

5a
1ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

VARIACIONES EN LA CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE
ÁCIDO LÁCTICO Y pH DURANTE LA PRODUCCIÓN Y
ALMACENAMIENTO DE LAS CEPAS

Streptococcus lactis subsp. *lactis* BM 147 y

Streptococcus lactis subsp. *cremoris* BM 149

Y SU CORRELACIÓN CON EL PERFIL DE PLASMIDOS

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :
MARIA SOLEDAD CORDOVA AGUILAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO D. F.

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Trabajo desarrollado en el Departamento de Biotecnología
del Instituto de Investigaciones Biomédicas
UNAM

Todos buscamos algo,
una vez que llegamos a un punto
en nuestra vida en que estamos
conscientes de nuestra realidad.

Y lo más maravilloso,
es que nunca estamos solos,
siempre hay espíritus gemelos
que en alguna forma comparten
nuestros deseos y aspiraciones.

A todos aquellos que me han
acompañado en esta etapa tan
importante participando en el
desarrollo de este trabajo,
por su valioso apoyo y colaboración

GRACIAS

MARIA SOLEDAD CORDOVA AGUILAR

| | |
|---|----|
| CONTENIDO | 1 |
| RESUMEN | 2 |
| INTRODUCCION | 3 |
| OBJETIVO | 16 |
| MATERIALES Y METODOS | |
| I. Microorganismos | 17 |
| II. Condiciones de producción y almacenamiento | 17 |
| III. Actividad, pH y Cuenta total | 18 |
| IV. Perfil de plásmidos | 19 |
| V. Diseño experimental | 20 |
| VI. Diseño Estadístico | 21 |
| RESULTADOS | |
| I. Condiciones de producción | 22 |
| II. Comportamiento durante la producción y almacenamiento de los caldos de fermentación | 23 |
| III. Perfil de plásmidos en la producción y almacenamiento de los cultivos | 24 |
| DISCUSION | 26 |
| APENDICE 1 - CUADROS | 33 |
| APENDICE 2 - FIGURAS | 39 |
| REFERENCIAS | 53 |

R E S U M E N

RESUMEN

Los perfiles de plásmidos de las cepas *Streptococcus lactis subsp. lactis* BM 147 y *Streptococcus lactis subsp. cremoris* BM 149 se correlacionaron con los cambios en la capacidad de producción de ácido láctico y en el pH durante la producción y almacenamiento de los cultivos.

Las condiciones de manejo, producción y almacenamiento de los cultivos se establecieron para minimizar las variaciones de sus características. Por otra parte, el protocolo de extracción de plásmidos se modificó para obtener los perfiles de plásmidos de las cepas durante la producción y almacenamiento de los caldos de fermentación. Las cinéticas de crecimiento, producción de ácido láctico, almacenamiento y los perfiles obtenidos, fueron consistentes con lo reportado por otros autores.

Según las cinéticas de almacenamiento y los perfiles de plásmidos obtenidos, el pH del medio puede causar daños a nivel de plásmidos. Se encontró además, que la disminución de viabilidad y actividad durante el almacenamiento coincide con la pérdida de bandas en el perfil de plásmidos.

Se sugiere que los perfiles de plásmidos, al ser específicos para cada cepa, representan una valiosa técnica para la identificación de cultivos de interés industrial además de evaluar la estabilidad y origen de las cepas mismas.

I N T R O D U C C I O N

*"Al terminar este camino,
el viajero imaginario desaparece
y se sale del espacio y del
tiempo hacia una nueva especie
de realidad, ya que el camino
desaparece de golpe."*

A. Blanco

INTRODUCCION

La fermentación de los alimentos es uno de los métodos más antiguos de conservación conocido por la humanidad, de manera que muchos alimentos deben su producción, sabor, textura, cualidades nutricionales y otras características a las actividades de los microorganismos. Estas actividades fueron descubiertas al observarse cambios por la introducción accidental de microflora del ambiente o por la presencia de cultivos silvestres no controlados. Actualmente es posible controlar el tipo y número de microorganismos e inocular alimentos con cultivos puros de microorganismos específicos a los que se denomina cultivos iniciadores (Smith, 1981).

La fermentación ácido láctica es la más ampliamente utilizada para la manufactura de productos lácteos, tales como queso, leches fermentadas, mantequilla y otros productos diversos a partir de leche. Así mismo, las bacterias capaces de realizarla se utilizan en la elaboración de encurtidos, de algunos productos cárnicos y para la conservación de desechos orgánicos para su posterior empleo como alimento animal (Gilliland, 1985; Fenton, 1987).

El principal papel de las bacterias ácido-lácticas en la manufactura de productos obtenidos a partir de leche, es el de producir ácido láctico para evitar el crecimiento de microorganismos indeseables que puedan causar defectos en el sabor de los productos finales. Las condiciones ácidas inducidas por estas bacterias tienen otras funciones diversas, como cuajar la leche, proporcionar el sabor característico, favorecer la acción de la renina, ayudar en la sinéresis (expulsión del suero de la cuajada), la cual mejora la conservación de la calidad del producto terminado (Adda, 1986), y por otra parte, la actividad proteolítica contribuye, junto con otras actividades bioquímicas de los microorganismos, al desarrollo del sabor, textura y otras características deseables en estos productos (Law, 1984, Margalith, 1981).

Hasta hace algunos años, se utilizaban mezclas de iniciadores lácticos con composición no definida en la fabricación de quesos, las cuales presentan el problema inherente de que sus propiedades no pueden ser completamente predecibles y por lo tanto ha sido necesario estudiar y experimentar con el fin de reducir el número de cepas empleadas y formular iniciadores con una composición y actividad definida, predecible y controlable hasta un máximo posible, de manera que contengan el tipo y balance adecuados de microorganismos y que, bajo las condiciones de uso y efecto, desarrollen los cambios deseados durante la manufactura y maduración de los productos, además de ser compatibles para su propagación en conjunto (Sellars, 1977). El desarrollo histórico de estos iniciadores puede verse en el cuadro 1.

Actualmente se utilizan mezclas de múltiples cepas con rotación ya que con el uso de cepas únicas difícilmente se puede cumplir satisfactoriamente con las necesidades de sabor, textura y ácido láctico, o resistir a la temperatura y a la concentración

de sal. Así pues, las cepas se combinan en una variedad de sistemas disponibles para asegurar el desarrollo del producto final esperado (Gilliland, 1985, Tzeng, 1984)).

Los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, son las bacterias que se emplean con mayor frecuencia como cultivos iniciadores. Las bacterias lácticas del género *Lactococcus* se agrupan en el grupo serológico N de Lancerfield. Con base en estudios recientes de taxonomía numérica, quimiotaxonomía y de hibridización de ácidos nucleicos, se les agrupó a estas bacterias en el género *Lactococcus*, quedando este género con dos especies y 3 subespecies, de las cuales, *Streptococcus lactis subsp. lactis*, (*Lactococcus lactis subsp. lactis*), lo que anteriormente se conocía como *S. lactis*, y *Streptococcus lactis subsp. cremoris* (*Lactococcus lactis subsp. cremoris*), lo que antes era *S. cremoris*. Son bacterias Gram positivas que no forman esporas, siendo fáciles de cultivar bajo condiciones micro-aerofílicas (no necesariamente aerobias), son catalasa negativas y sus principales características consisten en la fermentación de carbohidratos y la producción de ácidos orgánicos (Bergey, 1986).

De acuerdo a Sharpe (1979), la clasificación de estas bacterias por sus características fisiológicas se basa en la vía metabólica que emplean para el metabolismo de los carbohidratos, como sigue:

- a) Homofermentativas.- Fermentan carbohidratos con producción predominante de ácido láctico, utilizando la vía metabólica de Embden-Meyerhoff.
- b) Heterofermentativas.- Fermentan carbohidratos con la producción de ácido láctico y una variedad de otros

productos, tales como: ácido acético, etanol, CO₂, etc., en diferentes cantidades, utilizando la vía metabólica de las hexosas monofosfato.

Las clasificaciones mencionadas se encuentran resumidas en el cuadro 2 (Tamine, 1983).

Las bacterias ácido-lácticas tienen otras características que podrían considerarse negativas, pero que deben tomarse en consideración:

Son nutricionalmente delicadas, ya que requieren de grandes cantidades de aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas del complejo B para su desarrollo; tienen baja actividad biosintética, ya que son incapaces de crecer en medios minerales; producen pocas enzimas extracelulares; no atacan polisacáridos y sus enzimas lipolíticas son relativamente débiles, sin embargo, son susceptibles de crecer en sustratos de bajo costo (medios derivados de suero), obteniendo densidades altas en fermentaciones a gran escala y tecnología de conservación adecuada, siendo importante seleccionar un medio de cultivo y métodos adecuados para la producción, mantenimiento y propagación de estas bacterias, principalmente para su empleo a nivel industrial (Margalith, 1981).

Del género *Lactococcus*, fundamentalmente las especies *Streptococcus lactis* subsp. *lactis* y *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris*, son los iniciadores que más se han utilizado y estudiado hasta el presente, pudiendo decirse asimismo, que las propiedades de los iniciadores lácticos y sus usos para la manufactura de productos lácteos se han documentado extensamente en la literatura (Heap 1976; Cox, Diebel, Sellars 1978; Kosikowski 1980; Davies 1981; Daly 1983; Sellars 1985; Gasson 1987).

Durante la propagación y manejo de los iniciadores lácticos se ha tropezado con diferentes problemas, uno de ellos es la inestabilidad de las cepas. Se ha observado, por ejemplo, que las enzimas esenciales para el crecimiento en leche (específicamente las enzimas del metabolismo de la lactosa y las proteinasas) son inestables y que su inestabilidad parece estar relacionada con la amplia cantidad de plásmidos que se encuentra presente en estos microorganismos (McKay 1982; Davies y Gasson 1981; Gasson 1983).

No obstante que la genética de los estreptococos lácticos ha permanecido ignorada por mucho tiempo, se han venido realizando estudios sobre la misma habiéndose encontrado variantes de *S. lactis subsp. lactis* y *S. lactis subsp. cremoris* que carecían de la habilidad para fermentar lactosa. Algunos autores sugirieron que había condiciones del ambiente y de manejo que hacían susceptibles a las cepas de perder esta capacidad, tales como el subcultivo, o los efectos de la temperatura o de algún agente mutagénico (H₂O₂, ácido láctico en exceso), o la producción en cultivo continuo, además del estado fisiológico de las cepas (Okulitch, 1936 y 1939; Yawger, 1937 y Hunter, 1939; Bibal, 1988).

Existe un buen número de factores que afectan adversamente el desarrollo de los iniciadores, siendo las condiciones de tensión las que más contribuyen a causar variaciones (Gilliland, 1985). Con el control de algunos de estos factores, tales como la temperatura, el pH, el medio de cultivo y el mantenimiento de las cepas, se puede contrarrestar la heterogeneidad y minimizar los cambios.

Entre los fenómenos que más se han analizado con respecto a la heterogeneidad que existe en los cultivos iniciadores están la

producción de ácido y la sensibilidad a bacteriófagos, sin embargo es posible que esta heterogeneidad se manifieste en otras características que son más difíciles de evaluar, debido a que los procedimientos necesarios no son del todo factibles o aún no se encuentran disponibles.

McKay desde 1970 realizó algunos estudios sobre la inestabilidad del metabolismo de la lactosa examinando sus posibles causas, habiendo encontrado una relación de esta capacidad con material extracromosomal. Al poco tiempo se comenzaron estudios sobre la actividad proteolítica, encontrándose también una relación de la actividad con elementos extracromosomales (McKay, 1983).

Se ha observado también que otras propiedades de los estreptococos lácticos, útiles para el procesamiento de lácteos, tales como resistencia a fagos, utilización de citrato y sacarosa, producción de nisina y de mucilago, se pierden fácilmente, y cuya inestabilidad parece estar también relacionada con la pérdida de plásmidos durante el crecimiento de las bacterias, (Larsen, 1978; Kempler, 1979; Gasson, 1984; Steele, 1986; Vedamuthu, 1986; Buchman, 1988).

