las muestras fueron fijadas durante 14 h. Se prepararon las cajas de hibridación (tubos Falcon de 50 ml), colocando papel filtro humedecido en solución de NaCl 1M para mantener la humedad al interior, al menos durante una hora. Se utilizaron 5 tubos Falcon para un total de 5 muestras, destinando dos muestras para hibridación con la sonda universal bacteriana EUB 338 y tres muestras para hibridación con la sonda universal de levaduras PF2. Lavado y deshidratación: se realizaron lavados a las laminillas con 5 ml de amortiguador fosfatos 1X para remover los restos de formaldehido, con cuidado de no desprender la muestra del portaobjetos. Se deshidrataron las muestras por inmersión durante 3 min en una solución de etanol al 50 % (v/v), posteriormente al 80 % (v/v) y finalmente al 95 % (v/v).

Hibridación: se cubrieron las laminillas con 100 µl de la dilución de sonda EUB 338 marcada con fluoresceína misma que es específica para la región 16S ribosomal de bacterias (Cuadro 10). La dilución de sonda EUB 338 contenía 3 µl de sonda EUB + 27 µl de H_2O destilada + 240 µl de amortiguador de hibridación previamente preparado (20 µl Tris-HCl 1 M, 225 µl NaCl 4 M, 150 µl formamida, 1 µl SDS 10 %). En el caso de la sonda PF2 marcada con el fluoróforo rojo texas, para la identificación de levaduras, la dilución se preparó con 4 µl de sonda PF2 + 36 µl de H_2O destilada conteniendo 320 µl de amortiguador de hibridación.

La concentración de la sonda fue de 50 ng/µl a una proporción de 8:1. Para la incubación, se colocaron las muestras dentro de las cámaras de hibridación previamente etiquetadas, se cerraron con su respectiva tapa de rosca y se incubaron durante 2 h a una temperatura de 46 ºC. Transcurridas las dos horas, se enjuagaron con 5 ml de amortiguador de lavado Oerther (800 µl Tris-HCl, 6.36 ml NaCl 4 M, 32.84 ml H_2O destilada) el cual fue previamente atemperado a 46 ºC y se incubaron 20 min. El lavado es realizado para remover las sondas que no hibridaron. Visualización: La fotografía de los datos de hibridación *in situ* es un paso crucial en la obtención de un buen registro de los datos. Es fundamental contar con un microscopio equipado con filtros y lentes apropiados.

Se visualizaron las muestras de gránulos de kéfir, utilizando el microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss, Mod. Observer D.1 HAL10) (Figura 32), equipado con el programa Zen (Carl Zeiss).

Cuadro 10. Sondas utilizadas para la identificación de bacterias y levaduras en los gránulos de kéfir, mediante hibridación fluorescente *in situ.*

Sonda	Fluoróforo	Microrganismo identificado	Dilución
EUB 338	Fluoresceína	Bacterias 16S rRNA	3 µl de sonda EUB 338 + 27 µl de H_2O destilada + 240 µl amortiguador de hibridación
PF2	Rojo Texas	Levaduras 18S rRNA	4 µl de sonda PF2 + 36 µl H_2O destilada + 320 µl de amortiguador de hibridación

Figura 26. Visualización de las muestras en el microscopio de fluorescencia. Búsqueda del filtro y objetivo adecuado para una mejor observación.

5. Resultados

5.1 Imágenes de hibridación fluorescente *in situ*

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) es una herramienta poderosa para estudios filogenéticos, ecológicos, ambientales y de diagnóstico. En este caso, se utilizó para la detección directa de las células bacterianas y de levaduras en los gránulos de kéfir, a través del microscopio de fluorescencia Carl Zeiss, Mod. Observer D1.

5.1.1 Identificación de bacterias con la sonda EUB 334

En la figura 27 se observa el polímero de kefirano que nubla la visualización de los microorganismos, debido a que en esta muestra en particular el corte del gránulo no fue lo suficientemente delgado. En el resto de las muestras, las zonas en donde fue posible visualizar de mejor manera los microorganismos y la emisión de señales fluorescentes, fue en donde había porciones más delgadas de la muestra.

Figura 27. Polímero de kefirano que nubla la visualización de los microorganismos.

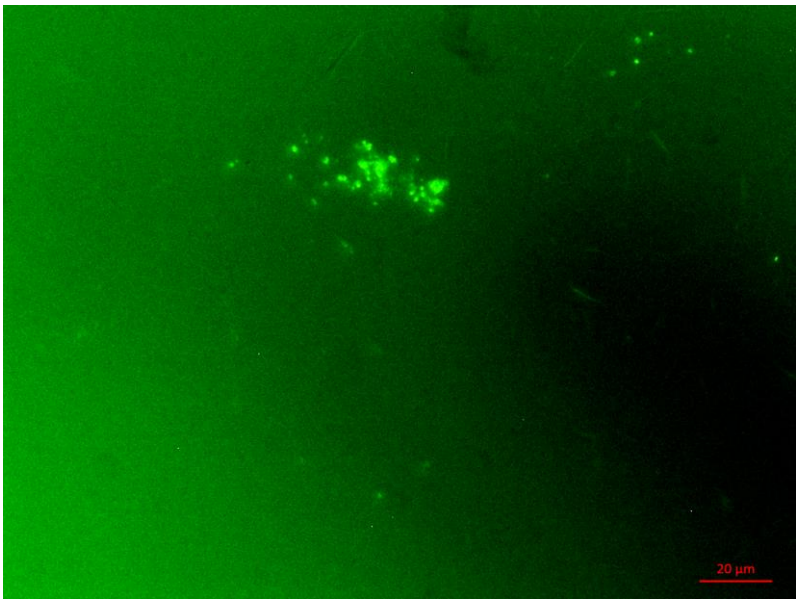


Figura 28. Hibridación de la sonda EUB con la región 16S rRNA bacteriana
Se observan las bacterias emitiendo fluoresceína. Magnificación 63X.

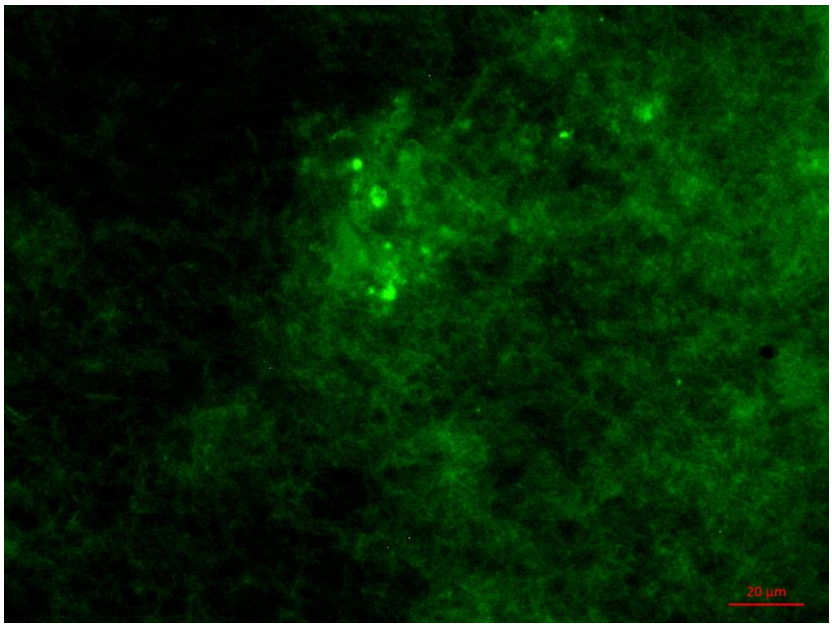


Figura 29. Hibridación de la sonda EUB con la región 16S rRNA de las bacterias presentes. Se observa la emisión de fluoresceína. Magnificación 63X.

5.1.2 Identificación de levaduras con la sonda PF2

En las distintas muestras de gránulos se observa la emisión del fluoróforo rojo texas, indicando que hubo una hibridación exitosa de la sonda PF2 con el DNA ribosomal de las levaduras presentes en las muestras (Figura 32).

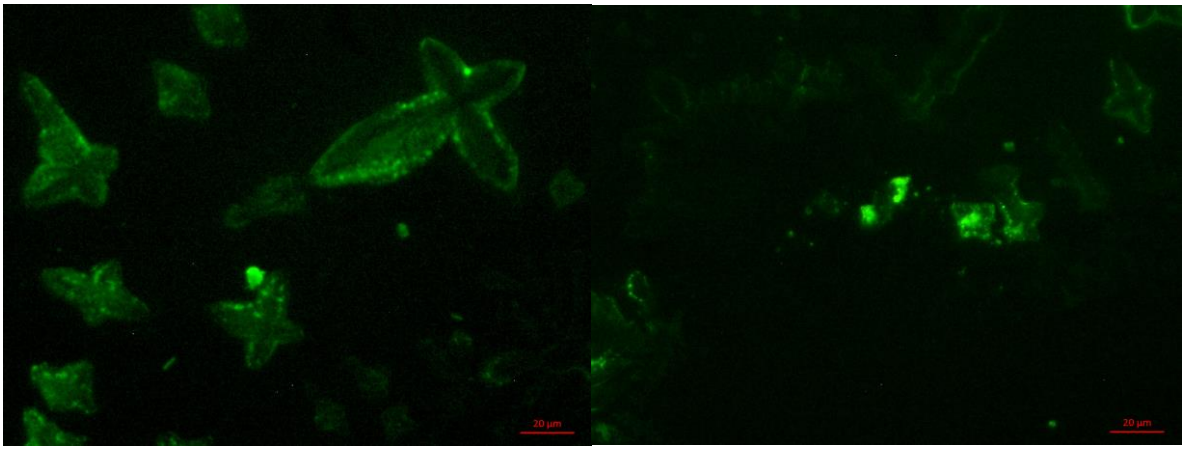


Figura 30. Hibridación de la sonda EUB con la región 16S rRNA de las bacterias presentes. Se observa la emisión de fluoresceína. Magnificación 20X y 40X.

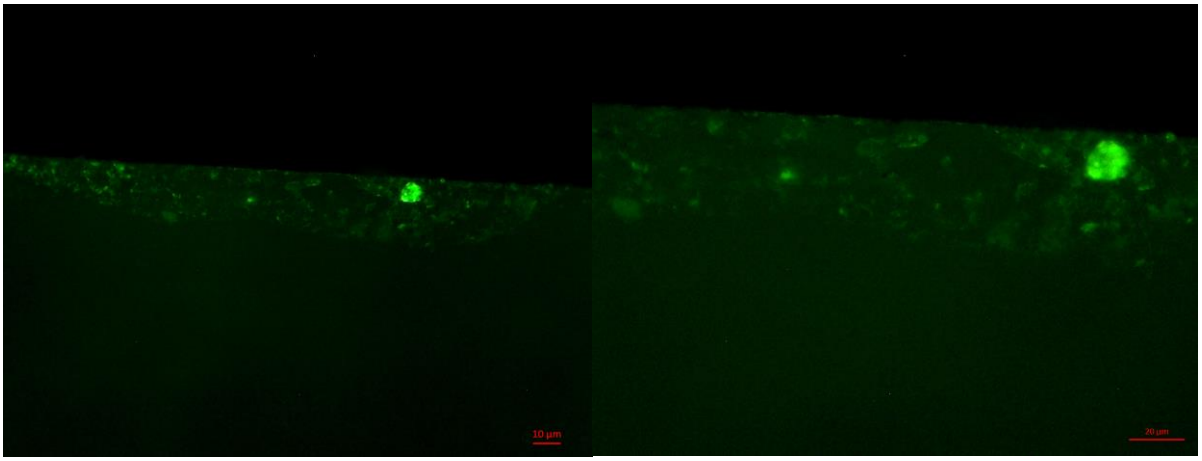


Figura 31. Emisión de fluoresceína por la Hibridación de la sonda EUB. Bacterias presentes en el borde del portaobjetos. Magnificación 20X y 40X.

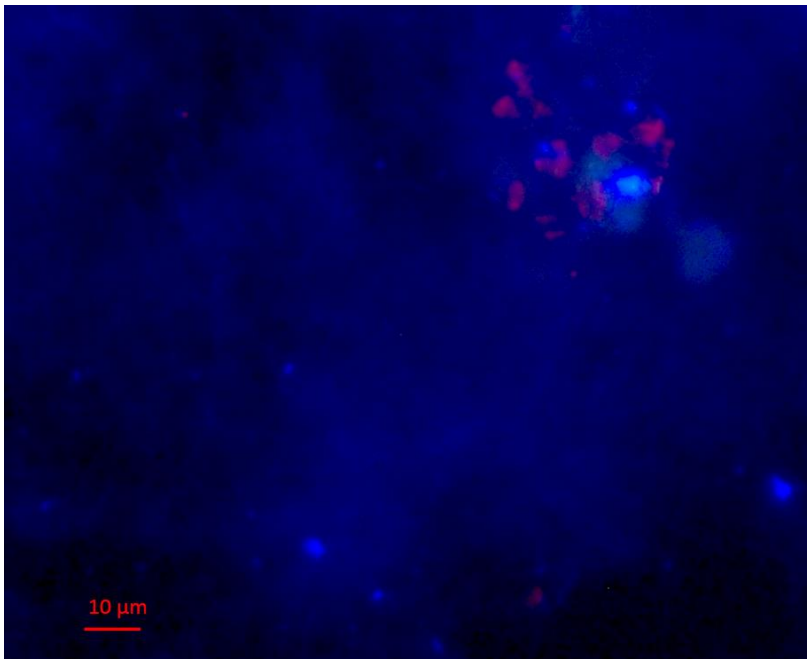


Figura 32. Las levaduras muestran fluorescencia roja. Magnificación 20X.

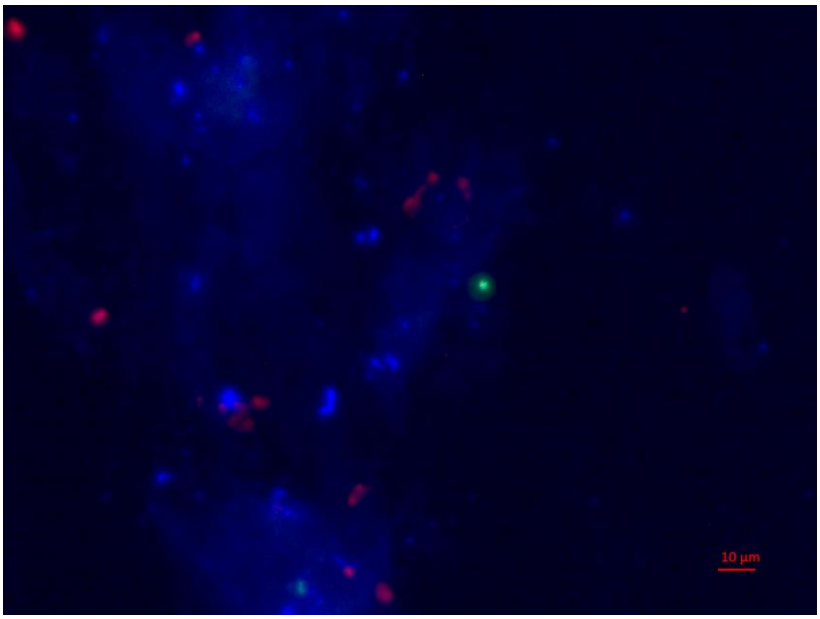


Figura 33. Hibridación de la sonda PF2 con la región 18S rRNA de levaduras presentes en gránulos de kéfir. Se observa la emisión del fluoróforo rojo Texas. Magnificación 40X.

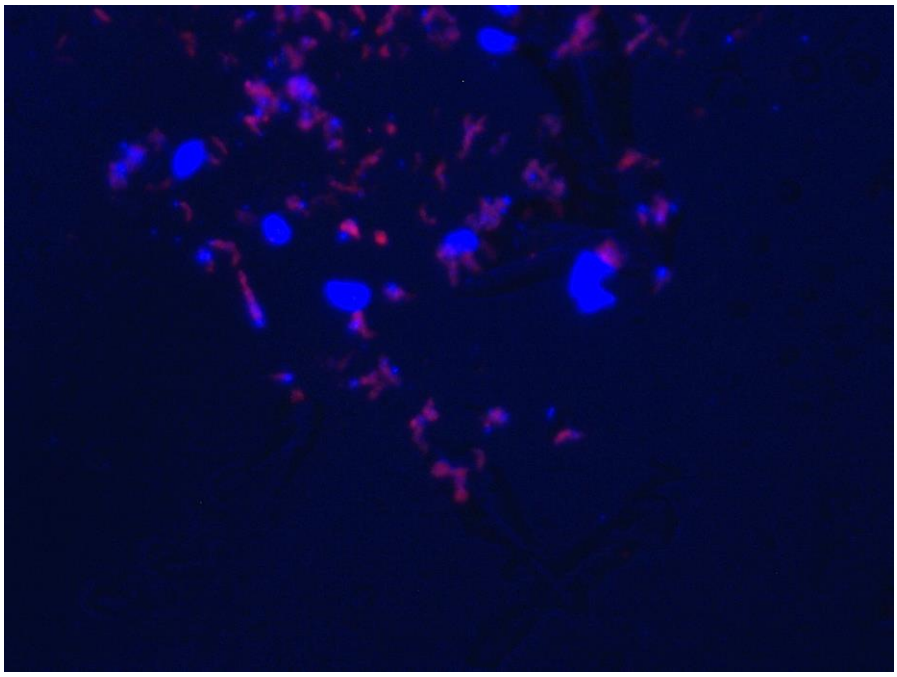


Figura 34. Hibridación de la sonda PF2 con la región 18S rRNA de levaduras. Magnificación 40X.

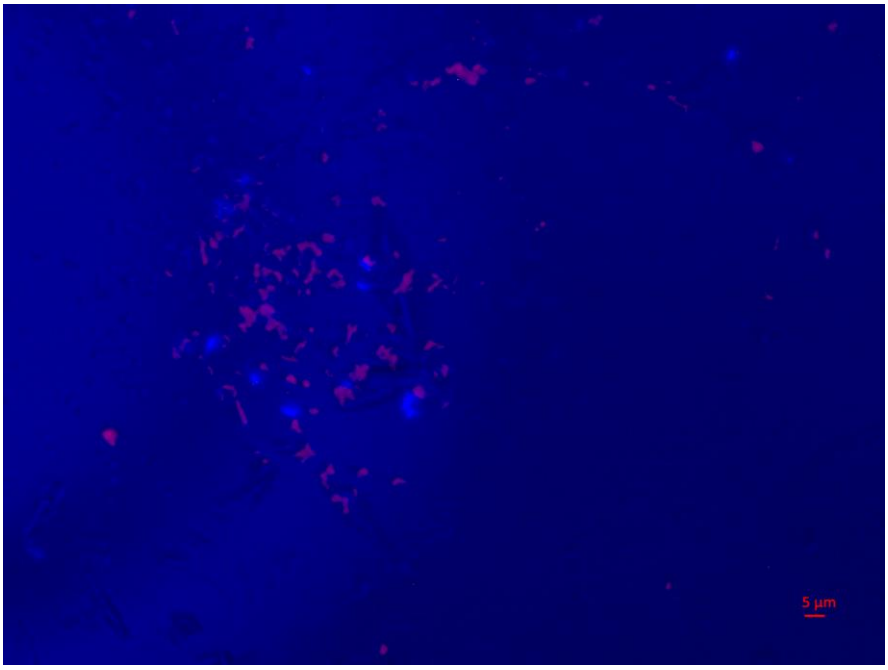


Figura 35. Identificación y visualización de las levaduras dentro de su microhábitat en los gránulos de kéfir. Magnificación 20X.

