

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE UNA CEPA DE *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* EN LECHE DE CABRA (*Capra hircus*)

Isolation and Molecular Identification of a Strain of *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* in Goat Milk (*Capra hircus*)

Matilde Coronado S.^{*,1}, Albano Bravo M.^{*}, Bernavé Meléndez C.^{*}, Eduardo Rodríguez-Román^{**}, Belkys Vázquez^{***}, Oscar De La Rosa^{***}, Alexis F. Márques^{***}, Catalina Ramis^{****}, Luis Angulo^{****}, Yreni de Faria^{****}, Jeannette Tromp^{****}, Ana T. Serrano^{*****}

^{*}Cátedra de Industrias de la Leche y de la Carne, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Apartado Postal 2104, Maracay-Venezuela; ^{**}Laboratorio de Biotecnología y Virología Vegetal, Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas-Venezuela; ^{***}Laboratorio de Biotecnología Agrícola Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Maracay-Venezuela; ^{****}Centro de Investigaciones y Biotecnología Agrícola, Facultad de Agronomía, UCV-Maracay ^{*****}Cátedra de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV-Maracay

Correo-E: maticorona@gmail.com

Recibido: 31/10/17 - Aprobado: 00/00/18

RESUMEN

La leche de cabra (*Capra hircus*) constituye una alternativa alimentaria y una fuente importante de microorganismos, entre los cuales se encuentra, el *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* de amplio uso en la producción de yogurt y quesos madurados. En este sentido, se planteó el aislamiento e identificación en leche de cabra de una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* de interés biotecnológico, como fermento láctico. Se analizaron muestras de leche de cabra procedentes de la Unidad Experimental de Caprinos de la Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Central de Venezuela (UNEXCA-FCV-UCV). En el aislamiento, se emplearon los medios selectivos caldo y agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe). Se identificó a nivel fenotípico por caracteres morfológicos y fermentación de azúcares, y genotípicamente por secuenciación del ADNr 16S con iniciadores universales HDA1 y WLAB2. Además, se evaluó el crecimiento

ABSTRACT

Goat milk (*Capra hircus*) is a food alternative that represents an important source of microorganisms, among which is the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, widely used in the production of yogurt and ripened cheese. In this sense, the objective of this investigation was the isolation and identification in goat milk, of a strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, of biotechnological interest as a lactic ferment. To carry out this investigation, samples of goat milk from the Goat Research Unit (UNEXCA) of the Facultad de Ciencias Veterinarias of the Universidad Central de Venezuela, located in Maracay, the State of Aragua, were analyzed. For the microorganism isolation, the selective culture media MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) Broth and the MRS Agar were used. Once the strain was isolated, it was identified phenotypically, by morphological characters and fermentation of sugars and, genotypically, by sequencing the 16S

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

bacteriano, acción patógena, desarrollo de acidez, reducción del contenido de lactosa y capacidad proteolítica del lactobacilo sobre la caseína (Cs), alfa-lactoalbúmina (α -La) y beta-lactoglobulina (β -Lg), con registros de absorbancia a 595nm y apreciación de productos en geles discontinuos de poliacrilamida SDS-PAGE. El modelo estadístico aplicado fue del tipo descriptivo con empleo del *software* Statistics versión 10.0. La cepa aislada de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fue nombrada como CIL 1671 FCV-UCV, la cual mostró una excelente capacidad fermentativa con rápido desarrollo de acidez en 4 h de incubación a $42 \pm 1^\circ\text{C}$, no exhibió acción patógena y presentó capacidad hidrolítica sobre la Cs, α -La y β -Lg, lo que le confiere alto valor biotecnológico como fermento en la industria láctea.

(Palabras clave: *Lactobacillus*; cabra (*Capra hircus*); leche)

INTRODUCCIÓN

La leche de cabra (*Capra hircus*), constituye una alternativa alimentaria a la leche de vaca, [1]. Para el año 2004, su producción en Asia, Europa y África superó las 6000, 2000 y 2500 toneladas de leche, respectivamente, siendo Francia, España y Grecia los países con mayor nivel de producción, entre 400.000 y 500.000 toneladas/año [2]. Existe un número mayor de personas consumidoras de leche de cabra que las que consumen cualquier otro tipo de leche [3]. La leche de cabra posee un contenido de sólidos totales y de nutrientes en una posición intermedia entre la leche de vaca y oveja [4], también presenta mejor digestibilidad que la leche de vaca [5], y es capaz de proporcionar toda la proteína por día que necesita un niño hasta los 8 años de edad y el 6% hasta los 14 años; suple 35 g de proteína por litro, lo cual representa el 54% de los 65g/d que requiere una mujer en lactancia o embarazada [1].