La presencia de plásmidos en estas bacterias ha quedado bien establecida (Cords, 1974; McKay, 1976; Efstathiou, 1976; Davies, 1981), y aunque generalmente tienen un gran número de plásmidos, la mayoría de estos parecen crípticos y sólo para unos pocos se ha demostrado que codifican para funciones conocidas (Gasson, 1987).

Se tienen tres rasgos bien documentados codificados por plásmidos, los cuales son importantes para el crecimiento en leche: el catabolismo de lactosa con producción de ácido láctico; la presencia de una potente proteinasa ligada a la pared celular, y la utilización de citrato para la generación de compuestos del

sabor tales como diacetilo, según se señala en el cuadro 3 (Gasson, 1987).

Los genes para el metabolismo de la lactosa y la actividad proteínasa están codificados por el plásmido pLp712, de 56.5 kilobases del *S. lactis* 712 (Gasson, 1982, 1983). Este plásmido se ha caracterizado extensivamente por mapas de restricción y por aislamiento y mapeo de fragmentos obtenidos del plásmido. Correlacionando la posición de los diferentes fragmentos con su efecto sobre los fenotipos de lactosa y proteínasa, fue posible localizar los determinantes genéticos para estos rasgos en el mapa de restricción (Gasson, 1987). Una caracterización similar se realiza con *S. cremoris* H2, encontrándose que el plásmido pDI-21, de 63 kilobases tiene los genes que codifican para el metabolismo de la lactosa y la actividad proteínasa (Yu, 1989).

La relación entre plásmidos específicos y rasgos fenotípicos ha sido implicada generalmente de la asociación entre pérdida de la función y pérdida de plásmidos. La conclusión a que se llegó inicialmente sobre esta implicación fue el resultado de una evidencia confusa y contradictoria para la localización del gen relevante (McKay 1982; Davies y Gasson 1981; Gasson 1983). La frecuencia en la pérdida de los plásmidos mayores es tal, que es posible que no exista relación entre la pérdida de estos plásmidos y de la función en su totalidad. De cualquier manera se ha aceptado que debe buscarse mayor evidencia para confirmar que un plásmido específico es portador de genes para una propiedad en particular. Se cuenta con técnicas de transformación, por lo que algunos de los genes que codifican para algunas características metabólicas se han clonado y expresado en cepas curadas, confirmando que dichas características están codificadas en plásmidos.

En los estreptococos lácticos como en otros microorganismos, los plásmidos pueden separarse de acuerdo a su peso molecular por electroforesis en geles de agarosa, lo que permite en la actualidad obtener perfiles de forma rápida y específica para cada cepa (Leblanc, 1979, Anderson, 1983)). Se han encontrado plásmidos de entre 1 y 40 Mdals o mayores y hasta 14 bandas de plásmidos pueden observarse en los perfiles aunque los plásmidos pueden ocurrir en la bacterias en formas variadas: monomérica, multimérica, circular abierta, circular cerrada y lineal, y así los perfiles obtenidos por electroforesis en geles de agarosa pueden sobreestimar el número de plásmidos presente en cada cepa, pero se busca mejorar las técnicas para el aislamiento de los plásmidos y minimizar este problema (Orberg, 1984). Las diversas técnicas de extracción de plásmidos se señalan en el cuadro 4.

La inestabilidad de las cepas y el papel que tienen los plásmidos en ésta queda aún por resolverse, aunque por otro lado, se ha encontrado que el mayor número de plásmidos que se pierde corresponde particularmente a los de pocas copias, pero los perfiles en general quedan suficientemente inalterados y permanecen característicos y reconocibles (Davies y Gasson, 1981), con lo que se tiene una herramienta valiosa para la identificación de los estreptococos lácticos (Davies et al., 1981), además de ser útil para evaluar la estabilidad de los iniciadores mezclados en la práctica (Andresen, 1984).

Hasta el presente, las bacterias aisladas de un cultivo iniciador se caracterizan solamente por pruebas morfológicas y fisiológicas, y en ocasiones por su sensibilidad a fagos. Las pruebas fisiológicas establecen diferencias a nivel de especie y la reacción a fagos puede dar diferencias entre cepas, siempre que haya fagos homólogos disponibles (Josephsen, 1988). Sin embargo se han encontrado fagos con 14 morfologías diferentes que

concretamente reaccionan con *Lactococcus*. Para caracterizar los cultivos iniciadores se han realizado pruebas con estos fagos y tipificando las cepas pero se encontró que la identificación de una cepa aislada es muy difícil por este método (Gasson, 1984; Gilliland, 1985). Es posible que la relación fago-huésped sea hipervariable y que el uso de esa propiedad como determinante de la cepa pueda resultar en la proliferación de cepas que difieran solamente en su sensibilidad a fagos. Por lo tanto, la distinción de cepas basada en esta propiedad puede ser menos que ideal y potencialmente confusa a menos que se correlacione con otras determinantes genéticas. Los perfiles de plásmidos pueden proporcionar una alternativa más útil (Andresen, 1984; Josephsen, 1988).

Por medio de un análisis de perfiles de plásmidos a un iniciador utilizado en la manufactura de queso Cheddar, se demostró que con este tipo de análisis es posible diferenciar las bacterias, que de otro modo no podrían lograrse en una mezcla compleja de cepas iniciadoras como las utilizadas comúnmente en la industria láctea (Josephsen, 1988).

Se han desarrollado recientemente nuevas aplicaciones para los perfiles de plásmidos. El aislamiento e identificación de cepas de *Acetobacter*, responsables de la fermentación del vinagre, es sumamente difícil, sin embargo se encontró que la caracterización de la microflora del vinagre es posible mediante el aislamiento de los plásmidos y su resolución por electroforesis en geles de agarosa (Teuber, 1987). Asimismo, en plantas de procesamiento de aves, se pudo investigar la fuente de contaminación por *Staphylococcus aureus* y pudieron ser identificadas las cepas endémicas por perfiles de plásmidos (Dodd, 1988). Se ha sugerido establecer un banco de referencia de iniciadores lácticos con sus respectivos perfiles de plásmidos facilitando así la identificación de las diversas cepas (Collins, 1955 y

Sandine, 1985, citados por Gilliland, 1985), lo que ilustra como la determinación de perfiles de plásmidos proporciona una alternativa útil en la identificación de cepas.

La aplicación de las técnicas de clonación de genes a estreptococos lácticos puede estar dirigida ya sea al mejoramiento de las propiedades existentes o a la construcción de cepas que sinteticen eficientemente nuevos productos lácteos o no lácteos. La primera opción complementa de manera racional los métodos clásicos existentes para el mejoramiento de cepas al establecer propiedades favorables y suprimir las indeseables. Además de lograr la estabilización de las propiedades ventajosas, lo cual es de particular relevancia para las funciones lácteas codificadas por plásmidos. La segunda alternativa implica el uso de los estreptococos lácticos como organismos de producción, los cuales sintetizarían eficientemente nuevas proteínas heterólogas (Vos, 1986). Sin embargo, la aplicación de estas tecnologías de clonación en los estreptococos lácticos sólo puede alcanzarse con un conocimiento básico de los procesos esenciales de la biología molecular, así como de la fisiología y expresión de las características de interés del grupo. Muchos de los estudios genéticos realizados sobre estreptococos lácticos se originaron en el interés microbiológico y se enfocaron hacia la presencia y funciones de los plásmidos (Davies 1981; McKay 1983; Gasson 1984), lo que ha aumentado el número de laboratorios interesados en estas bacterias.

Actualmente, la primera generación de vectores bifuncionales de clonación ya se ha desarrollado; algunas cepas modelo son transformables y los genes de *S. lactis subsp. lactis* del metabolismo de la lactosa se estudian a nivel molecular y se ha buscado la posibilidad de expresarlos en diferentes especies bacterianas como *E. coli* y *B. subtilis* (Vos, 1986), lo que permitirá obtener mayor información sobre su

regulación y expresión (Venema, 1987).

Se ha encontrado que una gran variedad de sistemas de transferencia de genes funcionan en estos microorganismos (Kondo, 1985). Algunos sistemas pueden ocurrir en la naturaleza (conjugación, transducción), mientras que otros sólo operan en el laboratorio y hacen uso de protoplastos (fusión, transfección y transformación) o la transformación por electroporación. Los sistemas naturales así como la fusión de protoplastos son relevantes para la construcción de nuevas cepas lácticas. Además, en algunos casos se puede lograr la integración de los genes de interés en el cromosoma, con miras a la estabilización de las características para las que codifican (Vos, 1986; Gasson, 1986; Kondo, 1985).

La conservación de los iniciadores es otro punto crítico para la estabilidad de los mismos, considerando que los cultivos deben mantener su viabilidad, capacidad de producción de ácido y otras características por periodos prolongados de almacenamiento, en los niveles adecuados para la manufactura de productos de calidad. Actualmente, los cultivos concentrados están desplazando la forma tradicional de los cultivos "madre" y el subcultivo regular, por la posibilidad de utilizarlos en forma directa e inmediata sobre las tinas de elaboración de los productos lácteos. Considerando además, que son más controladas las condiciones de producción, se manejan volúmenes mínimos y se disminuyen los problemas de tipo laboral y de rotación de cultivos. No obstante, existe la desventaja del almacenamiento en grandes espacios para su mantenimiento a temperaturas de congelación. La congelación de estos cultivos puede ser desde 0°C hasta -196°C, logrando esta temperatura con nitrógeno líquido. Otra forma de conservarlos es por liofilización, sin embargo, la viabilidad y la capacidad de producir ácido se ven más afectadas que en la congelación aunque

ofrece ventajas de conservar en refrigeración y requiere menores volúmenes de transporte y almacenamiento, no obstante que estos cultivos no sean de inoculación directa (Gilliland, 1985).

La refrigeración como método de conservación propone como ventaja el bajo costo, con respecto a los anteriores, sin embargo, los periodos de almacenamiento se reducen a 20 días (Pérez-Gavilán, 1984). Con el fin de evitar el alto costo de las cepas concentradas en forma liofilizada o congelada, Goldhaber (1982) estudió la refrigeración como método de conservación, almacenando bacterias lácticas a 4°C en el medio de producción, a base de caseinato, para luego emplearlas directamente en la elaboración de quesos tipo manchego. Habiéndose comprobado posteriormente la efectividad de este método de conservación por Fuentes (1987), quien verificó que las cepas *S. lactis subsp. lactis* BM 147 y *S. lactis subsp. cremoris* BM 149 conservan, en el medio de producción, a esa temperatura y por 24 días, los niveles de viabilidad y actividad aceptables para la industria láctea.

Conjuntando todo lo anterior, se demuestra una franca búsqueda de que la manufactura de productos lácteos y principalmente quesos, pueda convertirse en una operación totalmente controlada con el empleo de cepas estables o con la selección cuidadosa de cepas especializadas en diferentes actividades. En este sentido, los logros alcanzados han permitido mejorar las técnicas de identificación y con la posibilidad de diseñar iniciadores lácticos mediante la ingeniería genética se puede obtener mayor información sobre la regulación y expresión de las actividades metabólicas de interés, facilitando así la manipulación y el mejoramiento genético de los iniciadores. Sin embargo, la implementación de esta metodología se encuentra aún en desarrollo ya que el conocimiento de la fisiología y genética de los estreptococos lácticos aún no rinde completamente los resultados deseados.

El estudio de las funciones codificadas por plásmidos hace que cada vez sea más sencillo controlar las características funcionales asociadas a las fermentaciones, buscando el mejoramiento de los iniciadores de uso comercial. En este sentido, se han venido realizando diversos estudios relacionados con la producción y aplicación de iniciadores lácticos (Reynoso, 1981; Goldhaber, 1982; Pérez-Gavilán, 1984; Pérez-Gavilán, 1985; Fuentes, 1987; Olivares, 1988; Terrones, 1989; Enríquez, 1989), con una presentación simple cuya utilización sea de forma directa, de producción nacional, que mantenga su viabilidad y tenga capacidad para producir ácido láctico suficiente durante su utilización, además de conferir a los productos las características sensoriales de preferencia y aceptabilidad por parte del consumidor nacional. Considerando que los trabajos que se han realizado en el área, no hacen referencia a la relación de los plásmidos con la producción de ácido láctico durante la producción de los iniciadores ni hay reportes sobre el cambio del perfil de plásmidos durante el almacenamiento de estos cultivos, en el presente trabajo se propone el siguiente objetivo.