5.3. Imágenes de microscopía electrónica de barrido

Los gránulos de kéfir poseen una estructura elástica y gelatinosa a simple vista, su superficie exterior es suave y brillante (Figura 36). Sin embargo, en las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido, se observa claramente la irregularidad de la superficie y que los gránulos son huecos (Figura 37). Las imágenes indican que la densidad celular en los gránulos es extremadamente alta.

Resultó difícil localizar una zona regular en la muestra, por esta razón, algunas imágenes mostraban un ligero barrido debido a que los electrones inciden en distintos puntos. Se eligieron las mejores imágenes para su discusión. Se puede observar una abundancia de lactobacilos, embebidos en la matriz de kefirano, se observaron en menor cantidad levaduras y algunos cocos. En la microbiota predominan tres tipos de bacilos: cortos, largos y curvos. Se observa claramente el el polisacárido de kefirano.

Las micrografías muestran la matriz de bacterias, levaduras, polisacárido y proteínas (Figura 42). Se ha reportado que la población es distinta en la superficie respecto al interior, esto se atribuye en parte a las diferencias de pH a lo largo del gránulo; el interior se ha reportado que presenta un pH muy bajo que inhibe el crecimiento de lactococcus. En las micrografías obtenidas se observan que predominan bacilos curvos y largos.

Figura 36. Imagen macroscópica de gránulos de kéfir. Superficie irregular y multilobular. Presentan elasticidad y textura viscosa.

Los microorganismos de la superficie probablemente sean los que tienen un mayor impacto en el proceso de fermentación (Farnworth, 2008). Sin embargo, ocurre una gran variación en la población bacteriana de distintos gránulos, inclusive dentro de un mismo gránulo. Lin y col. (1999) concluyeron que el lugar de orígen de los gránulos por sí mismo explica las diferencias que han sido reportadas en varios estudios. Los resultados coinciden con Guzel-Zeydim y col. (2005), corroborando que el contenido microbiano de los gránulos de kéfir así como su distribución en los mismos, depende de su orígen. Se ha reportado que contienen lactobacilos, lactococcus y levaduras, inclusive en ocasiones bacterias ácido acéticas.

El material granular observado corresponde a partículas de leche coagulada que se adhieren a la superficie del gránulo, mientras que el material fibrilar corresponde al polímero de kefirano que se encuentra esparcido en todas las áreas del gránulo (Guzel-Seydim y col., 2005; Magalhaes y col., 2011).

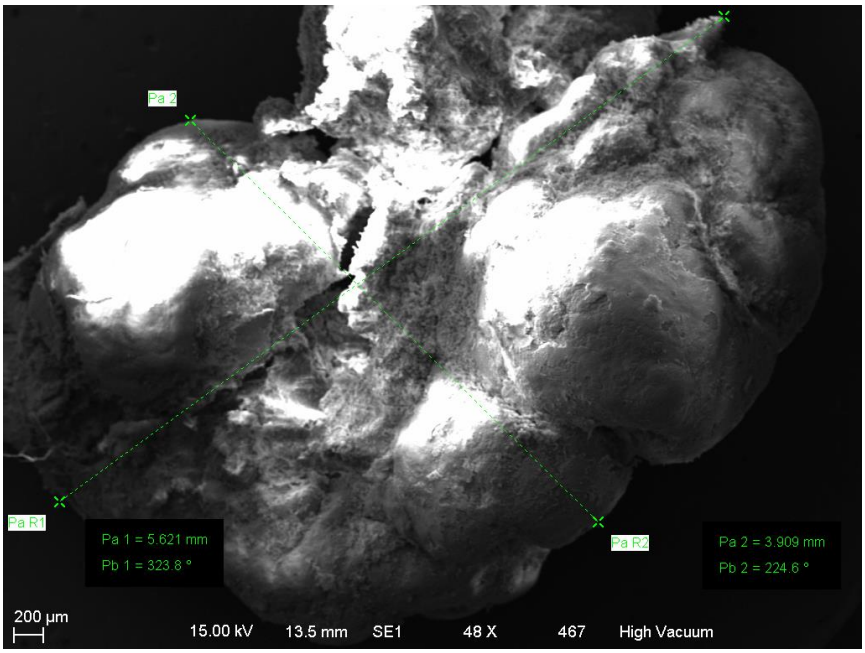


Figura 37. Micrografía electrónica de la superficie externa del gránulo de kéfir. Aumento 48X.

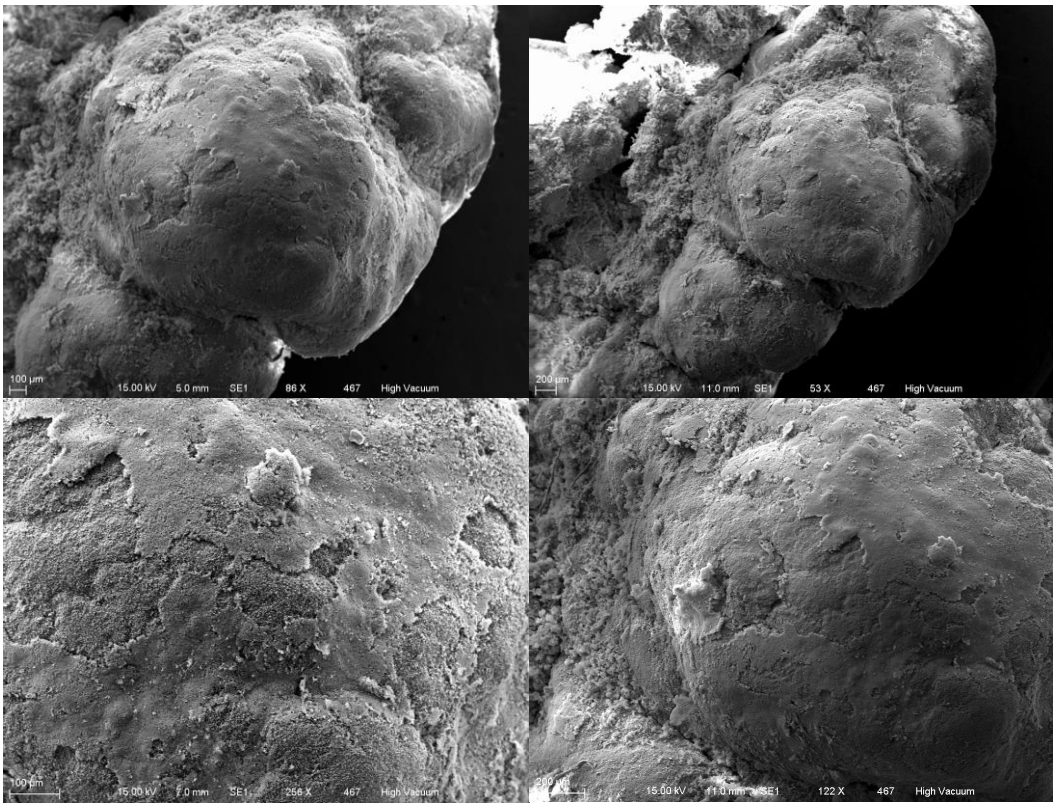


Figura 38. Micrografía electrónica de la superficie externa del gránulo de kéfir. Aumento 122X.

Figura 39. Superficie externa del gránulo de kéfir. Aumento 1,300X.

En las figuras 43-53 es posible observar la asociación de la microbiota en el kéfir, se observa el aglomerado de microorganismos en simbiosis, así como el polímero de kefirano.

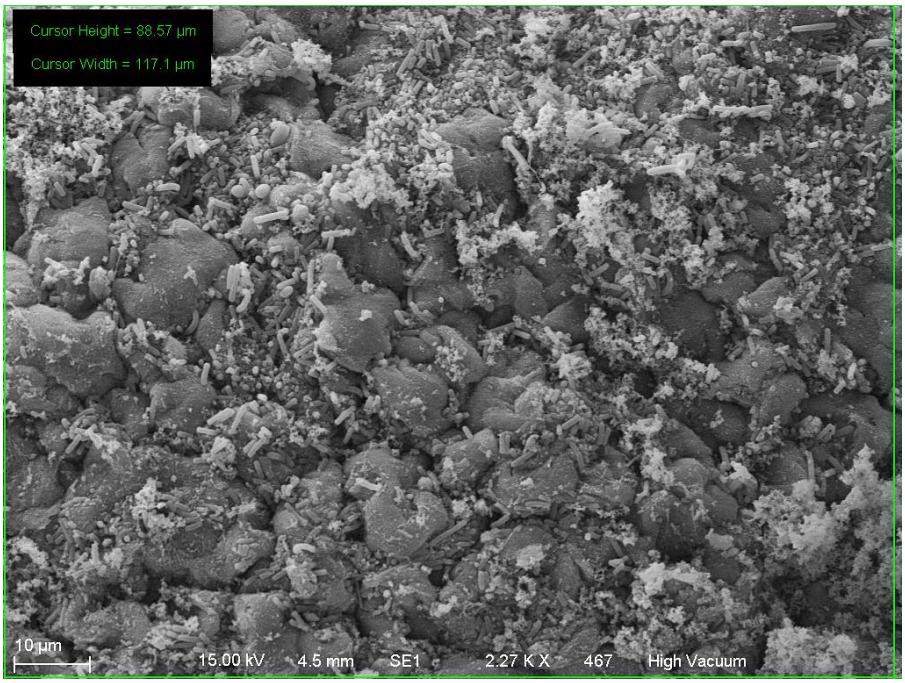


Figura 40. Superficie externa del gránulo de kéfir. Aumento 2,270X Se observa material fibrilar (polímero de kefirano).

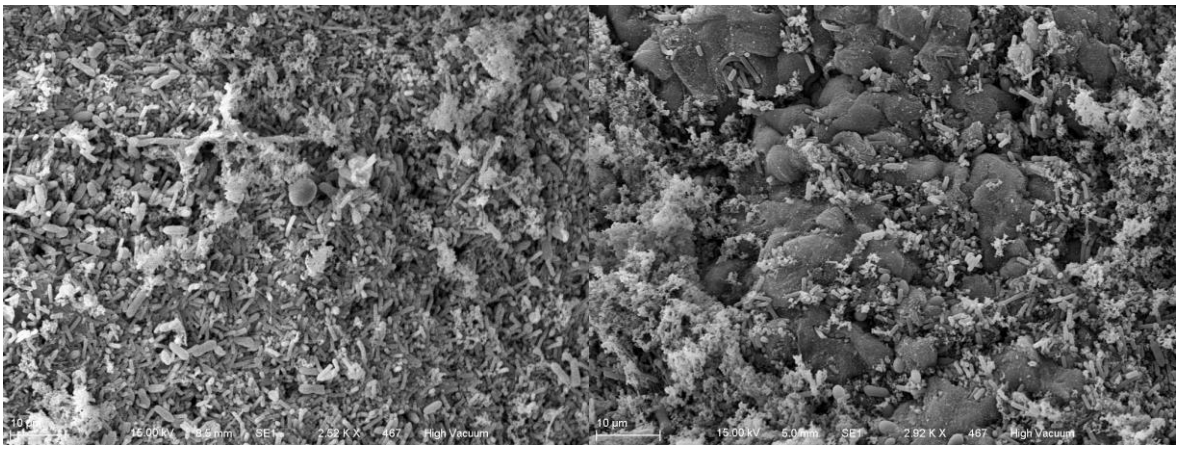


Figura 41. Superficie externa del gránulo de kéfir. Aumento 2,520X y 2,920X. Se observa material fibrilar (polímero de kefirano).

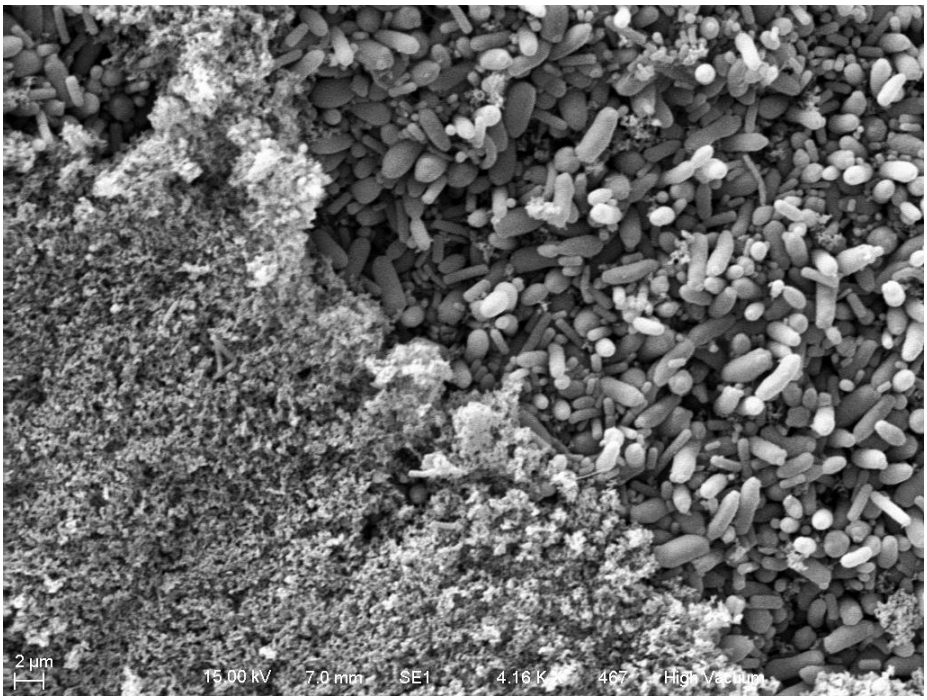


Figura 42. Superficie externa del gránulo de kéfir. Aumento 4,160X. Se observa material fibrilar (polímero de kefirano).

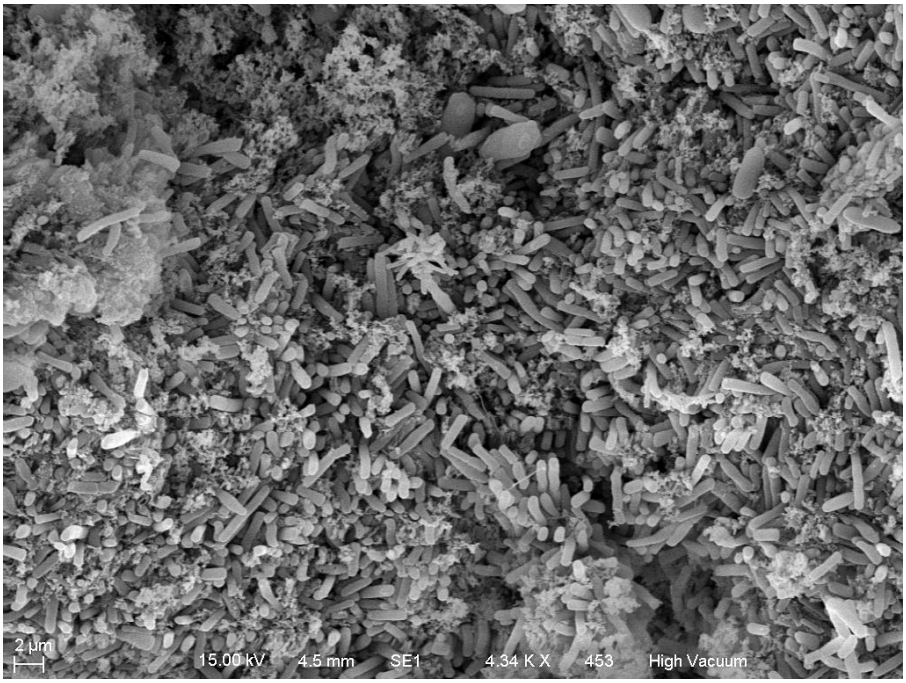


Figura 43. Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 4,340X. Microorganismos inmovilizados en la matriz de polisacárido y proteína.

Figura 44. Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 4,910X. Alta densidad celular. Se observa que diversas especies coexisten en una asociación simbiótica dentro de los gránulos de kéfir.

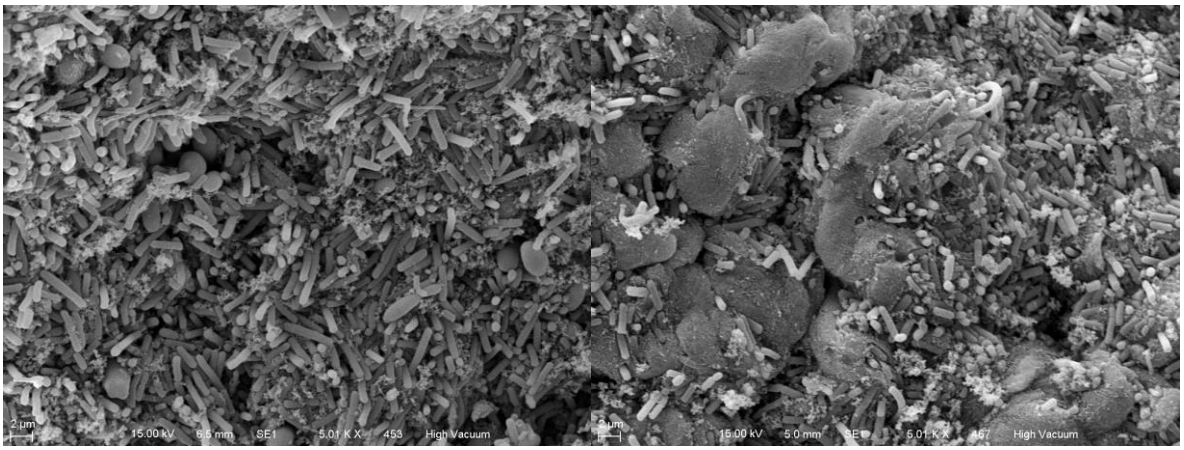


Figura 45. Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 5,010X. Abundantes lactobacilos y pocas levaduras.

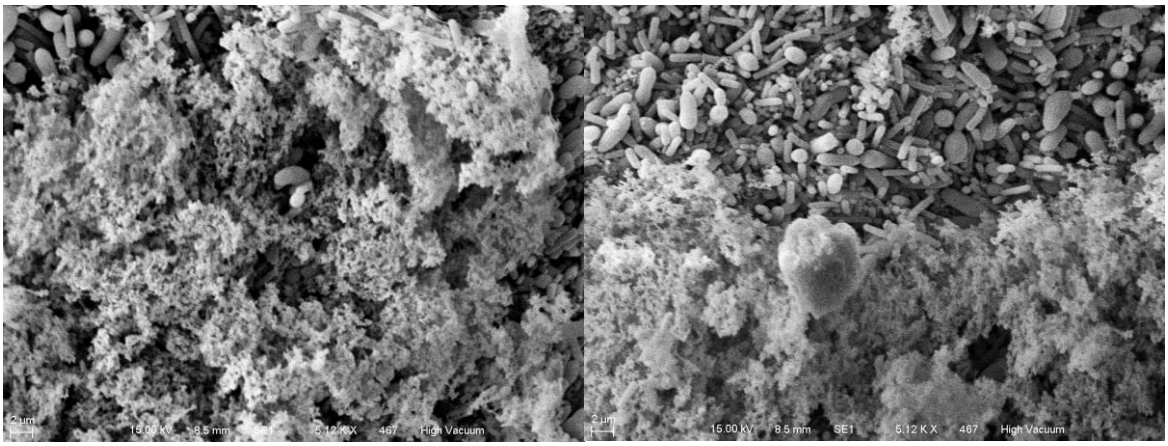


Figura 46. Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 5,120X. Se observa el polímero de kefirano.

