

03072

14
20j

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIDAD ACADÉMICA
DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES



FACTORES GENÉTICOS RELACIONADOS CON LA EXPRESIÓN DEL
FENOTIPO MUCOIDE EN BACTERIAS LÁCTICAS UTILIZADAS
EN LA ELABORACIÓN DEL YOGHURT

TESIS

que para obtener el grado de
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA
presenta
LUIS ALBERTO SALCEDO BECERRA

Mexico, D.F.
1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



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.

"FACTORES GENETICOS RELACIONADOS CON LA EXPRESION DEL FENOTIPO MUCOIDE EN BACTERIAS LACTICAS UTILIZADAS EN LA ELABORACION DEL YOGHURT"

RESUMEN

La fermentación de la leche se ha empleado tradicionalmente como una forma de conservar este alimento. El yoghurt es la leche fermentada que ha presentado durante los últimos años el mayor incremento en su consumo a nivel mundial, y por lo cual se ha investigado desde diversos puntos de vista como son: Características reológicas, microestructura y microbiología.

El yoghurt es producido en leche empleando como cultivo iniciador *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, en una proporción de 1:1. Anteriormente se ha reportado que algunas cepas de estas bacterias lácticas, producen polisacáridos exocelulares, a lo cual se le denomina como el fenotipo mucoso o filante. Esta característica mejora la textura y apariencia del producto, evitando el desuerado.

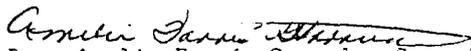
El objetivo de este proyecto de investigación fué el de iniciar el estudio de los factores genéticos relacionados con la producción de polisacáridos exocelulares en las bacterias del yoghurt.

Se ha logrado diferenciar la morfología colonial entre cepas mucoides y no mucoides de ambas especies bacterianas, mediante el crecimiento de las bacterias en medio sólido MRS adicionado con Lactosa 20g/L y Rojo Neutro 24 mg/L. La cuantificación en la producción del polisacárido exocelular se llevó a cabo por dos diferentes métodos, dependiendo éste de las características propias de las cepas. Con base en los resultados obtenidos por extracción de plásmidos de las distintas cepas empleadas, se

determinó que las cepas mucoides en ambas especies no presentan plásmidos. La cepa no mucóide de *Streptococcus thermophilus* ST 233 presenta un plásmido de 3.66 Kb, y la cepa no mucóide de *Lactobacillus bulgaricus* EM B 13 presenta dos plásmidos de 1.77 y 3.71 Kb. Estos resultados hacen suponer que esta característica no se encuentra codificada por lo menos en plásmidos pequeños.

También, se comprobó mediante experimentos de curación que los plásmidos presentes en cepas no productoras no codifican algún mecanismo regulatorio de la producción de polisacáridos exocelulares, por lo que se considera que los plásmidos encontrados en estas cepas son crípticos.

Vo.Bo. Asesora del proyecto


Dra. Amelia Farrés-González Saravia
Investigadora Titular A
Fac. de Química, UNAM

INDICE

	Página
CAPITULO I. Leches Fermentadas	1
a) Leches fermentadas tipo I	2
b) Leches fermentadas tipo II	3
c) Leches fermentadas tipo III	4
d) Leches fermentadas tipo IV	5
 CAPITULO II. Yoghurt	 8
 CAPITULO III. Bacterias Lácticas	 12
 CAPITULO IV. Bacterias del Yoghurt	 20
 CAPITULO V. Producción de Polisacáridos Exocelulares	 25
 CAPITULO VI. Estabilidad e Inestabilidad Genéticas de los Microorganismos	 31
 CAPITULO VII. Hipótesis	 35
Objetivos	35
a) General	35
b) Particulares	35
 CAPITULO VIII. Material y Método	 36
a) Cepas de bacterias	36
b) Condiciones de crecimiento en medio líquido	37
c) Condiciones de esterilización	37
d) Condiciones de crecimiento en medio sólido	37
e) Determinación de la capacidad de fermentar carbohidratos	 38
f) Determinación de la producción de polisacáridos exocelulares	 38
g) Extracción de plásmidos de bacterias lácticas	38
h) Purificación de plásmidos	40
i) Procedimientos de Curación	40
I) Métodos físicos	41
1) Temperatura	41
2) Electroporación	41
II) Métodos químicos	41
j) Extracción de plásmidos de <i>Escherichia coli</i> BHB 2800	 42
k) Transformación de la cepa de <i>Streptococcus thermophilus</i> NCFB 859	 43
 CAPITULO IX. Resultados y Discusión	 45
 CAPITULO X. Conclusiones y Perspectivas	 65
 CAPITULO XI. Apéndices	 69
 CAPITULO XII. Bibliografía	 73

CAPITULO I

Leches Fermentadas

El inicio de la agricultura permitió al hombre establecerse y al mismo tiempo facilitó la domesticación de diversos animales de los cuales se han obtenido tradicionalmente diferentes tipos de alimentos como la leche. La leche es producto del metabolismo de los mamíferos y es empleada en la alimentación de las crías, por lo tanto en el interior de los organismos se encuentra estéril. Una vez en el exterior del cuerpo del animal, por sus mismas características fisicoquímicas, es un sustrato altamente nutritivo, en donde proliferan una gran cantidad de microorganismos (Green y Manning, 1982).

En diferentes países se ha optado por la fermentación de la leche en forma tradicional, para poder conservarla durante más tiempo, lo que implica el crecimiento de diversos microorganismos bajo condiciones controladas. Este procedimiento permite mantenerla en buen estado durante varios días sin que pierda su calidad nutritiva, e inclusive la mejora y a su vez pueden desarrollarse nuevas características organolépticas. En algunos países se prefieren las leches fermentadas con respecto a la leche fresca, debido a sus características de sabor, aroma, apariencia o textura, y en vista de que se consideran más seguras desde el punto de vista microbiológico, ya que en los alimentos fermentados es difícil que se presente el crecimiento de microorganismos patógenos. Sin embargo existen lugares en donde los problemas de contaminación originados por el transporte, pasteurización y refrigeración inadecuados de los alimentos, representan un problema de salud pública aún en alimentos fermentados (Kroger et al, 1989).

En diversas partes del mundo cambia el tipo de leches fermentadas que se consumen en forma tradicional, y dependen de los tipos de microorganismos empleados, así como del procedimiento de elaboración. Las principales regiones en donde se consumen las leches fermentadas como parte de la dieta normal son los países de Oriente, Oriente medio, y en la Península Escandinava. Un ejemplo de esto es Bulgaria, en donde se ha reportado un consumo de 31.5 Kg de estos alimentos por persona en un año, mientras que para Estados Unidos es de solamente una décima parte (Kroger et al, 1989; Marshall, 1984).

Las características de los quesos y leches fermentadas que se producen a nivel mundial dependen del estado mismo de la leche, así como de la concentración, composición y características de sus componentes (Green y Manning, 1982).

No existe una clasificación adecuada con respecto a las leches fermentadas debido a la diversidad de inóculos y procedimientos de elaboración de las mismas, sin embargo éstas pueden dividirse en cuatro categorías principales, al considerar las especies microbianas predominantes de la flora durante la fermentación (Marshall, 1984).

Los tipos de leches fermentadas y los géneros de microorganismos predominantes en ellas (Marshall, 1984), se muestran en la tabla 1.

Tipo de Leche Fermentada	Géneros microbianos relacionados
Tipo I	<i>Streptococcus</i> sp. y <i>Leuconostoc</i> sp.
Tipo II	<i>Lactobacillus</i> sp.
Tipo III	<i>Streptococcus</i> sp. y <i>Lactobacillus</i> sp.
Tipo IV	<i>Streptococcus</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp. y levaduras.

TABLA 1. Tipos de leches fermentadas con respecto a los géneros de microorganismos empleados en su producción.

A continuación se describen los diferentes tipos de leches fermentadas, así como ejemplos característicos de cada una de ellas, como han sido descrito por diversos autores (Marshall, 1984).

a) Leches fermentadas de Tipo I.

En este tipo de fermentación predominan las especies de *Streptococcus* sp., pero es importante la contribución de *Leuconostoc* sp.

i) "Buttermilk" cultivada.

Este producto se obtiene al fermentar crema batida con *Streptococcus cremoris* o *Streptococcus lactis* junto con *Leuconostoc cremoris* a 22°C durante 14-16 horas, hasta obtener una acidez titulable de 0.7 a 0.9% o un pH de 4.5-4.6. Su sabor característico lo proporcionan el ácido láctico y el diacetilo. Este alimento se consume en forma de bebida de manera tradicional en Irlanda y en Estados Unidos.

ii) "Buttermilk" Escandinava.

Dentro de este nombre se agrupan diversos alimentos lácteos fermentados. Se consumen principalmente en Noruega y Suecia en donde reciben el nombre de Filmjolk, Lattfil y Langfil; de éstas

la primera representa el mayor consumo, que corresponde al 68 % del total. En Suecia este tipo de alimentos representan un consumo de 17.2 Kg/persona/año, y la mayoría de ellas se consumen en lugar de leche fresca. En general, este tipo de leches fermentadas presentan un 3 % de grasas y su apariencia es cremosa, con buena consistencia y aroma agradable. Durante la fermentación se emplea *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis* y *Leuconostoc cremoris*, los cuales se incuban a 18-20°C hasta obtener un pH de 4.2-4.6. El aroma es proporcionado por el acetaldehído y el diacetilo, y su principal característica organoléptica es su alta viscosidad, que es debida a la producción de polisacáridos generados por las mismas bacterias iniciadoras.

iii) Ymer.

Este producto es el equivalente danés del Filmjolk, y es producido por la fermentación de la leche con *Streptococcus cremoris* y *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis*. Contiene 3 % de grasas y 11 % de sólidos totales. El aroma es producido por el diacetilo y acetaldehído, y presenta un pH de 4.4-4.6. En Islandia desde el siglo X se consume un producto similar denominado Skyr.

iv) Viili.

También denominado como "buttermilk" finlandés, es similar a los anteriores pero se considera de calidad superior, debido a que en la superficie del alimento ya fermentado crece el hongo filamentoso *Geotrichum candidum* el cual forma una capa granulosa blanca, que le proporciona un aroma de humedad muy característico. El sabor es muy parecido al Filmjolk escandinavo, y se menciona que el crecimiento del hongo promueve el desarrollo del aroma, y al mismo tiempo previene la oxidación en el alimento. Una característica importante en esta leche fermentada, es su alta viscosidad, generada por el crecimiento de microorganismos capsulados. Se considera que las cápsulas están formadas por polisacáridos, y pueden perderse por efecto de un ataque de bacteriófagos en las bacterias, lo que hace que el producto pierda su calidad (Saxelin et al, 1979). También se ha descrito una fracción proteínica con respecto a la viscosidad producida, particularmente en *Streptococcus cremoris* (Sundman, 1953).

b) Leches fermentadas de Tipo II.

Este tipo de leches fermentadas se consideran como producto del crecimiento de diferentes especies del género *Lactobacillus*.

1) "Buttermilk" Búlgara.

Existe poca información acerca de ella, pero se sabe que se produce al fermentar leche entera pasteurizada, con *Lactobacillus*

bulgaricus a 40-42°C durante la noche, y se obtiene un producto muy ácido, con sabor y aroma parecidos al del yoghurt debido a la alta producción de acetaldehído, aparentemente como una consecuencia del metabolismo celular de la treonina.

ii) Leche acidófila.

En la fermentación se utiliza *Lactobacillus acidophilus*, pues se considera que es benéfico para la salud, por el hecho de haber sido aislado del tracto digestivo como parte de la flora normal, sin embargo por esto mismo su crecimiento en leche es lento, y el producto que se obtiene presenta un sabor y una consistencia pobres, debido a la escasa generación de compuestos propios del metabolismo. Con *Lactobacillus acidophilus* puede obtenerse una leche fermentada con buena consistencia pero aroma pobre, cuando se agrega extracto de levadura a la leche. Por otra parte, puede emplearse un cultivo iniciador mixto de *Lactobacillus acidophilus* junto con *Bifidobacterium* sp. y otros iniciadores lácteos en la producción de alimentos infantiles, con el fin de promover el establecimiento de la flora intestinal normal en niños.

iii) Yakult.

Este es un producto desarrollado por el Instituto Central Yakult para la Investigación Microbiológica de Japón, en el que se emplean cepas de *Lactobacillus casei* junto con *Bifidobacterium* sp. en la fermentación de leche descremada, y al cual se agregan también azúcar o jarabe de maíz. Se fermenta el producto hasta obtener un cierto nivel de acidez, y se adicionan frutas y esencias para obtener el sabor deseado. Los principales metabolitos microbianos que se encuentran en el Yakult son los ácidos acético, cítrico, succínico y málico, junto con el acetaldehído, diacetilo y acetoina. En otro tipo de leches fermentadas en las que se emplea *Lactobacillus casei*, se puede mejorar el aroma cuando se agrega piruvato al medio de crecimiento.

c) Leches fermentadas de Tipo III.

En este tipo de fermentación se emplean diversas especies de los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus*.

i) Yoghurt.

Es la leche fermentada más ampliamente distribuida y estudiada a nivel mundial. Se produce comercialmente con un cultivo iniciador de *Streptococcus thermophilus* (nuevo nombre *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*), y *Lactobacillus bulgaricus* (nuevo nombre *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) (Sneath et al, 1986), en una proporción 1:1, presenta un pH final de 4.0 a 4.4 y su sabor es muy característico,

debido a los productos del metabolismo de las dos bacterias, principalmente el acetaldehído, la acetofina y el diacetilo. La relación que existe entre los microorganismos ha sido estudiada desde distintos puntos de vista, y se ha encontrado que existe una interacción entre ambas bacterias, la cual puede considerarse como de sinergismo. En el yoghurt pueden encontrarse diversos compuestos volátiles que le proporcionan su aroma característico como son el acetaldehído, diacetilo, acetofina y 2-butanona, y se considera que el primero es el principal constituyente del aroma.

Existen diferencias en el sabor y aroma del yoghurt que dependen del país en que se produce, causado por el proceso mismo de producción, el tipo de cepas iniciadoras, e inclusive el tipo de leche que se emplea.

Cuando se concentra el yoghurt, lo cual puede realizarse por diferentes procedimientos, entonces recibe el nombre de Labneh, el cual tiene una gran importancia en el Medio Este, en donde se han estudiado ampliamente los factores relacionados con su producción (Tamime y Robinson, 1978), al igual que lo relacionado con su valor nutricional, sensorial y microbiológico (Kalab et al, 1975; Rao et al, 1987). Este producto presenta una gran diversidad con respecto a sus características, las cuales dependen de las condiciones de elaboración del yoghurt original. Así, se ha encontrado que algunos procedimientos como la pasteurización o ultrapasteurización, pueden afectar la textura del mismo, al cambiar las propiedades de gelatinización del yoghurt por causa de la alteración que sufren las micelas de caseína (Dagher y Ali, 1985; Mottar et al, 1989; Parnell-Clunies et al, 1988), y también se ve afectado el producto por el medio de crecimiento de los microorganismos (Mottar et al, 1989), por procesos físicos como la centrifugación, y por la presencia de aditivos que son agregados como espesantes (Dagher y Ali, 1985).

ii) Dahi.

Este producto es el equivalente hindú del yoghurt, sin embargo no se produce comercialmente a gran escala, y su microbiología es extremadamente variable, por lo que también lo son su apariencia y sabor. Generalmente se produce con bacterias de los géneros *Lactobacillus bulgaricus* y/o *Lactobacillus plantarum*, junto con *Streptococcus thermophilus* y/o *Streptococcus lactis*. El inóculo es de aproximadamente el 20 % y la incubación dura de 1 a 3 horas, y en consecuencia el pH que se alcanza es muy alto. Si se utiliza como iniciador *Lactobacillus plantarum*, el cual es un microorganismo con un metabolismo heterofermentativo, además del ácido láctico puede producirse ácido acético.

d) Leches fermentadas de Tipo IV.