OBJETIVO

OBJETIVO

Obtener los perfiles de plásmidos de las cepas *Streptococcus lactis* subsp. *lactis* BM 147 y *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris* BM 149 en geles de agarosa, para su utilización como patrones específicos de identificación y analizar su posible correlación con los cambios en la capacidad de producir ácido láctico (actividad) y pH durante la producción y almacenamiento de los cultivos.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

MICROORGANISMOS

Las cepas utilizadas fueron *Streptococcus lactis subsp. lactis* BM 147 y *Streptococcus lactis subsp. cremoris* BM 149, ambas cepas pertenecientes a la colección del cepario del IIBM-UNAM. Se mantuvieron en leche descremada por subcultivo bisemanal de acuerdo con Sellars (1985).

Las cepas se diferenciaron morfológicamente sembrando por agotamiento en Agar Reddy modificado e incubando a 30°C por 48 hs en atmósfera de anaerobiosis (Reddy, 1972). El medio permite diferenciar en placa donde *S. lactis subsp. lactis* presenta colonias grandes y blancas y, por la producción de ácido láctico, contorno verde amarillo mientras que *S. lactis subsp. cremoris* presenta colonias pequeñas y amarillas con fondo amarillo.

CONDICIONES DE PRODUCCION Y ALMACENAMIENTO

La producción, a nivel piloto, de los caldos de fermentación fue en fermentaciones por lote en medio industrial (MI), cuya composición es leche descremada 6%, caseinato de sodio 2%, extracto de levadura 1% y glucosa 2.5%, con control automático de pH y temperatura, neutralizando con NaOH 20%(5N). La metodología fue la propuesta por Goldhaber, 1982, seguida por Fuentes, 1987 y modificada por Enríquez, 1989, como se señala en el cuadro 5. Los caldos de fermentación fueron enfriados y colectados en envases estériles y posteriormente fueron almacenados en frío (4°C) por un período de 28 días. El producto obtenido corresponde a cepas puras que pueden emplearse en forma directa en la tina de cuajado de quesos.

El equipo utilizado fue:

- Consola New Brunswick Scientific Co., Modelo M-19-1410.
- Jarra de 14 litros de cristal refractario con cabezal New Brunswick Scientific Co., Modelo F14-1002.
- Bomba peristáltica Masterflex, Modelo 7013, adaptada a un controlador automático de pH.
- Electrodo para medición de pH marca Ingold, para jarra de 14 litros, esterilizable, Modelo 761-351.

La producción a nivel de laboratorio fue en matraces de 500 ml, sin control de pH, utilizando el mismo medio y la metodología para la obtención de inóculos de los fermentadores.

ACTIVIDAD, pH y CUENTA TOTAL

Para la determinación de actividad %, se utilizó leche descremada al 11% de ST, pasteurizada a 62°C/30 min. Se inoculó al 1% e incubó a 29°C por 6 horas. Muestras de 9 ml fueron tituladas con NaOH 0.1N, utilizando fenoftaleína como indicador. El gasto de NaOH se expresa en % de actividad y significa la capacidad de producción de ácido láctico por parte de la cepa (Sellars, 1985).

Asimismo, el ácido láctico producido durante el crecimiento, como metabolito primario de la fermentación, se determinó tomando muestras de los caldos de fermentación y titulando con NaOH 0.1N. Los resultados se expresaron en ácido láctico producido %. En las fermentaciones con control de pH, el consumo de NaOH 5N se expresó en gramos de ácido producido.

La medición de pH se hizo con un potenciómetro Corning Modelo 103 con electrodo tipo convencional combinado.

La cuenta total de microorganismos iniciadores se hizo de acuerdo al Método microbiológico cuantitativo de vaciado en placa, en agar APT (Merck), expresado en UFC/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro),

PERFIL DE PLASMIDOS

La extracción de plásmidos se realizó de acuerdo con el protocolo propuesto por Anderson y McKay (1983), para bacterias lácticas, basado en el subcultivo en medio Elliker modificado. Para las condiciones experimentales del proyecto, se ajustaron los volúmenes de los amortiguadores a 100 ml, utilizando 10 mM de DL-treonina y 5 mg/ml de lisozima. Las extracciones realizadas con DL-treonina presentaron perfiles nítidos, mientras que con L-treonina se detectó la presencia de RNA. Para eliminarlo, se intentó el uso de RNasa; sin embargo, el rendimiento disminuyó en un 50%, haciendo las preparaciones más inestables y reduciendo considerablemente el tiempo de conservación, lo cual afectó más a la cepa BM 147 que a la BM 149.

Los perfiles se obtuvieron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (Meyers, 1976). Se hicieron algunas pruebas con diferentes porcentajes de agarosa, mayores voltajes y otros volúmenes de muestra, determinándose finalmente que con un volumen de muestra de 20 μ l, 0.8% de agarosa y 100 V, es posible observar mejor las bandas de menor tamaño.

En el caso de extracciones para caldos de fermentación almacenados por varios días se buscó que el número de células alcanzado en la fase de subcultivo correspondiera al alcanzado por las células no almacenadas. Para lo cual se dejaron crecer en

Elliker modificado, 4 h para caldos jóvenes, 5 horas para caldos de 8, 16 y 20 días y 6 h para caldos de 28 días.

Por otra parte, se hicieron extracciones partiendo directamente de los caldos de fermentación, sin el subcultivo en Elliker modificado, encontrándose dificultades para la separación de la biomasa del medio por métodos convencionales. Con el fin de tener el número de células requerido (10^8) se hizo dilución en Elliker modificado y lavado con amortiguador de tris 0.1M del caldo de fermentación y se procedió como en el caso anterior.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Con el fin de conocer el comportamiento de las cepas durante la fermentación y a diferentes condiciones de cultivo se realizaron cinéticas de crecimiento y producción de ácido láctico, a nivel laboratorio y en fermentador instrumentado de 14 lt. De cada fermentación se tomaron muestras cada dos horas y se les determinó UFC/ml, ácido láctico producido, actividad % y pH. Con estos resultados y la metodología propuesta por Goldhaber (1982) se estandarizaron las condiciones de producción de los caldos de fermentación señaladas en el cuadro 5.

Para determinar el comportamiento durante la producción y almacenamiento de los caldos de fermentación, se hicieron fermentaciones con control de pH y de acuerdo con lo señalado en el cuadro 5. Se tomaron muestras cada 2 h, las cuales fueron enfriadas y almacenadas a 4°C por 28 días. El día de la fermentación y cada 4 se les determinó pH, UFC/ml y actividad %.

Considerando esta información y para obtener los perfiles de plásmidos durante las diferentes fases de la fermentación y el almacenamiento, se hicieron dos fermentaciones más para cada

cepa. Se seleccionaron las 4, 8 y 10 h para la cosecha y los días 0, 10 y 20 del almacenamiento para tomar las muestras que se correlacionaron con el perfil de plásmidos. En las diferentes horas de cosecha y los diferentes tiempos de almacenamiento, se determinó pH, UFC/ml, actividad % y se obtuvo el perfil de plásmidos.

DISEÑO ESTADISTICO

Se realizaron diseños de experimentos completamente aleatorios, por triplicado para la determinación de características fenotípicas. Para la producción y almacenamiento de caldos de fermentación se consideró el tiempo como variable independiente pero no aleatorizable. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza para diseños completamente aleatorizados, con comparaciones a priori.

R E S U L T A D O S

RESULTADOS

I. Condiciones de producción.

En la figura 1 se presentan los resultados de las cinéticas de crecimiento y producción a nivel laboratorio. Para la cepa BM 147, la máxima concentración de biomasa se obtiene a las 10 h mientras que para BM 149, se obtiene a las 12 h. No obstante haberse alcanzado la fase estacionaria, la producción de ácido continúa por 2 h más. A las 12 h la cuenta total de BM 147 disminuye un ciclo logarítmico, en cambio la cuenta para BM 149, se mantiene constante. Con estos datos podemos observar que entre las 8 y las 12 horas se tiene una alta población viable para utilizarse como inóculo en la producción de caldos de fermentación.

Los resultados de las cinéticas realizadas en jarras de fermentación de 14 litros (figuras 2 y 3), señalan que el control de pH favorece significativamente ($P < 0.05$) el aumento de las UFC/ml, de la actividad % y la producción de ácido láctico para ambas cepas. En la fermentación con control de pH (CpH) desde las 4 horas se tiene mayor concentración de biomasa que en las fermentaciones sin control de pH (SpH). En ese tiempo la fermentación CpH permanece en fase exponencial mientras que en la SpH, es cuando se inicia la fase estacionaria, etapa que se logra en CpH hasta las 6 horas. En las fermentaciones SpH el % de actividad es de 0.6% para BM147 y 0.4% para BM149, mientras que en las CpH, para ambos casos se obtiene 0.7%. Se observa un comportamiento comparable entre las cinéticas sin control de pH de laboratorio y de fermentador. Las velocidades específicas de crecimiento (μ) para la cepa BM147 son de 0.4 en ambas fermentaciones y para la cepa BM149 de 0.3, aunque la fase

estacionaria se alcanza a las 8 horas para el caso de laboratorio, y a nivel piloto, la fase estacionaria se alcanza a las 6 horas.

II. Comportamiento durante la producción y almacenamiento de los caldos de fermentación

En las figuras 4 y 5 se presentan los resultados obtenidos en la producción de los caldos de fermentación, con control de pH y temperatura, cosechando cada 2 h y almacenando a 4°C por 28 días, para las cepas BM 147 y BM 149 respectivamente. En el caso de la cepa BM147, con respecto a la actividad, la muestra cosechada a las 2 h de fermentación se mantiene constante los primeros 12 días, a los 16 disminuye a 0.3% y continua bajando hasta 0.18% al final del almacenamiento. Los caldos de 4 y 6 h tienen una clara tendencia a bajar durante todo el almacenamiento mientras que el de 8 h mantiene la actividad durante 16 días, a los 20 disminuye a 0.50% y al final del almacenamiento es de 0.29%.

El pH de los caldos de fermentación durante el almacenamiento presenta una caída drástica, los primeros 4 días del almacenamiento, siendo este descenso menor conforme aumenta el tiempo de cosecha. Así, la caída para la muestra de las 2, 4 y 6 h es similar pero más marcada que para el caldo de fermentación, el cual disminuye de 6.70 a 5.99 los primeros días. Sin embargo, después de la caída, el pH permanece constante hasta el final del almacenamiento. Asimismo, encontramos que menores tiempos de fermentación llevan a un problema de almacenamiento afectando la actividad de las cepas y el pH de los caldos de fermentación.

En el caso de la cepa BM 149, las fermentaciones duraron 10 h y las diferentes muestras observaron un comportamiento similar, en

% actividad y pH, a las de la cepa BM 147. En este caso, la actividad de la muestra de 8 h y del caldo de fermentación (10 h) fue de 0.68% y disminuyó el día 28 a 0.33%. El pH se mantuvo por arriba de 6.3 durante todo el periodo del almacenamiento aunque para las muestras de las 2, 4 y 6 h el pH tuvo una caída mayor.

Las figuras 6, 7 y 8 se señala el comportamiento de las muestras cosechadas a las 4, 8 y 10 h de fermentación y almacenadas por 20 días para cada cepa en estudio. Dichas muestras se correlacionaron con el perfil de plásmidos. Se distingue claramente que la actividad es mayor a las 8 y 10 h y su caída es menor que en la muestra de las 4 h, durante el almacenamiento, mientras que a menores tiempos de cosecha, las caídas son más drásticas. Esto comprueba lo que se obtuvo con los experimentos anteriores. La viabilidad del caldo de fermentación de la cepa BM 147 se mantiene por 20 días, mientras que la BM 149 presenta una caída de 1 ciclo logarítmico entre el día 10 y el día 20. El pH observa un comportamiento similar al señalado en las figuras anteriores para los diferentes tiempos y para ambas cepas, observándose la caída durante los primeros días del almacenamiento y luego permanece constante hasta el final del periodo.