Al igual que la leche de vaca, la leche de cabra es también considerada una fuente de microorganismos, en especial los del género *Lactobacillus*, que comprende las subespecies *delbrueckii*, *lactis*, *bulgaricus* y una nueva subespecie, la *indicus*, identificada por Dellaglio (2005). Este microorganismo es una

rDNA with universal primers HDA1 and WLAB2. The bacterial growth, pathogenicity, development of acidity, reduction of lactose content, and proteolytic capacity of lactobacillus, were also evaluated on casein (Cs), alpha-lactalbumin (α -La), and beta-lactoglobulin (β -Lg), with absorbance records at 595 nm and product evaluation in SDS-PAGE polyacrylamide discontinuous gels. The statistical model applied was of the descriptive type, using the software Statistics, version 10.0. The isolated strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, was called the CIL 1671 FCV-UCV and showed an excellent fermentative capacity, with rapid development of acidity in 4 hours of incubation at $42 \pm 1^\circ\text{C}$. The strain did not exhibit pathogenicity and showed a hydrolytic capacity on Cs, α -La and β -Lg, which confers high biotechnological value as ferment in the dairy industry.

(Key words: *Lactobacillus*; goat (*Capra hircus*); milk)

bacteria asociada a la microbiota adquirida desde temprana edad en el ser humano.

Algunos lactobacilos son considerados como probióticos, término referido por primera vez por el microbiólogo ucraniano y premio Nóbel de Medicina *Ilya Metchnikoff* en 1908, quién los describió como microorganismos fermentadores o sustancias producidas por microorganismos en alimentos fermentados (yogurt) con efectos benéficos y que influyen en la microbiota intestinal. A estos probióticos, se les atribuye la longevidad de los habitantes de Bulgaria [6]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2013, no incluye a los probióticos en su definición de “sustancias” como lo hizo *Metchnikoff* y los definen como “organismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas confieren efectos beneficiosos en el hospedador.

Los lactobacilos son bacterias ácido lácticas, descritas como microorganismos Gram-positivos, no móviles, no esporulados, catalasa negativa, cocos o bacilos. También, son reconocidos como quimiorganotróficos y productores de ácido láctico. Su rango de crecimiento oscila entre mesófilos a termófilos, con limitantes de crecimiento por debajo de los 15°C ; son microorganismos anaeróbicos

aunque son capaces de tolerar y desarrollarse en medios aeróbicos; son homofermentadores obligados que metabolizan la lactosa y ácido láctico por la vía EMP (*Embden-Meyerhof-Parnas*), con producción de 90-97% de ácido láctico a partir de la glucosa [7].

El *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* facilita la digestión de la lactosa en individuos con intolerancia a este carbohidrato, por la acción β -galactosidasa durante la fermentación en el intestino [8], habilidad que distingue a esta subespecie de las otras [9]; de igual manera, ha sido objeto de modificaciones genéticas con la finalidad de mejorar e incrementar el aroma, sabor de alimentos tales como sueros de leche y yogurt [7], y quesos fermentados [9-11]; por esto resulta de gran interés aislar una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* con valor biotecnológico para la industria láctea como iniciador bacteriano para la producción de yogurt y quesos madurados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de Muestras

Para el siguiente estudio se colectaron muestras de leche de 22 cabras de razas mestizas de Canarias y Alpinas, pertenecientes a la Unidad de Caprinos (UNEXCA), de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela (FCV-UCV), núcleo Maracay, municipio Girardot, Maracay, estado Aragua, con ubicación geográfica: latitud norte 65171, latitud este: 1136119, Datum: La Canoa (PSAD 56).

Esta unidad de producción caprina es intensiva, con sistema de sala de ordeño mecánico y tanque de refrigeración a 4°C. La alimentación del rebaño consistió en pacas de heno de pasto *Cynodon dactylon* y se suplementó con alimento concentrado de marca comercial con 18% de proteína declarada por el fabricante. La UNEXCA cuenta con control sanitario de los animales en lo referente a planes de vacunación contra fiebre Aftosa, Brucelosis y Tuberculosis.

La toma de muestras se hizo de acuerdo a lo referido por la Comisión Venezolana para Normas Industriales (COVENIN) [12], lo cual consistió en 1 muestra semanal durante tres semanas, a razón de 500 mL de leche de cabra/muestra. Las muestras de leche se colectaron en envases de vidrio porta

muestras, previamente esterilizados en autoclave a 121°C a presión de 1 atm. Las muestras se tomaron fue en el mes de abril del año 2014. La época de parto en la unidad de producción es desde el 27 de septiembre del 2013 hasta el 13 de octubre del 2013, correspondiéndose la fecha de toma de muestra con los 7 meses del período de ordeño del rebaño. Los análisis de control de calidad físico-química y bacteriológica se realizaron en el Centro de Investigaciones Lácteas de la FCV-UCV, bajo los lineamientos de las Normas Venezolanas COVENIN para Leche y Productos Lácteos [12] y estándares internacionales [13].

Aislamiento Bacteriológico

Se analizaron tres muestras de leche de cabra, de 500 mL de volumen por muestra. A partir de cada muestra se procedió a preparar: diluciones de 1 en 10 (1:10) (5 mL de leche de cabra en 45 mL de Caldo MRS (*Mann Rogose Sharp*), RPI Corporation, Illinois. Se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24-48 h en condiciones anaeróbicas, en una campana de desecación con atmósfera de 5-10% de CO_2 . Se consideraron tubos de crecimiento positivo aquellos que presentaron turbidez del medio. Se evaluó la densidad poblacional por escala Mc Farland. De los tubos positivos se dispensaron una alícuota de 1 mL de cada muestra, directamente en Agar MRS, (Hi-Media), India, para recuento total en placa en UFC/mL. Se incubó a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ y por un tiempo de 24-48 h. Las muestras podrían ser preservadas en refrigeración a 4-8 °C durante 7 d y luego activadas con caldo MRS e incubación [14].