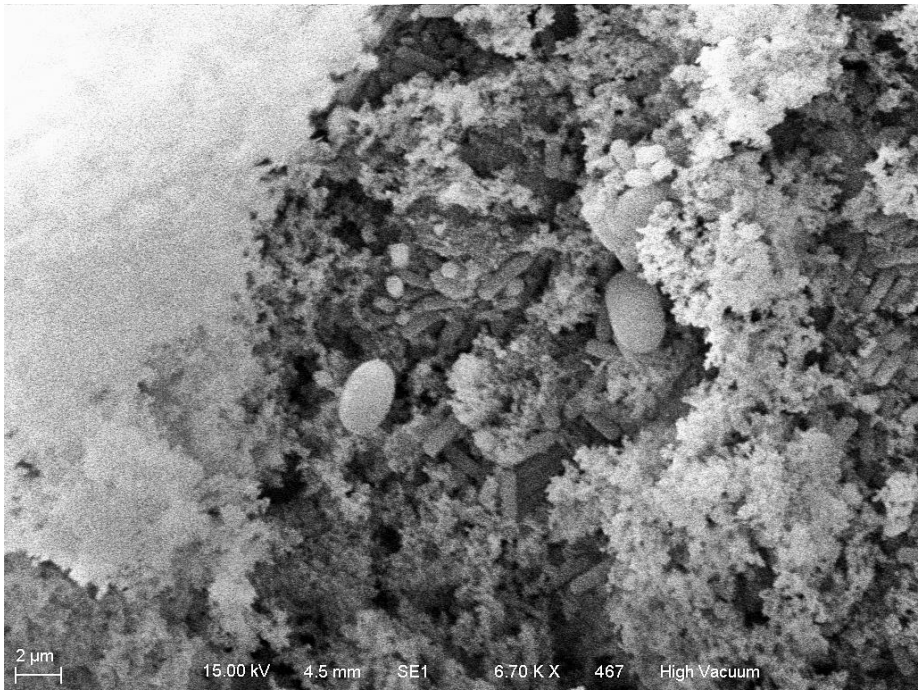


Figura 47. Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 6,700X. Se observa el polímero de kefirano.

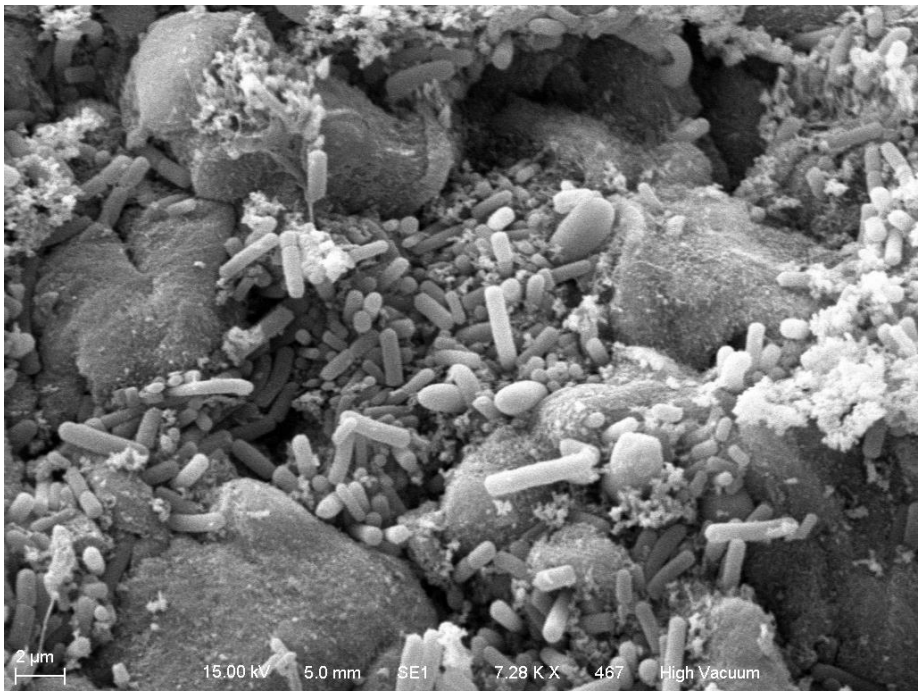


Figura 48. Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 7,280X. Se observan lactobacilos y un par de levaduras embebidas en material fibrilar (polímero de kefirano).

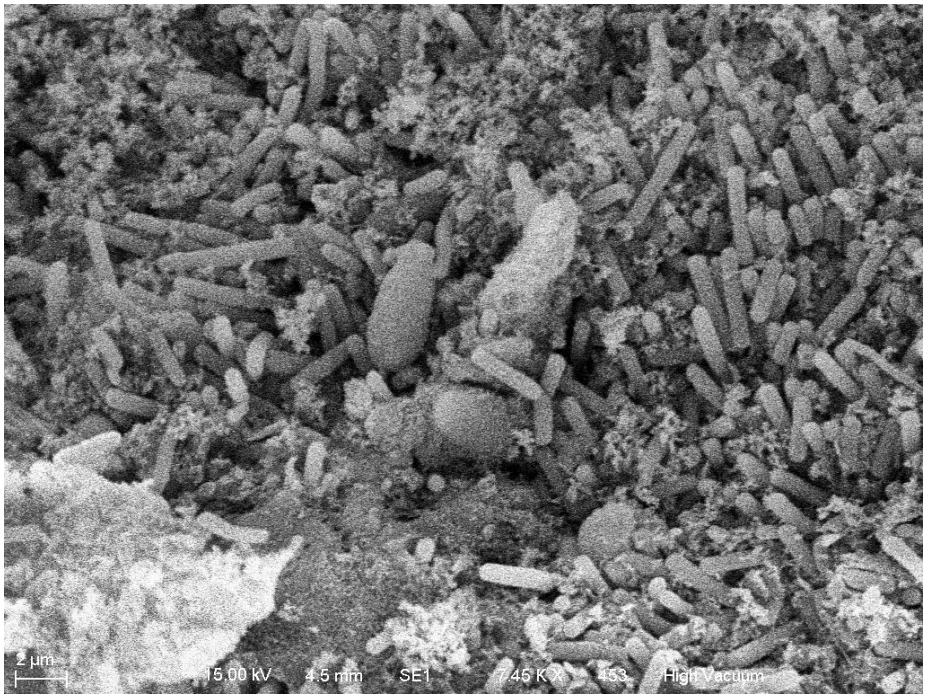


Figura 49. Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 7,450X. Se observan lactobacilos y un par de levaduras embebidas en material fibrilar (polímero de kefirano).

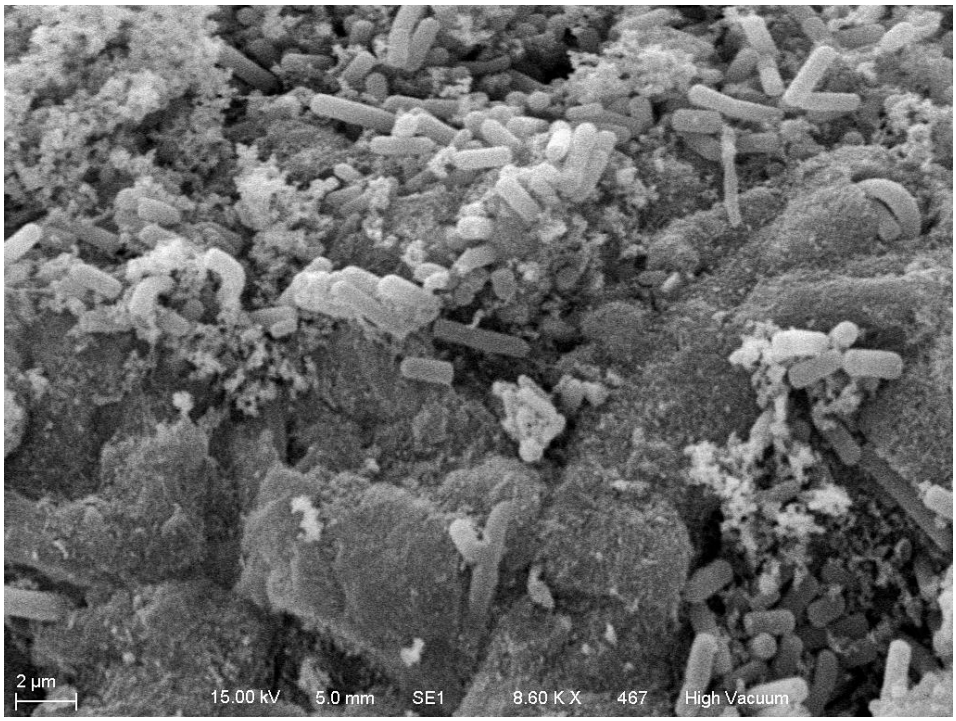


Figura 50. Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 8,600X. Se observan lactobacilos en material fibrilar (polímero de kefirano).

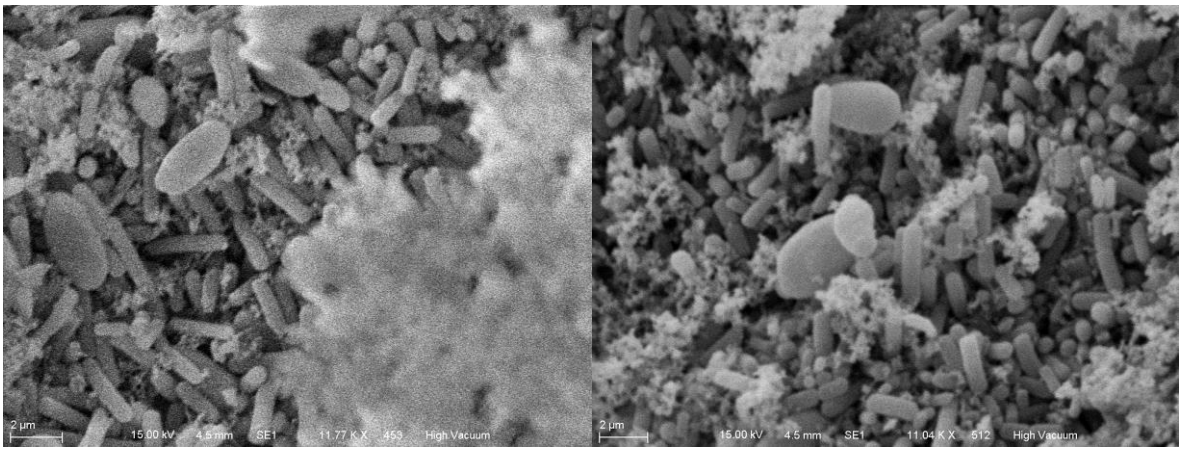


Figura 51. Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 11,770X. Observación de levaduras.

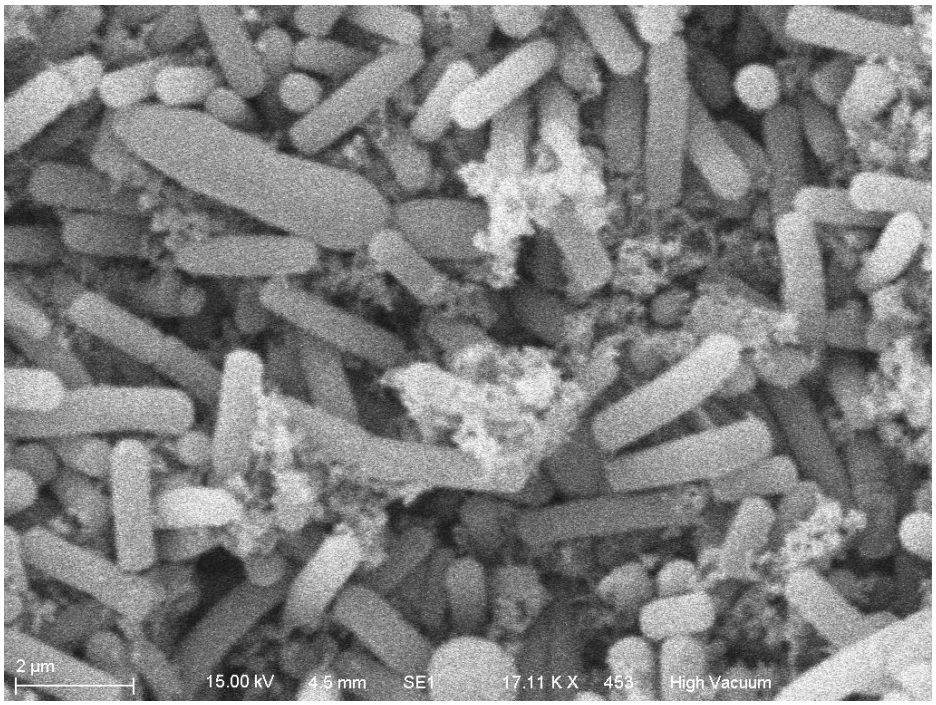


Figura 52. Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 17,110X. Se observan lactobacilos cortos y largos así como material fibrilar.

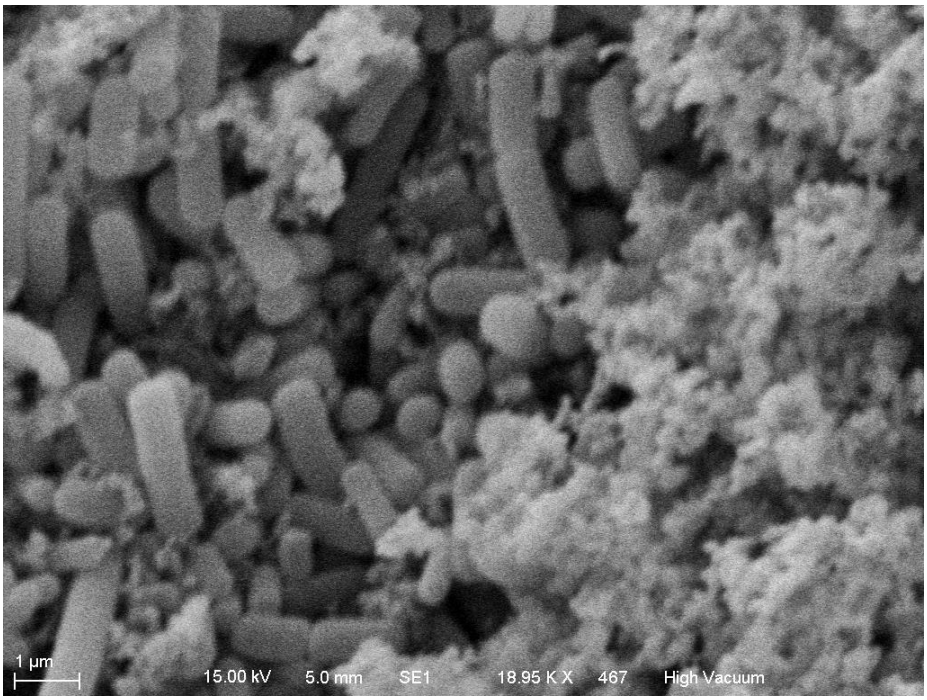


Figura 53. Superficie interna del gránulo de kéfir. Aumento 18,950X. Se observan lactobacilos cortos y largos así como material fibrilar.

5.4 Análisis molecular

El DNA fue extraído después de múltiples intentos (Figura 54). Se observa el DNA, sin embargo, se esperaba una mejor visualización. Este DNA fue utilizado para la amplificación de los marcadores filogenéticos de interés: la región V4-V5 del gen 16S rRNA de las comunidades bacterianas y la región ITS1 de levaduras.

5.4.1 Amplificación bacteriana

La región variable V4-V5 del gen 16S rRNA de bacterias fue amplificada mediante reacción en cadena de la polimerasa, utilizando los oligonucleótidos universales V1 y V5 reportados por Marsh y col. (2013). Para verificar la correcta ejecución de la PCR, así como la integridad de los fragmentos amplificados, se efectuó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) de donde se obtuvo la Figura 55. En esta figura se tiene en el primer carril el marcador de peso molecular (1 kb), seguido en orden el control negativo, control positivo 1, control positivo 2, muestra de bebida de kéfir KL8i, KL8ii y KL8iii.

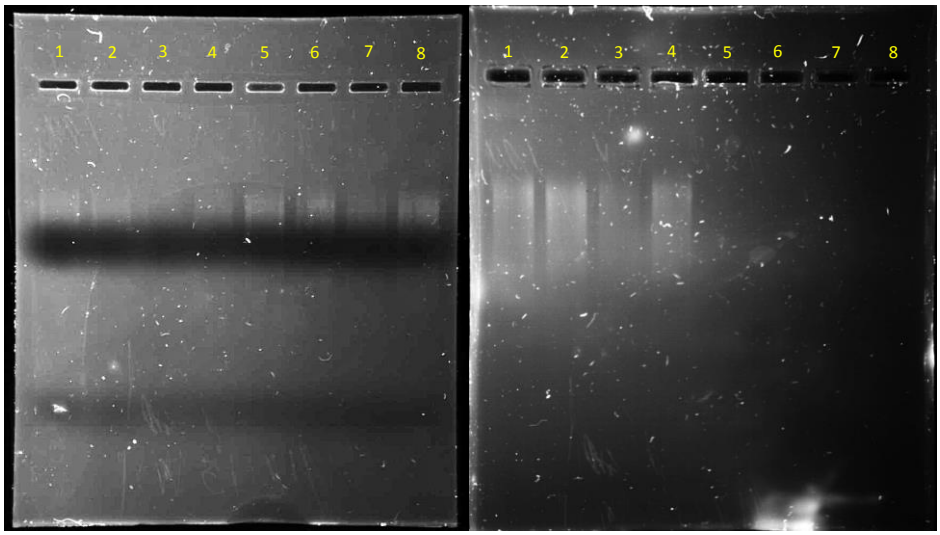


Figura 54. Muestras de la extracción de DNA visualizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v). A) En los carriles (1-8), muestras de DNA de gránulos de kéfir (GKSB) B) En los carriles (1-4), muestras de DNA de bebida fermentada de kéfir (KLSB).

Se pueden observar las bandas obtenidas por la amplificación (Figuras 55 y 56), coincidiendo en tamaño con el fragmento esperado de 408 pares de bases que reporta Marsh y col. (2013), confirmando así la realización adecuada de la técnica.

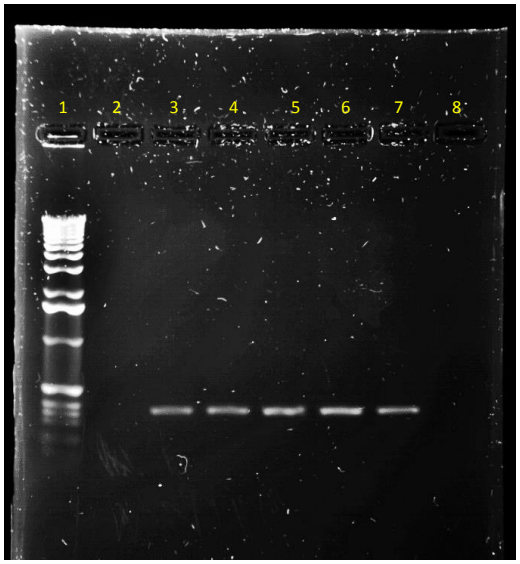


Figura 55. Productos de la amplificación de la región V4-V5 del gen 16S rRNA de la población bacteriana en la bebida de kéfir. En los carriles: (1) marcador de peso molecular (1 kb), (2) control negativo, (3) control positivo 1, (4) control positivo 2, (5-7) muestras KL8$_{i}$, KL8$_{ii}$ y KL8$_{iii}$.

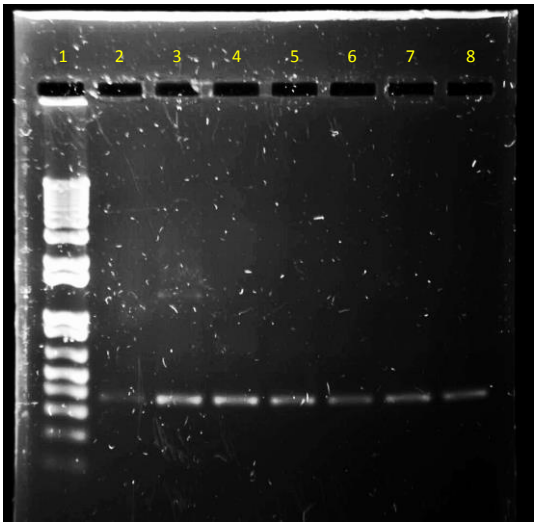


Figura 56. Imagen de gel de agarosa correspondiente a la amplificación de la región V4-V5 del gen 16S rRNA de la población bacteriana en gránulos de kéfir.
En los carriles: (1) marcador de peso molecular (1 kb), (2) control negativo, (3) control positivo, (4-8) muestras GKSB$_{1}$, GKSB$_{2}$, GKSB$_{3}$, GKSB$_{4}$, GKSB$_{5}$.