Son productos de gran interés, debido a la compleja mezcla de poblaciones microbianas que intervienen en su producción.

1) Kefir.

Esta es una leche fermentada de tipo alcohólica proveniente de la región del Cáucaso, en donde se consume en una proporción de 4.5 Kg/persona/año. Como cultivo iniciador se utilizan granos de kefir que están formados por partículas de leche asociadas con diferentes bacterias y con levaduras, las cuales producen etanol como metabolito final. La concentración de alcohol puede variar debido a las condiciones de fermentación, pero se considera que el producto típico contiene 1 % de alcohol. La fermentación se inicia al agregar granos de kefir a leche entera tratada, la cual se calienta a 95oC durante 10 minutos, y se incuba a 25oC durante 1 o 2 días, después de lo cual se madura por 1-3 días a 10oC. Las levaduras que han sido identificadas son *Saccharomyces delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus*, *Candida (Torula) kefir*, y *Candida pseudotropicalis*. Con respecto a las bacterias lácticas que se han encontrado pueden mencionarse *Lactobacillus caucasicus*, *Lactobacillus kefir*, y *Lactobacillus acidophilus*. En la matriz del grano de kefir se ha encontrado un polisacárido fibrilar compuesto de glucosa y galactosa al cual se le ha llamado kefirano, y también se han aislado las bacterias capaces de producirlo (Yokoi et al, 1990). A pesar de que esta leche fermentada ha sido estudiada desde diversos puntos de vista, no se conoce aún el mecanismo de formación del grano de kefir. De acuerdo con estudios de microscopía electrónica se sabe que la parte externa del grano de kefir está colonizada principalmente por bacterias y algunas levaduras, mientras que en la parte central se localizan pocas células microbianas. El grano por sí mismo presenta una estructura esponjosa fibrilar con una matriz lamelar reticulada y una masa fibrosa, la cual presenta ramificaciones e interconexiones por medio de cordones alargados de polímeros (Botazzi y Bianchi, 1980).

ii) Laban.

Es una leche fermentada de Líbano, en donde también se realiza una fermentación alcohólica. Los microorganismos que se han encontrado durante la fermentación son *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Leuconostoc lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluveromyces fragilis*. El aroma es producido por el diacetilo y el acetaldehído. El pH es de 4.25 y *Saccharomyces cerevisiae* produce una concentración final de alcohol de 1.25%. La leche se inocula a 50oC con *Streptococcus thermophilus* como cultivo iniciador al 2.5 a 3% (V/V), seguido por la inoculación con *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, y finalmente se enfría a 20-22oC para propiciar el crecimiento de las levaduras.

iii) Koumiss.

Se consume principalmente en la URSS a partir de leche de cabra o de vaca, y se fortifica al mismo tiempo con proteínas de suero de leche con el fin de prevenir la sinéresis o desuerado.

Su característica más sobresaliente es la alta concentración de etanol y de CO₂, contiene aproximadamente 3 % de etanol. La fermentación se realiza al emplear un cultivo iniciador mixto formado por los microorganismos *Lactobacillus bulgaricus* y *Candida (Torula) kefir*.

iv) Gari.

Es un producto fermentado de yuca característico de la parte oriental de Europa que ha sido llevada a Africa, en donde se ha descrito que el cultivo iniciador presenta células de distintas cepas de *Streptococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp., *Saccharomyces* sp., e inclusive *Geotrichum candidum* (Ofuya y Nnajiolor, 1989).

CAPITULO II

Yoghurt.

El yoghurt es un producto lácteo fermentado que ocupa un lugar importante dentro de la industria de alimentos. En los últimos 50 años se ha observado un marcado aumento en el consumo de este producto tanto a nivel nacional como mundial, principalmente en los países occidentales, en donde ahora se considera como parte de la dieta normal debido a que se le ha relacionado como un producto cuyo consumo es saludable. Sin embargo, la alta proporción en el consumo de yoghurt en las regiones de Oriente medio y Escandinavia, está relacionada más con una ingesta tradicional que como un cambio de actitud con respecto a los alimentos (Kroger et al, 1989; Marshall, 1984).

El yoghurt es el único producto de leche fermentado descrito en el cual se menciona el tipo de microorganismos que deben emplearse en el cultivo iniciador para ser considerado como tal. De esta manera se considera que la fermentación debe realizarse con las bacterias *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, empleadas ambas como inóculo al 0.5-1.0 %, con una proporción de 1 a 1 en el número de bacterias entre ambas especies (Kroger, 1989).

Con respecto a las propias bacterias del yoghurt, se han realizado diferentes estudios, principalmente relacionados con el comportamiento de estas bacterias durante la fermentación de la leche (Larsen y Añón, 1989)

Al principio de la fermentación, *Streptococcus thermophilus* crece rápidamente y es el principal responsable en la producción de ácido láctico. Al mismo tiempo, *Lactobacillus bulgaricus* crece lentamente pero produce una gran cantidad de acetaldehído, acetoina y diacetilo, compuestos que proporcionan el sabor y aroma característicos del yoghurt. El diacetilo es el principal compuesto que proporciona el aroma, y se ha encontrado un punto óptimo cuando se tienen valores entre 23 y 41 partes por millón (ppm). En diferentes estudios se ha encontrado que *Streptococcus thermophilus* produce en cultivo simple 4 ppm de acetaldehído, mientras que *Lactobacillus bulgaricus* produce 10 ppm; sin embargo cuando se encuentran en cultivo mixto entre ambas especies se pueden producir 23 ppm de este compuesto. Del mismo modo, cuando se emplean altas concentraciones de treonina y bajas concentraciones de glicina en el medio, se aumenta la síntesis de acetaldehído tanto en una bacteria como en la otra (Marranzini et al, 1989).

Se han realizado diferentes observaciones en las que se nota que el crecimiento de *Streptococcus thermophilus* es inhibido a un pH de 4.2 o 4.4, mientras que *Lactobacillus bulgaricus* puede tolerar rangos de pH de 3.5 a 3.8, por lo tanto al final de la fermentación *Streptococcus thermophilus* crece muy lentamente

mientras que *Lactobacillus bulgaricus* lo hace de manera acelerada, y como resultado de esto se tiene que la proporción de bacterias continua siendo la misma al cabo de tres horas de fermentación. Al mismo tiempo, se ha reportado que se requiere que el yoghurt tenga una cierta viscosidad, generada por el crecimiento de las bacterias mismas, que emplean diferentes carbohidratos en su desarrollo (Keating y White, 1990).

El crecimiento sinérgico de ambas bacterias parece relacionarse con una simbiosis, en donde *Lactobacillus bulgaricus* proporciona aminoácidos esenciales y péptidos a la otra bacteria al liberarlos al medio, mientras que *Streptococcus thermophilus* produce ácido fórmico junto con CO_2 , el cual estimula la producción de ácido en *Lactobacillus bulgaricus* (Rajagopal y Sandine, 1990).

La producción de ácido láctico mantiene al yoghurt sin contaminarse, inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos, y proporciona al mismo tiempo importantes características de digestibilidad y asimilación para el organismo humano (Gilliland, 1990).

Se ha encontrado que el empleo de sacarosa 15 % durante la incubación y almacenamiento del yoghurt inhibe la proteólisis y la producción de ácido láctico, lo cual depende principalmente del cultivo iniciador empleado (Slocum et al, 1988).

El yoghurt siempre se ha reconocido como un alimento saludable. Elie Metchnikoff (1845-1916), científico ruso ganador del premio Nobel de Medicina en 1908, trabajó en el Instituto Pasteur de París y a través de su libro "The prolongation of life" (Metchnikoff, 1906), promovió a las leches fermentadas a nivel de probióticos, y desarrolló una teoría en la cual las bacterias lácticas del tracto digestivo, podían prolongar la vida previniendo la putrefacción (Kroger et al, 1989).

Actualmente se han reportado una serie de ventajas nutricionales y de salud, relacionadas con el consumo de leches fermentadas. Dentro de las ventajas del consumo del yoghurt, pueden mencionarse las siguientes:

a) Mayor biodisponibilidad de minerales, principalmente el hierro (Gilliland, 1990).

b) En estudios realizados "in vitro", la mayoría de las bacterias lácticas ejercen una acción antagonista contra diferentes patógenos, aunque existen también estudios en donde se indica que no existe ningún efecto directo en infecciones intestinales (Gilliland, 1990).

El mecanismo por el cual pueden inhibirse patógenos intestinales aún no es muy claro, y aparentemente parece estar relacionado en primer término con la producción de acidez en el medio, y posteriormente a la presencia de sustancias parecidas a

antibióticos o bacteriocinas como la nisina, acidolina, acidofilina o lactocidina (Gilliland, 1990).

La acción antagonista de las bacterias del yoghurt contra patógenos se presenta en el alimento, pero no en el tracto digestivo, debido a su incapacidad para permanecer en él, puesto que no son resistentes a las sales biliares. Sin embargo, algunos compuestos excretados por estas bacterias permiten la implantación de otras bacterias lácticas como *Lactobacillus* sp. y *Bifidobacterium* sp. en el intestino como parte de la flora normal, por lo que podrían ser consideradas como probióticos (Gilliland, 1990).

c) En algunos individuos se presenta la deficiencia de la enzima β -galactosidasa o lactasa, la cual hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa. El consumo de alimentos producidos a base de leche en estos individuos, genera malestar estomacal, flatulencia y diarrea, y es lo que se conoce como intolerancia o mala absorción de la lactosa. Las bacterias del yoghurt hidrolizan la lactosa durante la fermentación láctica, antes de que sea consumido por personas intolerantes a ella, lo que evita consecuentemente el malestar. Al mismo tiempo, al tener la glucosa y la galactosa un mayor poder edulcorante con respecto a la lactosa, el alimento fermentado es más dulce que la leche fresca, sin aumentar el valor calórico de la misma (Gilliland, 1990).

Aparentemente, la lactosa del yoghurt está relacionada con la utilización de minerales en el humano, ya que se ha encontrado una mayor absorción de calcio, magnesio y zinc (Behling y Greger, 1990).

d) Se ha reportado una posible relación entre el consumo de yoghurt y un efecto antitumoral, principalmente en el colon. Este efecto se ha sugerido que puede relacionarse con diversas substancias o compuestos asociados a la pared celular, producidos por los microorganismos durante su crecimiento (Gilliland, 1990).

El efecto anteriormente descrito no puede explicarse por la permanencia de bacterias del yoghurt en el tracto digestivo, ya que estudios realizados sobre la adhesión de estas bacterias en células de estómago e intestinal, demuestran que *Lactobacillus bulgaricus* se une en mayor proporción que *Streptococcus thermophilus*, y sin embargo la adhesión es muy limitada y no parece ser específica (Conway et al, 1987), a diferencia de otras bacterias lácticas que sí pueden adherirse al intestino en el hombre, como *Lactobacillus acidophilus* (Speck, 1975), y

e) Se ha descrito que los niveles de colesterol pueden ser influenciados por la flora intestinal, la cual interfiere con su absorción. Este efecto puede deberse al hidroximetil glutarato como factor activo, el cual también se ha pensado que inhibe la

síntesis de colesterol en el cuerpo humano. Del mismo modo, se ha reportado que los iones calcio del yoghurt pueden tener un efecto en la acción hipocolesterolemica (Gilliland, 1990).

El efecto de disminución en el colesterol plasmático, puede deberse a lo siguiente: Para que una bacteria pueda implantarse en el intestino, es necesario que presente una alta actividad hidrolítica de las sales biliares, con el fin de evitar el daño que puedan surtir las mismas sobre los microorganismos. Si se requiere colesterol como precursor de las sales biliares, entonces puede pensarse que con una alta actividad enzimática, se elimina una elevada proporción de sales biliares, las cuales deben ser reemplazadas con el colesterol sanguíneo, y esto tiene como consecuencia la disminución de sus niveles en el torrente sanguíneo (Gilliland, 1990).

Características del yoghurt con respecto a la viscosidad.

Las características del yoghurt dependen de las condiciones mismas de la leche empleada como medio de cultivo, así como de las características propias de las bacterias empleadas en la fermentación (Green y maning, 1982). De esta manera, si se desea un yoghurt con alta viscosidad, se tiene un efecto similar cuando se emplea leche con un alto contenido de sólidos, que cuando se emplean cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, capaces de producir polisacáridos exocelulares, los cuales se unen a la matriz de proteína del sistema y evitan la sinéresis o desuerado (Schellhass y Morris, 1985). Esta condición puede romperse por efecto de la agitación, al cambiar las características reológicas del yoghurt (Teggatz y Morris, 1990).

CAPITULO III.

Bacterias Lácticas

1) Características generales y clasificación. . .

La característica principal de las bacterias lácticas es la capacidad de utilizar como fuente de carbono la lactosa presente en la leche, y obtener como producto del metabolismo el ácido láctico, del cual deriva su nombre. Se reconocen como parte de este grupo géneros de bacterias que no están relacionados filogenéticamente (Ludwig et al, 1985), pertenecientes a tres familias bacterianas: Streptococcaceae, Micrococcaceae y Lactobacillaceae.

Dentro de la familia Streptococcaceae se reconocen los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*, con distintas especies en cada uno de ellos. El grupo N de Lancefield del género *Streptococcus*, actualmente se considera como un género distinto, nombrado como *Lactococcus* (Sneath et al, 1986). El nombre *Lactococcus* aún no se acepta formalmente, pero ya se ha utilizado en la literatura con el fin de designar a las bacterias lácticas de este grupo, diferenciándolas de los grupos serológicos de *Streptococcus* restantes. Este género está representado por una especie, y dos subespecies, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, y la variedad *diacetylactis* dentro del género *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Anteriormente estas especies se denominaron como *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* y *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis*, respectivamente. Dentro del género *Streptococcus* se consideran también como parte del grupo de bacterias lácticas, especies de bacterias que habitan en la cavidad bucal como *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus thermophilus* (Sneath et al, 1986).

Dentro de el género *Leuconostoc* se encuentran seis especies, y en el género *Pediococcus* se han descrito cinco especies (Moat, 1985).

La familia Micrococcaceae, está representada en el grupo de bacterias lácticas por el género *Micrococcus*, con diferentes especies (Moat, 1985).

La familia Lactobacillaceae, está a su vez representada por 27 especies todas ellas dentro del género *Lactobacillus* (Moat, 1985; Sneath et al, 1986).

2) Características de las bacterias lácticas durante la fermentación.

Debido a que las bacterias lácticas son utilizadas tradicionalmente desde hace mucho tiempo en la elaboración de alimentos, y que por sus mismas características pueden ser empleadas sin ningun problema en otros campos, se han realizado

una gran cantidad de estudios y descubrimientos con respecto a ellas (Gibbs, 1987).

Con el objeto de entender la fisiología y genética de las bacterias lácticas, se han realizado diversos estudios con diferentes enfoques. Así, se han evaluado diferentes características dentro de las que destacan las siguientes:

a) Procesos de conservación.

Dentro de estos procesos se ha encontrado que la sacarosa 0.29 M, el adonitol 0.75 M y el glicerol 0.75 M, pueden servir como crioprotectores durante la liofilización de las cepas (Alaeddinoglu et al, 1989), y también se ha encontrado que la refrigeración y la congelación de cepas tienen efecto sobre la actividad de la β -galactosidasa en *Lactobacillus acidophilus* (Gilliland y Lara, 1988).

b) Fermentación ácido láctica.