Identificación fenotípica bacteriana

Identificación fenotípica microscópica

La identificación fenotípica microscópica se llevó a cabo usando las tinciones de Gram y la de *Schaeffer-Foulton* o tinción de esporas [14].

Identificación fenotípica macroscópica

Caracteres Morfológicos

Se estableció un criterio de selección de las colonias que se desarrollaron en el agar MRS, de acuerdo a su morfología [8]. Para ello se tomaron en cuenta las siguientes características: forma circular, tamaño de acuerdo al diámetro de la colonia, de superficie lisa, elevación en el centro de la colonia,

bordes continuos, estructura interna amorfa o granular; color de acuerdo al observado con la luz reflejada o transmitida (puede ser blanco o crema), opaca y de consistencia gelatinosa o mucosa.

Pruebas Bioquímicas

- Prueba de catalasa

Las bacterias del género *Lactobacillus* son catalasa negativo debido a que no poseen esta enzima y no son capaces de degradar al peróxido de hidrógeno, por lo tanto las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* son catalasa negativas [14].

- Prueba de oxidasa

Se emplea el reactivo de Kovac (solución acuosa de Tetrametil p-fenilendiamina al 1%). Se usa un control positivo que es la *Pseudomonas aeruginosa* y un control negativo que es la *Escherichia coli* [14].

- Pruebas de fermentación de azúcares:

Las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* no pueden fermentar la sucrosa pero si fermentan la N-acetil-glucosamina (GlcNAc), con base en esta capacidad de fermentación de azúcares, se emplea la prueba de fermentación de reconocimiento formado por GlcNAc, glucosa, lactosa, maltosa, sucrosa y trehalosa, propuesto por Tanigawa and Watanabe [15].

Identificación Genotípica Bacteriana

Extracción de ADN genómico

Esta actividad se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) con sede en Maracay, estado Aragua. El protocolo que se emplea es el referido por Wilson [22], el cual establece el siguiente orden: 1). Se dispensó 1,5 mL del cultivo bacteriano en un tubo *ependorf* de 2 mL de capacidad. Se centrifuga a 8000 g por 5 min a 4°C, descartándose el sobrenadante. 2) Se suspendió el *pellet* en 567 µL de buffer TE y se agita por pipeteo ligero. Se añaden 30 µL de SDS al 10% y 3 µL de proteinasa K (20mg/mL). Se mezcló sutilmente y se incubó 1 h a 37 ± 1°C. 3) Se adiciona 100 µL de NaCl 5M y se mezcla. Con este procedimiento se removieron los residuos de la pared celular y se desnaturalizan proteínas, mientras que los ácidos nucleicos permanecen solubles. 4) Se agregó 80 µL de solución de CTAB/NaCl. Se mezcla e incubó a 65°C x 10 min. 5) Se añade 700 µL de solución de cloroformo-alcohol-isoamílico,

mezclar bien y se centrifuga por 5 min a 4°C. 6) Se remueve la fase acuosa a un nuevo *ependorf*. Se añade igual volumen de fenol cloroformo alcohol-isoamílico y centrifugar a 8000 g a 4°C x 5 min. 7). Se transfiere la fase acuosa sobrenadante a un nuevo tubo *ependorf* y se añade 250 µL de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos, los cuales pueden visualizarse claramente. 8) Se lava el ADN precipitado con 700 µL de etanol al 70%. Este procedimiento se repite 2 veces. 9) Se descarta el sobrenadante y dejar secar el *pellet* de ADN a 30°C x 30 min en un secador al vacío. La técnica original expresa que puede secarse a temperatura ambiente a 30°C con la variante en el proceso del uso del secador *Speed-Dried* a 30°C. 10) Se suspende el *pellet* de ADN en 30 µL de *buffer* TE. Se deja en reposo a temperatura ambiente durante 24 h. Transcurridas las 24 h se mide la concentración de ADN obtenido en el cuantificador de ADN *Nano-Drop 2000* de *Thermo Fischer Scientific*®, Massachussets, EUA.

Evaluación de la calidad de ADN obtenido

Se comprueba la integridad del ADN obtenido a través de un gel de agarosa al 1%, con 1,2 µL de *Sybr-Safe*, como agente intercalante. Se emplea TBE 0,5% como búfer de corrida en una cámara horizontal de 12 cm de longitud, con un peine de 12 carriles. Las muestras se dispensan a razón de 5 µL adicionando 2,5 de búfer de corrida, y 1 µL del marcador diluido en 2,5 µM de búfer de carga. Se corren las muestras a 30 voltios durante 1 h.