5.4.2 Amplificación de levaduras

Se observó la presencia de una banda inespecífica en el gel de agarosa de la amplificación de levaduras en las muestras de bebida fermentada de kéfir (Figura 57). Se realizaron gradientes de temperatura y se modificó la concentración de cloruro de magnesio con el fin de optimizar la PCR y reducir los productos inespecíficos, sin embargo, las bandas continuaron observándose.

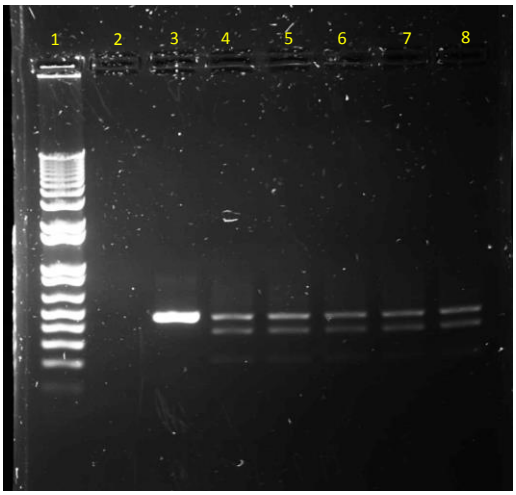


Figura 57. Imagen de gel de agarosa correspondiente a la amplificación de la región intergénica ITS1 rRNA de levaduras en muestras de bebida fermentada de kéfir. En los carriles: (1) marcador de peso molecular (1 kb), (2) control negativo, (3) control positivo, (4-8) muestras $KLSB_1$, $KLSB_2$, $KLSB_3$, $KLSB_4$, $KLSB_5$.

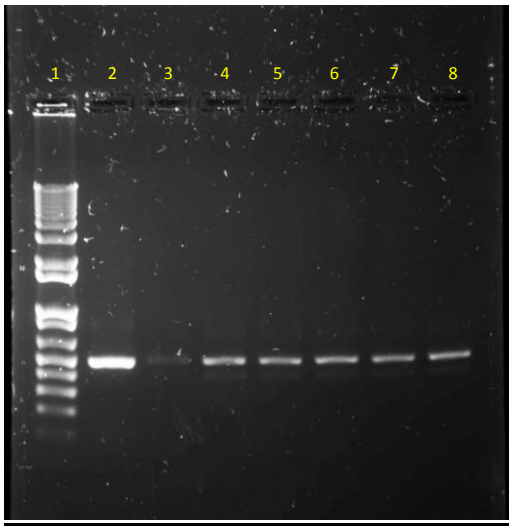


Figura 58. Amplificación de la región intergénica ITS1 rRNA de levaduras, utilizando los oligonucleótidos universales ITS1F e ITS2 en muestras de gránulos de kéfir.

En este caso, para la amplificación de levaduras fue necesario cortar las bandas de interés y purificar los productos directamente a partir del gel de agarosa (Figura 58).

5.5 Comunidades microbianas identificadas

El algoritmo BLAST utiliza estadística para ordenar todos los resultados acertados, muestra el mejor de ellos y nos muestra estadísticamente porqué es el mejor resultado. Para determinar las especies con mayor similitud, se consideró el valor máximo (mayor puntaje), que representa el mejor alineamiento para cada búsqueda y se denomina “max score”. En segundo lugar se analizó el porcentaje de homología y la similitud de bases que presentaron entre sí las secuencias. Cuanto mayor sea la puntuación mejor será el alineamiento. Las variables de confiabilidad son el porcentaje de identificación en la alineación que es el número de bases que coinciden por cada cien posiciones (Roderick, 2012).

Cuadro 11. Resumen del análisis de secuencias, bacterias identificadas en los gránulos y en la bebida fermentada kéfir.

Muestras	Microorganismos identificados	Similitud de bases	Porcentaje de similitud	Número de acceso
Bebida fermentada de kéfir	*Acetobacter syzygii*	310/314	99 %	NR_113850.1
	Acetobacter pasteurianus	312/314	99 %	NR_102925.1
	Acetobacter ghanensis	309/317	97 %	KP240984.1
Gránulos de kéfir	*Lactobacillus kefiranofaciens*	295/305	97 %	NR_117066.1
	Lactobacillus kefiranofaciens subs. kefirgranum	277/291	95 %	NR_117067.1
	Lactobacillus helveticus	277/291	95 %	HM218084.1

5.5.1 Bacterias identificadas en los gránulos de kéfir

En base a los resultados de homología, se determinó que el género de bacterias identificadas en las muestras de gránulos de kéfir fue Lactobacili. A nivel de especie se logró caracterizar a *Lactobacillus kefiranofaciens, Lactobacillus kefiranofaciens subs. kefirgranum, y Lactobacillus helveticus* (Cuadro 11).

En la columna de similitud de bases en dicho cuadro, se indica la tasa de homología de bases de las secuencias de las especies identificadas respecto a especies ya conocidas.

```
Puntaje                 Similitud de bases  Huecos

516 bits(279)  6e-146  295/305(97%)    2/305(0%)
       Query  24   CTCGGNTT-ACCGNGGNTTNGCNTCGNGAAACTGTTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG  82
                   ||||| || |||| ||   | || ||| |||||||||||||||||||||||||||||||||
       Sbjct  628  CTCGGCTTAACCGAGGAATTGCATCG-GAAACTGTTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG  686

       Query  83   TAGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAATACCAGTGGCGAAGG  142
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
       Sbjct  687  TAGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAATACCAGTGGCGAAGG  746

       Query  143  CGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAG  202
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
       Sbjct  747  CGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAG  806

       Query  203  ATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGGAGGCTTCCGCCTCT  262
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
       Sbjct  807  ATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGGAGGCTTCCGCCTCT  866

       Query  263  CAGGGCTGCAGCTAACGCATTAACCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAAC  322
                   ||| |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
       Sbjct  867  CAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAAC  926

       Query  323  TCaaa  327
                   |||||
       Sbjct  927  TCAAA  931
```

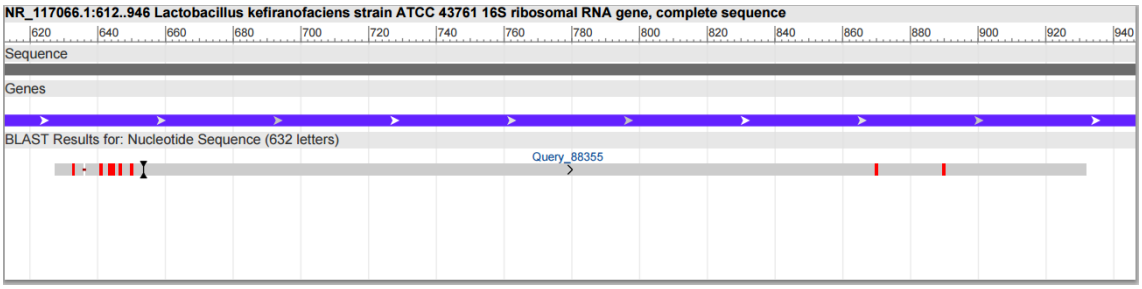


Figura 59. Alineamiento de la secuencia bacteriana del gen 16S rRNA respecto a *Lactobacillus kefiranofaciens*.

5.5.2 Bacterias identificadas en la bebida fermentada de kéfir

En el caso de las muestras de bebida fermentada de kéfir, el análisis de secuencias permitió identificar *a Acetobacter syzygii, Acetobacter pasteurianus y Acetobacter ghanensis.* Las secuencias de la región parcial del gen 16S rRNA de todas las especies identificadas se muestran en el Anexo I.

Como resultado de la búsqueda en el programa BLAST, en el Cuadro 11 se muestra la similaridad de las secuencias obtenidas con las registradas en el banco de genes de acuerdo con su alineamiento. Después de ello, es posible elaborar un dendograma (árbol filogenético) de las especies identificadas, el cual representa una hipótesis evolutiva de un conjunto de genes o especies y permite una clasificación de las relaciones evolutivas entre los genes homólogos existente en el genoma de especies divergentes (Roderick, 2012).

5.5.3 Levaduras identificadas en los gránulos de kéfir

El género de levaduras identificadas en las muestras de gránulos de kéfir fueron fue *Kazachstania* y *Saccharomyces.* Se logró caracterizar a *Kazachstania unisporus y Saccharomyces cerevisiae,* tal como se muestra en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Resumen del análisis de secuencias, levaduras identificadas en el kéfir de origen mexicano.

Muestras	Microorganismos identificados	Similitud de bases	Porcentaje de similitud	Número de acceso
Gránulos de kéfir	*Kazachstania unisporus*	207/214	97 %	*KJ128242.1*
	Saccharomyces cerevisiae	273/301	91 %	DQ530277.1
Bebida fermentada de kéfir	*Saccharomyces unisporus*	207/214	90 %	AF321542.1

5.5.4 Levaduras identificadas en la bebida de kéfir

En el caso de la bebida fermentada, la especie identificada fue *Saccharomyces unisporus* (Cuadro 12), presentando una similitud de bases de 207/214 (Cuadro 12). *S. unisporus* ha sido documentada en varias leches fermentadas y se ha convertido en un microrganismo de interés por ser no patógeno y de uso potencial en la industria alimentaria (Bhattacharya y col., 2013). El alineamiento de secuencias se observa en la Figura 60.

```
Puntaje                Similitud de bases  Huecos
357 bits(193)  6e-95  207/214(97%)    1/214(0%)  Plus/Plus
Query  59   CGTAGCTTTGCTTGGAGACACATACTGCCGAACCAGCGCTTAATTGCGCGGTTTGGTGGG  118
||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  28   CGTTGCTTTGCTTGGAGACACATACTGCCGAACCAGCGCTTAATTGCGCGGTTTGGTGGG  87

Query  119  TCTCTGTAGCTCAGTAGCACTATTACACACTGTGGAGATTTTATAATTCTTTGCATGCTT  178
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  88   TCTCTGTAGCTCAGTAGCACTATTACACACTGTGGAGATTTTATAATTCTTTGCATGCTT  147

Query  179  CTTTGGGCAGCTTCGGCAGCCCAGAGGTAACAAACACAAACAACTTTGTAATATTTGTTA  238
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| | |
Sbjct  148  CTTTGGGCAGCTTCGGCAGCCCAGAGGTAACAAACACAAACAACTTTGTAATATTTTTAA  207

Query  239  CCCAGTCANAACCAGAATTCCATAAAAATT-ATC  271
|||||||| ||||||||||||| ||| ||| |||
Sbjct  208  CCCAGTCAAAACCAGAATTCCAGAAAGATTTATC  241
```

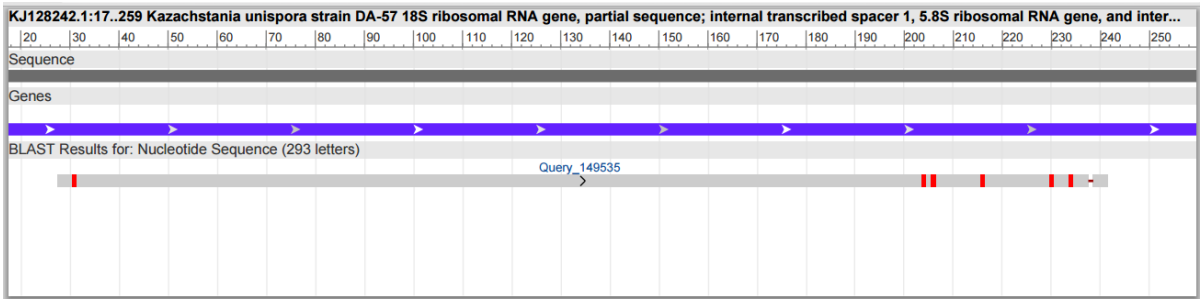


Figura 60. Alineamiento de la secuencia obtenida de la región ITS1 respecto a *Kazachstania unispora.*

5.6 Relación filogenética

El árbol filogenético se construyó en base a la homología de las secuencias del gen 16S rRNA bacteriano y de la región ITS1 de levaduras. Se utilizó el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) que puede ser descargado gratuitamente en el sitio http://www.megasoftware.net/. Se realizó un alineamiento

múltiple con las secuencias obtenidas, a partir de ello se construyó un dendograma (árbol filogenético) para las bacterias identificadas y otro para levaduras (Figura 61), basado en el análisis de máxima verosimilitud (ML; Maximum Likelihood Phylogenetic Tree). La relación filogenética entre las especies de bacterias se muestra en la figura 61. El árbol filogenético de las levaduras identificadas se encuentra representado en la Figura 63. Cabe notar que los componentes que incluye un árbol filogenético son: las puntas o nodos terminales, que son los organismos de interés que se pretende estudiar (pueden ser individuos de una misma especie o de un distinto nivel jerárquico), los nodos internos que representan los ancestros comunes que comparten dos o más taxones.

Las ramas unen a los nodos internos y por último, la raíz, la cual es el nodo más interno, siendo este el ancestro común que comparten todos los taxones (Mendoza, 2012). Cuando dos taxones comparten un ancestro común que no es compartido con nadie más se les denomina taxones hermanos. El “grupo sin conexión (outgroup)” es un taxón más lejanamente emparentado a nuestros taxones de interés, sirve para enraizar el árbol, en otras palabras, es en donde se encuentra la primera ramificación (Mendoza, 2012).

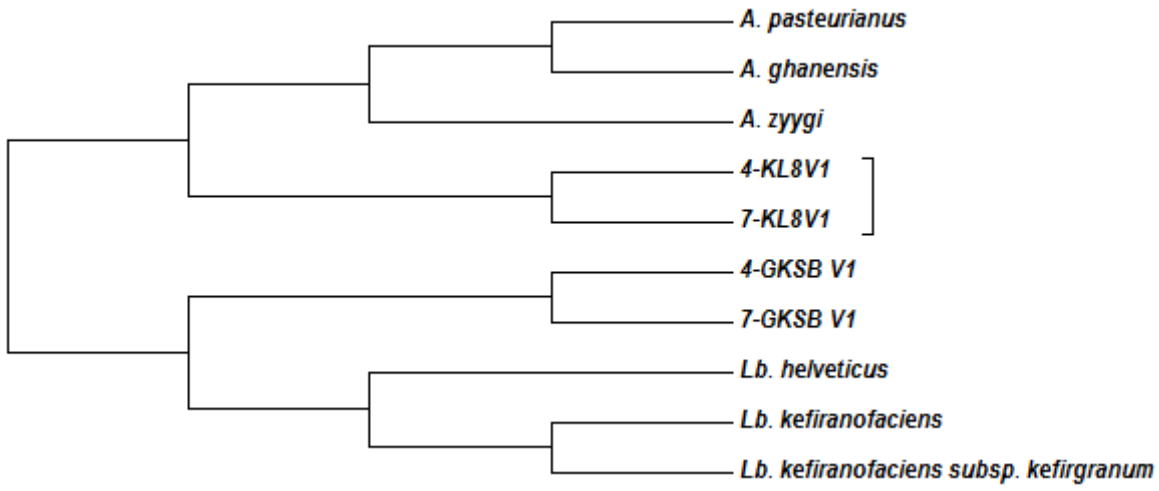


Figura 61. Construcción del árbol filogenético de la población bacteriana del kéfir, basado en el análisis de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood Phylogenetic Tree) (MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

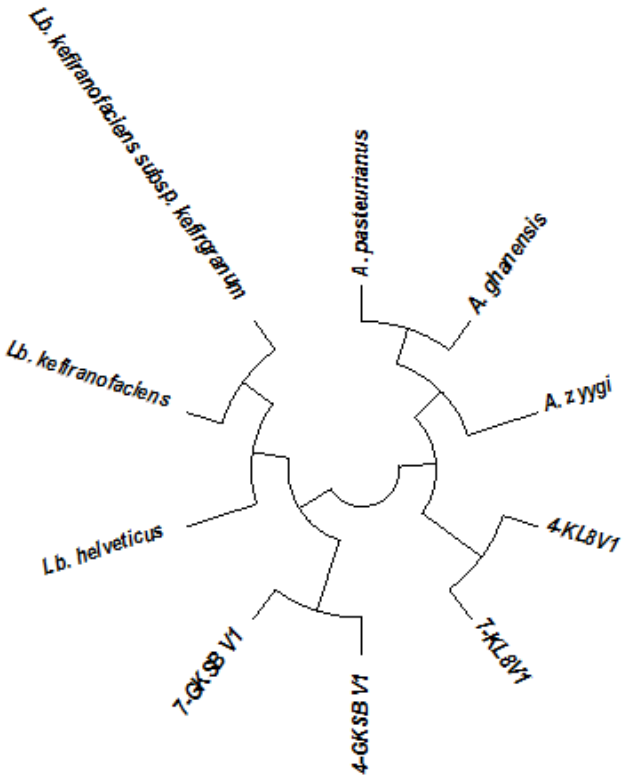


Figura 62. Representación circular del árbol filogenético de la población bacteriana.

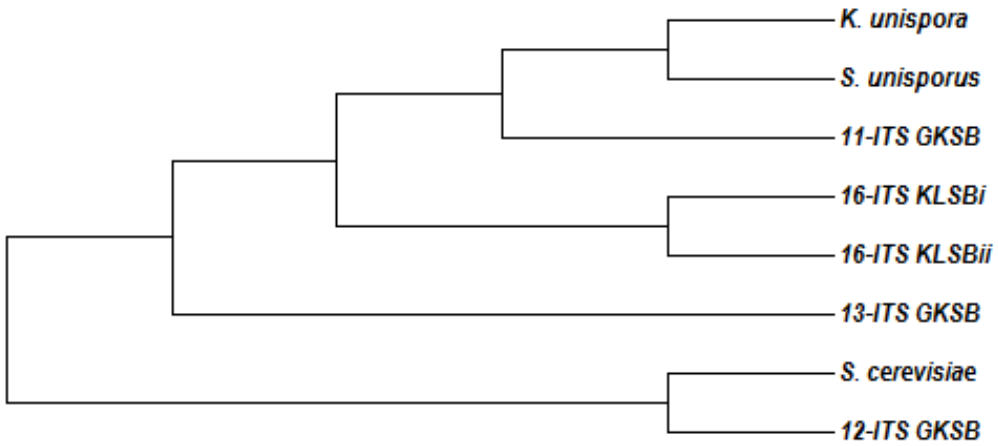


Figura 63. Construcción del árbol filogenético basado de la población de levaduras del kéfir, basado en el análisis de máxima verosimilitud.