III. Perfil de plásmidos en la producción y almacenamiento

Siguiendo el protocolo de Anderson y McKay (1983), con las modificaciones especificadas en material y métodos, se obtuvo el perfil de plásmidos para *S. lactis subsp. lactis* BM 147 que presenta 6 bandas y para *S. lactis subsp. cremoris* BM 149, 8 bandas (Figura 9).

En las figuras 10 y 11 se presentan los perfiles obtenidos a diferentes tiempos de almacenamiento y diferentes horas de

cosecha. En este caso se utilizó la extracción directa del caldo de fermentación para obtener una imagen del perfil de plásmidos de la población total. En las figuras se puede ver que con este método de extracción, las bandas de bajo peso molecular disminuyen en intensidad y el perfil de plásmidos presenta patrones similares a las 4 y 8 h de fermentación pero a las 10 h no se detectan las bandas de bajo peso molecular.

Para descartar que la desaparición de las bandas fuera por el efecto del método de extracción, se obtuvo paralelamente el perfil con el método de subcultivo. En las figuras 12 y 13 se observa que aparecen todas las bandas en los caldos de fermentación no almacenados y que durante el almacenamiento de éstos, se pierden bandas. Para el caso de la cepa BM147, las preparaciones de los caldos cosechados a las 8 y 10 h y almacenados por 20 días, sólo presentan 4 bandas en las muestras diluídas, desapareciendo las bandas dos y cuatro, mientras que en las muestras de Elliker modificado sólo desaparece la banda dos. En las muestras diluídas de la cepa BM 149, sólo se tienen 2 bandas y el barrido correspondiente a la hidrólisis de las bandas de mayor peso molecular. En las muestras de Elliker este barrido es también notorio aunque aquí sí se perciben algunas bandas de alto peso molecular.

D I S C U S I O N

DISCUSION

Con el fin de minimizar la inestabilidad de las bacterias lácticas se han diseñado diversas técnicas para su manejo y almacenamiento, relacionándose asimismo esta característica con la presencia de material extracromosomal. Tomando como base los antecedentes directos a este trabajo, mencionados en el cuadro 5, se establecieron las condiciones de manejo de inóculos. Por otra parte se trabajó en la detección de la pérdida de actividad durante el almacenamiento.

Con la estandarización en el manejo de inóculos, de acuerdo a la metodología planteada, prácticamente se eliminó la posibilidad de que la variación en la actividad de las cepas fuera por diferentes formas de manejo.

El porcentaje de inóculo y el tiempo de incubación de éste, son factores importantes a considerar en el éxito de una fermentación y su posterior almacenamiento. Inóculos con tiempos de incubación mayores a 12 h, no varían su actividad pero si incrementa el tiempo de crecimiento alargando la fase lag y por tanto, el de la fermentación a más de 10 h. (Datos no mostrados, Enríquez et al., 1989). Las cinéticas de crecimiento de 18 h reportadas por Fuentes (1987), fueron reducidas al utilizar inóculos de 5% y con 12 h de incubación, permitiendo así disminuir los tiempos de fermentación a 8 - 9 h ya que las células permanecen menos tiempo en una atmósfera de ácido láctico.

Asimismo encontramos que la 3a. resiembra es lo más adecuado para lograr cepas más estables y obtener resultados reproducibles. Experimentos realizados con cepas con una o dos resiembras prolongaron el tiempo de incubación, hasta 24 hs y no se lograron

actividades mayores de 0.3% (cuadro 5). Sin embargo, debe también tomarse en consideración que el efecto de las resiembras puede causar la degradación de plásmidos. Algunos autores encontraron cepas curadas espontáneamente por la resiembra constante y por el efecto de la temperatura (Sinha, 1989; Efstathiou, 1976). De hecho, Sinha ha propuesto esta forma de curación como un método alternativo a los métodos químicos u otros métodos físicos para obtener cepas libres de plásmidos de una manera más sencilla.

La neutralización del ácido producido durante la fermentación constituye un factor crítico, aunque su valor es función del propósito de la fermentación, sea para producción de biomasa o para obtención de metabolitos. El rango de pH entre 6.3 y 6.9 se ha reportado como el adecuado para lograr un crecimiento óptimo de las bacterias lácticas y obtener máximas concentraciones de biomasa (Gilliland, 1977 y Bibal, 1988). El control de pH por tanto, permite tener hasta 10 veces más UFC/ml ($10E10$) y mayor actividad que cuando se trabaja sin control de pH (figuras 2 y 3).

Algunos autores consideran que la acumulación de ácido láctico es la causa fundamental por la cual se inhibe el crecimiento y se reduce la actividad. El crecimiento a pH menor de 5.0, causa daños en las células, que si bien no se expresan inmediatamente, sí repercuten en la disminución de la velocidad de crecimiento y en la reducción de la actividad específica de la mayoría de las enzimas de las vías metabólicas. Además se pierde el control de la composición iónica intracelular, llevando por lo tanto a una inactivación total de la Hexocinasa y a la falta de síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos (Harvey, 1965). La recuperación de estas células lleva tiempo, aunque se cultiven a pH mayor de 5.0 y con control de pH, prolongando por lo tanto los tiempos de fermentación. No obstante, la elevada concentración de sólidos de leche o derivados de la misma en el medio de cultivo,

incrementan la capacidad amortiguadora del medio y se favorece el crecimiento de los iniciadores, limitando la inhibición por ácido (Chavarri et al. 1988). La presencia de ciertos compuestos en el medio de cultivo, como el extracto de levadura o la glucosa, puede favorecer el crecimiento de las bacterias lácticas.

Estos compuestos favorecen un crecimiento acelerado y una mayor concentración de biomasa al final de la fermentación. Sin embargo, no se debe olvidar que la presencia de compuestos como la glucosa y/o galactosa en el medio, como fuente de carbono, además de acelerar el crecimiento, también favorece la autólisis (Vegarud, 1983).

El crecimiento cesa a concentraciones de 70 g/l de ácido láctico, aunque con medios menos ricos, el crecimiento se detiene a concentraciones menores de ácido (19 - 33 g/l), siendo por tanto la inhibición del crecimiento por ácido fuertemente dependiente de la composición del medio (Bibal, 1989).

En fermentaciones con control de pH y una adecuada composición del medio, el crecimiento llega a un punto en que también se inhibe. Sin embargo, se logran incrementos en el número de células con la neutralización con NaOH, datos que coinciden con lo reportado por Cox y Stanley, 1978.

La producción celular se detiene antes que los nutrientes se agoten y antes de que se detenga la producción de ácido. Los máximos valores de UFC/ml y de ácido producido se logran después de 5 - 6 h de fermentación, decreciendo la producción de ácido después de la 6a. hora por autoinhibición, causada probablemente por los altos niveles de metabolitos formados en la fermentación, tales como lactato de sodio, ácido láctico disociado, o D-leucina, los cuales causan daño a la célula (Chavarri et al., 1988).

Los resultados obtenidos en las cinéticas con y sin control de pH son consistentes con lo reportado por Bibal, 1988 y Chavarri, 1988. Asimismo, Gilliland señala que la posible causa de la inhibición del crecimiento en fermentaciones con control de pH, es la acumulación de D-leucina ya que las concentraciones de lactato acumulado que se requieren deben ser mayores a las logradas en una fermentación de 12 - 14 h (Gilliland, 1977).

Además señala la posible presencia de H₂O₂ como compuesto inhibidor. Se ha demostrado por lo tanto, que la inhibición del crecimiento no sólo se da por la acumulación de lactato sino que también influye la composición del medio, el agotamiento de nutrientes y la acumulación de otros inhibidores (Bibal, 1989), constituyendo así un fenómeno muy complejo y aún en estudio por diversos grupos.

La cosecha de los cultivos antes de las 8 h de fermentación, momento en que se detiene el consumo de NaOH, no es recomendable, ya que implica tener células en plena actividad y por tanto produciendo altas cantidades de ácido, lo que las hace inestables al almacenamiento.

Con las modificaciones al protocolo de extracción y adecuaciones al medio de producción y a las diferentes etapas de almacenamiento de los caldos de fermentación, se obtuvieron los perfiles de plásmidos para las cepas en estudio, coincidiendo el número de bandas con lo reportado por otros autores para otras cepas (Davies, 1981 y McKay, 1983). El perfil de 6 bandas de la cepa BM 147 (figura 9), coincide con el señalado para las cepas 712, C2 y ML3 de *S. lactis*, cuyos pesos moleculares corresponden a 5.2, 11, 18 y 33 Mdal. La cepa BM 149 prácticamente coincide con el perfil de la cepa *S. cremoris* 924. Las diferencias que se dan en los perfiles de las diferentes cepas

pueden estar relacionadas con las diferentes condiciones y ambientes de manejo (Davies, 1981).

Las cinéticas de almacenamiento y los perfiles de plásmidos obtenidos nos permiten especular que hay una relación entre la producción de ácido y los plásmidos, además de que el pH del medio puede causar daños en las células a nivel de éstos. Es posible que durante el almacenamiento de los cultivos se presente una hidrólisis de material extracromosomal manifestada en la presencia de extenso barrido y en la desaparición de bandas específicas. Las condiciones adversas tienen como consecuencia una alta concentración de células muertas y por tanto, la presencia de nucleasas. En las dos cepas tienden a desaparecer bandas de alto peso molecular, lo que guarda correlación con lo reportado por Yu et al. (1989) y Gasson (1983) que localizan los genes de la β -galactosidasa en plásmidos de alto peso molecular. Estos resultados coinciden con el hecho de que son los plásmidos de mayor tamaño los que tienden más fácilmente a hidrolizarse y pocos autores presentan fotografías de ellos (Morlon-Guyot, 1989) aunque el método de extracción es un factor importante a considerar para su obtención.

Lo observado en los geles con subcultivo en Elliker modificado (figuras 12 y 13), nos permite señalar que no se pierden todas las bandas durante el almacenamiento y que la ausencia de las bandas en los geles con el método de dilución se debe a la dificultad para obtener perfiles de una población total y con una alta concentración de células muertas.

Los resultados de las cinéticas obtenidas son consistentes con los estudios reportados en la literatura y coincidimos al señalar que el efecto del pH del medio en la viabilidad y actividad de los iniciadores es un fenómeno complejo y dependiente de diversos factores. Como los perfiles de plásmidos son

específicos para cada cepa y señalan diferencias en el número de bandas entre las cepas en estudio, existe la posibilidad de utilizar el perfil de estas cepas como un patrón de identificación y diferenciación siendo además, útil para evaluar la estabilidad de las cepas y complementar las pruebas bioquímicas y morfológicas tanto en el manejo como en la producción y almacenamiento de los cultivos, como lo sugieren Davies et al., 1981, Josephsen, 1988 y Andrensen, 1984.

Quedan aún por resolver los problemas de extracción a partir de medios complejos y sin subcultivo, buscando separar de una población total, las células viables con el mínimo de manejo. Por otra parte, hay que tener un conocimiento más amplio sobre la fisiología y genética de los iniciadores lácticos y definir los requerimientos nutricionales adecuados para conocer los efectos negativos que pueden ejercer sobre el crecimiento. Es conveniente continuar los estudios de la relación de plásmidos con la fisiología para determinar realmente cual es el efecto del pH y de los metabolitos obtenidos en la fermentación. Asimismo, Profundizar en las causas de la producción de ácido durante el almacenamiento y evitar que el pH disminuya en ese período, además de encontrar las concentraciones de lactato y otros metabolitos a las cuales se inhibe el crecimiento y analizar su efecto sobre el perfil de plásmidos. De igual manera, hay que buscar aún la forma de estabilizar las cepas y que no pierdan los plásmidos donde esté codificada su capacidad de producir ácido láctico.