Amplificación del ADN obtenido

Se emplearon los iniciadores universales:

HDA1:5'ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT 3'

WLAB2: 5'TCGAATTAAACCACATGCTCCA 3'

Se creó un perfil de amplificación considerando las temperaturas sugeridas por Eurofins®: oligo-us@eurofins.com; www:operon.com, para los iniciadores seleccionados: 55-61 °C. Para ello, se elaboró un gradiente de temperaturas para ajustar la temperatura de desnaturalización que asegure que exista un número mayor al 50% de amplificadas obtenidos.

Se formuló un perfil de amplificación con *buffer* 5X; MgCl₂ 25 mM; dNTP's 10 mM; iniciadores HDA1 10mM; iniciador WLAB2 10mM; 5U de Flexi Go Taq Polimerasa (PROMEGA); 5 µL de ADN, en un volumen final de reacción de 15 µL.

Se estableció un perfil de PCR que emplea un bloque de temperaturas ajustado de acuerdo al gradiente: temperatura de desnaturalización 95°C durante 5 min; 30 ciclos a 95°C durante 30 seg; seguido de 55-61°C durante 30 seg y 72°C durante 40 seg; extensión final de 72°C x 10 min y enfriamiento a 10°C durante 59 segundos. Se evalúan los resultados en un gel de agarosa al 2%, en una cámara de 60 mL de capacidad y voltaje de 35V durante una hora aproximadamente.

Secuenciación del ADN

Purificación de amplificadores:

Un requisito previo a la secuenciación es la purificación de los amplificadores para evitar los residuos de secuencias no amplificadas en toda la extensión del iniciador y restos de *buffer* TE que interfieren con la secuenciación. Para purificar los amplificadores se emplea el *kit AccuPrep® PCR Purification Kit* (BIONEER)-Corea y se sigue el protocolo señalado por el proveedor. Una vez realizado el proceso de purificación, se evaluó la integridad de los amplificadores en un gel de agarosa al 1%, de acuerdo al protocolo del Laboratorio de Biotecnología y Virología Vegetal, Centro de Microbiología y Biología Celular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas-Venezuela. Este paso permite verificar la integridad del ADN, así como, cuantificar el mismo a través de la intensidad de las bandas al compararse con el marcador de concentración conocida, esta concentración debe ser mayor a 50 ng/ μ L, los amplificadores deben dispensarse en envases limpios para luego sellarse e identificarlos de acuerdo a las etiquetas de referencias que indica *Macrogen Corea*, para su envío.

Evaluación del Potencial Biotecnológico de la Cepa Aislada de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*

Evaluación de la cinética de crecimiento bacteriano:

Se realizó la siembra de la cepa bacteriana en 50 mL de Caldo MRS-RPI Corp., India, y se incubó a 42°C \pm 1°C por 6 d, durante los cuales se registraron valores de absorbancia a 546 nm [14]. Se realiza además la comparación entre los valores de absorbancia y las densidades bacterianas de acuerdo a la escala *Mc Farland* para estimar la

densidad poblacional de lactobacilos y el crecimiento bacteriano en el tiempo.

Evaluación del Crecimiento Bacteriano a Diferentes Temperaturas

Se realizó la siembra o inoculación de la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en medio agar MRS de *Hi-Media Laboratories*, India, por triplicado, en placas de Petri. La siembra se realizó por triplicado de manera superficial en doble capa a 37°C, 42°C, 50°C durante 72 h, expresándose los resultados en UFC/mL.

Evaluación de la Capacidad Hemolítica

Consiste en evaluar el grado de patogenicidad de la cepa en estudio a través de su potencial de hemólisis que evidencia la presencia de antígenos somáticos y/o flagelares capaces de destruir los eritrocitos [8]. En este ensayo, se empleó el agar Columbia con 5% de sangre de cordero. La siembra se realizó por estriación superficial y se incubó a 37 \pm 1°C en condiciones de anaerobiosis. Los parámetros de medición fueron los siguientes:

- Hemólisis o Hemólisis Incompleta:

Clarificación parcial del agar.

- Hemólisis o Hemólisis Verdadera

Clarificación total del agar.

- Hemólisis

No se observa clarificación del agar.

- Tolerancia a sales biliares.

El agar Bilis Esculina Merck fue el empleado en este ensayo; para esto se inoculó la cepa por siembra en profundidad en el agar, se incubó a 37 \pm 1°C durante 24 h en condiciones de anaerobiosis y se observa la aparición de colonias sobre la superficie del agar. De existir crecimiento bacteriano, la cepa es resistente a las sales biliares.

- Capacidad para producir ácido láctico a partir de la lactosa:

Se prepararon tres muestras de leche de cabra esterilizada a 121°C durante 15 min a vapor fluente, en 300 mL de leche. A cada muestra de precipitado se le inoculó 10 mL del lactobacilo, suspendido en solución *buffer* de densidad 1 x 10⁹ UFC/mL, de acuerdo a la escala *Mc Farland* e incubándose en una estufa vertical Fanem (modelo 315, India), con ventilación forzada a 42°C \pm 1°C durante 5 h para evaluar la capacidad fermentativa del lactobacilo. Se registraron los valores de acidez expresada como

ácido láctico/9 mL muestra y contenido de lactosa presente en las muestras.

- Capacidad de modificar la densidad de la leche.