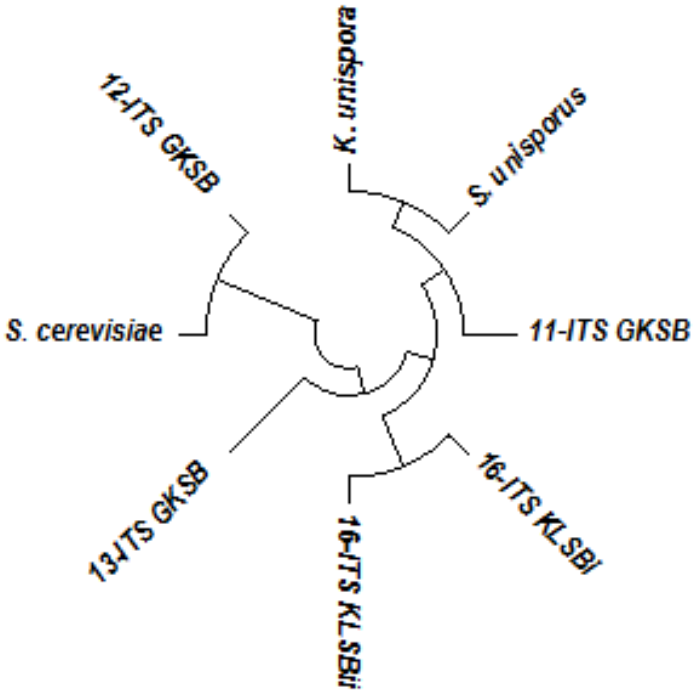


Figura 64. Representación circular del árbol filogenético de la población de levaduras del kéfir.

6. DISCUSIÓN

6.1 Extracción de DNA y exopolisacáridos

El aislamiento de DNA fue complicado pues requirió de varios intentos para optimizar los rendimientos y calidad, hasta obtener muestras que fueran adecuadas para la ejecución de PCR. Se observa en la Figura 54 que aún es necesario mejorar la extracción. Esta dificultad se atribuye a la alta presencia de exopolisacáridos (EPS) y proteínas en el kéfir, mismos que interfieren durante el procedimiento de extracción. Es necesario analizar más a fondo el polímero de kefirano. Se reporta que es de suma importancia prestar atención al protocolo de aislamiento de DNA ya que es un paso crucial y lo ideal es que el DNA extraído sea representativo de toda la comunidad microbiana del kéfir.

6.2 Especificidad de los oligonucleótidos utilizados

Los cebadores universales V1 y V5, funcionaron adecuadamente y dieron un buen resultado para la amplificación de la región V4-V5 del gen 16S rRNA bacteriano. En el caso de la amplificación de la región ITS1 de levaduras, se realizaron gradientes de temperatura para identificar la temperatura de alineamiento adecuada de los oligonucleótidos; así mismo, se varió la concentración de cloruro de magnesio con el fin de reducir los productos inespecíficos que se observaron (Figura 57). Sin embargo, los oligonucleótidos universales ITS1F e ITS2 no mostraron ser muy específicos ya que las bandas adicionales al fragmento de interés tanto en las muestras de gránulos de kéfir así como de bebida fermentada, continuaron apareciendo. A pesar de ello, no hubo problema al momento de purificar las bandas deseadas directamente a partir del gel de agarosa, ni con la posterior secuenciación de éstos productos de PCR. Marsh y col. (2013) en sus reportes no indican haber presentado problemas con los oligonucleótidos ITS1F e ITS2, de cualquier manera se sugiere analizar otras posibilidades e intentar con otros cebadores para futuros estudios.

6.3 Especies identificadas

Entre las especies identificada en el presente trabajo se encuentran *Saccharomyces cerevisiae, Kazachstania unisporus y Saccharomyces unisporus*. *S. cerevisiae* es la responsable de la producción de etanol y CO_2. Su presencia contribuye al potenciamiento de la calidad sensorial de la bebida de kéfir, promueve un olor fuerte que es típico de levaduras, así como su sabor fresco y punzante (Magalhaes y col., 2010). Además, reduce la concentración de ácido láctico, remueve el peróxido de hidrógeno y produce compuestos que estimulan el crecimiento de otras bacterias, incrementando la producción de exopolisacáridos de kefirano (Cheirsilp y col., 2003).

En lo que respecta a *Lactobacillus kefiranofaciens,* es una bacteria acido láctica homofermentativa que ha sido identificada frecuentemente en los gránulos de kéfir. Ha sido reportada en gránulos en Taiwan (Chen y col., 2008), Tibet, China (Jianzhong y col., 2009), Turquía (Kesmen y Kacmaz, 2011; Kök-Tas y col., 2011) y Brazil (Leite y col., 2012). Es una especie clave en el ecosistema del gránulo de kéfir y ha demostrado estar involucrada en la formación del gránulo debido a su fuerte capacidad de autoagregación. Además, se ha encontrado que *Lactobacillus kefiranofaciens subs. kefirgranum* es la bacteria responsable de la producción de kefirano (Hamet y col., 2013), el polisacárido soluble en agua en donde se encuentra embebido el consorcio microbiano y que ha mostrado poseer propiedades antidiabéticas, antibacterianas, antitumorales, así como un rol importante como espesante y emulsificante (Farnworth y col., 2005; Ahmed y col., 2013).

Lactobacillus helveticus es una especie homofermentativa y produce lactato a partir de glucosa en su vía glicolítca. Pertenece al grupo de organismos conocidos como bacterias ácido lácticas (ACL) y es reconocida con el status GRAS. Se utiliza tradicionalmente en la manufactura de quesos tipo suizos e italianos como el Gruyere, Emmental, Grana, Padano y Parmigiano Reggiano. Comienza a ganar

importancia como una especie benéfica para la salud en productos probióticos y nutraceúticos (Giraffa, 2014). *L. helveticus* tiene la capacidad de producir péptidos bioactivos y bacteriocinas, además de tener efecto simbiótico cuando se encuentra en conjunto con prebióticos en productos fermentados. Puede considerarse como una bacteria ácido láctica multifuncional y de sumo interés para la industria alimentaria. En cuanto a las especies *acetobacter*, son bacterias ácido acéticas y utilizan el etanol como fuente de carbono, sobreviviendo durante el proceso de fermentación. La acumulación de ácido acético, producto del metabolismo de las bacterias *acetobacter*, es importante ya que vuelve a la bebida de kéfir cada vez más ácida con el paso de los días e inhibe a microorganismos patógenos. Por otra parte, a pesar de que *L. lactis* es uno de los microorganismos predominantes y que usualmente se aíslan del kéfir, varios investigadores no han logrado observar cocos en las micrografías electrónicas. De acuerdo con varios autores, la hipótesis es que *L. lactis* presenta una baja adhesión a los gránulos durante su crecimiento, lo cual facilitaría su desprendimiento de los gránulos durante los procesos de lavado (Guzel-Seydim y col., 2005; Jianzhong y col., 2009; Magalhaes y col., 2011).

En este punto es importante mencionar que tanto para la extracción de DNA como para el proceso de preparación de muestra de microscopía electrónica de barrido, se realizaron varios lavados con agua destilada estéril con el fin de desprender restos de leche de los gránulos. Ello podría explicar el por qué no se identificó a *L. lactis* en las micrografías electrónicas ni en el análisis de secuenciación. Como se ha reportado, los grupos de microorganismos identificados en el presente trabajo realizan la fermentación láctica, alcohólica y acética.

6.4 Relación filogenética

Por definición, mientras más ancestros comunes compartan dos taxones en exclusión con otros en un árbol filogenético, se encuentran más cercanamente emparentados. En la Figura 61, el dendograma muestra que *A. ghanensis* y *A. pasteurianus* son taxones hermanos y se encuentran cercanamente emparentadas

con la bacteria *Acetobacter zyygi* y con las secuencias obtenidas de las muestras de bebida de kéfir. Por su parte, *Lactobacillus kefiranofaciens y Lactobacillus kefiranofaciens subs. kefirgranum* se encuentran más cercanamente emparentadas entre ellas y con *Lactobacillus helveticus, además,* con las secuencias obtenidas de las muestras de gránulos de kéfir. La Figura 62 se muestra el mismo árbol de especies bacterianas, siendo la única diferencia que la representación es en círculo. Los árboles pueden representarse de distintas maneras, siempre y cuando se respete la topología o patrón de ramificaciones.

En el caso de levaduras, *Kazachstania unispora* y *Saccharomyces unisporus* son taxones hermanos y comparten ancestro común (nodo interno) con la muestra 11-ITS GKSB (Gránulo de kéfir) (Figura 63). Todas las secuencias presentan homología (la relación entre dos caracteres que han descendido, generalmente con modificación, de un ancestro común), particularmente *S. cerevisiae* se encuentra cercanamente emparentada con la secuencia obtenida de la muestra de gránulo de kéfir 12-ITS GKBS. La representación en círculo muestra claramente los patrones de ramificación y la manera en que se encuentran conectadas las secuencias (Figura 64). En los dos árboles filogenéticos, el nodo raíz representa el ancestro común más reciente de todos los taxones, también llamados Unidades Operacionales Taxonómicas (OTU, Operational Taxonomic Unit).

6.5 Distribución de los microorganismos en los gránulos de kéfir

La distribución de los microorganismos en los gránulos de kéfir se ha estudiado y los resultados son un tanto controversiales. Por ejemplo, un grupo de investigadores apoya la hipótesis de que las levaduras se encuentran en la zona interna del gránulo y que los lactobacilos así como escasos lactococos predominan en la superficie (Botazzi y Bianchi, 1980; Lin y col., 1999). A la inversa, otros grupos describen que las levaduras están presentes tanto en las áreas externas como internas, habiendo como única diferencia entre zonas la morfología de las bacterias (Guzel-Seydim y col., 2005; Jianzhong y col., 2009; Magalhaes y col., 2011). Guzel-

Seydim y col. (2005) notaron que en el interior predominaban lactobacilos y no encontraron evidencia de levaduras al interior. Además de eso, algunos autores (Jianzhong y col., 2009; Magalhaes y col., 2011) han reportado que hay un menor número de células al interior del gránulo respecto a la porción externa. De Olivera Leite y col., (2013) evaluaron la distribución de gránulos de distintas regiones de Brazil, observando variaciones de acuerdo al origen del gránulo. Los lactobacilos se encontraron tanto en la parte interna como externa, sin embargo las levaduras se encontraron con mayor frecuencia en el exterior. Lin y col. (2012) concluyeron que el origen de los gránulos por sí mismo explica las diferencias que se han reportado en varios estudios de microscopía electrónica.

6.6 Relación simbiótica e interacciones de microorganismos en el kéfir

Se observó la interacción entre las levaduras y bacterias en los gránulos de kéfir mediante microscopía electrónica de barrido. Su interdependencia es muy compleja y aún no se entiende completamente. Los microorganismos pueden ya sea competir por nutrientes o producir metabolitos que inhiban o estimulen el crecimiento de los otros. Sin embargo, cabe notar que cuando las bacterias son removidas de los gránulos, las levaduras no crecen con la misma eficiencia (Cheirslip y col., 2003; Farnworth, 2008). Otros ejemplos que muestran la importancia de estas interacciones, es que cuando *L. kefiranofaciens* crece en cocultivo con *S. cerevisiae*, se estimula la producción de kefirano. (Cheirslip y col., 2003). Por otra parte, Lopitz-Otsoa y col. (2005) obtuvieron resultados que indican que la producción de vitamina B de *Acetobacter spp.* favorece el crecimiento de otros microorganismos presentes en los gránulos de kéfir.

6.7 Análisis de comunidades microbianas complejas

Una de las principales limitantes al investigar comunidades microbianas complejas es que las especies que se encuentran en pequeñas cantidades, frecuentemente no son amplificadas o no se logra aislar su DNA (Ercolini, 2004).

6.8 Factores que influyen en la identificación de las especies microbianas del kéfir

6.8.1 Condiciones de fermentación

Simova y col. (2012) mencionan que la proporción de los microorganismos que se encuentran en los gránulos difiere con respecto a los que se encuentran en la bebida fermentada. Asociadas a esta diferencia están las condiciones de fermentación como es el tiempo de fermentación, temperatura, grado de agitación, tipo de leche utilizada, proporción del inóculo gránulo/leche, almacenamiento, entre otros.

6.8.2 Abundancia variable de especies

La menor abundancia de ciertas especies en una determinada muestra afecta los resultados de PCR, esto ocasiona que se minimice la amplificación de fragmentos de algunas especies bacterianas (Bacer y col., 2003). Las especies dominantes pueden suprimir la amplificación de aquellas que se encuentran presentes en menor cantidad (Schabereiter-Gurtner y col., 2011). Prakitchaiwattana y col. (2004) mencionan que las especies dominantes llegan a presentar mayores cantidades de DNA y por ello tienen una mayor probabilidad de ser detectadas.

Por otra parte, Garrote y col. (1997) reportaron que el número de lactobacilli (10^9 UFC/g) era más alto que el de lactococci (10^7 UF C/g) en los gránulos de kéfir. En base a esto se esperaba que las probabilidades de amplificar DNA de lactobacilos fueran considerablemente más altas, y así fue. Esto podría explicar el por qué no se logró amplificar DNA de *L. lactis*.

6.8.3 Ausencia de especies contaminantes

Se han llegado a aislar algunas especies de manera poco frecuente las cuales son consideradas como contaminantes. Tal es el caso de *Pseudomonas spp*. (Jianzhong y col., 2009; Dobson y col., 2011; Leite y col., 2012) y miembros de la

familia Enterobacteriaceae, al igual que Clostridiciaceae (Dobson y col., 2011). La presencia de estos microorganismos se asocia a una contaminación debido al manejo de los gránulos y a malas prácticas durante la preparación de la bebida. En el presente trabajo, no se identificó a ninguna de estas especies lo cual indica que el manejo de los gránulos fue adecuado a pesar de que el cultivo y la fermentación se llevaron a cabo de manera casera.

6.9. Comparación de resultados con los reportes más recientes de otros países

En el presente estudio de kéfir mexicano, tal como se muestra en el Cuadro 13, se identificó la presencia del género Acetobacter, coincidiendo con reportes de gránulos de Portugal (Magalhaes y col., 2011), El Tibet, Turquía e Italia. *Lb. kefiranofaciens* fue identificada al igual que en Turquía (Unal y col., 2013) e Italia (Garofalo y col., 2015). *S. cerevisiae* se reporta en Portugal, mientras que *Kazachstania* ha sido identificada en Irlanda (Marsh y col., 2013) y Portugal. En Irlanda y Taiwan (Wang y col., 2008) se reporta el género *Kluveromyces,* mismo que no fue identificado en los gránulos del presente estudio.

Se puede observar que hay similitudes en algunos casos, al mismo tiempo que se presentan diferencias en otros. No hay especies que sean exclusivas de una región. Como lo mencionan varios autores, la composición microbiana del kéfir puede considerarse como extremadamente variable y en ocasiones no del todo definida, ya que es influenciada en gran medida por el origen geográfico de los gránulos, las condiciones climáticas, el método (temperatura y tiempo de incubación, agitación, proporción de gránulos/leche, entre otros) y tipo de leche utilizada para el cultivo y subcultivos (Garofalo, 2015).

Cuadro 13. Bacterias y levaduras que recientemente se han encontrado en kéfir.

Región	Especies identificadas	Referencias
Portugal	*Acetobacter* *Lactobacillus paracasei* *Saccharomyces cerevisiae* *Kazachstania aerobia* *Lachancea meyersii*	Magalhaes y col., 2011
Taiwan	*Kluveromyces marxianus* *Saccharomyces turicensis* *Pichia fermentans* *Saccharomyces unisporus*	Wang y col., 2008
Tibet	*Lactobacillus* *Lactococcus* *Acetobacter*	Gao y col., 2013
Turquía	*Lactobacillus kefiranofaciens* *Enterococcus faecium* *Acetobacter zyygi* *Lactobacillus helveticus* *Leuconost mesenteroides* *Lactococcus lactis* *Acetobacter lovaniensis*	Ünal y col., 2013
	L. lactis *Leuconostoc mesenteroides* *Lactobacillus kefiri* *Lactobacillus acidophilus* *Streptococcus thermophilus*	Kesmen y col., 2011
Italia	*Lactobacillus kefiranofaciens* *Dekkera anomala* *Streptococcus thermophiles* *Lactococcus lactis* *Acetobacter*	Garofalo y col., 2015
Irlanda	*Lactobacillus* *Leuconostoc* *Saccharomyces* *Kazachstania* *Kluveromyces*	Marsh y col., 2013

7. CONCLUSIONES

La técnica de amplificación mediante PCR de la región V4/V5 del gen 16S rRNA así como de la región intergénica ITS1 y su posterior secuenciación, permitió una identificación confiable de bacterias y levaduras en kéfir mexicano.

Se identificaron 6 especies de bacterias (*Lactobacillus kefiranofaciens, Lactobacillus kefiranofaciens subs. Kefirgranum, Lactobacillus helveticus, Acetobacter syzygii, Acetobacter pasteurianus y Acetobacter ghanensis)* y 3 de levaduras: *Kazachstania unisporus, Saccharomyces cerevisiae y Saccharomyces unisporus*.

La identificación molecular, en conjunto con la técnica de FISH y microscopía electrónica de barrido, combina la precisión de la genética molecular con la información visual de la microscopía, permitiendo la identificación y visualización de las células microbianas individuales en los gránulos de kéfir.

Se visualizó el consorcio microbiano del kéfir, observando la presencia de lactobacilos, cocos y levaduras, los cuales coexisten en una asociación simbiótica y se encuentran embebidos en una matriz de polímero de kefirano.

Las cepas microbianas y su distribución en los gránulos de kéfir dependen de su orígen. El presente trabajo sienta las bases para estudios futuros que estén orientados a generar un mayor conocimiento de la microbiota del kéfir mexicano.

PERSPECTIVA

Actualmente, la aplicación de probióticos en la industria alimentaria se encuentra en expansión. El entendimiento de las relaciones simbióticas entre distintos microorganismos presentes en los alimentos y sus interacciones, será de gran ayuda en la mejora de los procesos tecnológicos.

El desarrollo y comercialización de una bebida mexicana a base de kéfir, podría tener un rol importante en el mercado nacional así como ser un beneficio para la salud de la población mexicana

Se sugiere la construcción de una biblioteca metagenómica que permita realizar un análisis molecular representativo de toda la población microbiana así como utilizar técnicas actualizadas como lo es la pirosecuenciación.

8. REFERENCIAS

Ahmed Z, Wang Y, Ahmad A, Khan S, Nisa M, Ahmad H, Afreen A. Kefir: a contemporary perspective. Critical Reviews in Food Science and Nutrition **2013**; 53(5):422-434.

Amann R, Ludwig W, Schleifer K. Phylogenetic Identification and *in situ* Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. Microbiological Reviews **1995**;59: 143-169.

Amann R, Fuchs B. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. Nature Reviews Microbiology **2008**;6:339-348.

Assadi M, Pourahmad R, Moazami N, Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. World Journal of Microbiology & Biotechnology **2000**;16:541-543.

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

Bacer G, Smith J, Cowan D. Review and re-analysis of domain- specific 16S primers. Journal of Microbiological Methods **2003**;55:541-555.

Bhandari B. Food Materials Science and Engineering. John Wiley & Sons Ltd Publications **2012**.

Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. Applied Microbiology and Biotechnology **2010**;87:99-108.

Bekar O, Yilmaz Y, Gulten M. Kefir improves the efficacy and tolerability of triple therapy in eradicating *Helicobacter pylori.* Journal of Medicinal Food **2011**;14(4):344-347.

Bergey DH. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. New York Springer Press **2005**.

Bosshard P, Abels S, Zbinde R, Bottger E, Altwegg M. Ribosomal DNA Sequencing for Identification of Aerobic Gram-Positive Rods in the Clinical Laboratory (an 18-Month Evaluation). Journal of Clinical Microbiology **2003**;43:4134-4140.

Botazzi V, Bianche F. A note on scanning electron microscopy of micro-organisms associated with the kefir granule. Journal of Applied Bacteriology **1980**;48:265-268.

Brown T. Genomas 3ª edición. Editorial Médica Panamericana **2008**:34-36.

Cai H, Archambault M, Prescott JF. 16S ribosomal RNA sequence–based identification of veterinary clinical bacteria. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation **2003**;15:465-469.

Cardenas E, Tiedje J. New tools for discovering and characterizing microbial diversity. Current Opinion in Biotechnology **2008**;19:544-549.

Chen T, Wang S, Chen K, Liu J, Chen M. Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. Journal of Dairy Science **2009**;92:3002-3013.