Algunos grupos que han trabajado por muchos años con estos cultivos han vertido su experiencia en el estudio de otras especies utilizadas como iniciadores (Gilliland, 1988). No obstante, actualmente se realizan estudios sobre el crecimiento en cultivo puro y mixto de los iniciadores lácticos (Boquien,

1988) y sobre la composición de los medios de producción (Exterkate, 1987; Chavarri, 1988), además de la caracterización molecular y genética de los genes codificadores para actividades metabólicas de interés (Inamine, 1986) y la obtención de vectores integrables (Venema, 1987).

El fin primordial que se persigue y que continuará en estudio, está relacionado con el desarrollo de los iniciadores, buscando siempre que las características deseables en cuanto a metabolismo, cinéticas de crecimiento y producción, condiciones de cultivo, tensiones ambientales y aspectos de transferencia de masa se conjuguen en forma más definida.

APENDICE 1

CUADROS

- 1.- Desarrollo histórico de los Iniciadores Lácticos
- 2.- Clasificación de Cultivos Lácticos
- 3.- Principales Vías de Producción de Sabor en la Fabricación de Quesos
- 4.- Técnicas de extracción de plásmidos en estreptococos del grupo N
- 5.- Metodología para la Producción de Iniciadores

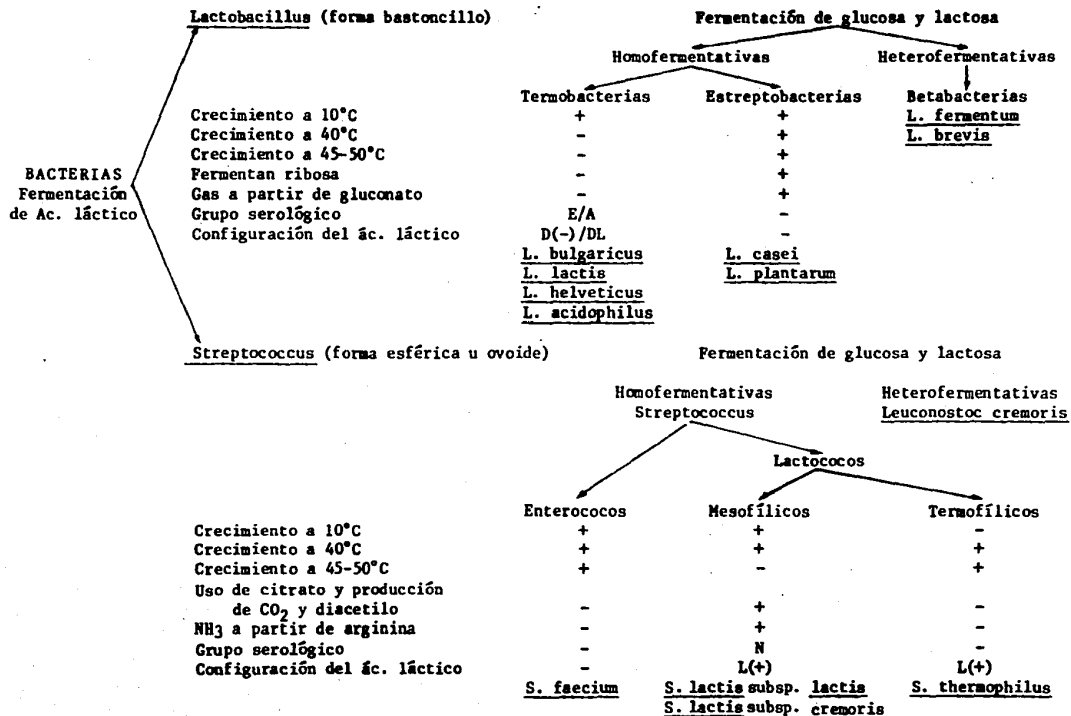
CUADRO 1

DESARROLLO HISTORICO DE LOS CULTIVOS INICIADORES

| AÑO | CULTIVO | SISTEMA DE FERMENTACION | OTROS DESARROLLOS |
|------------|---|--|---|
| Hasta 1930 | Cultivo "Madre" Queso de una sola cepa iniciadora en Nueva Zelandia Mezcla múltiple de cultivos iniciadores en rotación | Medio: leche Botella estéril Ordenar en la botella e inocular el cultivo con un producto anterior Producción de queso en pequeña escala | |
| 1940 | Una o más cepas de <u>S. lactis</u> y/o <u>L. cremoris</u> | Medio: leche descremada deshidratada | |
| 1950 | Iniciador mezclado (composición aún desconocida) | En botellas de 4 onzas para propagar el iniciador a granel para inocular las tinas de cuajado | |
| 1960 | Cultivos mesofílicos congelados con o sin concentración Cultivos Italianos <u>S. thermophilus</u> <u>L. bulgaricus</u> <u>L. helveticus</u> | Medio inhibidor de fagos con fosfato y otros agentes quelantes Tanque a granel Tinas múltiples para vaciar el queso con tiempos controlados Medio a base de suero o leche descremada Tanque a granel Sistema múltiple | |
| 1970 | Mezcla múltiple de cepas Cepas múltiples Cepas mezcladas Cepas pures Cepas solas | Medio inhibidor de fagos para cultivos italianos Tanque a granel con crecimiento natural simbiótico asociado | Presencia de plásmidos en <i>Streptococos</i> del grupo N Primeros estudios sobre la relación de las actividades metabólicas con plásmidos Transducción y conjugación Técnicas de ingeniería genética e inmunológicas Caracterización molecular y genética de plásmidos y cromosoma |
| 1980 | Cultivos como los anteriores y también cepas con mayor resistencia a fagos | Medio amortiguado Se inicia sistema fermentador con control externo de pH, con hidróxido de amonio y otros neutralizantes, con varios grados de automatización Sistema integrado Sistema con control interno de pH Medio de fosfato Neutralización de un paso | Transformación por electroporación Fusión de protoplastos Mapas de restricción de plásmidos Construcción de vectores multifuncionales e integrables Perfiles de plásmidos para identificación de cepas en cultivos mixtos Inmovilización y microencapsulación de células iniciadoras |
| 1990 | | | |

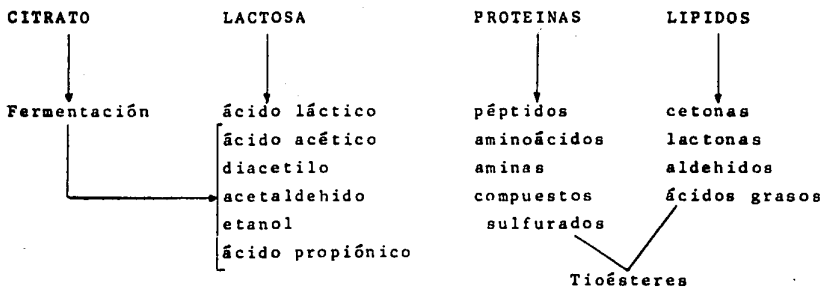
(Adaptado de Gasson, 1981; Tzeng, 1985; Kondo, 1985)

CLASIFICACION Y DIFERENCIACION DE BACTERIAS ACIDO-LACTICAS



CUADRO 3

PRINCIPALES VIAS DE PRODUCCION DE SABOR EN LA FABRICACION DE QUESOS



(Law, 1984)

CUADRO 4
TECNICAS DE EXTRACCION DE PLASMIDOS

| AUTOR/AÑO | MICROORGANISMO | CONDICIONES DE EXTRACCION | ANALISIS |
|------------------|--|--|---|
| Guerry, 1973 | Método general para bacterias | Lisozima 5 mg/ml SDS NaCl Centrifugación Gradiente CsCl-EB | Centelleo Microscopía electrónica |
| Cordé, 1974 | Estreptococos del grupo N | Lisozima 5 mg/ml (1 mg) 37°C/1.5 h SDS 5% 0.4 ml 25°C NaCl 5 M 4°C/noche/centrifugar Centrifugación por gradiente de CsCl-EB | Centelleo Microscopía electrónica |
| Klaenhammer 1978 | Estreptococos del grupo N | Lisozima 10 mg/ml (2.5 mg) 37°C/10-20' SDS 1% Dietil pirocarbonato NaCl 5 M 4°C/baño hielo centrifugar Gradiente CsCl-EB Cloroformo RNA asa 1 mg/ml/1 h/37°C | Dialisis TES Electroforesis en agarosa |
| Larsen, 1978 | <u>S. cremoris</u> | Lisozima 0.6 mg/ml 1.5 h/37°C SDS 5% NaCl 5 M 4°C/baño hielo centrifugar Gradiente CsCl-EB | ME/Kleinschmidt |
| Eckhardt, 1978 | Estreptococos del grupo N | Lisozima RNA asa Tris-boratos/EDTA Azul bromofenol SDS 50°C Lisis directamente sobre el gel de agarosa | Electroforesis en agarosa |
| Léblanc, 1979 | Estreptococos A, D, F, N | Lisozima 40 mg/ml (28.8 mg) 37°C/20' SDS 20% 55°C/15 seg (5 veces) Inversiones Desnaturalización alcalina NaOH 3 M Neutralizar con Tris-HCl 7.0 NaCl - fenol Cloroformo RNA asa 2 mg/ml/1 h/37°C | Electroforesis en agarosa |
| Gasson, 1980 | <u>S. lactis</u> | Lisozima 10 mg/ml (40 mg) 50°C/3' centrifugar Hielo SDS 1% Dietil pirocarbonato NaCl 5 M hielo/centrifugar Cloroformo | Electroforesis en agarosa |
| Anderson, 1983 | Protocolo de extracción para 600 ml y 10 ml de cultivo | Lisozima SDS Desnaturalización alcalina Fenol-cloroformo | Electroforesis en agarosa |
| Orberg, 1984 | Estreptococos del grupo N | Lisozima 20 mg/ml / 0°C Metalisina 37°C/3' Tris-HCl Acido trisopropil naftalen sulfónico Desnaturalización alcalina Neutralizar con acetato Na Fenol - NaCl Cloroformo RNA asa 10 mg/ml/20'/37°C | Electroforesis en agarosa |

CUADRO 5

METODOLOGIA PARA LA PRODUCCION DE INICIADORES**

| PARAMETRO | CONDICIONES |
|-------------------------------------|---|
| <u>INOCULOS</u> | |
| Medio de cultivo | leche descremada |
| Volumen de inóculo | 1% v/v |
| Temperatura de incubación | 29°C |
| Edad del inóculo | 8 - 12 horas |
| Reactivación y número de resiembras | 1a. resiembra: 18-24 hs 2a. resiembra: 18 hs 3a. resiembra: 12 hs |

| | |
|------------------------|------------------------------------|
| <u>PRODUCCION</u> | |
| Medio de cultivo | Medio industrial (Goldhaber, 1982) |
| Volumen de inóculo | 5% v/v |
| Volumen operativo | 10 lt |
| Temperatura | 29°C |
| pH | 6.9 - 7.0 |
| Agente neutralizante | NaOH 20% |
| Agitación | 200 rpm |
| Tiempo de fermentación | 8 horas |

**Datos experimentales obtenidos por Córdova A., M.S. y Enríquez F., M.L., durante el desarrollo de los proyectos de investigación, considerando los trabajos de Goldhaber y Fuentes para la producción de los caldos de fermentación.