Para este ensayo se emplearon vasos de precipitado de 500 mL de capacidad que contenían 300 mL de leche de cabra esterilizada, la cual fué inoculada con 10 mL de suspensión bacteriana equivalente a 1×10^9 Ufc/mL en escala *Mc Farland* y se incubó a 42 °C durante 4 h. Se registró la densidad con el uso de un lactodensímetro de Quevenne calibrado a 20°C; el rango de temperatura de incubación fue ajustado de acuerdo al resultado obtenido en el ensayo anterior, en el cual se mostraron valores aceptables de crecimiento bacteriano a 42 ± 1 °C de temperatura de incubación. Los ensayos se realizaron por triplicado.

- Capacidad hidrolítica sobre las proteínas de la leche de cabra:

Para evaluar la capacidad proteolítica, del *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, sobre las proteínas de la leche de cabra, se establecieron tratamientos para períodos de tiempo de 0, 3, 6 y 12 h de incubación, cada uno con tres réplicas, y temperatura de incubación de 37 ± 1 °C, bajo condiciones aeróbicas. Se registraron los cambios de densidad óptica a 595 nm [14].

RESULTADOS

Se aislaron seis cepas a partir de leche de cabra de acuerdo a las características morfológicas de las colonias, descritas previamente [8]. El aspecto morfológico de los muestreos respectivos, se presenta en la Figura 1, lo cual coincide con lo referido en la literatura para la identificación del lactobacilo. Las subespecies de *Lactobacillus delbrueckii* muestran alto grado de relación ADN-ADN [22] y pueden ser diferenciables a través de sus rasgos fenotípicos [9, 17].

Los resultados para tinción de esporas y prueba de catalasa y oxidasa, resultaron negativos en cuanto a la tinción de *Gram*. Tres cepas se identificaron como lactobacilos y tres cepas como cocos, de acuerdo a su morfología, vista al microscopio *Karl-Zeiss* con objetivo de inmersión 100X.

Respecto a los resultados obtenidos en las pruebas de fermentación de azúcares (Cuadro 1), éstos sólo confirmaron a una de las cepas por características

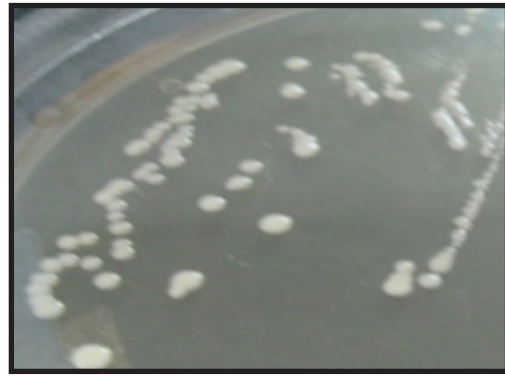


Figura 1. Colonias características de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aisladas en leche de cabra procedente de la UNEXCA-FCV-UCV

fermentativas como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [9,15-17]. La diferenciación se establece por la capacidad de este microorganismo de fermentar a la lactosa, en cambio, la subespecie *lactis* metaboliza la maltosa y trehalosa como rasgo fenotípico distintivo. La capacidad fermentativa es evidente por el cambio de color en el medio, de color púrpura a amarillo. Es interesante señalar que la subespecie *bulgaricus* degrada constitutivamente a la lactosa; sin embargo, las cuatro subespecies son negativas a la amplificación específica de la β -galactosidasa, lo cual sugiere que presentan un sistema genético único para la degradación de la lactosa [19].

De acuerdo a los resultados anteriores, la C1 del segundo muestreo, C1 2°, presentó criterios de selección por fermentación de azúcares como cepa presuntiva de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Sin embargo, las características fermentativas no llegan a ser lo suficientemente satisfactorias para la diferenciación entre subespecies [9,19] y es necesario el uso de pruebas de PCR para comprobar la identificación [20]. En virtud de lo anteriormente referido, se realizó la extracción de ADN y posterior evaluación en geles de agarosa al 1% (Figura 2).

Se realizó el gradiente de ajuste de temperatura de acuerdo al rango de temperaturas referido por *Oligofilms* 55°C - 61°C, con resultado de 59,3°C para la amplificación del ADN bacteriano (Cuadro 2) y su posterior evaluación en gel de agarosa al 2% para observar la integridad de bandas de amplificadas (Figura 3).

Se amplificó el ADN genómico empleando la temperatura seleccionada previamente (59,3°C) a la amplificación final y definitiva (Figura 4), con la finalidad de asegurar que la concentración de amplificadas fuese

Cuadro 1. Resultados de pruebas fermentativas de cepas bacterianas aisladas en agar MRS

Análisis	Control	1 ^{er} . Muestreo		2 ^{do} . Muestreo		3 ^{er} . Muestreo	
Colonias	CC	C1 1°	C2 1°	C1 2°	C2 2°	C1 3°	C2 3°
Morfología	Bacilos	Bacilos	Cocos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Cocos
Sucrosa	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Glucosa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Maltosa	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
Trehalosa	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
Lactosa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
GlcNac	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
Manitol	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)

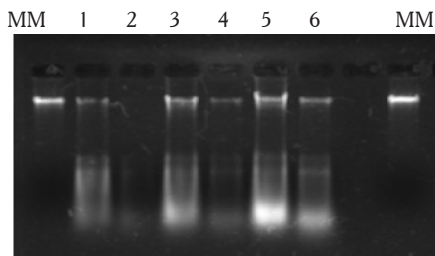


Figura 2. Evaluación de extracción de ADN bacteriano. Carril MM: marcador molecular *Lambda*. Carriles 1-6: ADN de cepas de bacterias ácido lácticas

mayor a lo exigido por Macrogen Corea > 50ng/μL.