Durante la fermentación ácido láctica, se han reportado las condiciones óptimas de producción de iniciadores lácticos, como en *Streptococcus lactis* INIA 12 (Chavarri et al, 1988), se ha descrito el efecto de las condiciones de fermentación en el crecimiento de *Streptococcus cremoris* AM2 y *Leuconostoc lactis* CNRZ 1091, en cultivo puro y mezclado (Boquien et al, 1988), y se han utilizado medios alternativos, como el suero de leche, para el cultivo de bacterias lácticas mesófilas (Christopherson y Zottola, 1989).

También se ha encontrado que el ácido láctico tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de *Streptococcus cremoris* bajo condiciones limitantes de nutrientes (Bibal et al, 1989), la aeración durante la fermentación tiene un efecto limitante sobre los metabolitos finales formados a partir de glucosa y galactosa en *Streptococcus lactis* (Cogan et al, 1989), y la inmovilización de cultivos de *Streptococcus lactis* en geles de alginato, confiere protección contra el ataque de bacteriófagos (Steenson et al, 1987).

Por otra parte, se han buscado características y homologías entre diferentes cepas de *Lactobacillus* aisladas del intestino de diversos mamíferos (Axelsson y Lindgren, 1987).

c) Obtención de nutrientes.

Con respecto a la obtención de nutrientes del medio extracelular, se ha comprobado que la captura de aminoácidos básicos así como de dipéptidos, se realiza por medio de vesículas de membrana en *Streptococcus lactis* y emplea un sistema simportador de energía acoplado a una fuerza motriz de protones (Driessen et al, 1989; Smid et al, 1989), al igual que en *Lactobacillus casei* (Strobel et al, 1989).

d) Codificación de características en el genoma.

En vista de que las bacterias lácticas son microorganismos con importancia en la producción de alimentos, se ha tratado de estudiar con detalle las características de su genoma, con el fin de mejorar las funciones catalíticas de las bacterias, obtener material genético que codifique para productos de interés, y por último introducir y expresar genes heterólogos (Batt, 1986).

1) A nivel cromosomal.

Se conocen algunas características de las bacterias lácticas, que están codificadas en el cromosoma. Así, se ha encontrado que la codificación de una peptidasa se encuentra a nivel cromosomal en *Streptococcus lactis* SSL135 (Tynkkynen et al, 1989).

2) A nivel extracromosomal.

En general, se han encontrado elementos extracromosomales o plásmidos en la mayoría de las bacterias lácticas, los cuales pueden codificar para características conocidas, y algunos permanecen como crípticos, es decir que se desconocen las características que son codificadas por ellos (Cords et al, 1974). Por ejemplo, se considera que el 90 % de las cepas de *Lactobacillus lactis*, contienen plásmidos crípticos, y se ha encontrado que son al menos seis diferentes (Casey y Jimeno, 1989).

Los patrones plasmídicos obtenidos de las bacterias lácticas, principalmente los *Streptococcus* del grupo N de Lancefield, se han utilizado como un sistema de identificación de estas especies bacterianas (Davies et al, 1981), y también con este objetivo se han utilizado los perfiles electroforéticos de la deshidrogenasa láctica dependiente de NAD⁺ (Dicks y van Vuuren, 1990).

Las características que se han encontrado codificadas en plásmidos están relacionadas principalmente con lo siguiente:

- Metabolismo de lactosa, y Actividad ureasa (Kempler y McKay, 1979a; Maeda y Gasson, 1986; Steele et al, 1989b)
- Actividad de proteasas (Hugenholtz et al, 1987; Kiwaki et al, 1989)
- Utilización del citrato (Kempler y McKay, 1979b)
- Producción de diacetilo (Gasson et al, 1987)
- Producción y resistencia a bacteriocinas (Gonzalez y Kunka, 1987; Muriana y Klaenhammer, 1987; Scherwitz y McKay, 1987; van Belkum et al, 1989).
- Producción de polisacáridos exocelulares (Vedamuthu y Neville, 1986; Vecovo et al, 1987; y von Wright y Tynkkynen, 1987).

Como ejemplo de lo anterior se tiene que el metabolismo de lactosa y de la actividad proteinasa en *Streptococcus lactis* M18, C10 y ML3, se encuentran relacionadas con plásmidos de 18-22 MDA y de 8-10 MDA respectivamente (Efstathiou y McKay, 1976), mientras que en *Streptococcus cremoris*, puede encontrarse en el plásmido pDI-21 de 63 Kb (Yu et al, 1989).

La producción de la bacteriocina denominada bulgaricano de *Lactobacillus bulgaricus* (Abdel-Bar et al, 1987), y la Lactocina S, relacionada con el plásmido pCIM1 (50Kb), de *Lactobacillus sake* L45 (Mortvedt y Nee, 1990).

Otra característica que puede relacionarse con plásmidos es la resistencia que se ejerce contra bacteriófagos por diferentes mecanismos, en *Streptococcus lactis* KR5 y otras cepas (Froseth et al, 1988; Hill et al, 1989a; Hill et al, 1989b; McKay et al, 1989), en *Streptococcus cremoris* (Gautier y Chopin, 1987; Josephsen y Vogensen, 1989), o en ambas bacterias (Jarvis, 1988; Jarvis, 1989; Steele et al, 1989a).

Con base en lo anterior, se ha visto que algunos productos de interés así como parte de sus vías metabólicas, se encuentran codificadas en plásmidos. La pérdida de estos plásmidos en las bacterias resulta en una concomitante pérdida de los productos, haciendo inestable la generación de ellos. Entre los compuestos codificados en plásmidos cuya producción es inestable, se encuentran la Enzima II y el Factor III del sistema de transporte de lactosa de fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato (PTS-PEP), así como la enzima fosfo- β -galactosidasa (P- β -gal) en *Streptococcus lactis* C2 y 11454, *Streptococcus cremoris* B1, y *Lactobacillus casei* 64H y 69H (Gasson y Davies, 1984; Lee et al, 1982). Las tres enzimas de la vía D-tagatosa-6-P (galactosa-6-P-isomerasa, D-tagatosa-6-P y tagatosa-1,6-difosfato aldolasa), en las cepas de *Streptococcus lactis* C10, H1 y 133 (Gasson y Davies, 1984), así como el metabolismo de la lactosa en *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis* WM4 (Gasson y Davies, 1984).

No sólo el metabolismo de la lactosa se ha relacionado con plásmidos, sino que también se ha asociado a éstos la codificación del metabolismo de otros carbohidratos como glucosa, galactosa, manosa y xilosa en diferentes géneros de bacterias lácticas (Kondo, 1989), sacarosa en *Streptococcus lactis* (Gasson y Davies, 1984), rafinosa en *Pediococcus pentosaceus* y sacarosa en *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 (Gonzalez y Kunka, 1987).

Por otra parte se ha encontrado la codificación en plásmidos de la actividad proteinasa en *Streptococcus lactis* 712, C10, ML3 y M18, en *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis* DRC1 y en *Streptococcus cremoris* KH (Gasson y Davies, 1984; Kamaly y Marth, 1988; Maeda y Gasson, 1988). Así mismo, se ha encontrado que en *Streptococcus cremoris* Wg2 y SK11, se encuentra localizada en plásmidos la codificación de una proteasa de maduración, y aquí mismo se han localizado secuencias de inserción a los lados de

estos genes, que pueden explicar de alguna manera su inestabilidad (Haandrikman et al, 1990).

El transporte de citrato también se ha encontrado codificado en plásmidos en diferentes cepas de *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis* (Gasson y Davies, 1984; Kempler y McKay, 1979).

También se sabe que la producción y resistencia de péptidos con actividad antimicrobiana o bacteriocinas se codifican en plásmidos. Entre las bacteriocinas se encuentran la nisina, diplococcina, acidofilina, lactocidina y pediocina. La codificación plasmídica de estas bacteriocinas está bien documentada y se piensa que está ampliamente distribuida en las bacterias lácticas (Gasson y Davies, 1984; Muriana y Klaenhammer, 1987). Actualmente se considera una práctica común el empleo de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias lácticas como conservadores en alimentos (Daeschel, 1989).

e) Ingeniería genética aplicada a las bacterias lácticas.

Las herramientas moleculares que proporciona la Ingeniería Genética permiten pensar en el mejoramiento genético de los iniciadores lácticos empleados a nivel industrial. Es por esto que se ha avanzado en el estudio y caracterización del material genético de este tipo de bacterias (Huggins, 1984; Sandine, 1987), a distintos niveles como son:

1) Vehículos moleculares o vectores.

En el género *Lactobacillus* se han localizado plásmidos pequeños que pueden ser utilizados como vectores de clonación. Así, se ha descrito la organización estructural de diferentes plásmidos crípticos como posibles vehículos moleculares, tales como el pLP1 de *Lactobacillus plantarum* (Bouia et al, 1989; Skaugen et al, 1989), el cual ya se ha caracterizado, clonado, y se conoce su distribución en bacterias lácticas (Bringel et al, 1989). Los plásmidos pLAB1000 y pLAB2000 de *Lactobacillus hilgardii* (Josson et al, 1989), y el plásmido pLJ1 de *Lactobacillus helveticus* ssp. *jugurti* (Takiguchi et al, 1989), Así como el plásmido pIP501, que ha sido utilizado como vehículo molecular entre *Streptococcus lactis* y *Lactobacillus bulgaricus* (Langella y Chopin, 1989).

2) Caracterización de promotores.

Se han localizado, aislado y caracterizado promotores específicos en *Streptococcus cremoris* Wg2, empleando para ello el gen de la acetiltransferasa de cloranfenicol, y se ha encontrado que son similares a los que se encuentran en *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* (van der Vossen et al, 1987), se ha caracterizado el promotor de un plásmido críptico de *Lactobacillus acidophilus* 168S (Damiani et al, 1987), y se ha caracterizado un promotor del fago temperado BK5-T de *Streptococcus cremoris* BK5 (Lakshmi Devi et al, 1990).

3) Caracterización de genes específicos.

Se han identificado y clonado las determinantes genéticas de resistencia a eritromicina codificadas en plásmidos de *Lactobacillus reuteri* (Axelsson et al, 1988), así como la comparación molecular de bacteriófagos del género *Streptococcus* (Powell et al, 1989). También se ha secuenciado la enzima P- β -galactosidasa de *Lactobacillus casei* (Porter y Chassy, 1988), y la β -galactosidasa de *Lactobacillus bulgaricus* (Schmidt et al, 1989a).

4) Transferencia de información genética en las bacterias lácticas.

Con relación a los procesos de transferencia de información genética, se ha encontrado que existen factores que determinan la eficiencia de cada uno de los distintos sistemas, y se ha encontrado que existen diferencias importantes entre estos sistemas (Luchansky et al, 1989).

Por conjugación se ha logrado transferir los mecanismos de sensibilidad reducida a bacteriófagos, la capacidad de fermentar sacarosa y lactosa en *Streptococcus lactis* y *Streptococcus cremoris* (Murphy et al, 1988), la resistencia a antibióticos entre especies de los géneros *Leuconostoc* sp. y *Streptococcus* sp. (Pucci et al, 1988), y los genes de resistencia y producción de nisina de *Streptococcus lactis* 7962 a *Leuconostoc dextranicum* 181 (Tsai y Sandine, 1987)

Asi mismo, se ha logrado transferir por conjugación plásmidos de *Streptococcus* del grupo B, y comovilizar plásmidos de *Streptococcus-Escherichia coli*, en *Lactobacillus plantarum* (Shrago y Dobrogosz, 1988). También, se ha logrado la transferencia de cointegrados de los plásmidos pVA797::pSA3, entre *Streptococcus lactis* y *Lactobacillus helveticus* (Thompson y Collins, 1989), y se ha descrito que la movilización conjugativa requiere de una enzima de recombinación de plásmido (pre) (van der Lelie et al, 1990)

Ya que las bacterias lácticas son microorganismos en los cuales no puede introducirse fácilmente material genético, se han desarrollado métodos para obtener altas eficiencias de introducción. Un ejemplo de lo anterior es el desarrollo de un método de transformación de esferoplastos de *Streptococcus thermophilus* al emplear Polietilenglicol (PEG) durante la transformación, aumentando la eficiencia al parecer debido a un efecto de union del material genético con la superficie celular, y en el cual se utiliza rafinosa junto con cloruro de calcio o de magnesio como agentes osmoprotectores. La eficiencia encontrada con este método es de 7.5×10^4 transformantes/ μ g de DNA encapsulado en liposomas (Mercenier et al, 1988). Por otra parte, se han descrito los efectos que presentan los sistemas de Restricción/Modificación en la transferencia de DNA en

Streptococcus lactis, en donde se ha descrito que el DNA que penetra a la célula puede ser degradado por estos sistemas de protección (Langella y Chopin, 1989).

Por comparación de métodos de transferencia de información genética, al emplear esferoplastos de *Lactobacillus plantarum* se tiene una eficiencia de 20-100 transformantes/ μ g de DNA, mientras que al emplear la electroporación pueden obtenerse 6.44×10^4 / μ g de DNA (Badii et al, 1989).

Se ha reportado anteriormente que existen proteasas que determinan la eficiencia en procesos de transfección y transformación de protoplastos en *Streptococcus lactis*, en donde al emplear quimotripsina o mutanolisina en la formación de los protoplastos pueden lograrse eficiencias de 10^4 - 10^5 transfectantes/ μ g de DNA y 5 transformantes en protoplastos de *Streptococcus cremoris* LS224/ μ g de DNA, sin embargo al emplear lizozima, no se encuentra un efecto directo en la cepa (Woskow y Kondo, 1987).

Por otra parte, se ha logrado introducir por transducción los genes responsables del metabolismo de lactosa en *Streptococcus lactis* C2 mediante la utilización del fago c2 (McKay, 1973).

En bacterias lácticas ya se ha demostrado que la electroporación es una metodología que permite obtener una alta eficiencia de transformación (Chassy et al, 1988; Batt, 1986). Así, se ha logrado la transformación de *Streptococcus thermophilus* con los plásmidos pVA736 (7.6 Kb), pAM β 1 (26.5Kb) y pIP501 (30.7Kb) con eficiencias de 10^3 - 10^4 transformantes/ μ g de DNA (Somkuti y Steinberg, 1988), y en *Streptococcus cremoris* y *Streptococcus lactis*, con eficiencias de 10^4 y 10^5 transformantes/ μ g de DNA (Powell et al, 1988). Al emplear junto con este método, un medio estabilizado osmóticamente con glicina, glicerol 10% y sacarosa 0.5M, se obtienen eficiencias de transformación por electroporación de *Streptococcus cremoris*, de 5.7×10^7 transformantes/ μ g de DNA (Holo y Nes, 1989), y en *Streptococcus lactis* de 10^5 transformantes/ μ g de DNA (McIntyre y Harlander, 1989a; McIntyre y Harlander, 1989b). El primer reporte encontrado para la transformación por electroporación de *Lactobacillus lactis* W597 es muy reciente (Zink et al, 1991).

5) Clonación de genes relacionados con bacterias lácticas.

Se ha logrado clonar genes de importancia provenientes de bacterias lácticas en otros microorganismos. Así, se ha clonado el gen de la α -acetolactato descarboxilasa de *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis* DSM20348 en *Escherichia coli* 5F8 por transformación con el plásmido pADC1 (Goelling y Stahl, 1988), el gen de la β -galactosidasa termoestable de *Streptococcus thermophilus* en *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (Lee et al, 1990), el gen responsable de la fermentación maloláctica de *Lactobacillus delbrueckii* en *Escherichia coli* y en

Saccharomyces cerevisiae (Williams et al, 1984), y el sistema de transporte de lactosa de *Streptococcus thermophilus* en *Escherichia coli* (Poolman et al. 1989). Los genes de la histidina descarboxilasa A y B de *Lactobacillus* 30A en *Escherichia coli* (Copeland et al, 1989), así como los genes de la L-2-hidroxiisocaproato deshidrogenasa de *Lactobacillus confusus* y la D-2-hidroxiisocaproato deshidrogenasa de *Lactobacillus casei* en *Escherichia coli* (Lerch et al, 1989a; Lerch et al, 1989b).