APENDICE 2

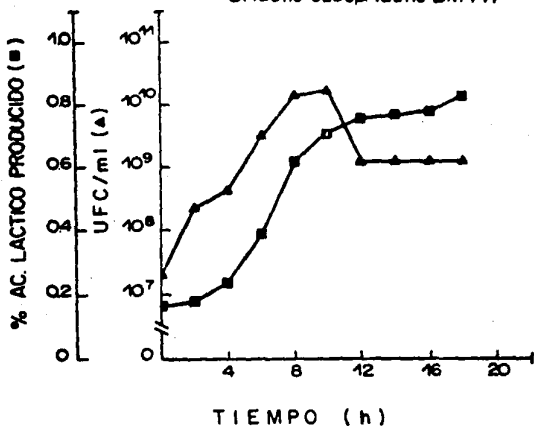
FIGURAS

- 1.- Cinéticas de Crecimiento y Producción de Acido Láctico (Laboratorio): BM 147 y BM 149
- 2.- Cinéticas de Crecimiento y Producción (Fermentador), con y sin control de pH: BM 147
- 3.- Cinéticas de Crecimiento y Producción (Fermentador), con y sin control de pH: BM 149
- 4.- Comportamiento de la actividad (%) durante el almacenamiento de los caldos de fermentación cosechados cada 2 h: BM 147 y BM 149
- 5.- pH durante el almacenamiento de los caldos de fermentación cosechados cada 2 h: BM 147 y BM 149
- 6.- Actividad (%) durante el almacenamiento de los caldos de fermentación. Cosecha: 4, 8 y 10 h/Almacenamiento: 0, 10 y 20 días. BM 147 y BM 149
- 7.- pH durante el almacenamiento de los caldos de fermentación. cosecha: 4, 8 y 10 h/Almacenamiento: 0, 10 y 20 días. BM 147 y BM 149
- 8.- UFC/ml durante el almacenamiento de los caldos de fermentación. cosecha: 4, 8 y 10 h/Almacenamiento: 0, 10 y 20 días. BM 147 y BM 149
- 9.- Perfil de Plásmidos de BM 147 y BM 149
- 10.- Perfil de Plásmidos de *S. lactis subsp. lactis* BM 147: dilución y lavado. Cosecha: 4, 8 y 10 h/Almacenamiento: 0, 10 y 20 días
- 11.- Perfil de Plásmidos de *S. lactis subsp. cremoris* BM 149: dilución y lavado. Cosecha: 4, 8 y 10 h/Almacenamiento: 0, 10 y 20 días
- 12.- Perfil de Plásmidos de *S. lactis subsp. lactis* BM 147 en Elliker modificado. Cosecha: 4, 8 y 10 h/Almacenamiento: 0, 10 y 20 días
- 13.- Perfil de Plásmidos de *S. lactis subsp. cremoris* BM 149 en Elliker modificado. Cosecha: 4, 8 y 10 h. Almacenamiento: 0, 10 y 20 días

CINETICAS DE CRECIMIENTO

(Laboratorio)

S. lactis subsp. *lactis* BM147



S. lactis subsp. *cremoris* BM149

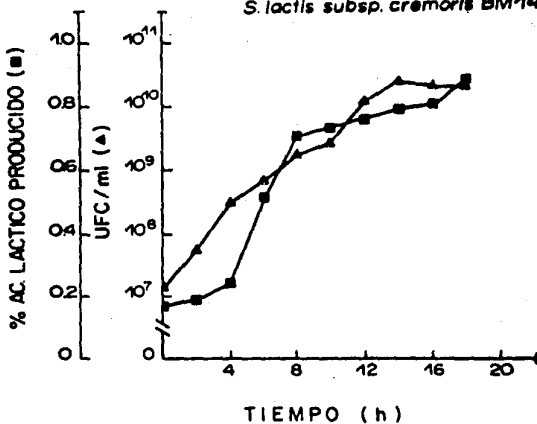


Figura 1.- Cinéticas de crecimiento y producción de ácido láctico a nivel laboratorio de las cepas BM 147 y BM 149.

CINETICA DE CRECIMIENTO

S. lactis subsp. *lactis* BM147 (fermentador)

(Sin control de pH)

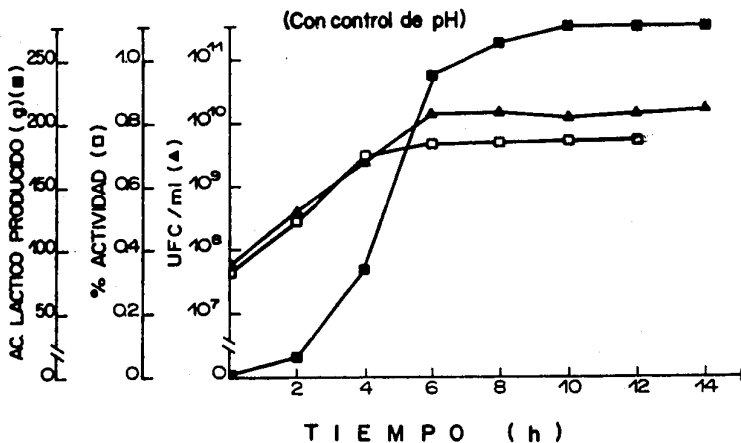
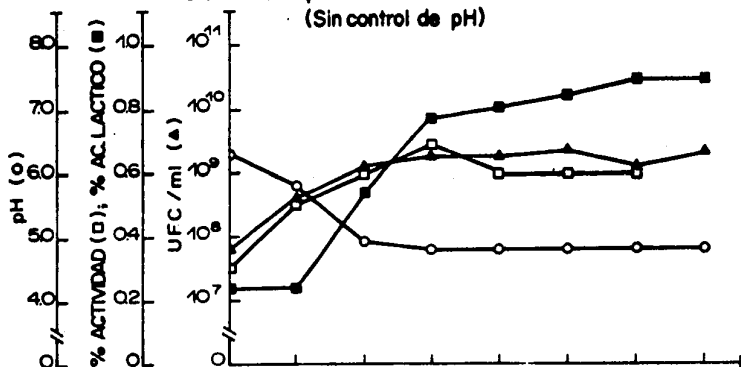


Figura 2.- Cinéticas de crecimiento y producción de ácido a nivel fermentador, con y sin control de pH para la cepa BM 147.

CINETICA DE CRECIMIENTO

S. lactis subsp. *cremoris* BM149 (fermentador)
(Sin control de pH)

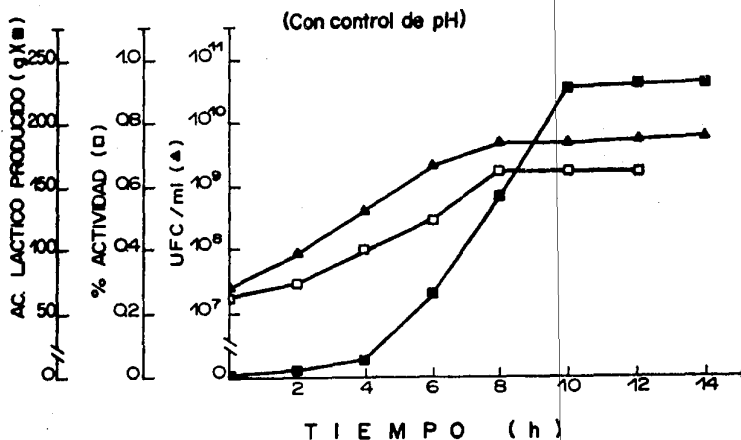
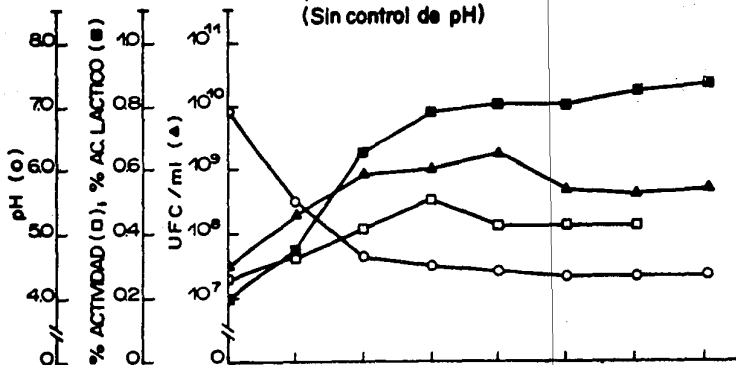
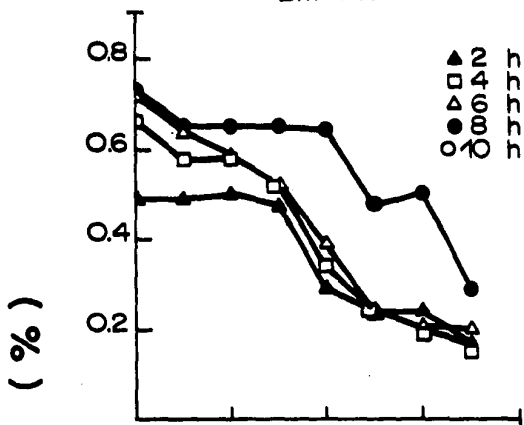
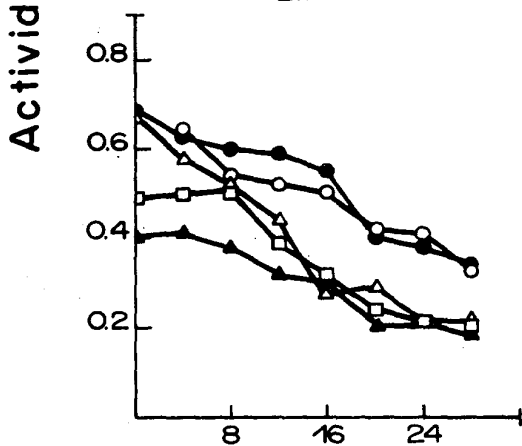


Figura 3.- Cinéticas de crecimiento y producción de ácido a nivel fermentador, con y sin control de pH para la cepa BM 149.

ALMACENAMIENTO *S. lactis* subsp. *lactis*
BM 147



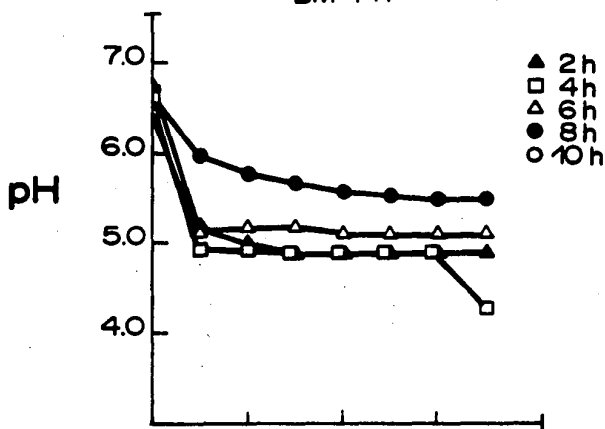
ALMACENAMIENTO *S. lactis* subsp. *cremoris*
BM 149



Días almacenamiento

Figura 4.- Comportamiento de la actividad durante el almacenamiento de los caldos de fermentación cosechados cada 2 h. Cepas BM 147 y BM 149.

ALMACENAMIENTO *S. lactis* subsp. *lactis*
BM 147



ALMACENAMIENTO *S. lactis* subsp. *cremoris*
BM 149

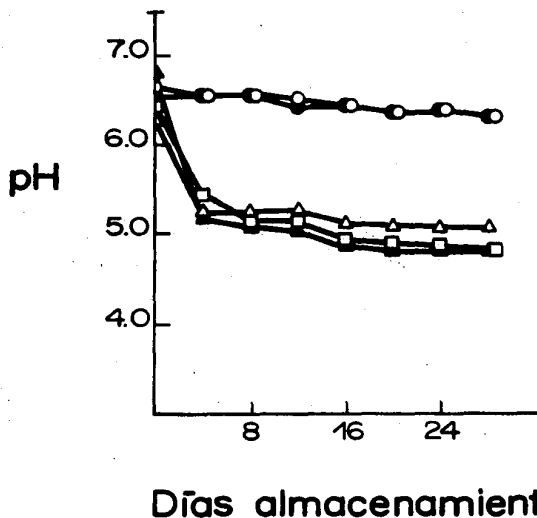


Figura 5.- Comportamiento del pH durante el almacenamiento de los caldos de fermentación cosechados cada 2 h. Cepas BM 147 y BM 149.