Cheirslip B, Shimizu S, Shioya S. Enhanced kefiran production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae.* Journal of Biotechnology **2003**;100:43-53.

Chivian D, Arkin A. Genomics for environmental microbiology. Current Opinion in Biotechnology **2006**;17:229-235.

Cocolin L, Aggio D, Manzano M, Cantoni C, Comi G. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast population in raw milk. International Dairy Journal **2002**; 12:407-411.

Da Silva A, BernardiI T; Carvalho P, Menegotto M, Valente P. Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. Brazilian Archives of Biology and Technology **2012**;55(2):60-68.

De LeBlanc D, Matar C, Farnworth E, Perdigón G. Study of immune cells involved in the antitumor effect of kefir in a murine breast cancer model. Journal of Dairy Science **2007**;90(4):1920-1928.

De Oliveira Leite A, Miguel M, Peixoto R, Rosado A, Silva J, Paschoalin V. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. Brazilian Journal of Microbiology **2013**;44(2):341-349.

De Vuyst L, Degeest B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews **2006**;23:153-177.

Dobson A, O'Sullivan O, Cotter P, Ross P, Hill C. High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain. Fems Microbiology Letters **2011**;320:56–62.

Ercolini D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. Journal of Microbiological Methods **2004**;56:297-314.

FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food: "Guidelines for the evaluation of probiotics in food". May 2002; London, Ontario, Canada.

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

Farnworth E. Handbook of fermented functional foods 2nd edition **2008**:90-118.

Garcia-Fontán M, Martínez S, Franco I, Carballo J. Microbiological and chemical changes during the manufacture of Kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture. International Dairy Journal **2006**;16:762-767.

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

Gao J, Fengying G, Jie G. Metagenome analysis of bacterial diversity in Tibetan kefir grains. European Food Research and Technology **2013;**236:549-556.

Gao J, Gu F, Abdella N, Ruan H, He G. Investigation on culturable microflora in Tibetan kefir grains from different areas of china. Journal of food science **2012**;77:425-433.

Garofalo C, Osimani A, Milanović V, Aquilanti L, De Filippis F, Stellato G, Di Mauro S, Turchetti B, Buzzini P, Ercolini, D, Clementi F. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. Food Microbiology **2015**;1-20.

Garrote G, Abraham A, De Antoni G. Preservation of Kefir Grains, a Comparative Study. Lebensmittel-Wissenchaft und Technologie **1997**;30:77-84.

Gilliland S. Technological & Commercial Applications of Lactic Acid Bacteria: Health & Nutritional Benefits in Dairy Products **2012.** Oklahoma State University, USA. Disponible en ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/Gilli.pdf

Giraffa G. Lactobacillus helveticus: importance in food and health. Frontiers in Microbiology **2014**;5:338.

Grajek W, Olejnik A. Epithelial Cell Cultures *in vitro* as a model to study functional properties of food. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences **2004**;54(1):5-24.

Gregory T. Understanding evolutionary trees. Evolution: Education and outreach **2008**;1:121-137.

Guzel Z, Kok T, Greene A, Seydim A. Review: functional properties of kefir. Critical Reviews in Food Science and Nutrition **2011**;51(3):261-268.

Handelsman J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. Microbiology and Molecular Biology Reviews **2004**;68:669-685.

Hertzler S, Clancy S. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. Journal of the American Dietetic Association **2003**;103(5):582-587.

Heo J, Lee S. Isolation and molecular taxonomy of two predominant types of microflora in Kefir. Journal of General and Applied Microbiology **2006**;52(6):375-379.

Hoepelman A, Tuomanen E. Consequences of microbial attachment: directing host cell functions with adhesins. Journal ASM of Infection and Immunity **1992;**60(5):1729-1733.

Hosseini H, Hippe B, Denner E, Kollegger E, Haslberger A**.** Isolation, identification and monitoring of contaminant bacteria in Iranian Kefir type drink by 16S rDNA sequencing. Food Control Journal **2012**;25:784-788.

Ihrmark K, Bödeker I, Cruz-Martinez K, Friberg H, Kubartova A, Schenck J, Strid Y, Stenlid J, Brandström-Durling M, Clemmensen K, Lindahl B. New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. FEMS Microbiology Ecology **2012**;82:666–677.

Iwasawa S, Ueda M, Miyata N, Hirota T, Ahiko K. Identification and fermentation character of kefir yeast. Agricultural and Biological Chemistry **1982**;46:2631-2636.

Jawetz. Principios de microbiología médica diagnóstica 25ª edición, **2011**: 713.

Jianzhong Z, Liu X, Jiang H, Dong M. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. Food Microbiology **2009**;26:770-775.

Kandler O, Kunath P. *Lactobacillus kefir* sp. nov., a component of the microflora of kefir. Systematic and Applied Microbiology **1983**;4(2):286-294.

Kaushik J, Kumar A, Duary R, Mohanty A, Grover et al. Functional and Probiotic Attributes of an Indigenous Isolate of *Lactobacillus plantarum*. PLoS ONE **2009;**4(12):809-816.

Kesmen Z, Kacmaz N. Determination of lactic microflora of kefir grains and kefir beverage by using culture-dependent and culture independent methods. Journal of Food Science **2011**;65(1):126-131.

Koneman. Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6th edition. **2006**:136-137.

Koroleva N. Products prepared with lactic acid bacteria and yeasts. In: Robinson, R.K., editor. Therapeutic properties of fermented milks: Elsevier Applied Sciences Publishers London UK **1991**;159-179.

La Riviere J, Kooiman P, Schmidt K. Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis.* Archives of Microbiology **1967**;59:269-278.

Leite B, Mayoa C, Rachid R, Peixoto J, Silva V, Paschoalin D. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. Food Microbiology **2012**;31:215-221.

Lee C. Factors affecting chemical-based purification of DNA from *Saccharomyces cerevisiae.* Yeast **2011**;10:230-236.

Lin C, Chen H, Liu J. Identification and characterization of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. Australian Journal of Dairy Technology **1999**;54:14-18.

Liu J, Wang S, Chen M, Chen H, Yueh P, Lin C. Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soya milk-kefir in cholesterol-fed hamsters. BrJ Nutrition **2006**;95(5):939-46.

Lopitz O**,** Rementeria A, Elquezabal N, Garaizar J. Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. Revista Iberoamericana de Micología **2006;**23(2):67-74.

Loretan T, Moster J, Viljoen B. Microbial flora associated with South African household kefir. South African Journal of Science **2003**;99:92-94.

Lorinczi K**.** The effect of health conscious trends on food consumption. European Association of Agricultural Economists. International Congress Belgium **2008**; Disponible en: http://purl.umn.edu/44325

Lu M, Wang X, Sun G, Qin B, Xiao J. Fine Structure of Tibetan Kefir Grains and Their Yeast Distribution, Diversity, and Shift. PLoS ONE **2014**;9(6):110.

Mainville I, Robert N, Lee B, Farnworth E. Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir. Systematic and Applied Microbiology **2006**;29:59-68.

Magalhães K, Gilberto V, Cássia R, Giuliano D, Rosane F. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. Brazilian Journal of Microbiology. **2011**;42(2):693-702.

Magra T, Antoniou K, Psomas E. Effect of Milk Fat, Kefir Grain Inoculum and Storage Time on the Flow Properties and Microbiological Characteristics of Kefir. Journal of Texture Studies **2012**;4:299-308.

Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E., Marín M, Olivares M. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. Trends in Food Science and Technology **2004**;(15):121-127.

Marsh A, O'Sullivan O, Hill C, Ross R, Cotter P. Sequencing-Based analysis of the Bacterial and Fungal Composition of Kefir Grains and Milks from multiple sources. PLOS One **2013**;8(7):693-702.

Marshal V, Cole W. Methods for making kefir and fermented milks based on kefir. Journal of Dairy Research **1984**;52:451-452.

Mendoza R. Contributions of phylogenetics to medical research. Rev Med Hered **2012**;23(2):119-127.

Merenstein D, Foster J, D'Amico F. A randomized clinical trial measuring the influence of kefir on antibiotic-associated diarrhea. Archives of Pediatrics and Adolescents Medicine **2009**;163(8):750-754.

Miguel M, Cardoso P, Lago L, Schwan R. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. Food Research International **2010**;42:1523-1528.

Mincer T, Fenical W, Jensen P. Culture-Dependent and Culture-Independent Diversity within the Obligate Marine Actinomycete Genus Salinispora. Applied and Environmental Microbiology **2005**;71:7019-7028.

Mukai T, Toba T, Itoh T, Adach S. Structure microheterogeneity of kefiran from kefiran grains. Japan Journal of Zootechnical Science **1990**;59:167-176.

Murofushi M, Shiomi M, Aibara K. Effect of orally administered polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice. Japanese Journal of Medicinal Science and Biology Impact **1983**;36(1):49-53.

Naunova E, Ivannikova Y, Naumov G. Genetic differentiation of the sherry yeasts *Saccharomyces cerevisiae.* Applied Biochemistry and Microbiology **2005**;41(6):578-582.

Ninane V, Mukandayambaje R, Berben G. Identification of lactic acid bacteria within the consortium of a kefir grain by sequencing of 16S rDNA variable regions. Journal of AOAC International **2007**;90:1111-1117.

Op De Beeck M, Lievens B, Busschaert P, Declerck S, Vangronsveld J, Colpaert J. Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies. PLoS ONE **2014**;9(6):629.

Ouwehand A**,** Rautonen N. Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. Current Opinion in Biotechnology **2005**;16(4):212-217.

Otogalli G, Galli A, Resmini P, Volonterio G. Composizione Microbiologipue, chimia ed ultraestrctura dei granuli di kefir. Annali di Microbiologia ed Enzimologia **1973**;23:109-121.

Pace N. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science **1997**;276(513):734.

Pevsner J. Bioinformatics and Functional Genomics. New York: John Wiley and Sons Publishers. International Journal of Epidemiology **2004**;33(4):913-914.

Piatek J, Gibas D, Oleijnik A, Krauss H, Wierzbicki K. The viability and intestinal epithelial cell adhesion of probiotic strain combination – *in vitro* study. Annals of Agricultural and Environmental Medicine **2012**;19(1):99-102.

Piermaria J, Abraham A. Gelling properties of kefiran, a food- grade polysaccharide obtained from kefir grain. Food Hydrocolloids **2008**;22:1520-1527.

Pintado M, Lopes Da Silva J, Fernandes P, Malcata F, Hogg T. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. International Journal of Food Science and Technology **1996**;31:15-26.

Pogacic T, Sinko S, Zamberlin S, Samarzija D. Microbiota of kefir grains. Mljekarstvo **2013**;63(1):3-14 .

Quigley L, O'Sullivan O, Beresford T, Ross P, Fitzgerald G, Cottera D. High-Throughput Sequencing for Detection of Subpopulations of Bacteria Not Previously Associated with Artisanal Cheeses. Applied and Environmental Microbiology **2012**;78(16):5717-5723.

Rodrigues K, Carvalho J, Schneedorf J. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. Inflammopharmacology **2005**;13(5):485-492.

Salminen S, Morelli L, Marteau P, Brassart D, Fondén R, Saxelin M. Demonstration of safety of probiotics – A review. International Journal of Food Microbiology **1998**;44(1-2):93-106.

Santos S, San Mauro M, Sanchez A, Torres J, Marquina D. The Antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus spp.* Isolated from Kefir. Systematic and Applied Microbiology **2003**;26:434-437.

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

Taranto M, Medici M, Perdigon G, Ruiz-Holgado A, Valdez G. Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. Journal of Dairy Science **1998**;81:2336-2340.

Takizawa S. The composition of the *Lactobacillus* flora in kefir grains. Systematic and Applied Microbiology **1998**;21(1):121-127.

Toba T, Arihara K, Adachi S. Comparative study of polysaccharides from kefir grains, an encapsuled homofermentative *Lactobacillus* species and *Lactobacillus kefir*. Milchwissenschaft **1990**;42:565-568.

Ünsal B, Alper A. Phylogenetic identification of bacteria within kefir by both culture-dependent and culture-independent methods. African Journal of Microbiology Research **2013**;7(36):4533-4538.

Vancanneyt M, Mengaud J, Cleenwerck I, Vanhonacker K, Hoste B, Dawyndt P, Degivry MC, Ringuet D, Janssens D, Swings J. Reclassification of *Lactobacillus kefirgranum* Takizawa et al. 1994 as *L. kefiranofaciens subsp. kefirgranum* subsp. nov. and emended description of *L. kefiranofaciens* Fujisawa et al. 1988. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **2004**;54:551-556.

Veldman M, Klootwijk J, De Regt V, Planta R. The primary and secondary structure of yeast 26S rRNA. Nucleic Acids Research **1981**;24(9):6935-6952.

Veronique N, Radegonde M, Berben G. Identification of lactic acid bacteria within the consortium of a kefir grain by sequencing 16S rDNA variable regions. Journal of AOAC International **2007**;90(4):1111-1117.

Vinderola C**,** Duarte J, Thangavel D, Perdigón G, Farnworth E, Matar C. Immunomodulating capacity of kefir. Journal of Dairy Research **2005**;72(2):195-202.

Wang S, Chen H, Liu J, Lin Y, Chen M. Identification of Yeasts and Evaluation of their Distribution in Taiwanese Kefir and Viili starters. Journal of Dairy Science **2008**;91(10):3798-3808.

Witthuhn R, Schoeman T, Britz T. Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. International Dairy Journal **2005**;15(4):383-389.

Wolfgang R, Schmitz R. Metagenomics – the key to the uncultured microbes. Current Opinion in Microbiology **2004**;7:492-498.

Wyder M, Spillmann H, Puhan Z. Investigation of the yeast flora in dairy products: A case study of Kefir. Food Technology and Biotechnology **1997**;35:299-304.

Yaman H, Elmali M, Karadagoglu G, Cetinkaya A. Observations of kefir grains and their structure from different geographical regions: Turkey and Germany. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi **2006**;1(1-2):11-15.

Yokoi H, Watanabe T, Fuji Y, Toba T. Isolation and Characterization of Polysaccharide-Producing Bacteria from Kefir Grain. Journal of Dairy Science **1990**; 73(7):1684-1689.

Yüksekdag Z, Beyatli, Y, Aslim B. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefirs with natural probiotics. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie **2004**;37:663-667.

Zhon J, Lin X, Jian H, Dong M. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. Food Microbiology **2009**;26:770-775.

Zeynep B, Guzel S, Tugokok T, Annelk G, Atifc S. Review: Functional properties of kefir. Critical Reviews in Food Science and Nutrition **2011**;51:261-268.

ANEXOS

I. Secuencias 16S rRNA de las comunidades bacterianas identificadas en los gránulos y bebida fermentada de kéfir.

Acetobacter syzygii strain NBRC 16604 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
NCBI Reference Sequence: NR_113850.1

AGCGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACATGCAAGTCGCACGAACCTTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTG
AGTAACGCGTAGGAATCTGTCCATGGGTGGGGGATAACTCTGGGAAACTGGAGCTAATACCGCATGATAC
CTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAGCCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGC
CTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGT
GTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCC
CCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTA
AAGGGCGTGTAGGCGGTTTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTTGATA
CGTACAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGA
AGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTGACTTTGTCATTCA
GTGTCGCAGTTAACGCGTTAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTT
GAATGTAGAGGCTGTATTCAGAGATGGATATTTCCCGCAAGGGACCTCTAACACAGGTGCTGCATGGCTG
TCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTTAGTTGCCAG
CATGTTTGGGTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC
CTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCTAGATGGTGAC
ATCGTGCTGATCTCTAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAAT
CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACAC
CATGGGAGTTGGTTTGACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCCGCAAGGGGCGCAGCCGACCACGGTCGGGTCA
GCGACTGGGGTGAAG

Acetobacter pasteurianus IFO 3283-01 strain IFO 3283 16S ribosomal RNA, complete sequence.
NCBI Reference Sequence: NR_102925.1

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAGCGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACATGCAAGTCGCACGAAGGTTTCG
GCCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGTATCTATCCATGGGTGGGGGATAACACTGGGAAACTG
GTGCTAATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAGCCTGCGTTTGATTAG
CTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATCAATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCT
GATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACGATGATGA
CGGTACCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTT

GCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAA
CCTGGGAGCTGCATTTGATACGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCCAGTGTAGAGGT
GAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATTACTGACGCTGAGGC
GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTAGATG
TTGGGTGACTTAGTCATTCAGTGTCGCAGTTAACGCGTTAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC
GCAGAACCTTACCAGGGCTTGAATGTAGAGGCTGCAAGCAGAGATGTTTGTTTCCCGCAAGGGACCTCTA
ACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCCTATCTTTAGTTGCCATCAGGTTGGGCTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAA
GGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACA
GTGGGAAGCTAGGTGGTGACACCATGCTGATCTCTAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACT
CGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
GTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTGACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCGCAAGGACGCAG
CCGACCACGGTCGGGTCAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGA
TCACCTCCT

Acetobacter ghanensis strain CIFT MFB 15295 HSA15 16S ribosomal RNA gene,partial sequence.
GenBank: KP240986.1

CATGCAGTCGCACGAACCTTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAATCTGTCCATGGG
TGGGGGATAACTCTGGGAAACTGGAGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTG
TGGAGGAGCCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGT
TTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGC
ACTTTCGACGGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGTACAGTC
AGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTTGATACGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGT
TGTGGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACC
TGGCTCATTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTGACTTTGTCATTCAGTGTCGCAGTTAACGCGTTAAGCACAC
CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCA
TGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGAATGTAGAGGCTGTATTCAGAGATGG
ATATTTCCCGCAAGGGACCTCTAACACAGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTTAGTTGCCAGCACGTTTGGGTGGGCACTCTAGAGAGAC
TGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACAC
ACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCTAGATGGTGACATCGTGCTGATCTCTAAAAGCCGTCTCA
GTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGC
GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTGACCTTAAGCCGG
TGAGCGAACCCGCAAGGGGCGCAGCCGACCACGGTCGGGTCAGCGACTGGG

Lactobacillus kefiranofaciens strain ATCC 43761 16S ribosomal RNA gene, complete sequence.