Debido a que las bacterias lácticas son consideradas como microorganismos GRAS (generalmente reconocidas como seguras), se piensa en ellas como microorganismos en los cuales puede introducirse información genética relacionada con la producción de algún metabolito de interés (Kondo, 1989; Kondo y McKay, 1985). De esta manera, se han clonado y expresado eficientemente genes heterólogos de importancia como la lisozima de clara de huevo en *Streptococcus cremoris* Wg2 (van de Guchte et al, 1989). También se ha logrado la clonación, expresión y mantenimiento en forma estable del gen de la endoglucanasa termestable de *Clostridium thermocellum* en *Lactobacillus plantarum* (Bates et al, 1989). El gen *lacZ* de *Escherichia coli* en *Lactobacillus plantarum* (David et al, 1989; de Vos et al, 1989a). Los genes que codifican para diversas enzimas como celulasas y xilanasas (Scheirlink et al, 1990), y α -amilasas y endoglucanasas en *Lactobacillus plantarum* (Scheirlink et al, 1989).

También, se han clonado y expresado genes provenientes de bacterias lácticas, en bacterias de este mismo tipo. Ejemplos de esto son: El gen de la serin proteasa extracelular de *Streptococcus cremoris* clonado en *Streptococcus lactis* 712 (de Vos et al, 1989b), y el gen que confiere resistencia a nisina en *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis* DRC3, el cual fué clonado en *Streptococcus lactis* LM0230 (Froseth et al, 1988).

Cuando se obtiene la inserción y amplificación de genes foráneos en el cromosoma de bacterias lácticas, se permite al mismo tiempo la estabilización de la característica, como se ha demostrado en *Streptococcus lactis* (Chopin et al, 1989; Ross et al, 1989), en *Streptococcus lactis* MG1363 (Leenhouts et al, 1989; Leenhouts et al, 1990), y en *Streptococcus lactis* C2 (McKay y Baldwin, 1978).

CAPITULO IV

Bacterias del yoghurt.

a) Morfología y metabolismo.

Como se ha mencionado anteriormente, en la elaboración del yoghurt se emplean dos especies de bacterias, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* (Kroger, 1989).

Streptococcus thermophilus se caracteriza por presentar células esféricas u ovoides de 0.7 a 0.9 μ m de diámetro, no móviles, que se encuentran asociadas en pares o en cadenas de células. Puede utilizar la glucosa, fructosa, lactosa y sacarosa como fuente de carbono, y generar ácido a partir de ellas. Es homofermentativa, y produce principalmente ácido láctico a partir de la degradación de la lactosa, empleando la fracción de glucosa, y expulsando la galactosa que no puede metabolizar al medio. Es una bacteria termófila que presenta una temperatura óptima de crecimiento entre 45 y 55°C. (Buchanan y Gibbons, 1974; Sneath et al, 1986).

Lactobacillus bulgaricus posee una forma de bacilos cortos y no es móvil. Como fuente de carbono puede utilizar la glucosa, lactosa, fructosa y galactosa. Es homofermentativa y forma ácido láctico a partir de lactosa. Generalmente utiliza el 85 % de la glucosa en la producción de ácido. También es termófila y presenta una temperatura óptima de crecimiento entre 45o y 55oC (Buchanan y Gibbons, 1974; Sneath et al, 1986).

Ambas especies bacterianas son gram-positivas y presentan el mismo tipo de metabolismo de la leche. La lactosa del medio pasa al interior de la célula por medio de permeasas (Hickey et al, 1986), en donde es hidrolizada por la enzima β -galactosidasa o lactasa, a glucosa y galactosa. En *Lactobacillus bulgaricus* si la concentración de lactosa en el medio es baja, la galactosa es fosforilada por la galactocinasa y se metaboliza a través de la vía de Leloir. *Streptococcus thermophilus* no puede metabolizar la galactosa ya que carece de las enzimas necesarias para ello, se excreta de la célula, y por lo tanto se acumula galactosa en el medio durante la fermentación (Hutkins et al, 1985). La glucosa en ambas especies bacterianas es metabolizada a través de la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP), con un paso final de conversión de piruvato a lactato (Marshall y Law, 1984).

b) Fisiología y genética de las bacterias del yoghurt.

Se han realizado diversos estudios con respecto a las bacterias del yoghurt, principalmente relacionados con las características que se mencionan a continuación:

1) Métodos de conservación.

La liofilización como método de conservación en estas bacterias es un proceso que permite la supervivencia de una gran parte de células de *Streptococcus thermophilus* mag₁ que de *Lactobacillus bulgaricus*, y se ha encontrado que la presencia de microorganismos muertos protege a los viables, al eliminar en ellos el efecto negativo de la atmósfera (Bozoglu et al, 1987). En este mismo sentido se ha descrito que la trehalosa puede actuar como un crioprotector en *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842 (De Antoni et al, 1989).

La conservación adecuada de las bacterias del yoghurt permite mantener la homogeneidad durante los procesos de producción, y al mismo tiempo, garantiza la calidad del producto durante la fermentación.

2) Fermentación ácido láctica.

Se han realizado estudios sobre la cinética de crecimiento en cultivos simples y mezclados de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, y se han desarrollado medios efectivos de diferenciación (Berkman et al, 1990). También se ha encontrado que durante una fermentación, se presentan diferencias en la utilización de azúcares y en la producción de ácido por parte de las bacterias, cuando se emplean células libres o inmovilizadas en k-carragenina. Este efecto parece deberse principalmente al diámetro de la esfera, particularmente para *Lactobacillus bulgaricus* (Audet et al, 1989). Cuando se emplean geles de k-carragenina y otras gomas, la fermentación láctica realizada por *Streptococcus thermophilus* puede desestabilizar el gel, el cual llega a romperse por efecto del ácido producido (Arnaud et al, 1989). También se sabe que el pH y la temperatura influyen en el crecimiento de *Streptococcus thermophilus* 404 y *Lactobacillus bulgaricus* 398 encontrándose que los niveles óptimos para éstas son de 6.5 a 40°C y 5.8 a 44°C, respectivamente (Beal et al, 1989), y ya se ha realizado completamente el modelamiento de la fermentación semicontinua al emplear suero de leche como medio de cultivo para *Lactobacillus bulgaricus* (Sanchez-Podlech et al, 1990).

Existen factores que afectan la producción de aminas en *Lactobacillus bulgaricus* (Chander et al, 1989), y de esta manera se sabe que la glicina presenta un efecto inhibitorio en la actividad de la treonina aldolasa, la cual es importante en la producción de diacetilo, importante metabolito que proporciona el aroma, tanto para *Lactobacillus bulgaricus* como para *Streptococcus thermophilus* (Schmidt et al, 1989b).

Ya que la presencia de bacteriófagos durante una fermentación puede impedir la producción del yoghurt o algún otro producto lácteo, se han buscado y caracterizado virus que infectan a estas bacterias en particular, como el bacteriófago ch2 aislado de *Lactobacillus bulgaricus* CH2 (Chow et al, 1988).

3) Caracterización de actividades enzimáticas.

Se sabe que *Lactobacillus* presenta un sistema proteolítico muy complejo. A nivel fisiológico, se ha trabajado en la obtención y caracterización de mutantes de *Lactobacillus bulgaricus* deficientes en aminopeptidasas como la arginil aminopeptidasa I y II, Leucil aminopeptidasa, y la X- prolil-dipeptidil aminopeptidasa (Atlan et al, 1989), al igual que en la cepa de *Lactobacillus bulgaricus* CNRZ 397 (Atlan et al, 1990).

4) Características del genoma.

Se conoce muy poco sobre las características del genoma en las bacterias del yoghurt. Lo que más se ha estudiado en este aspecto es el transporte y utilización de carbohidratos. Se sabe que tanto en *Streptococcus thermophilus* como en *Lactobacillus bulgaricus*, los genes responsables del transporte y metabolismo de la lactosa se encuentran localizados en el cromosoma y que pueden estar organizados en operones (Poolman et al, 1989), con respecto a esto se sabe que las regiones *lacZ* entre *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* presentan 48 % de homología, y la enzima β -galactosidasa presenta un peso molecular de 116,860 Da, similar en ambas bacterias (Schroeder et al, 1991).

También se ha reportado la obtención de secuencias específicas de DNA para las bacterias *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus lactis*, que pueden ser utilizadas como sondas de reconocimiento (Delley et al. 1990).

5) Características de plásmidos.

Existen reportes que indican la presencia y ausencia de plásmidos de tamaño pequeño para ambas bacterias. Sólo en *Streptococcus thermophilus* se ha demostrado en forma concluyente la presencia de plásmidos. Somkuti y Steinberg en 1989, después de un análisis de 35 cepas diferentes de esta bacteria, encontraron plásmidos en trece de ellas, tres cepas con dos plásmidos y en las diez restantes sólo un plásmido. De acuerdo a patrones generados con endonucleasas de restricción, de los plásmidos encontrados en estas cepas, se consideró que existían 9 plásmidos distintos, con al menos dos sitios únicos de restricción. Los tamaños de estos plásmidos varían entre 2.2 y 14.75 Kb (Tabla 2).

Herman y McKay en 1985 examinaron 23 cepas de *Streptococcus thermophilus*, y encontraron que solamente cinco cepas presentaban un plásmido. De acuerdo con lo anterior, concluyeron que aparentemente existen de tres a cinco plásmidos diferentes entre las distintas cepas de *Streptococcus thermophilus*, sin embargo permanecen como plásmidos crípticos ya que no se les ha podido relacionar con ninguna característica morfológica o fisiológica, incluyendo la capacidad de fermentar carbohidratos, la resistencia a antibióticos o la actividad de ureasa y proteasa (Tabla 2).

Por otra parte, despues de un análisis de hibridación DNA-DNA con plásmidos de *Streptococcus thermophilus*, se encontró una alta homología entre estos plásmidos, pero no con plásmidos de bacterias lácticas mesófilas, lo que indica que existe un origen distinto para los plásmidos de bacterias lácticas termófilas y mesófilas (Somkuti y Steinberg, 1991).

Plásmidos	Peso molecular		No. de copia	Cepas
	MDa	Kb		
(Somkuti y Steinberg, 1986)				
pER8	1.4	2.2	4-6	ST101,ST108,ST119 ST120,ST121
pER371	1.75	2.7	8-10	ST137,ST138
pER341	1.8	2.77	10-12	ST134
pER36	2.4	3.7	6-8	ST136
pER13	2.75	4.23	10	ST113
pER16	2.9	4.46	8-10	ST107,ST116,ST126
pER342	6.2	9.54	8-10	ST134
pER35	7.15	11.0	?	ST135
pER372	9.58	14.75	?	ST137,ST138
(Herman y McKay, 1985)				
pHM1	1.43	2.2	4-18	
pHM2	2.06	3.2	4-18	
pHM3	2.27	3.5	4-18	
pHM4	2.06	3.2	4-18	
pHM5	1.43	2.2	4-18	

TABLA 2. Plásmidos de *Streptococcus thermophilus*.

Por otra parte, para el género *Lactobacillus bulgaricus* existen dos reportes en donde se menciona la presencia de plásmidos. El primero es un reporte de Somkuti y Steinberg en 1986, en el que se menciona la presencia de dos plásmidos en una cepa de esta especie bacteriana, lo cual ha sido puesto en duda por B. Chassy (comunicación personal, 1990). Por otra parte, existe un reporte de Chagnaud y colaboradores en 1990, en el que se describe el empleo de un plásmido críptico de la cepa de *Lactobacillus bulgaricus* 10, descrita también en la colección ATCC, denominado pLB10, como un posible vehículo molecular para el género *Lactobacillus* en general. En todos los demás reportes que implicaron una búsqueda de plásmidos en *Lactobacillus bulgaricus*, los resultados indican que en esta especie bacteriana no se encuentran plásmidos.

Con respecto a otras especies del género *Lactobacillus*, si se han encontrado plasmidos en la mayoría de ellas (Gasson y Davies, 1984).

6) Bacteriófagos de bacterias del yoghurt. --

Los bacteriófagos que infectan a las diferentes cepas de *Streptococcus thermophilus* pertenecen principalmente al grupo B de Bradley, con cabezas isométricas y un tamaño de 50-70 nm de diámetro, mientras que los bacteriófagos de *Lactobacillus bulgaricus* pertenecen al grupo A de Bradley, con cabezas isométricas y un tamaño de 44-55 nm de diámetro (Davies y Gasson, 1984)

CAPITULO V

Producción de polisacáridos exocelulares.

Actualmente se conoce que distintas especies bacterianas producen polisacáridos exocelulares bajo ciertas condiciones de cultivo. Estos polisacáridos toman la forma de cápsulas discretas, o bien pueden estar libres y unidos por enlaces débiles a la superficie celular, y como consecuencia en el medio de cultivo se forma una red entre las partículas en suspensión y los polímeros producidos por las bacterias, cambiando las características reológicas del cultivo, y haciendo más viscoso el medio. Si al tocar el medio de cultivo donde se encuentran creciendo estos microorganismos con algún objeto se forman filamentos o hilos entre éste y el medio, debido a la alta viscosidad del medio, entonces a estos microorganismos se les denomina como mucoides o filantes. El estado exacto en composición y disposición de los polisacáridos o polímeros bacterianos parece que depende de la especie, la edad y las condiciones de cultivo del microorganismo. La diferencia entre los polisacáridos que se encuentran formando una cápsula y los que se encuentran unidos débilmente a la superficie celular, se definen por su grado de asociación superficial, después de una centrifugación (Cerning, 1990; Whitfield, 1988).

a) Estructura química de los polisacáridos exocelulares.

Los polisacáridos exocelulares pueden dividirse en dos grupos, con base en su composición química:

- Heteropolisacáridos, y

- Homopolisacáridos

Los homopolisacáridos se encuentran formados por unidades repetidas de un mismo carbohidrato, como el almidón en donde solo se localiza glucosa, mientras que en los heteropolisacáridos, las unidades repetidas están formadas por distintos monómeros de carbohidratos. En ambos grupos de polisacáridos, la mayoría de los carbohidratos son aniónicos. En *Lactobacillus hilgardii*, se ha realizado el estudio químico y microscópico del polisacárido que genera, y se ha encontrado que este es una dextrana formada por glucosa alfa(1,6), con una proporción pequeña de glucosa alfa(1,3,6) glucosa alfa(1,4,6) (Pidoux et al, 1990).

La diversidad estructural de los polisacáridos exocelulares deriva de la amplia variedad de monosacáridos, y de los distintos tipos de enlaces que se presentan entre ellos. Algunos componentes solamente se presentan en polisacáridos exocelulares, mientras que otros también pueden localizarse en los polisacáridos de las superficies celulares, como los lipopolisacáridos y los ácidos teicoicos. La flexibilidad en la estructura de los polisacáridos depende principalmente de las cadenas laterales del polímero, como en *Xanthomonas campestris* y

en *Rhizobium trifolii*. Los constituyentes no hidrocarbonados generalmente se encuentran en proporciones no estequiométricas, y pueden variar con respecto a las condiciones y fases de crecimiento del microorganismo.

Dentro de los homopolisacáridos, son comunes los que presentan un carácter neutro, como por ejemplo las levanas, que son homopolisacáridos de fructosa, o los glucanos, que son homopolisacáridos de glucosa, incluyendo a la dextrana.