ALMACENAMIENTO *S. lactis* subsp. *lactis*
BM 147

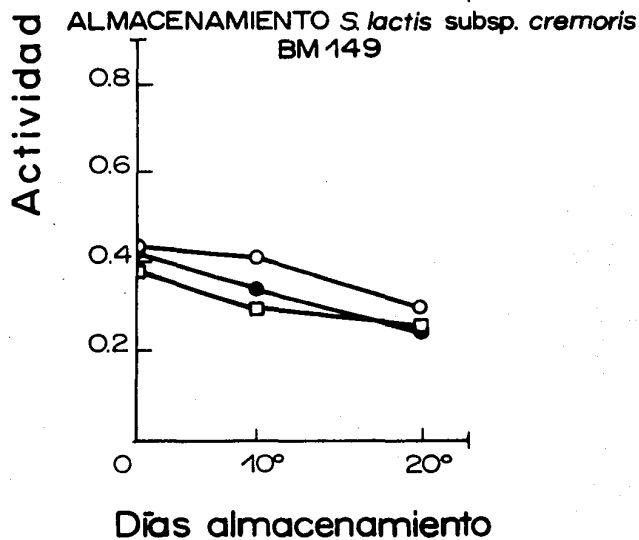
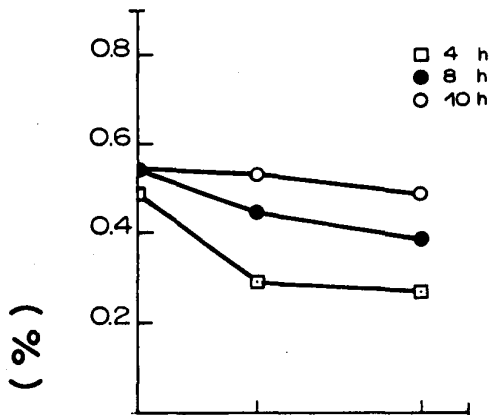
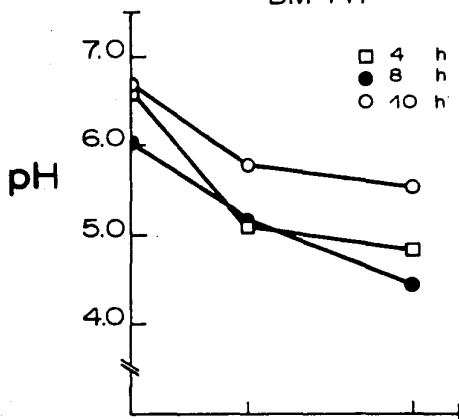
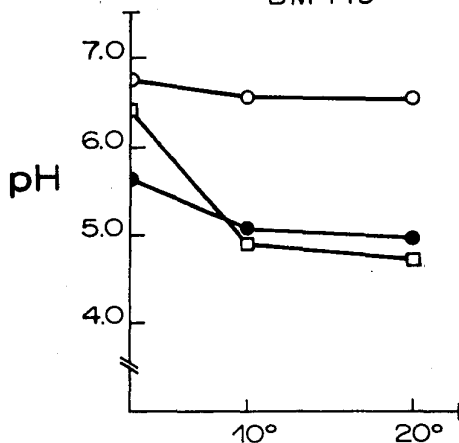


Figura 6.- Actividad durante el almacenamiento de los caldos de fermentación cosechados cada 2 h. Cepas BM 147 y BM 149, cosechados a las 4, 8 y 10 h.

ALMACENAMIENTO *S. lactis* subsp. *lactis*
BM 147



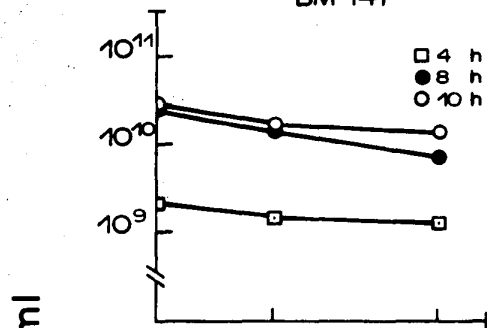
ALMACENAMIENTO *S. lactis* subsp. *cremoris*
BM 149



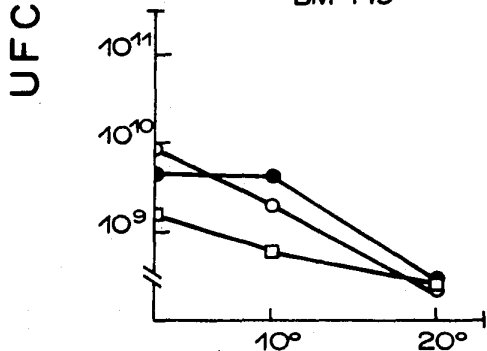
Días almacenamiento

Figura 7.- pH durante el almacenamiento de los caldos de fermentación de las cepas BM 147 y BM 149 cosechados a las 4, 8 y 10 h.

ALMACENAMIENTO *S. lactis* subsp. *lactis*
BM 147



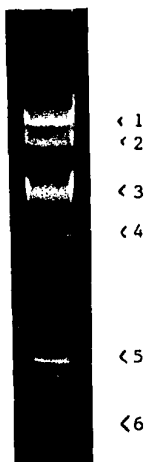
ALMACENAMIENTO *S. lactis* subsp. *cremoris*
BM 149



Días almacenamiento

Figura 8.- Viabilidad durante el almacenamiento de los caldos de fermentación de las cepas BM 147 y BM 149, cosechados a las 4, 8 y 10 h.

S. lactis subsp. *lactis* BM147



S. lactis subsp. *cremoris* BM149

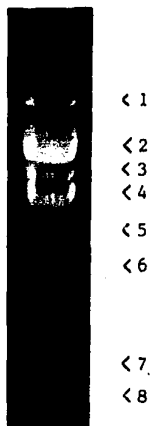


Figura 9.- Perfil de plásmidos de las cepas BM 147 y BM 149. Extracciones realizadas de acuerdo con el método de Anderson, 1983. Cepas subcultivadas 4h/32°C.

S. lactis subsp. *lactis* BM147

4 h 8 h 10 h
1° 10° 20° 1° 10° 20° 1° 10° 20°

hora de cosecha
día de almacenamiento

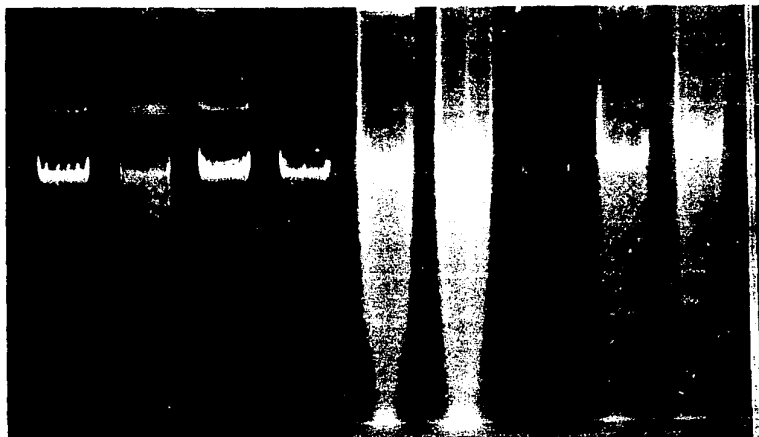


Figura 10.- Perfil de plásmidos durante el almacenamiento. Extracciones realizadas por dilución del caldo de fermentación y siguiendo el método modificado de Anderson como se especifica en materiales y métodos.

S. lactis subsp. cremoris BM149

4 h
1° 20°

8 h
1° 20°

10 h
1° 20°

hora de cosecha
día de almacenamiento

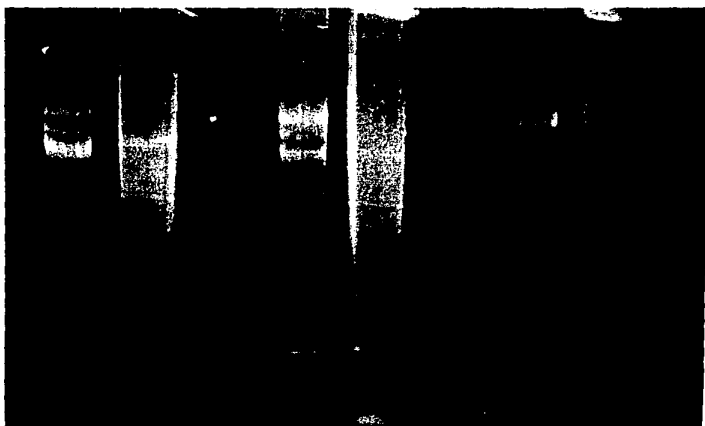


Figura 11.- Perfil de plásmidos durante el Almacenamiento. Extracciones realizadas por dilución del caldo de fermentación y como se especifica en materiales y métodos.

S. lactis subsp. cremoris BM149

4 8 10 4 8 10 4 8 10 día de almacenamiento
hora de cosecha

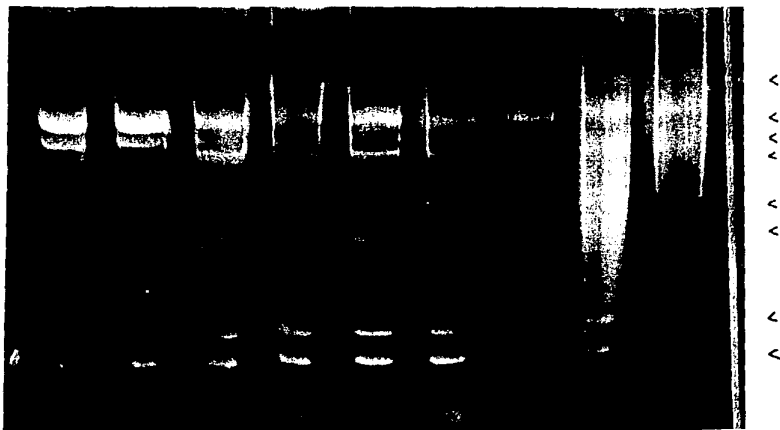


Figura 13.- Perfil de plásmidos durante el Almacenamiento. Extracciones realizadas a partir de subcultivos en Elikker modificado (4h/32°C).

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Adda, J., (1986), Flavour of Dairy Products, Developments in Food Flavours, Birch, G.G. y M.G. Lindley, eds., Elsevier Applied Science, U.K.
- Anderson, D.G., L.L. McKay, (1977), Plasmids, loss of lactose metabolism and appearance of partial and full lactose-fermenting revertants in *S. cremoris* B1, J. Bacteriol. 129:367 - 377.
- Anderson, D.G., L.L. McKay, (1983), Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic Streptococci, Appl. Microbiol. 46: 549 - 552.
- Andresen, V.A., (1984), Plasmid muster milchwirtschaftlich gewutzter starterkulturen, Milchwissenschaft 39: 140 - 143.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (1986), Gram-positive cocci, Sección 12, pp 999 - 1066, Sneath, P.H.A, ed., Williams & Wilkins, USA.
- Bibal, B., (1988), Influence of pH, lactose and lactic acid on the growth of *S. cremoris*: a kinetic study, Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 340 - 344.
- Bibal, B., (1989), Enhanced inhibitory effect of lactic acid on growth kinetics of *S. cremoris* during nutritional medium limitations, Appl. Microbiol. Biotechnol. 30: 630 - 635.
- Boquien, C., (1988), Effect of fermentation conditions on growth of *S. cremoris* AM2 and *L. lactis* CNRZ1091 in pure and mixed cultures, Appl. Environ. Microbiol. 54(10): 2527.
- Boquien, C., (1989), Enzymatic methods for determining populations of *S. cremoris* AM2 and *L. lactis* CNRZ1091 in pure and mixed cultures, Appl. Microbiol. Biotech. 30: 402 - 407.
- Buchman, G. W., (1988), Structure, expression and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic, J. Biol. Chem. 263(31): 16260 - 16266.
- Chavarri, F.J., M. de la Paz and M. Núñez, (1988), Optimization of fermentation parameters for the production of concentrated starters from Non bitter *S. lactis* INIA 12, J. Food Sci. 53(6): 1854 - 1857.
- Collins, E.B., (1955), Actions of bacteriophage on mixed strain cultures, Appl. Microbiol. 3:145.