NCBI Reference Sequence: NR_117066.1

AGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGCGGAACC
AGCAGAATCACTTCGGTGAGGACGCTGGGAAAGCGAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTG
CCCTTAAGTCTGGGATACCACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAGCAGTTCGCATGAACAGC
TTTTAAAAGGCGGCGCAAGCTGTCGCTAAAGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACG
GCCTACCAAGGCAGTGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC
AAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGT
GAGTGAAGAAGGTTTTCGGACCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTAACTGGCCTT
TATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAAAGCCCTC
GGCTTAACCGAGGAATTGCATCGGAAACTGTTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTAGAACTCCATGTG
TAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACG
CTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTG
CTAAGTGTTGGGAGGCTTCCGCCTCTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTAGTGCCATTTGTAGAGATACAAAGTTCCCTTCGGG
GACGCTAAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCTTGTTATTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGG
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCA
GCACAACGAGCAGCGAGCCTGCAAAGGCAAGCAAATCTCTGAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGTCT
GCAACTCGACTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCTGCAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCGCAAGG
AAGGAGCCGTCTAAGGCAGGGCAGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCG
GTTGGATCA

Lactobacillus kefiranofaciens subsp. kefirgranum strain JCM 8572 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

NCBI Reference Sequence: NR_117067.1

AGCGAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTGCCCTTAAGTCTGGGATACCACTTGGAAACAG
GTGCTAATACCGGATAAGAAAGCAGTTCGCATGAACAGCTTTTAAAAGGCGGCGCAAGCTGTCGCTAAAG
GATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCCTACCAAGGCAGTGATGCATAGCCGAGTT
GAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGACCGTAAAGCTC
TGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGC
GAGCGCAGGCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAATTGCATCGGAAACTGT
TTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTAGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAA
TACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGG

ATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGGAGGCTTCCGCCTCTCAGTG
CTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC
ATCTAGTGCCATTTGTAGAGATACAAAGTTCCCTTCGGGGACGCTAAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT
CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTATTAGTTGCCAGCATT
AAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG
CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGCACAACGAGCAGCGAGCCTGCAAAGGCAAG
CAAATCTCTGAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGAAGCTGGAATCGCTA
GTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG
GAGTCTGCAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCGCAAGGAAGGAGCCGTCTAAGGCAGGGCAGATGACTG
GGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGTTGGATCA

Lactobacillus helveticus strain NM17-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: HM218084.1

AGAATCACTTCGGTGAGGACGCTGGGAAAGCGAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTGCCC
TTAAGTCTGGGATACCACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAGCAGTTCGCATGAACAGCTTT
TAAAAGGCGGCGCAAGCTGTCGCTAAAGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCC
TACCAAGGCAGTGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG
TGAAGAAGGTTTTCGGACCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTAACTGGCCTTTAT
TTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
CGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGC
TTAACCGAGGAATTGCATCGGAAACTGTTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTAGAACTCCATGTGTAG
CGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTG
AGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTA
AGTGTTGGGAGGCTTCCGCCTCTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACC
GCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC
AACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTAGTGCCATTTGTAGAGATACAAAGTTCCCTTCGGGGAC
GCTAAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCTTGTTATTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG
AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGCA
CAACGAGCAGCGAGCCTGCGAAGGCAAGCAAATCTCTGAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGTCTGCA
ACTCGACTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC
CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCTGCAATGCCCAAAGCCGGTG

Secuencias ITS de las comunidades de levaduras identificadas en los gránulos y bebida fermentada de kefir.

Kazachstania unispora strain DA-57 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.

GenBank: KJ128242.1

```
AAGGATCATTATAGAAATATAATTATTCGTTGCTTTGCTTGGAGACACATACTGCCGAACCAGCGCTTAA
TTGCGCGGTTTGGTGGGTCTCTGTAGCTCAGTAGCACTATTACACACTGTGGAGATTTTATAATTCTTTG
CATGCTTCTTTGGGCAGCTTCGGCAGCCCAGAGGTAACAAACACAAACAACTTTGTAATATTTTTAACCC
AGTCAAAACCAGAATTCCAGAAAGATTTATCTTTTTGTAATATTATAACAAATATTCAAAACTTTCAACA
ACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATT
CCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCG
TCATTTCCTTCTCAAACAGCAATGTTTGGTTGTGAGTGATACTCATTCGAGTTAGCTTGAAATTGCTGGC
CGATGGCTGTTGTGGCTGAGTGTCTCCCTCGGGAGAGCACTTGCTGCGTTAGGGACGTCCTGCTGGACAT
CTTCGTACTAGGTTTTACCAATTCGAGGACGGTTAGCGAGGCGGCCTGCAGTGAGTGTAGTGCTTGACTA
CGTTGCACCATGGCGAACAGTGTTCTTTTAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTTA
A
```

Saccharomyces unisporus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

GenBank: AF321542.1

```
TTATAGAAATATAATTATTCGTTGCTTTGCTTGGAGACACATACTGCCGAACCAGCGCTTAATTGCGCGG
TTTGGTGGGTCTCTGTAGCTCAGTAGCACTATTACACACTGTGGAGATTTTATAATTCTTTGCATGCTTC
TTTGGGCAGCTTCGGCAGCCCAGAGGTAACAAACACAAACAACTTTGTAATATTTTTAACCCAGTCAAAA
CCAGAATTCCAGAAAGATTTATCTTTTTGTAATATTATAACAAATATTCAAAACTTTCAACAACGGATCT
CTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAAT
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCC
TTCTCAAACAGCAATGTTTGGTTGTGAGTGATACTCATTCGAGTTAGCTTGAAATTGCTGGCCGATGGCT
GTTGTGGCTGAGTGTCTCCCTCGGGAGAGCACTTGCTGCGTTAGGGACGTCCTGCTGGACATCTTCGTAC
TAGGTTTTACCAATTCGAGGACGGTTAGCGAGGCGGCCTGCAGTGAGTGTAGTGCTTGACTACGTTGCAC
CATGGCGAACAGTG
```

Saccharomyces cerevisiae strain 17(ITS-1) internal transcribed spacer 1 partial sequence.

GenBank: DQ530277.1

```
AAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGTTTTTTCTGGGCAAG
AAGTCAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCT
TTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATAGGACAATTAAAACCGTTTCAATACA
ACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCCAGAGGTA
ACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACTGGAAATTT
TAAAATATGTA
```

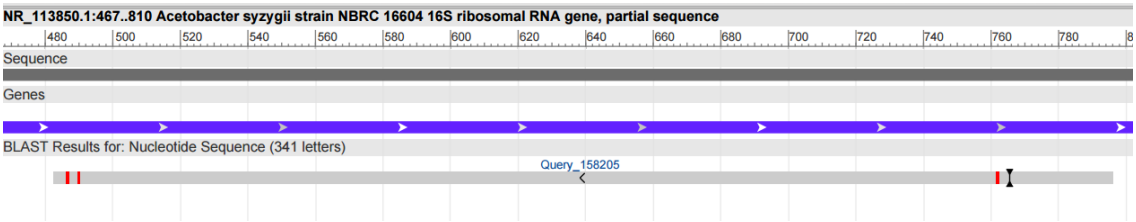
II. Alineamientos.

Bacterias

Acetobacter syzygii strain NBRC 16604 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
556 bits(301)	2e-158	310/314(99%)	1/314(0%)	Plus/Minus

```
Query  24   GTGCTTAACGCGTTAACTGCGACACTGAATAGACTAAGTCACCCAACATCTAGCACACAT  83
            ||||||||||||||||||||||||||||||| ||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  795  GTGCTTAACGCGTTAACTGCGACACTGAAT-GACAAAGTCACCCAACATCTAGCACACAT  737

Query  84   CGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCT  143
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  736  CGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCT  677

Query  144  CAGCGTCAGTAATGAGCCAGGTTGCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTTCCCAATATCTACG  203
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  676  CAGCGTCAGTAATGAGCCAGGTTGCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTTCCCAATATCTACG  617

Query  204  AATTTCACCTCTACACTGGGAATTCCACAACCCTCTCTCACACTCTAGTCTGTACGTATC  263
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  616  AATTTCACCTCTACACTGGGAATTCCACAACCCTCTCTCACACTCTAGTCTGTACGTATC  557

Query  264  AAATGCAGCTCCCAGGTTAAGCCCGGGGATTTCACATCTGACTGTACAAACCGCCTACAC  323
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  556  AAATGCAGCTCCCAGGTTAAGCCCGGGGATTTCACATCTGACTGTACAAACCGCCTACAC  497

Query  324  GCCCTTAACACCCA  337
            |||||| || ||||
Sbjct  496  GCCCTTTACGCCCA  483
```

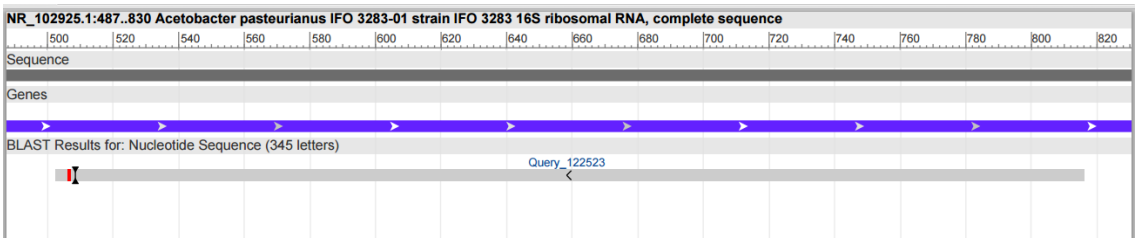


Acetobacter pasteurianus IFO 3283-01 strain IFO 3283 16S ribosomal RNA, complete sequence.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
568 bits(307)	8e-162	312/314(99%)	1/314(0%)	Plus/Minus

```
Query  28   GTGCTTAACGCGTTAACTGCGACACTGAATGACTAAGTCACCCAACATCTAGCACACATC  87
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  815  GTGCTTAACGCGTTAACTGCGACACTGAATGACTAAGTCACCCAACATCTAGCACACATC  756

Query  88   GTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTC  147
```

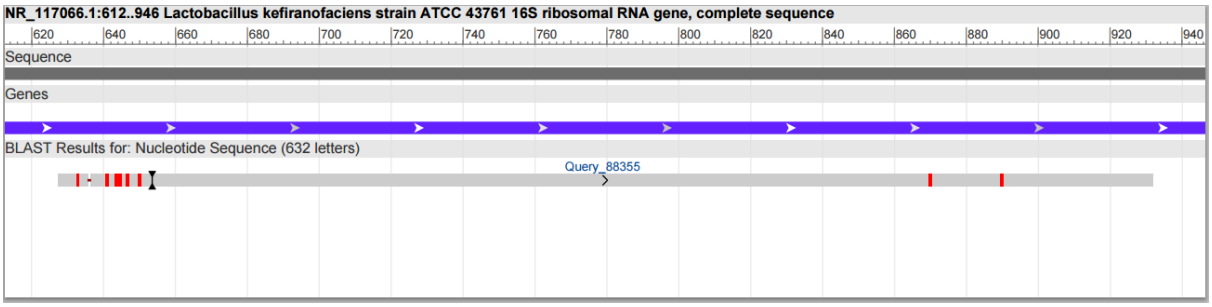
```
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  755   GTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTC  696

Query  148   AGCGTCAGTAATGAGCCAGGTTGCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTTCCCAATATCTACGA  207
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  695   AGCGTCAGTAATGAGCCAGGTTGCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTTCCCAATATCTACGA  636

Query  208   ATTTCACCTCTACACTGGGAATTCCACAACCCTCTCTCACACTCTAGTCTGCACGTATCA  267
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  635   ATTTCACCTCTACACTGGGAATTCCACAACCCTCTCTCACACTCTAGTCTGCACGTATCA  576

Query  268   AATGCAGCTCCCAGGTTAAGCCCGGGGATTTCACATCTGACTGTACAAACCGCCTACACG  327
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  575   AATGCAGCTCCCAGGTTAAGCCCGGGGATTTCACATCTGACTGTACAAACCGCCTACACG  516

Query  328   CCCTTTAACACCCA  341
             ||||||| | ||||
Sbjct  515   CCCTTTA-CGCCCA  503
```



Lactobacillus kefiranofaciens strain ATCC 43761 16S ribosomal RNA gene, complete sequence.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
516 bits(279)	6e-146	295/305(97%)	2/305(0%)	Plus/Plus

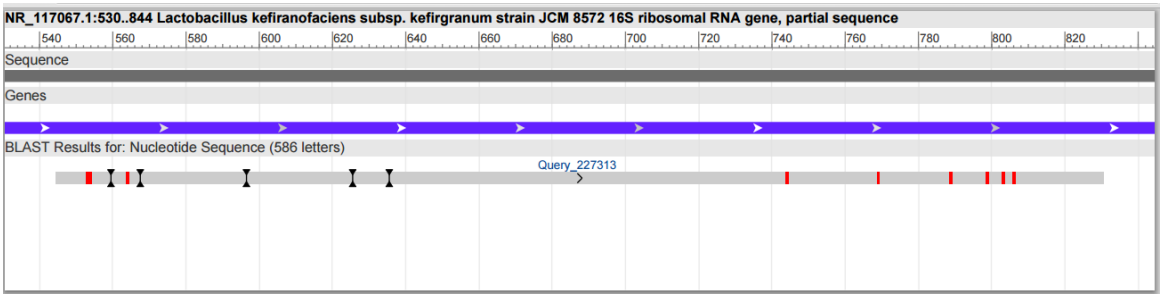
```
Query  24    CTCGGNTT-ACCGNGGNTTNGCNTCGNGAAACTGTTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG  82
             ||||| || |||| ||  | || ||| |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  628   CTCGGCTTAACCGAGGAATTGCATCG-GAAACTGTTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG  686

Query  83    TAGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAATACCAGTGGCGAAGG  142
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  687   TAGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAATACCAGTGGCGAAGG  746

Query  143   CGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAG  202
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  747   CGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAG  806

Query  203   ATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGGAGGCTTCCGCCTCT  262
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  807   ATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGGAGGCTTCCGCCTCT  866

Query  263   CAGGGCTGCAGCTAACGCATTAACCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAAC  322
             ||| |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  867   CAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAAC  926

Query  323   TCaaa  327
             |||||
Sbjct  927   TCAAA  931
```



Lactobacillus kefiranofaciens subsp. kefirgranum strain JCM 8572 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
459 bits(248)	9e-129	277/291(95%)	5/291(1%)	Plus/Plus

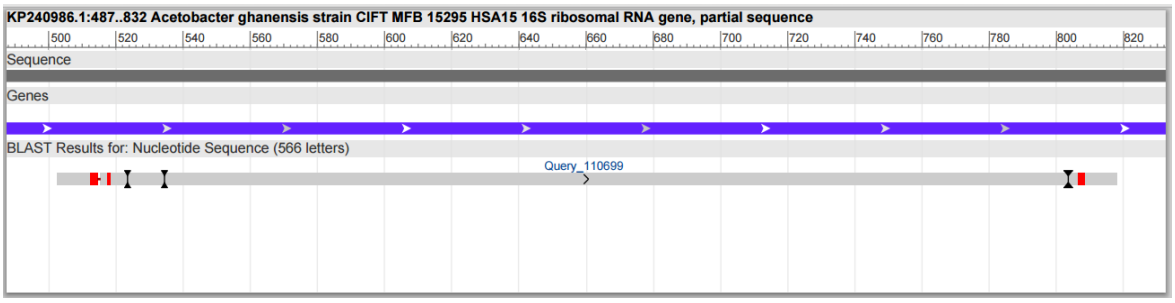
```
Query  14   TTGCATCGNNAACTGNTTTTACTTAGAGTGCAGAAGAGGAGAGTAGAACTCCATAGTGTA  73
            ||||||||  ||||| |||| ||| |||||||||||||||||||||||||||||| |||||
Sbjct  545  TTGCATCGGAAACTG-TTTTTCTT-GAGTGCAGAAGAGGAGAGTAGAACTCCAT-GTGTA  601

Query  74   GCGGTGGAATGCGTAGATATATGGGAAGAATACCAGGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCT  133
            ||||||||||||||||||||||||| |||||||||| |||||||||||||||||||||||||
Sbjct  602  GCGGTGGAATGCGTAGATATATGG-AAGAATACCA-GTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCT  659

Query  134  GCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC  193
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  660  GCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC  719

Query  194  CATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAATGTTGGGAGGCTTCCGCCTCTCAGGGCTGCAGCTA  253
            ||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct  720  CATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGGAGGCTTCCGCCTCTCAGTGCTGCAGCTA  779

Query  254  ACGCATTAACCACTCCGCCGGGGAAGAACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAA  304
            ||||||||| ||||||||| ||| || |||||||||||||||||||||||||
Sbjct  780  ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAA  830
```



Acetobacter ghanensis strain CIFT MFB 15295 HSA15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
520 bits(576)	1e-143	309/319(97%)	5/319(1%)	Plus/Plus

```
Query  28   CCCGGGCTTANN-TGNGAGCTNGCATTTGATACTGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGT  86
            |||||||||||    || ||||| ||||||||||| |||||||||||||||||||||||||
Sbjct  503  CCCGGGCTTAACCTGGGAGCT-GCATTTGATAC-GTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGT  560

Query  87   TGTGGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAA  146
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  561  TGTGGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAA  620

Query  147  GGCGGCAACCTGGCTCATTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT  206
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  621  GGCGGCAACCTGGCTCATTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT  680

Query  207  AGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTGACTTTGTCAT  266
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  681  AGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTGACTTTGTCAT  740

Query  267  TCAGTGTCGCAGTTAACGCGTTAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAA  326
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  741  TCAGTGTCGCAGTTAACGCGTTAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAA  800

Query  327  CTCaaaaaaaaaTTGACGG  345
            |||  |||  |||||||||
Sbjct  801  CTC--AAAGGAATTGACGG  817
```



Lactobacillus helveticus strain NM17-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
446 bits(494)	2e-121	277/291(95%)	5/291(1%)	Plus/Plus

```
Query  14   TTGCATCGNNAACTGNTTTTACTTAGAGTGCAGAAGAGGAGAGTAGAACTCCATAGTGTA  73
            ||||||||  ||||| |||| ||| |||||||||||||||||||||||||||||| |||||
Sbjct  573  TTGCATCGGAAACTGTTTTT-CTT-GAGTGCAGAAGAGGAGAGTAGAACTCCAT-GTGTA  629

Query  74   GCGGTGGAATGCGTAGATATATGGGAAGAATACCAGGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCT  133
            |||||||||||||||||||||||| ||||||||||| |||||||||||||||||||||||
```

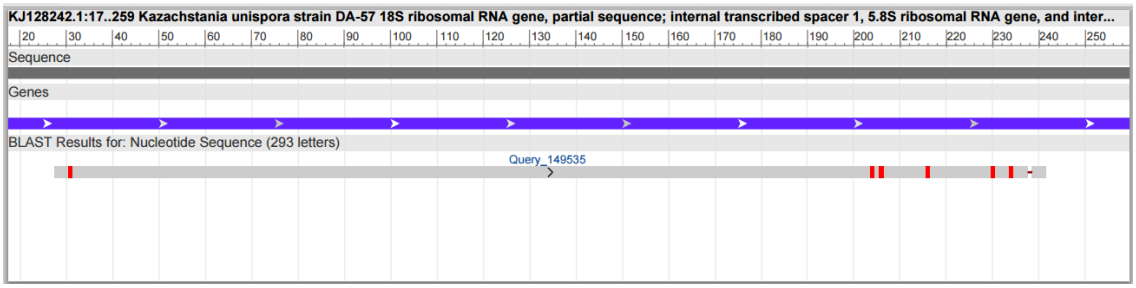
```
Sbjct  630  GCGGTGGAATGCGTAGATATATGG-AAGAATACCAG-TGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCT  687

Query  134  GCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC  193
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  688  GCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC  747

Query  194  CATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAATGTTGGGAGGCTTCCGCCTCTCAGGGCTGCAGCTA  253
            |||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct  748  CATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGGAGGCTTCCGCCTCTCAGTGCTGCAGCTA  807

Query  254  ACGCATTAACCACTCCGCCGGGGAAGAACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAA  304
            ||||||||| ||||||||| ||| || |||||||||||||||||||||||
Sbjct  808  ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAA  858
```

Levaduras

Kazachstania unispora strain DA-57 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
357 bits(193)	6e-95	207/214(97%)	1/214(0%)	Plus/Plus