Los polisacáridos exocelulares difieren en tamaño, pues pueden pesar entre 10^3 Da en *Agrobacterium tumefaciens*, hasta 10^5 - 10^6 en *Klebsiella* sp. Así mismo, se ha descrito que en *Pseudomonas aeruginosa* y en *Azotobacter vinelandii* los polisacáridos exocelulares pueden estar formados por estructuras en bloques, ya que se encuentran unidades o regiones de ácido poligulurónico, intercaladas con regiones de ácido polimanurónico, en distintas proporciones, dependiendo de las características de la cepa y del cultivo (Whitfield, 1988).

En *Propionibacterium* sp., se ha encontrado que durante la fermentación de la lactosa se obtiene una baja recuperación de productos, debida principalmente a la formación de un polisacárido compuesto de metilpentosa, glucosa y galactosa (Crow, 1988). También se ha reportado que para diferentes cepas de distintas especies de *Staphylococcus* sp., las características de energía libre en la superficie celular cambian con respecto a la capacidad o no de producir polisacáridos exocelulares (van der Mel et al, 1989).

En la cepa *Streptococcus pneumoniae* TYPE 18C(56), se ha determinado la composición estructural del polisacárido capsular, en donde se presenta D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa y residuos de glicerol en unidades repetidas, y con una proporción de 3:1:1:1 (Lugowski y Tennings, 1984).

En *Butyrivibrio fibrisolvens*, se ha encontrado que existen una gran cantidad de carbohidratos ácidos formando el polisacárido exocelular de esta especie. La cuantificación de los azúcares se ha realizado empleando principalmente las técnicas de cromatografía gas-líquido, y de capa fina (Stack, 1988), mientras que el análisis de polisacáridos exocelulares de bacterias marinas y de agua dulce se ha realizado empleando la separación de carbohidratos por columnas de intercambio iónico (Kennedy y Sutherland, 1987).

Para *Lactobacillus bulgaricus* se ha descrito la presencia de polisacáridos exocelulares, que aumentan la viscosidad del medio. Son solubles en agua y están formados por unidades repetidas de galactosa, glucosa y ramnosa en una proporción de 4:1:1, y con un peso molecular de 500,000 daltons (Cerning et al, 1988). Así mismo, se ha reportado que en *Streptococcus thermophilus* al crecer en leche descremada, se produce un polisacárido exocelular compuesto de galactosa y glucosa en una

proporción de 1:1, con pequeñas cantidades de xilosa, arabinosa, ramosa y manosa, e inclusive se ha observado una relación directa entre el polisacárido producido y la viscosidad obtenida en el medio (Cerning et al. 1988).

b) Biosíntesis de polisacáridos exocelulares en los microorganismos.

Los polisacáridos exocelulares se pueden sintetizar en diferentes etapas del crecimiento, y depende del microorganismo mismo. Los procesos biosintéticos pueden considerarse en dos categorías, los externos y los internos a la célula.

Los externos son llevados a cabo por enzimas exocelulares como la levana y la dextransacarasa, e inclusive pueden considerarse las reacciones de glucosil-transferasa.

Las reacciones internas pueden incluir las que se realizan a nivel de la membrana celular y a nivel citoplásmico. En bacterias gram negativas, los nucleótidos difosfato unidos a un azúcar, pueden ser utilizados como donadores del grupo glucosil. Las enzimas relacionadas con la síntesis de precursores son citoplásmáticas y pueden estar asociadas con la membrana, organizadas espacialmente junto con las glucosil-transferasas.

Las unidades repetidas de los polisacáridos son ensambladas por la transferencia secuencial de azúcares a intermediarios ligados a lípidos, y al menos algún paso de la polimerización ocurre en la fracción lipídica de la membrana (Whitfield, 1988).

Los mecanismos de síntesis son muy variados, y aún no se conoce como se llevan a cabo en la mayoría de los microorganismos (Whitfield, 1988).

c) Función de los polisacáridos exocelulares en los microorganismos.

La función de las cápsulas bacterianas formadas por polisacáridos parece depender del ambiente, al ser consideradas principalmente como mecanismos de defensa contra condiciones adversas del ambiente, y que pueden ser consideradas como presiones de selección. De esta manera, puede perderse fácilmente la característica en el laboratorio, pero puede mantenerse en condiciones naturales. El tipo de mecanismos de protección que proporcionan las cápsulas es variado, ya que puede conferir especificidad antigénica, servir como un mecanismo protector contra el oxígeno atmosférico o iones metálicos, y también se ha observado que ayuda en la formación de agregados celulares (Moat, 1985), como un agente crioprotector en *Streptococcus lactis* y *Streptococcus cremoris* (Gilliland y Speck, 1974), y como un factor que impide el ataque por bacteriófagos, al cambiar las características de la superficie celular (Watanabe et al, 1987), similar a lo que ocurre en *Streptococcus cremoris* SK110, el cual

presenta la codificación de esta característica en el plásmido pSK112, y le confiere resistencia con respecto al fago SK11G (Sijtsma et al, 1988). En algunos microorganismos, la capacidad de adherirse a las superficies está dada por las características de los polisacáridos exocelulares, como en el caso de las bacterias que producen la caries dental, o las que tienen la capacidad de adherirse en el tracto digestivo (Whitfield, 1988).

La presencia de polisacáridos exocelulares está relacionada con la unión de bacteriófagos a la superficie celular. De esta manera se sabe que en *Streptococcus cremoris* KH, el receptor del bacteriófago kh, es la ramnosa presente en un polisacárido de la pared exocelular. En bacterias gram negativas, se ha descubierto que los bacteriófagos reconocen lipopolisacáridos y proteínas específicas de la membrana interna. Un ejemplo de esto es el colifago ϕ X174, el cual se une a la fracción de carbohidratos del polisacárido, mientras que el bacteriófago lambda se adsorbe a la proteína de membrana relacionada con el transporte de maltosa. En bacterias gram positivas, los bacteriófagos generalmente se unen a carbohidratos en la superficie celular, a excepción del bacteriófago m13 el cual se une a una proteína de membrana (Valyasevi et al, 1990).

En *Streptococcus cremoris*, se ha encontrado que las bacterias capaces de producir polisacáridos exocelulares, aisladas a partir de la leche fermentada Viili, presentan mayores actividades de UDP-4-galactosa- epimerasa, y decrece la actividad de la UDP-glucosa- pirofosfatasa. Este efecto parece deberse a la presencia de un represor inactivo que desreprime la síntesis de varias enzimas. Así mismo, se ha considerado que está relacionada la proteína A en la membrana externa con el fenotipo mucoso en este tipo de bacterias, y por otra parte se sabe que pueden influir los factores genéticos y ambientales, y que la estabilidad de este mecanismo puede inducirse por la para-fluorofenilalanina (Forsén y Haiva, 1981). En otra cepa de *Streptococcus cremoris* aislada de Viili, las cepas filantes o mucoides, parecen tener asociada una glucoproteína, la cual puede perderse por el ataque de bacteriófagos en las cepas, con lo cual la característica se convierte en inestable (Kontusaari et al, 1985), y también se ha localizado la presencia, por métodos inmunquímicos, de un ácido lipoteicoico en *Streptococcus cremoris* T5, el cual actúa como un antígeno en esta cepa (Forsén et al, 1985).

El conocimiento de la biología molecular de la característica de producir polisacáridos exocelulares en diversos tipos de bacterias, permitiría su manipulación genética al afectar las funciones que se han encontrado relacionadas con este tipo de compuestos como son: Protección contra la desecación, la depredación, y contra iones metálicos (Whitfield, 1988).

d) Factores genéticos relacionados con la producción de polisacáridos exocelulares.

En diversas bacterias, la codificación genética de la

capacidad de producir polisacáridos exocelulares puede encontrarse tanto a nivel cromosomal como plasmídico, y los genes parecen estar agrupados en "clusters" de aproximadamente 15 Kb de DNA cromosomal como en *Escherichia coli* K1, el cual se ha considerado que codifica para doce productos, necesarios para la síntesis, polimerización, modificación y translocación de los polisacáridos exocelulares. En otras cepas de bacterias, los genes pueden estar acomodados en más de un "cluster", como en *Escherichia coli* K30 y *Klebsiella* K20 (Boulnois y Jann, 1989; Whitfield, 1988).

En *Rhizobium fredii* USDA 206, se ha encontrado una posible relación entre la síntesis de polisacáridos exocelulares con el número de copia y efectividad simbiótica, con respecto al plásmido pRj206b. También en esta cepa se ha encontrado que la producción del polímero sólo se expresa cuando se encuentran polioles en el medio (Barbour y Elkan, 1989).

Gracias al empleo de técnicas de DNA recombinante se sabe que la inestabilidad genética que se presenta en la producción de polisacáridos exocelulares puede deberse a distintas causas, como los eventos de recombinación homóloga, que resultan en la pérdida de una copia de los genes, en *Pseudomonas aeruginosa*, durante la síntesis de alginato. El control de la producción del polímero puede deberse a la disponibilidad de precursores debido a inhibición por retroalimentación, o degradación, la codificación a nivel plasmídico, y a la disponibilidad de los intermediarios lipídicos propuestos.

La regulación de la producción de polisacáridos exocelulares puede llevarse a efecto a diversos niveles, tales como la presencia de secuencias reguladoras positivas o negativas, por proteólisis, por la presencia de iones divalentes específicos como el Ca^{2+} intracelular, y sin embargo la mayoría de los procesos regulatorios aún no se han definido totalmente (Whitfield, 1988).

e) Factores genéticos relacionados con la producción de polisacáridos exocelulares en bacterias lácticas.

Se considera que los polisacáridos desempeñan un papel importante en los alimentos, puesto que estos compuestos proporcionan una mayor consistencia y mejoran su textura, debido a la formación de geles, con base en mezclas de biopolímeros (Morris, 1985).

En la elaboración industrial de yoghurt frecuentemente se adicionan sólidos de leche para aumentar su consistencia y evitar el desuerado o sinéresis, el cual puede verse afectado por factores como el pH, temperatura, fuerza iónica, grado de agitación, concentración de iones calcio y proteínas del tipo de la caseína (Pearse y MacKinlay, 1989). El empleo de cepas

productoras de polisacáridos en la elaboración del yoghurt, permite la formación de un alimento con una buena consistencia sin que se presente la sinéresis, se evita la adición de otros compuestos en él, y por lo tanto se disminuyen los costos de producción (Marshall, 1964).

Actualmente se sabe que existen diferentes cepas de bacterias lácticas que producen polímeros exocelulares que les confieren la característica de transformar el medio de cultivo haciéndolo más viscoso (Cerning, 1990).

En diferentes tipos de leches fermentadas como el Villi, se han encontrado cepas de bacterias lácticas con la característica filante o mucuioide desde hace varias décadas (Sundman, 1953). En años recientes se ha descrito que la codificación genética de intermediarios (Sjoberg y Hahn-Hagerdal, 1989), y enzimas responsables en la producción de polisacáridos exocelulares, como la levan o dextran sacarasa a nivel de la membrana celular, y a nivel citoplásmico la glucosil transferasa, e intermediarios unidos a lípidos, puede estar codificada a nivel cromosomal o a nivel plásmidico (Whitfield, 1988).

De esta manera se comprobó que la capacidad de producir el fenotipo mucuioide en *Streptococcus cremoris* ARH87, está asociada con el plásmido pV55 de 30 MDa, lo cual se comprobó curando la cepa productora y transformando, por medio de protoplastos, la cepa no mucuioide *Streptococcus lactis* MG1614 (von Wright y Tynkkyne, 1987). Siguiendo la misma estrategia de curación y transformación de una cepa mucuioide o filante, se comprobó que en *Streptococcus cremoris* MS esta misma característica está codificada en el plásmido pSRQ2202 de 18.5 MDa, el cual confiere también resistencia a bacteriófagos (Vedamuthu y Neville, 1986). Así mismo, para *Lactobacillus casei* NCFB 4114, este fenotipo está correlacionado con un plásmido de 4.5 MDa. En este mismo trabajo, se menciona que la cepa de *Lactobacillus bulgaricus* 201, que se comporta como una cepa filante, no presenta plásmidos (Vescovo et al, 1989).

Macura y Townsley en 1984 reportaron que la característica mucuioide o filante en las bacterias del yoghurt es muy inestable, puesto que se pierde como resultado de transferencias continuas, y sugirieron una posible codificación en plásmidos.

El interés que han despertado los plásmidos de bacterias lácticas es que presentan la posibilidad de ser utilizados como vectores o vehículos de clonación, para microorganismos que son utilizados en la industria de alimentos, como se ha mencionado anteriormente, debido a su condición de organismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) (Gasson y Davies, 1984).

CAPITULO VI

Estabilidad e Inestabilidad genética de los microorganismos.

La información genética codificada en el DNA presenta variaciones, y se considera como un mecanismo indispensable para asegurar la supervivencia de los organismos. Se piensa que debe existir la plasticidad genética en los organismos debido a dos razones fundamentales: Por una parte la información genética debe transmitirse en forma estable de una generación a la siguiente; y por otra parte se requiere de cierta inestabilidad para que se presenta la evolución biológica de las especies, y por lo cual se supone que la estabilidad genética no puede ser absoluta.

Estos conceptos parecen contradecirse. Sin embargo existen algunos factores que promueven la inestabilidad mientras que otros la limitan. Si la inestabilidad es excesiva esto hace que una cepa microbiana no pueda sobrevivir en un ambiente, y por otra parte si no cambia lo suficientemente rápido no puede adaptarse a cambios en las condiciones ambientales. Esto hace pensar en que debe existir un equilibrio entre la estabilidad e inestabilidad genéticas.

Los cambios en el ambiente permiten la selección de nuevas características en las bacterias, y propician el aislamiento de variantes genéticas, motivo por el cual se puede encontrar una amplia diversidad en la composición genómica de las poblaciones de microorganismos (Arber, 1990).

a) Procesos de cambio en el material genético de microorganismos.

Los cambios en el genoma o mutaciones espontáneas son producto de diferentes mecanismos moleculares. Estos mecanismos pueden ser los que se mencionan a continuación:

- 1) Fallas en la replicación del DNA, debidas a la incorporación o sustitución de nucleótidos, distintos a los encontrados en un templado.
- 2) Pequeñas deleciones, inserciones o duplicaciones del DNA, aunque estos cambios pueden ser reparados por diversos mecanismos moleculares, ciertos errores permanecen en el genoma.
- 3) Agentes mutagénicos del ambiente, como radiaciones ionizantes o agentes químicos encontrados en la naturaleza.
- 4) Rearreglos del DNA mediante procesos de recombinación, tal y como ocurre durante la conjugación bacteriana.
- 5) Elementos genéticos móviles, que presentan secuencias de inserción y que se encuentran ampliamente distribuidas en los

microorganismos (Haandrikman et al, 1990). Dentro de estos casos pueden considerarse los procesos de transposición, inserción, delección y fusión de DNA.

En contraste con estos procesos de rearrreglos intragenómicos del DNA, la adquisición de secuencias de DNA de otros microorganismos, ofrece a una célula receptora la posibilidad de enriquecer su potencial genómico en un solo evento.

La transferencia de información genética entre cepas diferentes de un microorganismo, contribuyen a la adaptación y evolución microbiana bajo condiciones naturales, y se sabe que los principales mecanismos de transferencia genética son los siguientes: Transformación, conjugación, transducción, y en cierta medida la fusión de células.