- Cords, B.R., McKay, L.L. and Guerry, P., (1974), Extrachromosomal elements in group N Streptococci, *J. Bacteriol.* 117: 1149 - 1152.
- Cox, W.A. and Stanley, G., (1978), Starters: Purpose, production and problems, pp 279 - 296 in *Streptococci*, Skinner and Quesnel, eds., Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Series 7, Academic Press, U.K.
- Davies, F.L., Underwood, H.M. and Gasson, M.J., (1981), The value of plasmid profiles for strain identification in lactic streptococci and the relationship between *Streptococcus lactis* 712, ML3 and C2, *J. Appl. Bacteriol.* 51: 325.
- Davies, F.L., and Gasson, M.J., (1981), Reviews of the progress of dairy science, genetics of lactic acid bacteria, *J. Dairy Res* 48:363 - 376.
- Davies, F.L., and Gasson, M.J., (1984), Bacteriophages of dairy lactic acid bacteria, pp 127 - 151 in *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*, Chapter 5, Davies & Law, eds., Elsevier Appl. Sci., U.K.
- Dodd, Ch. E.R., (1988), Plasmid profiles as indicators of the source of contamination of *S. aureus* endemic within poultry processing plants, *Appl. Environ. Microbiol.* 54(6): 1541 - 1549.
- Efstathiou, J.D. and McKay, L.L., (1976), Plasmids in *S. lactis*: evidence that lactose metabolism and proteinase activity are plasmid linked, *Appl. Microbiol.* 32: 38 - 44.
- Enriquez F., M. L. y Pérez-Gavilán, P., (1989), Condiciones de producción de Iniciadores lácticos: *S. lactis subsp. lactis* BM 147 y *S. lactis subsp. cremoris* BM 149, III Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Soc. Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C., Monterrey, N.L., México.
- Exterkate, F.A., (1987), Optimal growth of *S. cremoris* HP in milk is related to B and K casein degradation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25(5): 471 - 475.
- Fenton, M.P., (1987), An investigation into the sources of lactic acid bacteria in grass silage, *J. Appl. Bacteriol.* 62(3): 181 - 188.
- Fuentes, F., (1987), Industrialización de la leche con *S. cremoris* y *S. lactis*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM, México.
- Gasson, M.J., (1982), Identification of the lactose plasmid in *S. lactis* 712, *Microbiology*, Pp217 - 220, D. Schlessinger, ed., American Soc. Microbiology, USA.

Gasson, M.J., (1983), Genetic transfer systems in lactic acid bacteria, Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol. 49: 275 - 282.

Gasson, M.J., (1984), Transfer of sucrose fermenting ability, nisin resistance and nisin production into *S. lactis* 712, FEMS Microbiol. Lett. 21: 7 - 10.

Gasson, M.J. y Davies, F.L., (1984), The Genetics of Dairy lactic-acid bacteria, pp 99 - 126 in Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk, Chapter 4, Davies & Law, eds., Elsevier Appl. Sci., U.K.

Gasson, M.J., (1986), Genetic Engineering: Techniques and potential, pp 145 - 220 in Developments in Food Microbiology - 2, Robinson, R. K., ed., Elsevier Appl. Sci., U.K.

Gasson, M.J., (1987), Molecular genetics of metabolic traits in lactic Streptococci, pp 242 - 245 in Streptococcal Genetics, Ferretti and Curtiss, eds., Am. Soc. for Microbiol, USA.

Gilliland, S.E., (1977), Preparation and Storage of concentrated cultures of lactic Streptococci, J. Dairy Sci. 60(5):805 - 809.

Gilliland, S.E., (1985), Concentrated starter cultures, pp 145 - 157 in Bacterial Starter Cultures for Foods, Chapter 11, Gilliland, S.E., ed., CRC Press, Inc., USA.

Gilliland, S.E., (1988), Influence of storage at freezing and subsequent refrigeration temperatures on β gal activity of *L. acidophilus*, Appl. Environ. Microbiol. 54(4): 898 - 902.

Goldhaber S., E., (1982), Tecnología para la producción y conservación de algunos microorganismos de interés lactológico, Tesis de Maestría, UIA, México.

Guerry, P., Leblanc, D.J., and Falkow, S., (1973), General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid, J. Bacteriol. 116: 1064 - 1066.

Hall, R.J., (1985), Increase in bulk starter capacity using multiple batching, N.Z.J. Dairy Sci. Technol. 20: 35 - 42.

Hall, R.J., (1985), Cheese Starters, Comprehensive Biotechnology, vol 3:507, M. Moo-Young, ed., Pergamon Press, U.K.

Harvey, R.J., (1965), Damage to *S. lactis* resulting from growth at low pH, J. Bacteriol. 90(5): 1330 - 1336.

Hunter, G.J.E., (1939), Examples of variation with pure cultures of *S. cremoris*, J. Dairy Res. 10: 464.

Inamine, J.M., (1986), Molecular and genetic characterization of lactose metabolic genes of *S. cremoris*, *J. Bacteriol.* 167(3):855 - 862.

Josephsen, J. and E. Waagner N., (1988), Plasmid profiles and bacteriophage sensitivity of bacteria of a cheddar starter used for five years without rotation, *Milchwissenschaft* 43(4): 219 - 223.

Kempler, G. M. and McKay, L.L., (1979), Characterization of plasmid DNA in *S. lactis* subsp. *diacetylactis*: evidence for plasmid-linked citrate utilization, *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 316 - 323.

Klaenhammer, T.R., McKay, L.L. and Baldwin, K.A., (1978), Improved lysis of group N *Streptococci* for isolation and rapid characterization of plasmid DNA, *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 592 - 600.

Kondo, J.K. and McKay, L.L., (1985), Gene transfer systems and molecular cloning in Group N *Streptococci*, *J. Dairy Sci.* 68:2143 - 2159.

Larsen, L.D. and McKay, L.L., (1978), Isolation and characterization of plasmid DNA in *S. cremoris*, *Appl. Environ. Microbiol.* 36:944 - 952.

Law, B.A., (1984), Flavour Development in cheeses, *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*, Chapter 7, Davies & Law, eds., Elsevier Appl. Sci., U.K.

Leblanc, D.J. and Lee, L.N., (1979), Rapid screening procedure for detection of plasmid in *Streptococci*, *J. Bacteriol.* 140(3):1112 - 1115.

Maeda, S. and Gasson M.J., (1986), Cloning, Expression and localization of the *S. lactis* gene for p- β -D galactosidase, *J. General Microbiol.* 132: 331 - 340.

Margalith, P.Z., (1981), *Flavour Microbiology: Dairy Products*, Thomas Publisher, USA.

McKay, L.L. and Baldwin, K.A., (1970), Mechanisms of lactose Utilization by lactic acid *Streptococci*: Enzymatic and genetic analyses, *J. Bacteriol.* 102: 804 - 809.

McKay, L.L., Baldwin, K.A. and Zottola, E.A., (1972), Loss of lactose metabolism in lactic *Streptococci*, *Appl. Microbiol.* 23: 1090 - 1096.

- McKay, L.L., Baldwin, K.A. and Efstathiou, J.E., (1976), Transductional evidence for plasmid linkage of lactose metabolism in *S. lactis* C2, Appl. Environ. Microbiol. 32: 45 - 52.
- McKay, L.L., (1982), Regulation of lactose metabolism in dairy streptococci, Developments in Food Microbiology, Chapter 5, Davies, R. ed., Appl. Sci. Publishers LTD., U.K.
- McKay, L.L., (1983), Functional Properties of plasmids in lactic Streptococci, Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol. 49: 259 - 274.
- Meyers, J.A. Sánchez, D., Elwell, L.P. and Falkow, S., (1976), Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid DNA, J. Bacteriol. 127: 1529 - 1537.
- Morlon-Guyot, J., (1989), Comunicación personal.
- Oberg, P.K. and Sandine, W.E., (1984), Microscale method for Rapid isolation of CCC plasmid DNA from *N* Streptococci, Appl. Environ. Microbiol. 47(4): 677 - 680.
- Oberg, P.K. and Richardson, G.H., (1986), Manufacture of Cheddar Cheese using proteinase-negative mutants of *S. cremoris*, J. Dairy Sci. 69: 2975 - 2981.
- Okulitch, O., (1936), Cheese ripening studies, Can. J. Res. Ser B. 14: 320.
- Okulitch, O., (1939), Microbic dissociation of lactic acid streptococci, Can. J. Res. Ser. B. 17:17.
- Olivares M. A., (1988), Conservación de pescado por fermentación ácido láctica, Tesis de licenciatura, Fac. de Química, UNAM, México.
- Pérez-Gavilán, J. y Pérez-Gavilán, J.P., (1984), Bioquímica y Microbiología de la leche, Editorial Limusa, México.
- Pérez-Gavilán A., M.E., (1985), Estudio de algunos factores determinantes en la aceptabilidad de productos lácteos, Tesis de licenciatura, Fac. de Química, UNAM, México.
- Powell, I.B., (1988), A simple and rapid method for genetic transformation of lactic Streptococci by Electroporation, Appl. Environ. Microbiol. 54(3):655.
- Reddy, M.S., (1972), Agar medium for Differential Enumeration of Lactic Streptococci, Appl. Microbiol. 24(6):947 - 952.

Reynoso B., J., (1981), Desarrollo y estandarización de una técnica para la producción de un queso semimadurado, utilizando diversos cultivos lácticos, Tesis de Licenciatura, UIA, México.

Richardson, G.H., Ernstrom, C.A., Kim, J.M. and Daly, C., (1983), Proteinase negative variants of *S. cremoris* for cheese starters, *J. Dairy Sci.* 66: 2278 - 86.

Sandine, W.E., (1985), The Streptococci: milk products, Bacterial Starter Cultures for Foods, Chapter 2, Gilliland, S.E., ed., CRC Press, Inc., USA.

Sellars, R.L., (1977), Bacterial starter cultures, Microbial Technology, Peppler, H.J., ed., Krieger Publ. Co., USA.

Sellars, R.L., (1985), Cultures for the manufacture of dairy products, Chr. Hansen's Laboratory, Inc., USA.

Sinha, R.P., (1989), A new simple method of curing plasmids in lactic Streptococci, *FEMS Microbiol. Lett.* 57: 349 - 352.

Smith, J.L., (1981), Microorganisms as food additives, *J. Food Protect.* 44(12): 936 - 955.

Steele, J.L. and McKay, L.L., (1986), Partial characterization of the genetic basis for sucrose metabolism and nisin production in *S. lactis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 51(1): 57 - 64.

Tamine, A.Y., (1983), Microbiology of starter cultures, Dairy Microbiology-2, Chapter 4, Robinson, R.K., ed., Applied Sci. Pub., U.K.

Teuber, M., (1987), Characterization of the microflora of high acid submerged vinegar fermenters by distinct plasmid profiles, *Biotechnol. Lett.* 9(4): 265 - 268.

Terrones M., M. E., (1989), Desarrollo y evaluación de una leche fermentada a partir de diferentes mezclas de iniciadores lácticos: *S. lactis*, *S. cremoris* y *L. cremoris*, Tesis de Licenciatura, UIA, México.

Tzeng, C.H., (1985), Application of starter cultures in the dairy industry, *Dev. Ind. Microbiol.* 26:323.

Vedamuthu, E.R., (1986), Involvement of a plasmid in production of ropiness in milk cultures by *S. cremoris* MS, *Appl. Environ. Microbiol.* 51(40):677 - 682.

Vegarud, G., (1983), Autolysis of Group N streptococci. Effects of media composition modifications and temperature, *J. Dairy Sci.* 66: 2294 - 2302.

Venema, G. and Kok, J., (1987), Improving dairy starter cultures, Trends Biotechnol. 5: 144 - 149.

Vos, W.M., (1986), Gene cloning in lactic Streptococci, Neth. Milk Dairy J. 40: 141 - 154.

Yawger, E.S., (1937), Variants of *S. lactis* which do not ferment lactose, J. Dairy Sci. 20: 83.

Yu, P.L., Appleby, R.D., Prichard, G.G. and Limsowtin, G.K.Y., (1989), Restriction mapping and localization of the lactose-metabolizing genes of *S. cremoris* pDI-21, Appl. Microbiol. Biotechnol. 30: 71 - 74.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**