

EFFECTO DEL KEFIR SOBRE EL PATRÓN DE FERMENTACIÓN *IN VITRO* EN MODELOS ANIMALES DE FERMENTACIÓN PRE Y POST GÁSTRICA

De la Fuente^{1,2}, G., Jones³, S., Jones², E. y Newbold², C.J.

¹Departament Producció Animal, ETSEA, Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida, España;

²Institute of Biological and Environmental Rural Sciences, SY23 3DD, Aberystwyth, Reino Unido; ³Chuckling Goat LTD, SA44 6DS, Llandysul, Reino Unido; E-mail: gfuente@prodan.udl.cat

INTRODUCCIÓN

Kefir es una bebida procedente de la fermentación de la leche a través de los llamados “granos” de kefir. Aunque la concentración y composición relativa total de los microorganismos que lo componen es muy variable, se conoce que los granos de kefir contienen bacterias ácido lácticas, levaduras, y ocasionalmente bacterias ácido acéticas, dentro de una matriz sólida de lipopolisacáridos y proteínas (Lopitz-Otsoa et al., 2006). Se ha reconocido el efecto de cepas específicas aisladas del kefir como probióticos (Golowcycz et al., 2008) o productores de compuestos antimicrobianos (Rodrigues et al., 2005). Sin embargo, la naturaleza simbiótica de la microbiota del kefir hace que el aislamiento e identificación de dichas cepas sea una labor complicada. Hasta el momento, no se conocen estudios que valoren el uso del kefir en animales de producción o de compañía, aunque se conoce su potencial como subproducto rico en proteína (Koutinas, 2003). Las técnicas de producción de gas *in vitro* se usan rutinariamente desde hace 20 años en el análisis de alimentos (Pell et al., 1998). Estas técnicas son simples y baratas, y su uso se ha extendido al estudio de otros procesos como la toxicidad de compuestos secundarios (Ammar et al., 2004) o los efectos de aditivos sobre la fermentación ruminal (Colombatto et al., 2003). El objetivo de este estudio es el de probar el efecto específico del kefir sobre el patrón de fermentación microbiana, usando dos modelos digestivos, el fermentador pregástrico y el postgástrico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo digestivo pregástrico: rumen. Las incubaciones se llevaron a cabo en botellas de 120 ml con 50 ml de una mezcla (1:2) de líquido ruminal procedente de cuatro vacas fistuladas en el rumen alimentadas con ensilado de raigrás y de solución tampón (Theodorou et al., 1994) para microorganismos anaerobios. Como sustrato se pesaron 500 mg de materia seca (MS) molida a 1mm de una mezcla alfalfa:cebada (70:30)

Modelo digestivo postgástrico: colon. Las incubaciones se llevaron a cabo en botellas de 120 ml con 50 ml de una mezcla (1:2) de material fecal procedente de 4 caballos alimentados con heno de raigrás, y de solución tampón (Theodorou et al., 1994). Se pesaron 500 mg de un sustrato a base de alfalfa, predigerido con pepsina (0,2%) y pancreatina (0,1%).

Para ambos modelos digestivos se incluyó el extracto de Kefir en el sustrato como sigue: 0%, 0,05%, 0,2%, 0,4% y 1% (v/v) (tratamientos Control, K05, K20, K40 and K100) justo antes del inicio de la incubación. Tras su llenado, cuatro botellas por tratamiento se incubaron a 39 °C. La producción de gas se midió por presurometría a las 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 y 72 h y el cálculo de la cinética de fermentación se obtuvo mediante el ajuste a la fórmula $[Y = a + b(1 - e^{-c \cdot t})]$, donde “a+b” es el potencial de fermentación y “c” el índice fraccional de fermentación. Transcurridas 24 horas, una muestra (10%v/v) se extrajo mediante jeringa, se midió el pH de su contenido y se tomaron muestras para analizar la concentración en ácidos grasos volátiles (AGV), amoníaco, bacterias ácido-acéticas (AAB) ácido-lácticas (LAB) y levaduras, tal y como está descrito en Irigoyen et al. (2005). El efecto del kefir sobre la fermentación fue analizado estadísticamente con el programa Genstat mediante un modelo one-way ANOVA, considerando como réplicas el número de botellas y la dosis como factor principal. Comparación entre medias se realizó mediante el test LSD a $P < 0,05$. Análisis multivariante se aplicó para comparar ambos modelos (rumen vs. colon) mediante el paquete “vegan” del programa estadístico R.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el modelo rumen, los valores absolutos de los principales AGV no se modificaron con la inclusión de kefir ($P > 0,05$, Tabla 1), aunque el ratio Acético:Propiónico tendió a diferir