Así como se presentan mecanismos de transferencia de información genética entre cepas distintas de microorganismos, también existen mecanismos o factores que limitan la transferencia de información, entre los que se pueden mencionar los siguientes:

- 1) Compatibilidad entre las superficies celulares de dos microorganismos en el proceso de conjugación,
- 2) Competencia celular, o capacidad de introducir DNA a la célula en los procesos de transformación,
- 3) Rango de hospederos del fago en el proceso de transducción,
- 4) Sistemas intrínsecos celulares de Restricción/Modificación, que distinguen el DNA nativo de la célula y degradan el DNA foráneo, y
- 5) Compatibilidad/Incompatibilidad de la información genética presente en la célula y la información introducida, como es el caso de la incompatibilidad plasmídica (van der Lelie et al, 1988).

De acuerdo con lo anterior, una interrogante es conocer si la evolución biológica es el resultado de la acumulación de errores a nivel de la información genética, o bien si es posible que existan funciones o factores biológicos específicos que promuevan la evolución, como los plásmidos o los virus.

b) Plasticidad genética de los microorganismos.

La plasticidad genética representa una ventaja valiosa para los microorganismos ante cambios en el ambiente. Sin embargo, las poblaciones naturales deben presentar una cierta tolerancia ante los cambios a nivel genético para poder sobrevivir, y esto depende de diversos factores tanto ambientales como propios de los microorganismos (Arber, 1990).

Las características codificadas en plásmidos son más inestables genéticamente debido a que las células pueden perderlos fácilmente (Gasson et al, 1987). lo cual también se ha propuesto que ocurre en bacterias lácticas, principalmente relacionado con la capacidad de metabolizar la lactosa (McKay, 1978), y con la hidrólisis de la caseína en la leche, realizado por proteasas específicas (Morelli et al, 1986).

Por otra parte, se han desarrollado vehículos moleculares basados en plásmidos de diversos orígenes bacterianos. Estos vectores, en general son inestables, particularmente cuando presentan insertos de material genético extraño.

La inestabilidad en los plásmidos se ha encontrado que puede ser de dos tipos:

- 1) Segregacional: en donde se pierde el plásmido completo de la población de microorganismos, y
- 2) Estructural: en donde el plásmido sufre rearrreglos de las secuencias de bases, generalmente relacionados con deleciones.

Existen diversas teorías que pueden explicar cómo los plásmidos son conservados o no en una población de bacterias, a lo cual se le denomina como partición de plásmidos. Cuando se encuentran plásmidos multiméricos en una bacteria, se asegura la distribución de por lo menos una copia a las células hijas. También, existen casos en los que se produce la muerte celular en bacterias que no presentan una copia del plásmido. La incompatibilidad que se presenta entre algunos plásmidos, puede deberse a un desplazamiento por un plásmido de bajo número de copia, el cual puede ser mantenido más fácilmente en una célula, y también debido a que una célula puede mantener uno pero no ambos plásmidos (Austin, 1988).

Aparentemente la inestabilidad en los plásmidos es generada por la forma de replicación. En *Bacillus subtilis* se ha encontrado que la inestabilidad de plásmidos, está relacionada con el origen de replicación de los mismos. Aquellos que presentan una forma de replicación que sigue el modelo del círculo rodante tienden a ser inestables (Bron et al, 1990).

En algunos plásmidos que han sido utilizados como vectores de clonación en bacterias lácticas, particularmente *Lactococcus lactis*, se ha encontrado que plásmidos grandes de más de 10 Kb, son más estables que plásmidos pequeños de menos de 10 Kb, y se ha propuesto también que un factor importante que interviene en éste sentido es la forma en que se replican los mismos. Los plásmidos grandes generalmente se replican utilizando un mecanismo tipo teta, mientras que plásmidos pequeños se replican siguiendo el modelo del círculo rodante, ésto se ha observado con el plásmido pAM31 y el plásmido pTB19 (Delisle et al, 1990).

En el plásmido pAMβ1 puede encontrarse un fragmento de DNA que evita la segregación, cuando se utiliza como vector de clonación en *Bacillus subtilis* y *Clostridium acetobutylicum*. Aparentemente esta región codifica para dos genes, similares a las recombinasas bacterianas y a la topoisomerasa I de *Escherichia coli* (Swinfield et al, 1990).

En *Streptomyces* sp., también se presenta el fenómeno de inestabilidad genética, pero aun no se conocen bien los eventos relacionados con este proceso (Schrempf, 1990).

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la introducción de genes que presenten resistencia a cobre, o el gen de la superóxido dismutasa, confieren estabilidad en los cultivos del microorganismo (Rech et al, 1990).

Con base en lo anterior, puede observarse que existen mecanismos moleculares que favorecen tanto la estabilidad como la inestabilidad de la información genética en distintos grupos de microorganismos. lo cual tiene como consecuencia que estos microorganismos puedan adaptarse en forma eficiente ante cambios ambientales diversos.

CAPITULO VII

Hipótesis

Con base en la información anterior se propuso la siguiente hipótesis al inicio del proyecto:

"La producción de polisacáridos exocelulares que generan el fenotipo mucoso o filante en bacterias del yoghurt, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, es inestable y puede encontrarse codificada genéticamente"

Objetivos

a) Objetivo General

Establecer los factores genéticos que están relacionados con el fenotipo mucoso o filante en las bacterias *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, que se emplean en la elaboración del yoghurt.

b) Objetivos Particulares

I. Intentar desarrollar metodologías de identificación macroscópica y microscópica entre cepas filantes y no filantes de ambas especies bacterianas.

II. Cuantificar y diferenciar los niveles de producción de polisacáridos exocelulares mediante el empleo de técnicas bioquímicas, entre cepas filantes y no filantes de ambas especies bacterianas.

III. Establecer la relación que existe entre la presencia de plásmidos y la producción de polisacáridos exocelulares con respecto a cepas filantes y no filantes de ambas especies bacterianas.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CAPITULO VIII

Material y Método

a) Cepas de Bacterias

Durante la realización de este trabajo se utilizaron diferentes cepas de bacterias de los géneros *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, y *Escherichia coli*, como se muestra en la tabla 3.

CEPAS	ORIGEN	CARACTERISTICAS
<i>Streptococcus thermophilus</i>		
NCFB 859	NCFB ¹	CEPA FILANTE O MUCOIDE
NCFB 573	NCFB ¹	CEPA TIPO. NO MUCOIDE
NCFB 2075	NCFB ¹	CEPA COMERCIAL. NO MUCOIDE
ST 233	INRA ²	CEPA NO MUCOIDE
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>		
NCFB 2772	NCFB ¹	CEPA FILANTE O MUCOIDE
NCFB 1489	NCFB ¹	CEPA TIPO. NO MUCOIDE
NCFB 2074	NCFB ¹	CEPA COMERCIAL. NO MUCOIDE
BM B 13	IIBM ^{3,4}	CEPA NO MUCOIDE
<i>Escherichia coli</i>		
BHB 2600	JMG ⁵	PLASMIDO pGK12/NO MUCOIDE

TABLA 3. Cepas de bacterias utilizadas en el proyecto.

¹ NCFB = National Collection of Food Bacteria, Shinfield, Reading, Inglaterra. Cepas proporcionadas por el M. en C. Mariano García-Garibay.

² INRA = Institut National de la Recherche Agronomique. Jouy-en-josas, Francia. Cepa proporcionada por el M. en C. Mariano García-Garibay.

³ IIBM = Cepario del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Proveniente de la colección NRRL⁴ con número de catálogo B 548.

⁴ NRRL = Northern Regional Research Laboratories, EUA.

⁵ JMG = Cepa proporcionada por la Dra. Juliette Morlon-Guyot.

Las condiciones de mantenimiento de las cepas filantes y no filantes se describen en el Apéndice II.

b) Condiciones de crecimiento en medio líquido.

Las diferentes cepas se obtuvieron liofilizadas. Una vez abiertos los liofilizados, las cepas se crecieron en leche descremada bacteriológica, skim milk (Difco) estéril en solución al 11 %, y se mantuvieron por medio de transferencias bisemanales en leche descremada comercial estéril, al 11 % de sólidos totales.

En vista de que las bacterias empleadas en este estudio, presentan requerimientos nutricionales complejos, se probaron diferentes medios de crecimiento con el objeto de encontrar el que proporcionara las mejores condiciones de crecimiento. Así mismo, poder emplear un medio sintético translúcido durante los procedimientos de extracción de DNA plasmídico, en vista de que la leche interfiere en la realización de éstos. Con estas dos finalidades se probaron diversos medios, propuestos por varios autores.

Los medios probados fueron: Reddy con púrpura de bromocresol, M17, MRS adicionado con lactosa 2%, leche descremada, APT, Elliker modificado, y Lee (Apéndice 1).

Después de la inoculación en medio líquido sintético, o leche descremada comercial (Nido-Nestlé, Laussana, Suiza), se incubó a 37°C durante la noche. El crecimiento de los microorganismos se observó de distinta manera, en ambos medios. En la leche se presentó la coagulación de las proteínas debido a la acidez producida, y el número de bacterias se determinó por el método de cuenta en placa. En medio líquido sintético se cuantificó el crecimiento celular por la turbidez producida en el medio leyendo en espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm, con respecto a una curva estándar entre la absorbancia obtenida y una cuenta en placa.

c) Condiciones de esterilización.

La esterilización se realizó en olla de presión a 121°C o 15 libras/pulgada cuadrada de presión, durante 10-12 minutos, para evitar la caramelización de los azúcares presentes en el medio de crecimiento. La esterilización de sales y otros compuestos que no son afectados por la temperatura se realizó durante 15 minutos como mínimo.

d) Condiciones de crecimiento en medio sólido.

Se utilizó el medio MRS preparado a partir de sus componentes (Apéndice 1), o bien el preparado comercialmente por Difco (Difco Laboratories, Detroit, Mich), adicionado con lactosa al 2 % (20 g/L), Rojo Neutro (24 mg/L), y agar al 1.5 % (15 g/L), en lo que se denominó como el medio de crecimiento Agar/MRS-lactosa/Rojo Neutro.

Con la finalidad de diferenciar macroscópicamente a las colonias de las distintas cepas, se agregó el colorante Rojo neutro al medio de cultivo, a una concentración de 24 mg/L. Se probaron igualmente los colorantes Rojo Congo y Rojo de Aútenio, a la misma concentración.

e) Determinación de la capacidad de fermentar carbohidratos.

Una de las principales pruebas de identificación de bacterias, es la capacidad de utilizar diferentes carbohidratos como fuente de carbono, puesto que según cuáles de estos son metabolizados se puede conocer que género o especie se está trabajando. En este proyecto en particular, es necesario conocer que tipo de azúcares utilizan las bacterias, debido a que son un factor importante en la producción de polisacáridos.

Para realizar este tipo de experimentos se preparó el medio MRS en caldo a partir de sus componentes, sin agregarle carbohidratos que pudieran ser utilizados como fuente de carbono. Se realizó la determinación al agregar a la mezcla anterior, los carbohidratos específicos que se probaron como fuentes de carbono. Estos carbohidratos fueron: Glucosa, Lactosa, Galactosa, Fructosa, Sacarosa, Maltosa, Manosa, Xilosa y Arabinosa. Se agregó también púrpura de bromocresol (24 mg/L), el cual en solución presenta un color púrpura a un pH neutro, cambiando a un color amarillo a pH ácido de 5.8. Se inoculó con 1 % de bacterias a partir de un precultivo, y se incubó a 37°C durante 24 horas. El crecimiento de las bacterias genera un pH bajo debido a la producción de ácido láctico, y por lo tanto puede observarse un color amarillo en el medio.

f) Determinación de la producción de polisacáridos.

Se empleó la técnica que se ha denominado como Haze Assay, descrita por García-Garibay (1985). Se inocularon 10 mL de medio de cultivo líquido, leche o MRS caldo, con 1 % de un precultivo. Se incubó durante la noche, aproximadamente 12-16 horas a 37°C. Se tomaron alícuotas de 6 mL del cultivo, se agregó 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 80 % y se agitó vigorosamente. Se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 minutos, se tomaron 2 mL del sobrenadante y se mezclaron con 2 mL de etanol absoluto, para producir la precipitación del polisacárido. Se agitó, y dejó en reposo durante 20 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia del medio leyendo por espectrofotometría a una longitud de onda de 720 nm, como una medida de la turbidez generada en el medio por efecto de la precipitación del polisacárido con el alcohol.

g) Extracción de plásmidos de bacterias lácticas.

Para realizar la extracción de plásmidos de las diferentes cepas de bacterias del yoghurt se empleó una técnica

especialmente diseñada para bacterias lácticas termófilas (Somkuti y Steinberg, 1986).

Se inocularon 100 mL de medio de cultivo MRS caldo con lactosa y con DL-treonina 20 mM, con 1 % de un precultivo, y se incubó a 37°C durante toda la noche. El volumen total de medio se centrifugó a 10,000 rpm durante diez minutos a 4°C, y se resuspendió el paquete celular en 10 mL de buffer T1 para lavar las células. Se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm durante diez minutos y se resuspendió el paquete celular en 2.5 mL de buffer T2. Se agregaron 150 mg de lisozima la cual actúa como un agente de lisis de pared celular de bacterias gram positivas (Chassy y Giuffrida, 1980), 2.5 mL de Polietilenglicol (PEG) 24 % (PM = 3,600), y 25 uL de Dietilpirocarbonato (DEP) para inhibir la acción de nucleasas exógenas. La mezcla se incubó durante 60 minutos a 37°C. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos y se resuspendió el paquete celular en 4.5 mL de buffer T3, finalmente se rompieron los paquetes celulares con un agitador de goma. Se agregaron 0.5 mL de Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10 %, y se mezcló por inversiones suaves. Se incubó a 37°C durante 15 minutos para inducir la lisis celular, y posteriormente se agitó en vortex a velocidad máxima durante dos minutos. Se agregó Hidróxido de sodio (NaOH) 5N gota a gota con agitación suave hasta alcanzar un pH de 12.2-12.4, aproximadamente 0.15 mL, y se continuó con agitación suave por 15 minutos más. Se agregó 1 mL de buffer T4 hasta alcanzar un pH de 8.0-8.5, y 0.6 mL de cloruro de sodio (NaCl) 5M para obtener una solución de NaCl al 3%. Se adicionó fenol saturado con NaCl al 3%, y se agitó suavemente durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos y se removió la fase acuosa sin perturbar el precipitado floculento blanco. Se agregó un volumen de cloroformo y se mezcló por inversiones repetidas. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos nuevamente, y a la fase acuosa se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío, guardando la mezcla a -25°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante y se drenó el paquete durante 15 minutos, por inversión de los tubos sobre un papel secante. Se disolvió el paquete obtenido en 200 uL de buffer T5 y se agregaron 10 uL de RNAsa IA de una solución de 10 mg/mL hasta obtener una concentración final de 100 ug/ mL, y se incubó la mezcla durante 60 minutos a 37°C. Una vez terminado esto se realizó una electroforesis de las muestras, o bien se guardó la mezcla a -20°C.

Soluciones: (Apéndice III)

- DL-treonina 0.52 M
- SDS 10 %
- PEG (PM = 3,600) 24 %
- NaOH 5N
- NaCl 5M
- RNAsa IA 10 mg/ml en alícuotas de 25 uL

- Buffer T1; Tris 10 mM-HCl, pH 8.2
- Buffer T2; Tris 20 mM-HCl, pH 8.2
- Buffer T3; Tris 100 mM-HCl, EDTA 10 mM, pH 8.5
- Buffer T4; Tris 2 M-HCl, pH 7.0
- Buffer T5; Tris 10 mM-HCl, EDTA 100 mM, pH 8.0

h) Purificación de plásmidos.

La purificación de plásmidos de las bacterias lácticas se realizó por medio de electroelución. Una vez realizada la extracción de plásmidos de las células, se preparó una electroforesis en gel de agarosa 0.8 %, y se depositó en los carriles el total del volumen de la extracción. En los carriles externos del gel se colocó una pequeña muestra, de 10-20 uL, para poder marcar la posición de las bandas de interés. Se realizó la electroforesis y se tiñeron con bromuro de etidio, 40 ug/mL, las partes externas del gel.