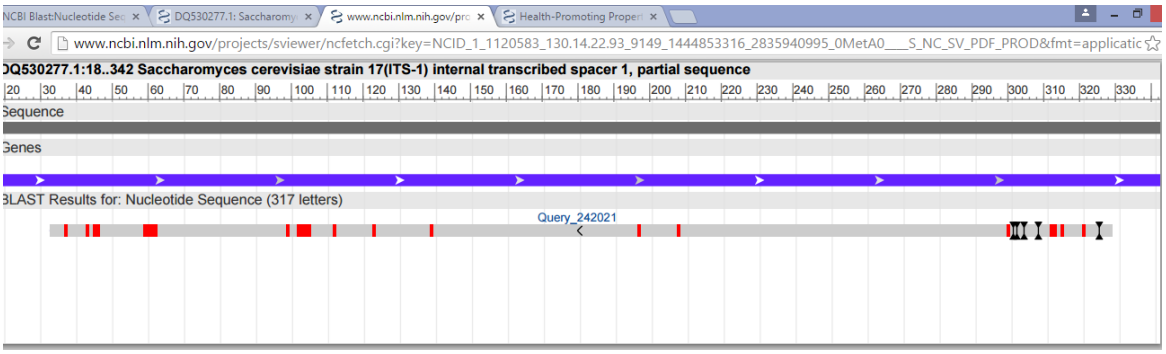
```
Query  59   CGTAGCTTTGCTTGGAGACACATACTGCCGAACCAGCGCTTAATTGCGCGGTTTGGTGGG  118
            ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  28   CGTTGCTTTGCTTGGAGACACATACTGCCGAACCAGCGCTTAATTGCGCGGTTTGGTGGG  87

Query  119  TCTCTGTAGCTCAGTAGCACTATTACACACTGTGGAGATTTTATAATTCTTTGCATGCTT  178
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  88   TCTCTGTAGCTCAGTAGCACTATTACACACTGTGGAGATTTTATAATTCTTTGCATGCTT  147

Query  179  CTTTGGGCAGCTTCGGCAGCCCAGAGGTAACAAACACAAACAACTTTGTAATATTTGTTA  238
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| | |
Sbjct  148  CTTTGGGCAGCTTCGGCAGCCCAGAGGTAACAAACACAAACAACTTTGTAATATTTTTAA  207

Query  239  CCCAGTCANAACCAGAATTCCATAAAAATT-ATC  271
            |||||||| ||||||||||||| ||| ||| |||
Sbjct  208  CCCAGTCAAAACCAGAATTCCAGAAAGATTTATC  241
```



Saccharomyces cerevisiae strain 17(ITS-1) internal transcribed spacer 1, partial sequence.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
403 bits(218)	9e-109	273/301(91%)	5/301(1%)	Plus/Minus

```
Query  17   TTGNTTTTGGACAANANNTTATATGACATGAGATTAAAATTGTTTGTGTTTGTTACCTCT  76
            ||| |||| ||||| |   ||| |||| || | | ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  328  TTG-TTTTTGACAAAAATTTA-ATGA-AT-A-AATAAAATTGTTTGTGTTTGTTACCTCT  274

Query  77   GGGCCCCGATTGCTCGAATGCCCAAAGAAAAAGTTGCAAAGATATGAAAACTCCACAGTG  136
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  273  GGGCCCCGATTGCTCGAATGCCCAAAGAAAAAGTTGCAAAGATATGAAAACTCCACAGTG  214

Query  137  TGTTGGATTGAAACGGCTTTAATTGTCCTATAACAAAAGCACAGAAATCTCTCACCGTTT  196
            ||||| |||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  213  TGTTGTATTGAAACGGTTTTAATTGTCCTATAACAAAAGCACAGAAATCTCTCACCGTTT  154

Query  197  GGAATAGCAAGAAACAAACTTACAAGCCTATCAAGACCGCGTACTTAAATAAAGCCCCGG  256
            ||||||||||||||| ||||||||||||||| |||||||||||  ||||||     || |||||
Sbjct  153  GGAATAGCAAGAAAGAAACTTACAAGCCTAGCAAGACCGCGCACTTAAGCGCAGGCCCGG  94

Query  257  CTGGACTCTCCATCTCTTGACTTCTTGCCCATCCTAAACTCTCATGCNATAGCCAAGACA  316
            |||||||||||||||||||||||||||||||    |||||||||||||  | ||||| |||
Sbjct  93   CTGGACTCTCCATCTCTTGACTTCTTGCCCAGAAAAAACTCTCATGCTCTTGCCAAAACA  34

Query  317  A  317
            |
Sbjct  33   A  33
```

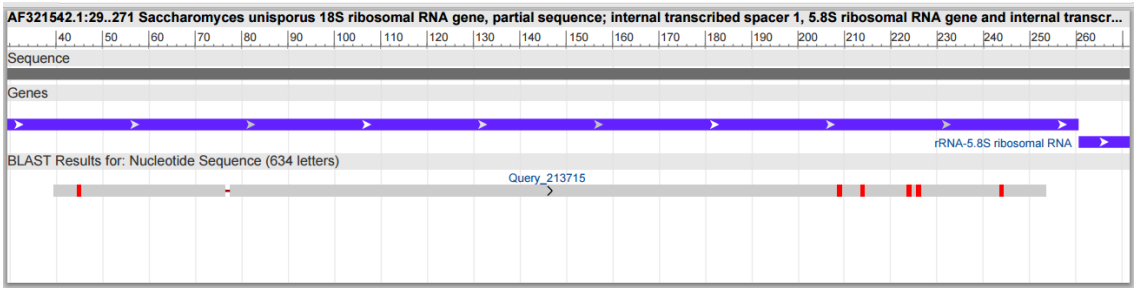


Saccharomyces unisporus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
355 bits(192)	5e-94	207/214(97%)	1/214(0%)	Plus/Plus

```
Query  61   CATACGGCCGAACCAGCGCTTAATTGCGCGGTTTGGT-GGTCTCTGTAGCTCAGTAGCAC  119
            ||||| |||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||
Sbjct  40   CATACTGCCGAACCAGCGCTTAATTGCGCGGTTTGGTGGGTCTCTGTAGCTCAGTAGCAC  99
```

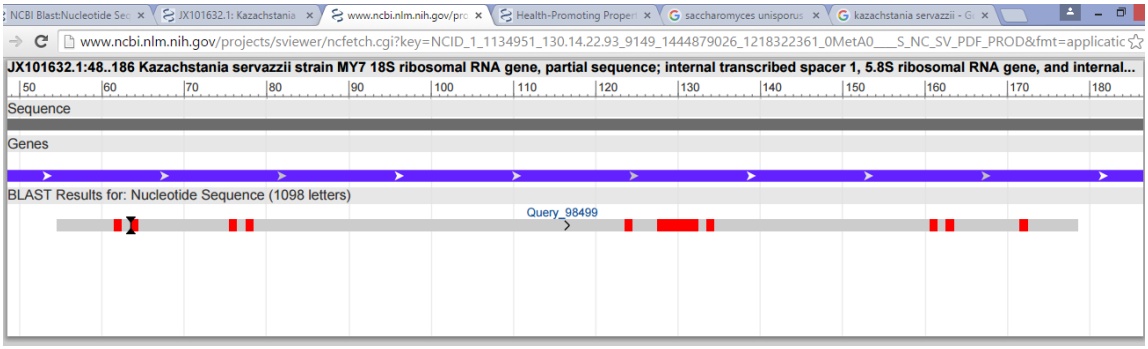
```
Query  120  TATTACACACTGTGGAGATTTTATAATTCTTTGCATGCTTCTTTGGGCAGCTTCGGCAGC  179
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  100  TATTACACACTGTGGAGATTTTATAATTCTTTGCATGCTTCTTTGGGCAGCTTCGGCAGC  159

Query  180  CCAGAGGTAACAAACACAAACAACTTTGTAATATTTTTAACCCAGTCAAGACCACAATTC  239
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||| |||||
Sbjct  160  CCAGAGGTAACAAACACAAACAACTTTGTAATATTTTTAACCCAGTCAAAACCAGAATTC  219

Query  240  CAGACACATTTATCTTTTTGTAATTTTATAACAA  273
            |||| | |||||||||||||||||| |||||||||
Sbjct  220  CAGAAAGATTTATCTTTTTGTAATATTATAACAA  253
```



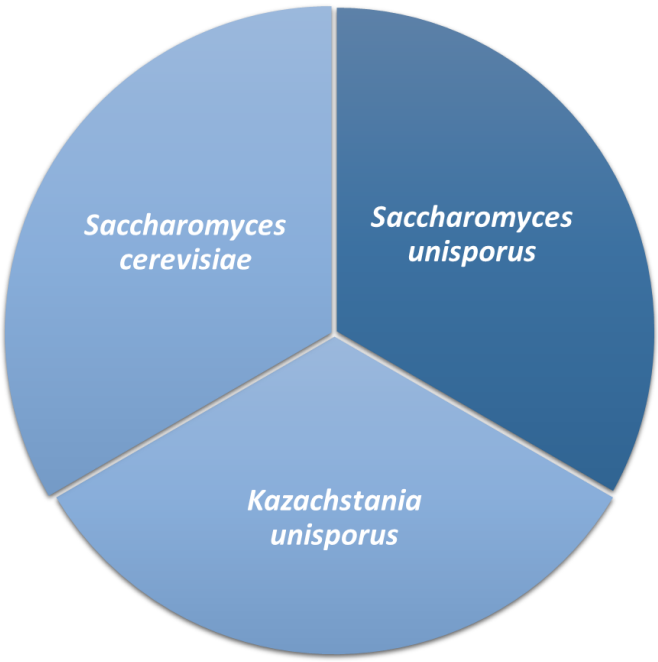
Kazachstania servazzii strain MY7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
147 bits(79)	6e-31	110/125(88%)	1/125(0%)	Plus/Plus

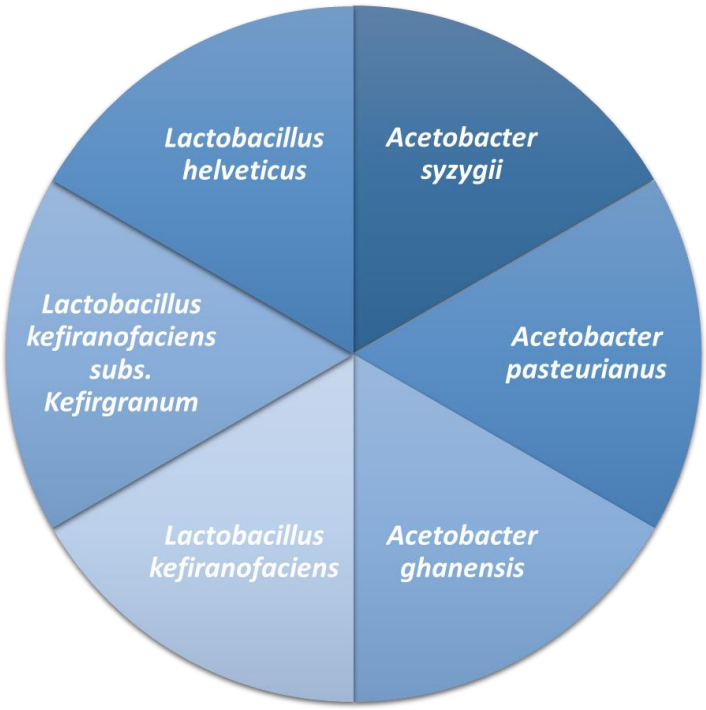
```
Query  60   ATACTGCCGCAACCAGCGCTTAGTGGCGCGGTTTGGTGGGTCTCTGTAGCTCAGTAGCAC  119
            ||||||| |  |||||||||||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  55   ATACTGCTG-GACCAGCGCTTAATTGCGCGGTTTGGTGGGTCTCTGTAGCTCAGTAGCAC  113

Query  120  TATTACACACTGTGTTCTATGTTATAATTCTTTGCATGCTTCTTTGGACAGCTTCGGCAG  179
            |||||||||| |||      | |||||||||||||||||||||||||| | ||||||||  |
Sbjct  114  TATTACACACAGTGGAGATTTTTATAATTCTTTGCATGCTTCTTTGGGCTGCTTCGGCGG  173

Query  180  CCCAG  184
            |||||
Sbjct  174  CCCAG  178
```



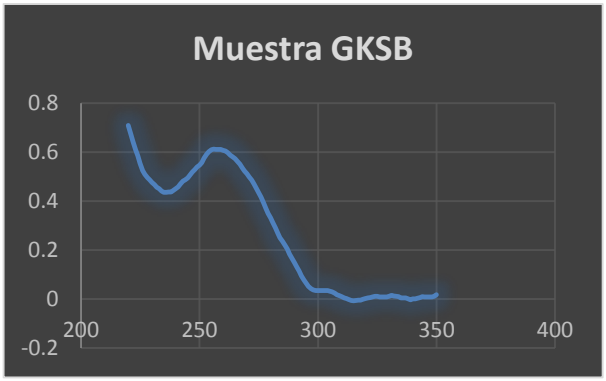
III. Representación gráfica de las levaduras identificadas.

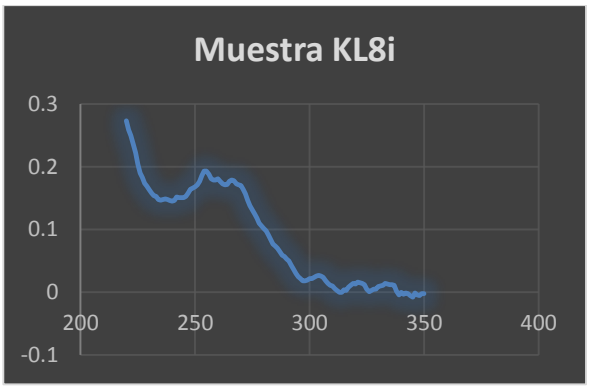


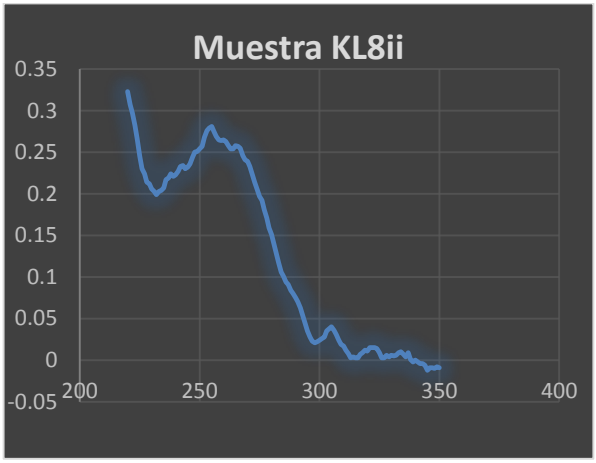
IV. Representación gráfica de las bacterias identificadas.

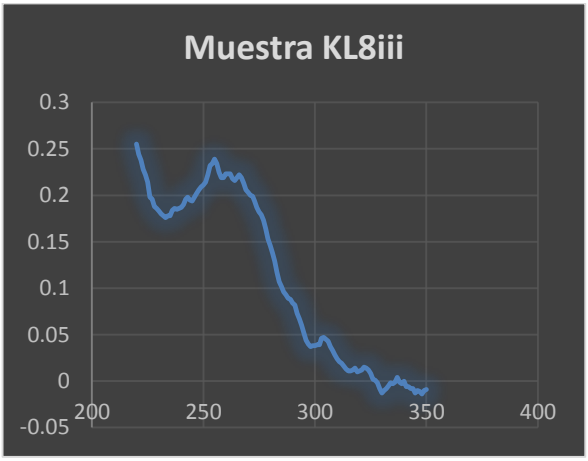


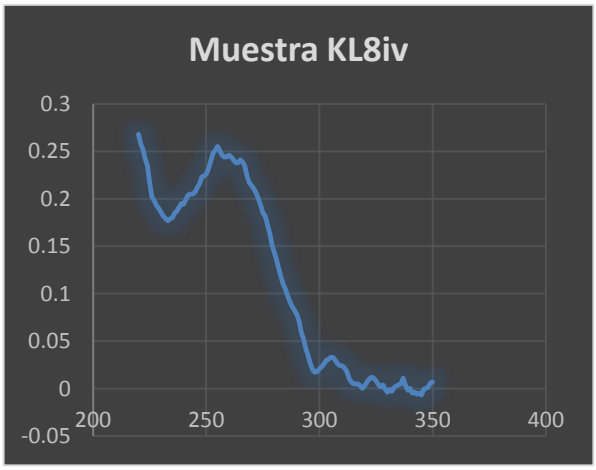
V. Cuantificación de muestras de DNA de gránulos y bebida fermentada de kéfir (Gráficas de absorbancia obtenidas con el programa NanoDrop 2000 de Thermo Scientific).

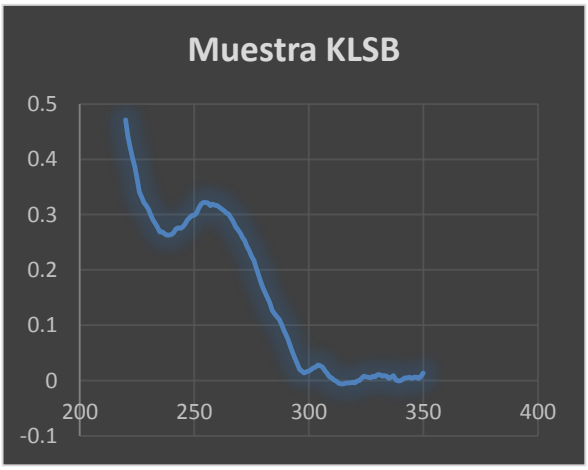






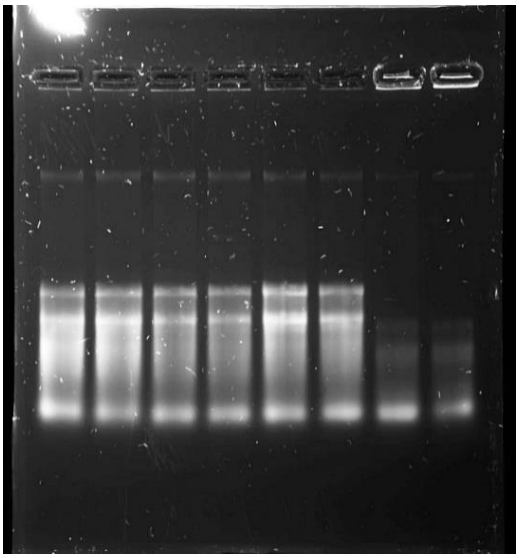




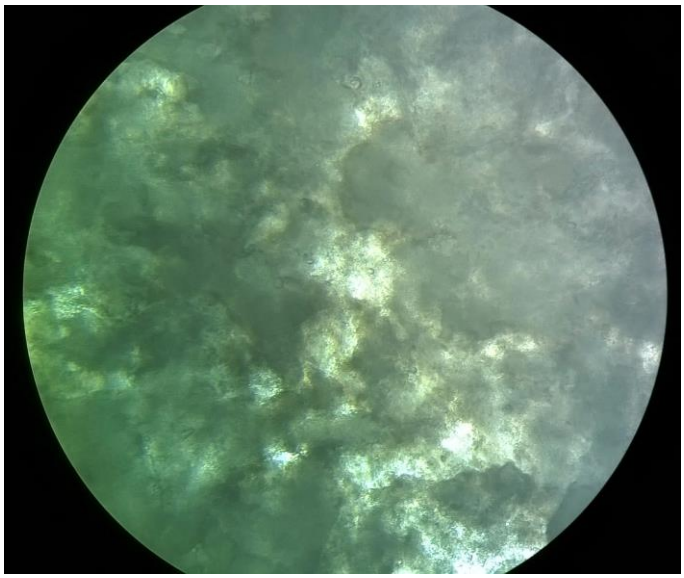


GKSB: Muestra DNA gránulo de kéfir
KL8: Muestra DNA bebida fermentada de kéfir
KLSB: Muestra DNA bebida fermentada de kéfir

VI. Extracción de DNA de *Saccharomyces cerevisiae* como control positivo para PCR de levaduras (Protocolo: Lee, 2012).



VII. Exopolisacárido del kéfir visualizado mediante microscopía óptica.



VIII. Amortiguadores y soluciones.

TAE 50X

50x Tris/Acetic Acid/EDTA (TAE) #1610743EDU (Bio-Rad)

TAE 1X

20ml TAE 50X en 980 ml H_2O destilada

10 ml TAE 50X en 490 ml H_2O destilada

Amortiguador de lisis TES

- 25mM Tris
- 10mM EDTA
- 50mM Sacarosa

TE 0.1X

- 10 mM Tris-HCl p.H. 7.3
- 1 mM EDTA