Antes de remitir la muestra de amplificados de ADN de la cepa considerada como presuntiva a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, se realizó la purificación de los fragmentos de ADN obtenidos a través de los iniciadores HDA1 y WLAB2, con la finalidad de eliminar restos de secuencias no amplificadas con toda la extensión de los *iniciadores* empleados y filtrar residuos de TE en los productos, esto se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Virología Vegetal, Centro de Microbiología y Biología Celular del IVIC y se empleó una prueba comercial de “AccuPrep® PCR Purification kit” (BIONEER). Se evalúan los resultados de la purificación en un gel de agarosa al 2% (Figura 5).

Secuenciación del ADN Bacteriano

La secuencia de nucleótidos remitida por Macrogen Corea fué revisada para eliminar residuos de secuencias nucleotídicas de menor longitud que no amplificaron completamente. Posteriormente, se realizaron alineamientos múltiples con las secuencias

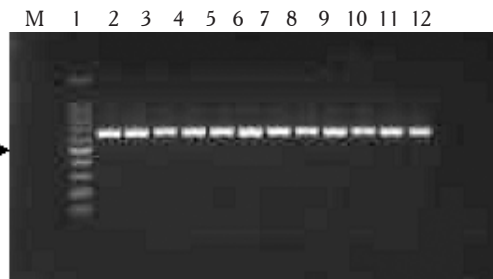


Figura 3. Gel de Agarosa al 2%. Gradiente de temperaturas de desnaturalización para los iniciadores HAD1 y WLAB2. M: marcador molecular *Benchtop* de 100 pb; carriles 1-12 rango de temperaturas desde 55°C–61.0 en orden correspondiente. Carril 8: temperatura seleccionada correspondiente a 59,3°C. Cepa empleada para el análisis: Cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

que muestran mayor similitud, reportadas en la base de datos del Banco de Genes, evaluándose la distancia filogenética entre ellas a través del programa MEGA versión 2.1. La secuencia obtenida no amplificó en su totalidad, solo amplificó 607 pb; sin embargo, esta longitud de secuencia es significativa. Como resultado se obtuvo una alta similitud para el *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* de 100% de identidad con varias de las secuencias reportadas. La identificación del lactobacilo es *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIL 1671 (Figura 6), por haber sido aislado en el Centro de Investigaciones Lácteas de la FCV-UCV.

En lo referente al crecimiento del lactobacilo, se observa que el término de la fase de crecimiento exponencial se proyecta a las tres horas de incubación a 42°C con una densidad de colonias de 2 x 10⁹ UFC/mL para un valor de absorbancia de 0,873 a 546nm, lo que permite inferir que es un microorganismo con

Cuadro 2. Perfil de amplificación para ajuste de temperatura de desnaturalización para la amplificación del ADN bacteriano

Carriles	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temp. °C	55	55,1	55,4	55,9	56,6	57,4	58,4	59,3	60,0	60,5	60,8	61,0

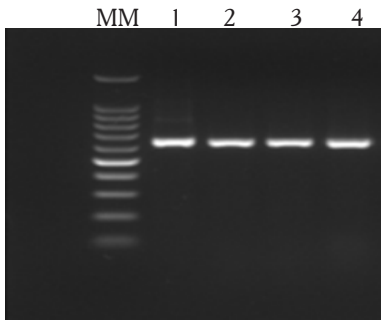


Figura 4. Evaluación de amplificandos en gel de agarosa al 2%, Carril MM: marcador molecular; carriles 1, 2, 3, 4: amplificandos de ADN de cepa de interés

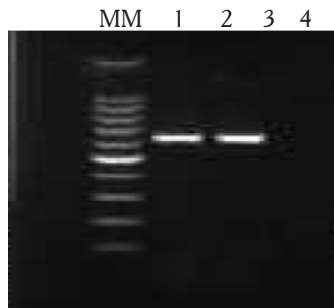


Figura 5. Amplificados de ADN de cepa de interés en gel de agarosa al 2%. M: marcador molecular *Benchmark* de 100 pb; carril 1: muestra de amplificandos de ADN; carril 2: Réplica

5' ACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTGGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTAC
TCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGTCCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTCCAACACCT
AGCACTCATCGTTTACGGCATGGACTACCACCTATCTAATCCTGTTCGCTACCCATGCTTTTCG
AGTCTCAGCGTCAGTTGCAGACCAGGTAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTAC
GCATTCACCGCTACACATGGAGTTCCACTAGGGTCTTCTGCACTCAAGTTATCCAGTTTCCGA
TGCACTTCTCCGGTTAAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAGAAAACCGCTGCACCTCTTT
ACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTT
AGCCGTGACTTCTGGTTAAATACCGTCAACGTATGAACAGTTACTCTCATACGTGTCTCTTT
AACACAGAGCTTACGAGCCGAAACCCCTTCTCACTCACGCGGTGTGCCATCAGGCTTGC
GCCAATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCC 3'

Figura 6. Secuencia del *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIL 1671 FCV-UCV

una rápida tasa de multiplicación en corto tiempo.