Con la ayuda de una mesa de luz ultravioleta se cortaron los fragmentos correspondientes a la posición de los plásmidos y los mismos fueron introducidos en bolsas de diálisis tratadas de la siguiente manera:

Un tubo de bolsa de diálisis se hirvió en una solución de bicarbonato de sodio al 2 % - EDTA 1 mM, durante 10 minutos, se lavó el tubo con agua destilada, se hirvió por 10 minutos más en una solución de EDTA 1 mM, se permitió enfriar y se guardaron las bolsas a 50C en una solución de EDTA 1 mM (Maniatis, 1982).

La bolsa de electroelución se llenó con una cantidad mínima de buffer TE 10-1 pH 8.0 (Apéndice III), junto con los fragmentos del gel. Se eliminaron todas las burbujas posibles, y se colocó en la cámara de electroforesis en forma transversal. Se hizo pasar una corriente eléctrica de 150 V durante una hora y media, con lo cual se permitió la salida del DNA del gel, el cual permaneció en el interior de la bolsa de diálisis. Al finalizar el tiempo, se invirtió la polaridad de la corriente en la fuente de poder durante 15-30 segundos, lo que permitió el desprendimiento del DNA de la pared interior de la bolsa. Se recuperó el buffer del interior de la bolsa, y se comprobó la salida del DNA del gel mediante el empleo de luz UV. El DNA se recuperó por precipitación con etanol absoluto a -250C. Para eliminar el exceso de sales se lavó el DNA con etanol al 70% (Maniatis, 1982).

i) Procedimientos de Curación

Para evaluar si la presencia de plásmidos estaba relacionada con la regulación en la producción de polisacáridos extracelulares, se intentó la eliminación de los plásmidos, es decir la curación de las cepas, empleando para ello diversos métodos.

I) Métodos físicos.

1) Temperatura.

Se hizo crecer a las bacterias a diferentes temperaturas, hasta una temperatura subletal de 60°C durante 4 horas, con dos o tres transferencias sucesivas, similar a lo reportado para *Lactococcus* sp. (Sinha, 1989).

2) Electroporación.

Se inocularon 10 mL de medio de cultivo MRS caldo y DL-treonina 20 mM con 1 % de precultivo. Se crecieron las bacterias durante la noche a 37°C. 24 horas después se inocularon tubos con medio fresco en las mismas condiciones de crecimiento y se permitió el desarrollo de las bacterias durante cuatro horas más a 37°C, para obtener un cultivo de células nuevas. Se lavaron las células cuatro veces en buffer de electroporación EB, (EB; Hepes 1 mM pH 7.4, MgCl₂ 1 mM, Sacarosa 0.3 M) (Apéndice III). Se resuspendieron las células en distintas cantidades de buffer EB, dependiendo de las condiciones requeridas.

Para los experimentos de curación se hizo una dilución de células de 10^{-6} . Se colocaron 50 uL de células en celdas de electroporación y se sometieron a un pulso eléctrico en diferentes condiciones, descritas en la tabla 4, en un aparato de electroporación Bio-Rad, Gene PulserTM, facilitado por la Dra. Juliette Morlon-Guyot. Inmediatamente después de aplicado el pulso eléctrico, se agregaron 450 uL de medio MRS, y se permitió la recuperación de las células durante una hora. Una vez transcurrido este tiempo, se tomaron 100 uL de células y se extendieron en una caja con Agar/MRS-lactosa/Rojo Neutro. Se permitió el crecimiento de las colonias hasta 5 días después de realizado el procedimiento de electroporación. Al término de este tiempo, se tomaron distintas colonias al azar, las cuales se propagaron y se les realizó la extracción de DNA plasmídico por la técnica descrita previamente (Somkuti y Steinberg, 1986), con el fin de conocer la eficiencia del método de curación de plásmidos de las cepas.

Las condiciones de curación por electroporación se muestran en la tabla 4.

II) Métodos químicos.

La curación química se realizó al colocar en tubos con 10 mL de medio MRS-lactosa líquido, distintas concentraciones de un agente químico que permite realizar la curación, también llamado agente curante. Se inoculó con 1% del volumen de una suspensión de células, y se incubó a 37°C durante 12-16 horas. Al finalizar este tiempo, se tomó una alícuota de 1% y se inoculó una segunda serie de tubos, en las mismas condiciones. Posteriormente se sembraron 100 uL de células, a partir de una serie de diluciones de los tubos de prueba en el medio MRS-lactosa agar con Rojo Neutro. Se muestreó una serie de colonias así obtenidas y se les

realizó la extracción de DNA plasmídico (Somkuti y Steinberg, 1986).

Se emplearon como agentes curantes Bromuro de Etidio, Acriflavina y Novobiocina. Las concentraciones probadas fueron de 0 a 4 ug/mL, de 0 a 100 ug/mL y de 0 a 5 ug/mL, respectivamente.

j) Extracción de plásmidos de *Escherichia coli* BHB 2600.

Durante el desarrollo del proyecto, en la fase de transformación de la cepa de *Streptococcus thermophilus* NCFB 859 por electroporación, se utilizaron plásmidos comunmente empleados como vectores en bacterias lácticas, particularmente el plásmido pGK12, el cual se recuperó de *Escherichia coli* BHB 2600, transformada con este plásmido. Los plásmidos empleados en esta parte del trabajo experimental, así como la cepa de *Escherichia coli* BHB 2600, fueron proporcionados por la Dra. Juliette Morlon-Guyot. Estos plásmidos presentan la característica de poseer la resistencia a uno o varios antibióticos.

Primero se realizó un precultivo a partir de una colonia en que se encontraron células con resistencia a un antibiótico específico. La cepa de *Escherichia coli* BHB 2600 con el plásmido pGK12 presenta resistencia a cloramfenicol (50 ug/mL) y a eritromicina (200 ug/mL). Se hizo un precultivo en 5 mL de medio LB (Luria-Bertani) (Apéndice I) con cloramfenicol 10 ug/mL, y se incubó a 37°C durante una noche. Al siguiente día se inocularon 250 mL de medio LB y cloramfenicol 10 ug/mL, con 2 mL de bacterias del precultivo, y se incubó a 37°C durante una noche, con agitación de 150 rpm. Para iniciar el procedimiento de extracción del plásmido, se centrifugó a 7,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, para obtener el paquete celular. Se lavaron las células dos veces en 100 mL de buffer STE, se centrifugó y se resuspendió el paquete celular en 20 mL de buffer TE 25-50, se agregó lisozima a una concentración de 5 mg/mL y se incubó durante 5 minutos en hielo. Se agregaron 40 mL de NaOH 0.2 M - SDS 1% en solución final, y se incubó durante 10 minutos en hielo, para provocar la lisis celular. Se mezcló por inversión, y se agregaron 30 mL de una solución de acetato de potasio 5M la cual se preparó en el momento al agregar a 80 mL de acetato de potasio 5 M, 11.5 mL de ácido acético glacial y 28.5 mL de agua, sin ajustar el pH. Se mezcló por inversión suave y se dejó reposar en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos, y se colectó el sobrenadante. Se agregó 0.6 veces el volumen de isopropanol, aproximadamente 50 mL, y se dejó en reposo durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos, y se decantó el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado en 5 mL de buffer TE 25-50 se agregaron 2.5 mL de acetato de amonio 7.5 M, y se incubó la mezcla en hielo durante 20 minutos. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos, se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo, y se agregaron 15 mL de etanol absoluto. Se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos. Se resuspendió el paquete en 750 uL de buffer TE 25-50 y

se agregaron 15 uL de RNasa con una concentración de 1 mg/mL, a una concentración final de 20 ug/mL, y se incubó a 65°C durante una hora. Se extrajeron las proteínas con fenol saturado, fenol-cloroformo, y cloroformo, y a la fase acuosa se le adicionó 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.0. Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se dejó en reposo durante 2 minutos. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos. Se eliminaron las sales por medio de un lavado con etanol al 70 %, y se resuspendió en un volumen determinado de buffer TE 10-1 pH 8.0, que depende de la proporción de DNA plasmídico recuperado, y que generalmente corresponde a 20-40 uL de buffer TE 10-1.

Soluciones: (Apéndice III)

- Buffer STE; Tris 10 mM-HCl pH 7.5, NaCl 10 mM, EDTA 1 mM.
- Buffer TE 25-50; Tris 25 mM-HCl pH 8.0, EDTA 50 mM.
- Buffer TE 10-1; Tris 10 mM-HCl pH 8.0, EDTA 1 mM.

k) Transformación de la cepa de *Streptococcus thermophilus* NCFB 859.

El único método de transformación que se utilizó fue la electroporación, y se siguió el protocolo descrito previamente, solamente que se colocaron en las celdas de electroporación, 50 uL de la suspensión de células sin diluir, junto con el DNA a transformar. Esta suspensión se obtuvo al resuspender la cantidad total de células obtenidas por crecimiento en medio líquido, en 200 uL de buffer EB. Se colocaron de 1 a 3 uL de una solución con el DNA del plásmido a transformar, a una concentración de 0.5-1.0 ug/uL, y se procedió a la aplicación del pulso eléctrico. Posteriormente a la aplicación de este, se agregaron 450 uL de medio MRS-lactosa líquido, y se permitió la recuperación de las células durante 4 horas a 37°C. La selección de las transformantes se realizó en el medio Agar/MRS-lactosa/Rojo neutro, adicionado con cloranfenicol (10 ug/mL), en donde se pretendió la expresión de la resistencia codificada en el plásmido transformado. También se probó dejar en recuperación a las células a 4°C durante una noche.

Los plásmidos que se intentó introducir a la cepa de *Streptococcus thermophilus* NCFB 859, fueron el plásmido pGK12 y el plásmido extraído de la cepa no filante de *Streptococcus thermophilus* ST 233, nombrado internamente en el laboratorio como pST233.

Se hicieron distintos intentos de transformación con la cepa de *Streptococcus thermophilus* NCFB 859 por electroporación, y se probaron diferentes variables susceptibles de cambio en esta metodología. Las diferentes condiciones de transformación probadas, se muestran en la tabla 4. De acuerdo con lo anterior, la fuerza iónica del medio se mantuvo constante al emplear el medio de electroporación reportado por Somkuti y Steinberg en 1988, el cual contiene un amortiguador de fosfatos 5 mM pH 7.0, con $MgCl_2$ 1 mM y sacarosa 0.3 M pH 7.4 (Apéndice III). La capacitancia se mantuvo constante a 25 microfaradios (uFd), la

resistencia se probó en 100, 200 y 400 ohms (Ω). El voltaje aplicado se varió entre 0.6 y 2.5 KiloVolts (KV), en décimas de unidad, hasta el marcado como máximo que es generado por el aparato. Este voltaje a su vez corresponde a un rango de 3,000 a 12,500 V/cm², al emplear celdas de electroporación de 0.2 cm de distancia total entre las placas de los electrodos.

CONDICIONES DE ELECTROPORACION

BUFFER	CAPACITANCIA (μ Fd)	RESISTENCIA (ohms)	VOLTAJE (V)	VOLTAJE/DISTANCIA (V/cm)
EB CHASSY 1988	25	100	0.6	3,000
			0.8	4,000
		200	1.0	5,000
			1.2	6,000
			1.4	7,000
			1.6	8,000
			1.8	9,000
			2.0	10,000
			2.2	11,000
			2.4	12,000
2.5	12,500			
EB SOMKUTI Y STEINBERG 1986	25	100	0.6	3,000
			0.8	4,000
		200	1.0	5,000
			1.2	6,000
			1.4	7,000
			1.6	8,000
			1.8	9,000
			2.0	10,000
			2.2	11,000
			2.4	12,000
2.5	12,500			

TABLE 4. Condiciones empleadas durante los experimentos de electroporación, tanto para la curación de la cepa de *Streptococcus thermophilus* ST 233, como para la transformación de la cepa de *Streptococcus thermophilus* NCFB 859.

En todos los casos reportados se realizaron los experimentos por triplicado como mínimo, como una forma de asegurar la validez de los mismos.

El análisis estadístico de los experimentos se realizó con ayuda de diversos paquetes estadísticos de computación.

CAPITULO IX

Resultados y Discusión

a) Medio de crecimiento e identificación macroscópica.

Se probaron diferentes medios de crecimiento sintéticos para conocer cuál de ellos podría ser utilizado en la identificación macroscópica de las colonias formadas por cada una de las cepas empleadas en este estudio.

Las características de crecimiento de las colonias de cada una de las distintas cepas en los diferentes medios se describen a continuación en la Tabla 5.

MEDIO	CEPA (a)	CRECIMIENTO (b)	DIFERENCIACION (c)	MORFOLOGIA (d)
Reddy + Púrpura de Bromo- cresol	NCFB 859	+	+	pequeñas, lisas, amarillas, circulares
	ST 233	+	+	pequeñas, lisas, amarillas, circulares
	NCFB 2772	-	-	--
	EM B 13	-	-	--
M17	NCFB 859	+	+	pequeñas, lisas, amarillas, circulares
	ST 233	+	+	pequeñas, lisas, amarillas, circulares
	NCFB 2772	-	-	--
	EM B 13	-	-	--
MRS + lactosa + Rojo neutro	NCFB 859	++	++	pequeñas, lisas, circulares, rojas
	ST 233	++	++	medianas, lisas, circulares, rosas
	NCFB 2772	++	++	pequeñas, lisas, circulares, rojas
	EM B 13	++	++	medianas, rugosas, irregulares, rosas

Continuación de la TABLA 5.

MEDIO	CEPA	CRECIMIENTO	DIFERENCIACION	MORFOLOGIA
leche desc. 11%	NCFB 859	++	+	pequeñas, lisas, circulares, blancas
	ST 233	++	+	pequeñas, lisas, circulares, blancas
	NCFB 2772	++	+	pequeñas, lisas, circulares, blancas
	EM B 13	++	+	pequeñas, lisas, circulares, blancas
APT	NCFB 859	-	-	--
	ST 233	-	-	--
	NCFB 2772	-	-	--
	EM B 13	-	-	--
Eliker modif.	NCFB 859	-	-	--
	ST 233	-	-	--
	NCFB 2772	-	-	--
	EM B 13	-	-	--
Lee	NCFB 859	-	-	--
	ST 233	-	-	--
	NCFB 2772	-	-	--
	EM B 13	-	-	--

TABLA 5. Descripción de las características coloniales en diferentes cepas, para cada uno de los medios probados.

- (a) Cepas: NCFB 859 = *Streptococcus thermophilus* filante
 ST 233 = *Streptococcus thermophilus* no filante
 NCFB 2772 = *Lactobacillus bulgaricus* filante
 EM B 13 = *Lactobacillus bulgaricus* no filante
- (b) Crecimiento colonial: (-) = no hay crecimiento; (+) = crecimiento escaso; (++) = crecimiento abundante
- (c) Distinción de las colonias con respecto al medio: (-) = no existe distinción; (+) = distinción deficiente; (++) = distinción evidente.
- (d) Morfología colonial: Descripción colonial general; (--) = No se presentan colonias.