($P=0,10$) descendiendo al aumentar la dosis de kefir. Los niveles de ácido valérico, un AGV relacionado con el metabolismo de la proteína, aumentaron en las dosis más alta de kefir, probablemente debido al aporte extra de metabolitos proteicos por parte de éste. Sin embargo los niveles de $\text{NH}_3\text{-N}$ no se modificaron al comparar diferentes tratamientos ($P>0,05$). Cambios en los niveles de caproico se asocian al uso de leche de cabra en la fabricación del kefir La cinética de fermentación tampoco se modificó al incluir kefir en las incubaciones ($P>0,05$), aunque se observaron valores absolutos más altos en las primeras horas de incubación. Asimismo no hubo diferencias entre los niveles de LAB, AAB y levaduras entre el control y las incubaciones con kefir a diferentes dosis ($P>0,05$).

Tabla 1. Efecto de la inclusión de kefir sobre los productos, cinética de fermentación y concentración de bacterias ácido-lácticas (LAB), ácido-acéticas (AAB) y levaduras en el modelo rumen.

Productos	Control	K05	K20	K40	K100	eed ¹	P-valor
AGV totales (mM)	67,30	66,90	65,10	68,30	67,10	3,460	0,92
Acético/Propiónico	3,52	3,43	3,35	3,31	3,32	0,083	0,10
Acético (mM)	42,12	41,56	40,31	42,35	41,23	2,164	0,89
Propiónico (mM)	11,98	12,12	12,09	12,78	12,43	0,707	0,79
N-butírico (mM)	9,02	9,00	8,50	8,88	8,86	0,411	0,72
N-valérico (mM)	1,10 ^b	1,12 ^b	1,09 ^b	1,18 ^{ab}	1,29 ^a	0,053	0,01
N-caproico(mM)	0,39 ^c	0,39 ^c	0,40 ^c	0,47 ^b	0,55 ^a	0,018	0,001
$\text{NH}_3\text{-N}$ (mM)	13,29	13,51	13,77	13,78	15,45	0,890	0,17
pH	6,50	6,52	6,43	6,49	6,43	0,049	0,27
a+b	100,7	113,3	128,3	114,1	113,8	9,72	0,14
C	0,058	0,062	0,057	0,059	0,073	0,0066	0,15
LAB (log UFC/mL)	5,24	5,21	5,23	5,17	5,25	0,064	0,71
AAB (log UFC/mL)	3,56	3,62	3,71	3,74	3,51	0,168	0,60
Levaduras (log UFC/mL)	3,61	3,62	3,60	3,61	3,59	0,060	0,99

¹error estándar de la diferencia (N=4).

En la misma fila, los valores con diferente letra difieren ($P<0,05$)

En el modelo colon, la inclusión de kefir en la incubación indujo un cambio en la mayoría de los parámetros de fermentación estudiados (Tabla 2, $P<0,05$). La mayoría de los AGV aumentaron con los niveles de inclusión más elevados de kefir, pero este incremento no se produjo en la misma manera en todos ellos, llevando a un descenso en la proporción acético:propiónico ($P=0,02$), que sugiere un cambio hacia una fermentación más propiónica, apoyada por la composición microbiana del kefir, basado principalmente en LAB. La cinética de fermentación fue también diferente, presentando mayores potenciales ("a+b", $P<0,1$) y velocidad ("c", $p<0,05$) de fermentación según la inclusión de kefir fue aumentando, sugiriendo un aumento en la actividad microbiana. La concentración de LAB aumentó en los niveles más altos de kefir, efecto que no se observó en la concentración de AAB o levaduras.

En la comparación entre los modelos de fermentación, tanto el modelo (rumen vs. colon) como niveles de inclusión de kefir mostraron diferencias en el patrón de fermentación ($P<0,05$), aunque el mayor efecto procede del modelo de fermentación. El modelo pregástrico (rumen) parece estar menos afectado por la inclusión de kefir que el modelo postgástrico (colon), aunque en ambos casos se observan cambios en la actividad metabólica. Las diferencias entre sustratos utilizados pueden ser una causa importante de esta variación, aparte de las obvias diferencias entre las poblaciones microbianas de ambos sistemas. Posteriores estudios han de realizarse para discernir entre el efecto producido por las poblaciones microbianas presentes en el kefir, y el de sus metabolitos secundarios.

Tabla 2. Efecto de la inclusión de kefir sobre los productos, cinética de fermentación y concentración de bacterias ácido-lácticas (LAB), ácido-acéticas (AAB) y levaduras en el modelo colon.