En cuanto a los resultados de la prueba de patogenicidad, se observó que el *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIL 1671 no muestra actividad ante las pruebas de patogenicidad por hemólisis, con caracterización de T-Hemolítico, por lo que no se considera cepa patógena, presentando aptitudes para el desarrollo de acidez a partir de la lactosa (Cuadro 3).

En cuanto a los resultados de resistencia a sales biliares la cepa aislada mostró resistencia a las mismas, mostrando un buen desarrollo y mayor contaje a los 42°C ± 1°C al incubarse en medio selectivo agar MRS, ratificando que es una bacteria termófila y que sufre inhibición a temperaturas inferiores de 15°C, como se refiere en la literatura [9] (Cuadro 4).

De acuerdo a la capacidad de modificar la densidad de la leche al ser incubado a 42°C, temperatura a la cual exhibe un mejor desarrollo y se obtienen los mayores recuentos bacterianos, se observó que modifica la densidad de la leche con aumento de sus valores a través del tiempo (Cuadro 5).

En cuanto a la capacidad de hidrolizar las principales proteínas de la leche de cabra (Cs, α-La, β-Lg), se logró apreciar la inhibición de las bandas de los pesos moleculares correspondientes al peso molecular de cada una de las proteínas evidenciables a partir de las 12 h de incubación (Figura 7).

Cuadro 3. Valores Promedios de acidez y contenido de lactosa en leche de cabra esterilizada e inoculada con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Valores	Tiempo (h)					
	0	1	2	3	4	5
Acidez (*)	0,17 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,63 ± 0,01	0,72 ± 0,01	0,84 ± 0,01
% Lactosa	4,34 ± 0,05	4,1 ± 0,05	3,8 ± 0,04	3,3 ± 0,05	3,0 ± 0,05	2,6 ± 0,05

Cuadro 4. Valores promedio de UFC/mL de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en Agar MRS a diferentes temperaturas de incubación durante 72 h

Valores	Temperaturas de incubación (°C)				
	4	32	37	42	50
UFC/mL	<30	772 ±	1285 ±	1493 ±	322 ±

Cuadro 5. Registro de valores de densidad de leche de cabra incubada a 42°C durante 4 h con cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Valores	Densidad g/cc a 20°C				
	0	1	2	3	Promedio
Densidad	1,033	1,037	1,036	1,037	1,037 ± 0,008

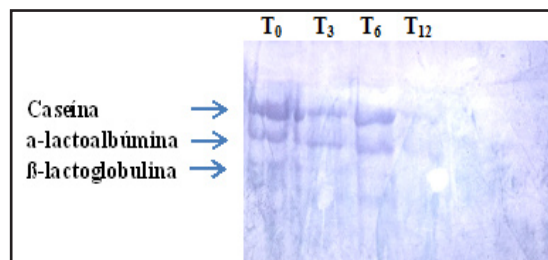


Figura 7. Capacidad hidrolítica del *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIL 1671 sobre las fracciones proteicas en leche de cabra: Caseína (Cs), Alfa-lactoalbúmina (α -La), Betalactoglobulina (β -Lg) en diferentes tiempos de incubación a $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

CONCLUSIONES

Se aisló una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* identificada como cepa CIL 1671 FCV-UCV, con identidad del 100% en las secuencias reportadas en la base de datos del Banco de Genes (*Blast*) con empleo de metodologías de PCR y secuenciación parcial del ARNr 16S para la identificación de esta especie bacteriana, como se ha descrito en anteriores investigaciones [5, 9, 19-22]. La cepa aislada es no-patógena, presenta resistencia a sales biliares, incrementa la densidad de la leche en condiciones de incubación a 42°C en 4 h, promueve el desarrollo de acidez en leche de cabra con producción de ácido láctico y es capaz de hidrolizar las fracciones proteicas caseína, alfa-lactoalbúmina y betalactoglobulina bajo condiciones de incubación a 42°C en 12 h, esto confiere a la cepa aislada de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIL 1671 FCV-UCV, un alto valor biotecnológico por el potencial como iniciador bacteriano para su uso en la industria láctea.

RECOMENDACIONES

Se sugiere una evaluación molecular más detallada de la secuencia reportada, así como la identificación de enzimas que actúan sobre la hidrólisis de las fracciones proteicas de la leche de cabra. Por igual, resulta interesante una vez identificadas las enzimas hidrolíticas, identificar al gen que le codifica para realizar su inserción en otras cepas de interés biotecnológico, como vector de expresión.

AGRADECIMIENTOS

A todas las Instituciones involucradas en la investigación FCV-UCV; UNEXCA-FCV-UCV, ESAT-INIA, CIBA-FAGRO-UCV, IVIC. A la Revista Científica FCV-UCV, en especial a la Dra. Ana Zuley Ruíz y TSU Yraiceles Jiménez por su valioso aporte profesional en la redacción, revisión, diagramación y artes de publicación.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran expresamente que no hubo conflicto de intereses durante el desarrollo de este trabajo.