Productos	Control	K05	K20	K40	K100	eed ¹	P-valor
AGV totales (mM)	35,84 ^b	36,15 ^b	37,57 ^b	38,38 ^b	43,88 ^a	1,879	0,004
Ace/Pro	2,21 ^a	2,19 ^a	2,18 ^a	2,16 ^a	2,08 ^b	0,035	0,02
Acético (mM)	22,05 ^b	22,15 ^b	22,99 ^b	23,29 ^b	26,03 ^a	1,115	0,02
Propiónico (mM)	9,97 ^b	10,09 ^b	10,56 ^b	10,80 ^b	12,52 ^a	0,562	0,003
N-butírico (mM)	2,15 ^b	2,18 ^b	2,25 ^b	2,37 ^b	2,79 ^a	0,121	0,001
N-valérico (mM)	0,29 ^d	0,31 ^d	0,36 ^c	0,42 ^b	0,63 ^a	0,020	0,001
N-caproico(mM)	0,03 ^d	0,02 ^d	0,04 ^c	0,06 ^b	0,11 ^a	0,006	0,001
NH ₃ -N (mM)	6,04 ^c	6,04 ^c	6,44 ^{bc}	6,89 ^b	8,71 ^a	0,343	0,001
pH	6,64	6,63	6,66	6,62	6,58	0,039	0,33
a+b	64,47	60,57	65,15	66,02	69,38	2,895	0,10
C	0,058 ^c	0,066 ^{bc}	0,067 ^{bc}	0,074 ^{ab}	0,082 ^a	0,0064	0,02
LAB	7,12 ^b	7,1 ^b	7,2 ^b	7,22 ^b	7,36 ^a	0,062	0,007
AAB	5,76	6,00	5,91	6,09	5,92	0,315	0,87
Levaduras	3,74	3,51	3,39	3,66	3,83	0,265	0,49

¹error estandar de la diferencia (N=4).

En la misma fila, los valores con diferente letra difieren (P<0,05)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ammar, H., Lopez, S., Gonzalez, J.S. & Ranilla, M.J., 2004. J. Sci. Food Agric. 84: 1349–1356.
- Colombatto, D., Mould, F.L., Bhat, M.K. & Owen, E., 2003. Anim. Feed Sci. Technol. 10: 201–209.
- Golowczyc MA, Gugliada MJ, Hollmann A, Delfederico L, Garrote GL, Abraham AG, Semorile L & De Antoni G .2008. J Dairy Res 75: 211–217.
- Irigoyen, A., Arana, I., Castiella, M., Torre, P., & Ibanez, F. C. 2005. Food Chem. 90(4): 613-620.
- Koutinas, A. A. 2003. New Horizons in Biotechnology. Springer Netherlands, 297-309.
- Lopitz-Otsoa F, Rementeria A, Elguezabal N & Garaizar J .2006. Rev Iberoamericana Micol 23: 67–74.
- Pell, A.N., Pitt, R.E., Doane, P.H., Schofield, P., 1998 In vitro techniques for measuring nutrient supply to ruminants. Occ Pub, 22. BSAS, Edinburgh, UK, 45–54.
- Rodrigues KL, Caputo LR, Carvalho JC, Evangelista J & Schneedorf JM. 2005. Int J Antimicrob Ag 25:404–408.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B. & France, J., 1994. Anim Feed Sci Tech. 48: 185-197

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado mediante el programa europeo ERDF, en colaboración con el Gobierno de Gales (Reino Unido) a través del proyecto WISE 2, de apoyo de investigación a SMEs (small and medium enterprises).

EFFECT OF KEFIR ON THE FERMENTATION PATTERN USING FOREGUT AND HINDGUT ANIMAL MODELS

ABSTRACT: An *in vitro* study was conducted to evaluate the effect of kefir on the fermentation pattern in both foregut and hindgut animal models. Kefir was incubated at 4 different doses (0.05, 0.2, 0.4 and 1% v/v) in both rumen fluid or horse faecal contents diluted in buffer for 72h. The addition of kefir promotes propionic and valeric production after 24 h increasing the maximum potential and speed of fermentation in hindgut models as well as increases the numbers of lactic acid bacteria (LAB) (P<0.05). These effects are less obvious in the foregut model where only valeric acid concentration showed differences between doses (P<0.05). When comparing both models, foregut systems seem to be less affected by the inclusion of kefir than hindgut ones, but in both cases the metabolic activity seems to change when increasing level of kefir is included.

Keywords: microbiology, kefir, foregut fermenters, hindgut fermenters