APORTE DE LOS AUTORES AL TRABAJO

MCS: Autoría y conducción de la investigación, manejo de muestras y ensayos, análisis estadístico, análisis de resultados. redacción del manuscrito. ABM: Asesoría profesional, manejo de muestras y ensayos, análisis de resultados. revisión bibliográfica. BMC: Tutor de investigación, revisión bibliográfica, manejo de muestras y ensayos, redacción y revisión del manuscrito, análisis de resultados. ERR; BV; ODR; AFM; CR; LA; YF; JT: Asesoramiento profesional, revisión bibliográfica, revisión del manuscrito, manejo de muestras y ensayos, análisis de resultados. ATS: Asesoría profesional, colaboración en aspectos logísticos y técnicos.

REFERENCIAS

1. Capra. La composición de la leche de cabra y su papel en la alimentación humana. 2004. Disponible en: <http://www.iespana.es/CAPRA/HOMBRE/HOMBRE.HTM>.
2. Alcalde MJ. Mapa Estadístico Mundial y Regional de las Producciones Animales. EUITA, Universidad de Sevilla. 2004; 15 p.
3. Marín P, Fuenzalida I, Burrows J, Gecele, P. Recuento de células somáticas y composición de leche de cabra, según nivel de producción y etapa de lactancia, en un plantel intensivo de la zona central de Chile. Arch Med Vet. 2010; 42:79-85.

4. Park YW, Haenlein GFW. Therapeutic and Hypoallergenic Values of Goat Milk and Implications on Food Allergies. Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals. (Y.W. Park; G.F.W. Haenlein, eds.). Blackwell Publishing. Oxford. 2006; pp. 121-136.
5. Arribas, MB. Probióticos: Una Nueva Estrategia en la Modulación del Sistema Inmune. Universidad de la Granada, España. 2009; 213 p.
6. Vasiljevic T, Shah NP. Fermented milk: Health benefits beyond probiotic effect. In: YH Hui (Ed), Handbook of Food Products Manufacturing. 2007; 2:99-115.
7. Rodríguez M. Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad inmunomoduladora. Universidad Autónoma de Barcelona. 2009; 197 p.
8. Dellaglio F. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus* subsp. nov., isolated from Indian dairy products. Inter J Syst Evo Microb. 2005; 55:401-404.
9. Yu J, Sun Z, Liu W, Zhang J, Sun T, Bao Q, Zhang K. Rapid identification of lactic acid bacteria isolated from home-made fermented milk in Tibet. J Gen Appl Microbiol. 2009; 55:181-190.
10. Nguyen T-T, Nguyen HA, Arreola SL, Mlynek G, Kristina D, Geir M, Thu-Ha N, Dietmar H. Homodimeric β -Galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081: Expression in *Lactobacillus plantarum* and Biochemical Characterization. 2012; 60(7):1713-21
11. El-Gizawy SA, Barakat S, Sharaf OM, El-Shafei Kawther, Fathy A, El-Sayed S. Effect of growth conditions on the production of exopolysaccharides by microencapsulated *Lactobacillus bulgaricus* and use it to improve quality of Kareish cheese. 2013; 9(2): 1097-1109.
12. Fondonorma. Norma COVENIN 938-83. Leche y productos lácteos. Métodos para la toma de muestras. Fondonorma, Caracas, Venezuela. 1983.
13. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food Londres. 2002. 11 p.
14. Pescuma M, Hebert E, Rabesona H, Drouet M, Choiset Y, Haertle T, Mozzi F, Font De Valdez G, Chobert J. Proteolytic action of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 656 reduces antigenic response to bovine b-lactoglobulin. Tucumán-Argentina. Food Chem. 2011; 127:487-492.
15. Tanigawa K, Watanabe K. Multilocus sequence typing reveals a novel subspeciation of *Lactobacillus delbrueckii*. Microbiology. 2011; 157:727-738.
16. Kandler O, Weiss N. Regular, nonsporeforming grampositive rods. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins. 1989; 2:1208-1234
17. Weiss N, Schillinger U, Kandler O. *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus leichmannii* and *Lactobacillus bulgaricus*, subjective synonyms of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* comb. nov. and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* comb. nov. Syst Appl Microbiol. 1983; 4:552-557.
18. Giraffa G, De Vecchi P, Rossetti L. Identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis. J Appl Microbiol. 1998; 85:918-924.
19. Lick S, Brockmann E, Hellerl KJ. Identification of *Lactobacillus delbrueckii* and Subspecies by Hybridization Probes and PCR System. Appl. Microbiol. 2000; 23:251-259.
20. Lick S. Typing systems for lactobacilli. Milchwissenschaft. 2003; 58:256-260.
21. Singh S, Goswami P, Singh R, Heller K. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. LWT - Food Sci Technol. 2009; 448-457.
22. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. Current Protocols in Molecular Biology. 2.4.1-2.4.5. Supplement 27. 1997.