Los medios de crecimiento más adecuados que se probaron fueron la leche, y el medio sintético MRS (De Man, Rogosa y Sharpe, 1960) adicionado con lactosa (20 g/L) y Rojo Neutro (24 mg/mL). En leche se presentó buen crecimiento de las bacterias, pero no pueden diferenciarse las colonias con respecto al medio, debido a que presentan el mismo color blanco. En el medio Agar/MRS-lactosa/Rojo neutro se observaron diferencias morfológicas entre colonias de cepas filantes y no filantes, tanto para *Streptococcus thermophilus* como para *Lactobacillus bulgaricus*. Las colonias de cepas filantes en ambas bacterias generalmente se observan pequeñas, circulares, lisas, con absorción intensa del colorante en la parte central, mientras que en la cepa no filante de *Streptococcus thermophilus* ST 233, se observan colonias lisas un poco más grandes, sin adsorber el colorante en forma tan intensa, y en la cepa no filante de *Lactobacillus bulgaricus* EM B 13, las colonias se presentan grandes, rugosas e irregulares. Este dato es importante, puesto que diferentes autores han reportado la incapacidad de continuar con los trabajos para determinar características genéticas específicas de las cepas productoras de polímeros, debido a la falta de un método de selección de colonias filantes (Vescovo et al, 1989).

Puede mencionarse que un aporte de este estudio es que se logró diseñar un procedimiento con el cual pueden diferenciarse macroscópicamente colonias filantes y no filantes en las cepas de bacterias de yoghurt empleadas. Esto es importante debido a que en estudios de transferencia de información genética de una cepa a otra, es necesario lograr reconocer colonias con la capacidad de producir el fenotipo filante o mucóide.

Se ha propuesto en diversos tipos de bacterias la utilización de colorantes en la identificación de polisacáridos exocelulares, y de polímeros de carbohidratos en general. Así, se ha empleado el colorante Rojo Congo en la cuantificación de actividades xilanolíticas (Capalash et al, 1990), el Rojo Neutro se ha empleado en la detección de *Salmonella*, (Pettipher y Watts, 1989), y el Rojo de Rutenio se ha empleado para medir polisacáridos exocelulares en flóculos de lodos activados (Figueroa y Silverstein, 1989).

Con base en lo anterior, se probaron estos tres colorantes para lograr diferenciar colonias productoras de polisacáridos exocelulares. El Rojo Congo no se empleó debido a que proporciona una coloración deficiente, y el Rojo de Rutenio se descartó en vista de que inhibe el crecimiento celular. El colorante que produjo los mejores resultados fué el Rojo Neutro, el cual se utilizó durante este proyecto.

Por otra parte, anteriormente se ha reportado la utilización de un medio de diferenciación para *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, basado en el agar TPYE, compuesto principalmente por Triptona, Fitona, Extracto de levadura y Erioglaucina. Con este agar, se encuentran diferencias

morfológicas y de color, con base en la utilización de carbohidratos, azul claro para *Streptococcus thermophilus* y azul oscuro para *Lactobacillus bulgaricus*, lo cual permite la identificación de estas dos especies bacterianas, pero no se permite la diferenciación entre cepas filantes y no filantes (Millard et al, 1990).

La morfología colonial que presentan las distintas cepas puede observarse en las Figuras 1 y 2.

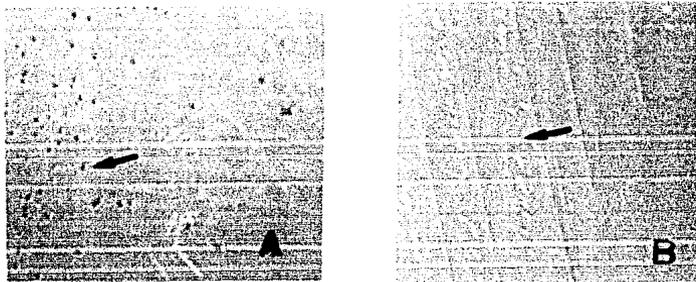


FIGURA 1. Morfología colonial de las cepas de *Streptococcus thermophilus*, en Agar/MRS-Lactosa/Rojo Neutro. A) Cepa NCFB 859, Filante, Colonias circulares, lisas, con absorción intensa del colorante en la parte central; B) Cepa ST 233, No Filante, Colonias circulares, lisas, sin absorción del colorante en la parte central. En ambas cepas la morfología es típica.

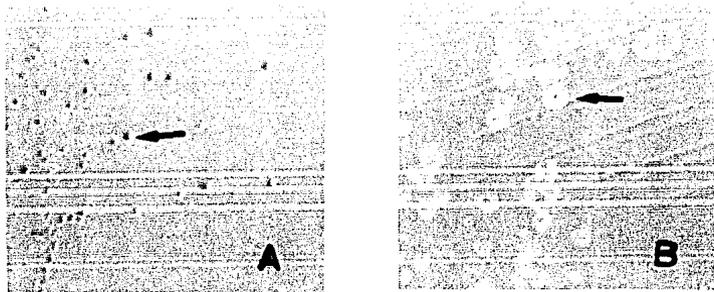


FIGURA 2. Morfología colonial de las cepas de *Lactobacillus bulgaricus*, creciendo en Agar/MRS-Lactosa/Rojo Neutro. A) Cepa NCFB 2772, Filante, Colonias circulares, lisas, con absorción intensa del colorante en la parte central; B) Cepa BM B 13, No Filante, Colonias irregulares, rugosas, sin absorción del colorante en la parte central. La morfología colonial típica de la especie es similar a la cepa BM B 13 No Filante.

b) Identificación microscópica de las cepas.

Con el objeto de conocer las características morfológicas de las células en las distintas cepas de bacterias lácticas, se procedió al análisis microscópico de las mismas. La descripción microscópica se llevó a cabo con dos finalidades específicas, por una parte la visualización de células productoras de polisacáridos, y por otra como parte de la identificación de las mismas.

La cepa de *Streptococcus thermophilus* NCFB 859 o cepa filante, se observa como cocos blancos o translúcidos, que forman cadenas alargadas. Pueden observarse cadenas más cortas, pero esto depende de la edad del cultivo. Si se utiliza como colorante de contraste el Rojo neutro en una preparación fresca, se distingue la adsorción del colorante en la superficie celular, y si el cultivo se realiza en medio MRS con lactosa, es posible ver que algunas bacterias producen una cápsula a su alrededor, y pueden observarse de un volumen mayor que otras bacterias cercanas, inclusive dentro de la misma cadena. La morfología celular de esta cepa se observa en la Figura 3A.

Las células de la cepa de *Streptococcus thermophilus* ST 233, que corresponde a la cepa no filante se observan como cocos blancos o translúcidos, generalmente en pares o en cadenas cortas de 3 a 6 bacterias, lo cual puede depender de la edad del cultivo. Si se coloca Rojo neutro en la preparación, no se observa la adsorción del colorante en las bacterias. Si el cultivo se realiza en MRS con lactosa, se encuentra que las cadenas pueden ser un poco más largas, pero no se observan bacterias de mayor grosor. La morfología celular de esta cepa se presenta en la Figura 3B.

Las células de las cepas de *Streptococcus thermophilus* NCFB 573 o cepa tipo, y NCFB 2075 aislada de yoghurt comercial, forman cadenas medianas o alargadas de cocos, similar a lo que se presenta en la cepa filante, y al crecer en medio MRS con lactosa no se detecta la presencia de bacterias de mayor grosor.

Las células de la cepa de *Lactobacillus bulgaricus* NCFB 2772, que corresponde a la cepa filante, se observan como bacilos cortos, los cuales presentan una mayor longitud cuando el cultivo es más antiguo. Cuando se adiciona Rojo neutro en la preparación, algunas bacterias pueden adsorber el colorante en su superficie, y si el cultivo se hace en MRS con lactosa, entonces pueden encontrarse algunas bacterias de mayor grosor, y curvas, que forman una estructura a su alrededor. La morfología de las células se encuentra en la Figura 4A.

Las células de la cepa EM B 13 de *Lactobacillus bulgaricus* no filante, se observan como bacilos cortos y también presentan una mayor longitud al aumentar la edad del cultivo. Si se cultiva en MRS con lactosa, no se observa la presencia de bacterias con mayor grosor. La morfología celular se observa en la Figura 4B.

La cepa NCFB 1489 o cepa tipo de *Lactobacillus bulgaricus*, y la cepa NCFB 2074 aislada de yoghurt comercial, se observan como bacilos cortos o medianos, sin encontrar bacterias de mayor grosor al crecer el cultivo en medio MRS con lactosa.

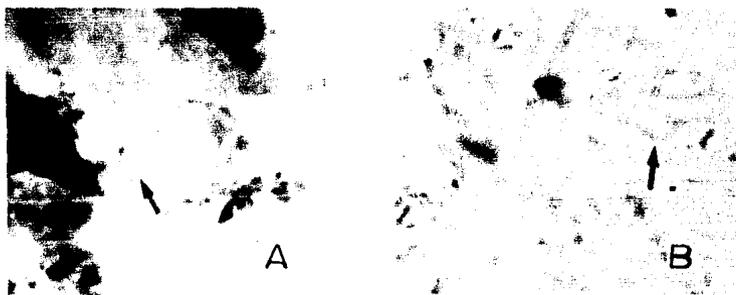


FIGURA 3. Morfología microscópica de las cepas de *Streptococcus thermophilus*. Preparaciones frescas con colorante Rojo Neutro. Objetivo 100X; A) Cepa NCFB 859 Filante, cadenas largas de cocos; B) Cepa ST 233 No Filante, cocos en cadenas cortas o pares.



FIGURA 4. Morfología microscópica de las cepas de *Lactobacillus bulgaricus*. Preparaciones frescas con colorante Rojo Neutro. Objetivo 100X. A) Cepa NCFB 2772 Filante, bacilos cortos, largos, curvos; B) Cepa BM B 13 No Filante, bacilos cortos o largos.

Las células observadas en cada una de las distintas cepas, corresponden a lo descrito para cada una de las cepas en estudio (Buchanan y Gibbons, 1974; Sneath et al, 1986).

Aparentemente las diferencias microscópicas observadas entre las diferentes cepas, no dependen de la capacidad de producir polímeros exocelulares por parte de ellas. De esta manera, la presencia de cadenas alargadas de cocos entre las diferentes cepas de *Streptococcus thermophilus*, no es exclusiva de la cepa filante, así como tampoco lo es el largo de las bacterias entre las cepas de *Lactobacillus bulgaricus*.

Sin embargo durante las observaciones al microscopio de las cepas filantes creciendo en el medio MRS con una alta proporción de lactosa, pueden distinguirse células de mayor grosor en la población, que probablemente indican la presencia de polisacáridos exocelulares alrededor de ellas.

Con base en lo anterior, puede decirse que hasta el momento no es posible contar con un método de diferenciación microscópica entre cepas filantes y no filantes de las cepas empleadas.

c) Fermentación de carbohidratos.

Las pruebas de fermentación de carbohidratos se realizaron con la finalidad de conocer la capacidad de las diferentes cepas para degradar distintos azúcares, empleados como fuente de Carbono. Los patrones de fermentación se consideran importantes en la identificación de las cepas bacterianas.

Se probaron diferentes azúcares como fuente de carbono para distintas cepas. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6.

CEPAS	AZUCARES ^a								
<i>Streptococcus thermophilus</i>									
	GLU	LAC	GAL	FRU	SAC	MAL	MAN	XIL	ARA
NCFB 859	-	+	-	-	-	-	-	-	-
NCFB 573	+	+	-	+	+	-	-	-	-
NCFB 2075	+	+	-	+	+	-	-	-	-
ST 233	+	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>									
NCFB 2772	+	+	d	+	-	d	-	-	-
NCFB 1489	+	+	d	-	-	d	-	-	-
NCFB 2074	+	+	-	-	-	d	-	-	-
EM B 13	+	+	+	-	-	d	-	-	-

TABLA 6. Fermentación de carbohidratos para cada una de las cepas de estudio. a) GLU=GLUCOSA, LAC=LACTOSA, GAL=GALACTOSA, FRU=FRUCTOSA, SAC=SACAROSA, MAL=MALTOSA, MAN=MANOSA, XIL=XILOSA y ARA=ARABINOSA. (-) = no hay reacción; (+) = reacción positiva; (d) = reacción débil o retardada.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la fermentación de carbohidratos, las cepas de *Streptococcus thermophilus* NCFB 573 o cepa tipo, NCFB 2075 o cepa comercial, y ST 233 no filante, presentan el mismo patrón de fermentación de carbohidratos, reportado para esta cepa (Sneath et al, 1988). Es importante hacer notar que la cepa de *Streptococcus thermophilus* NCFB 859 filante, no es capaz de utilizar los azúcares característicos de la especie bacteriana, por presentar problemas con el transporte de azúcares hacia el interior de la célula, lo cual quedó demostrado en un experimento posterior, al permeabilizar las células con $MgCl_2$ o $CaCl_2$ en el medio. Las células permeabilizadas de esta cepa son capaces de utilizar la glucosa, lactosa, fructosa y sacarosa como fuente de Carbono, al igual que las otras cepas. Así mismo, debe considerarse que no todas las cepas de una especie bacteriana, presentan un patrón único de fermentación, característico de la especie. Cuando se describe en los manuales de clasificación que una especie tiene la capacidad de fermentar un sustrato específico, se considera que aproximadamente el 90 % de las cepas pueden fermentarlo, pero no todas las cepas lo pueden fermentar.

Por lo anterior, puede pensarse como una hipótesis que la lactosa penetra a la célula por algún mecanismo de transporte en *Streptococcus thermophilus*, en donde es hidrolizada. Una fracción de la glucosa obtenida es utilizada por la célula y otra fracción es expulsada hacia el exterior junto con la galactosa, la cual no puede metabolizar, y forma al mismo tiempo el polímero exocelular.

Con respecto a las cepas de *Lactobacillus bulgaricus*, la única que presenta el patrón característico de la especie bacteriana es la cepa filante NCFB 2772. Las cepas NCFB 1489 o tipo, NCFB 2074 comercial, y la cepa BM B 13 no filante, no presentan el patrón de fermentación característico de la especie, aunque tampoco puede relacionarse con ninguna otra especie del género *Lactobacillus*. Sin embargo, debe considerarse que las pruebas bioquímicas no proporcionan una prueba irrefutable en cuanto a la clasificación, sino que también deben tomarse en cuenta otros criterios como experimentos de hibridación de DNA, y contenido de G + C en el DNA. Se considera que las cepas han sido catalogadas adecuadamente en las colecciones de las cuales se obtuvieron. Existe interés en clasificar positivamente a la cepa BM B 13 como *Lactobacillus bulgaricus*, debido a sus características genéticas, como se describe posteriormente.

d) Medición del polisacárido exocelular.

La producción de polisacárido en cultivos en leche se observó subjetivamente por la capacidad de estos para formar filamentos al momento de tocar el medio de cultivo con algún objeto.

La cuantificación de la producción del polisacárido exocelular se realizó por la técnica de Haze Assay (García-Garibay, 1985). Cuando se empleó como medio de fermentación el MRS-lactosa, la determinación presentó una gran variabilidad, debido a la

presencia misma de lactosa. Por otra parte, cuando se utilizo leche como medio de fermentación, sí pudo realizarse la cuantificación de la producción del polisacárido. Los valores máximos de producción obtenidos para las distintas cepas se observan en la Tabla 7.

BACTERIA	CEPA	CAPACIDAD DE PRODUCIR PSE ^a	PSE ^a PRODUCIDO (eq. mg Dx/mL) ^b	DIFERENCIA ^c ESTADISTICA
<i>S. thermophilus</i>	NCFB 859	Filante	0.05	No
<i>S. thermophilus</i>	ST 233	No Filante	0.05	No
<i>S. thermophilus</i>	NCFB 573	No Filante	0.05	No
<i>S. thermophilus</i>	NCFB 2075	No Filante	0.05	No
<i>L. bulgaricus</i>	NCFB 2772	Filante	0.18	No
<i>L. bulgaricus</i>	BM B 13	No Filante	0.06	Si
<i>L. bulgaricus</i>	NCFB 1489	No Filante	0.05	Si
<i>L. bulgaricus</i>	NCFB 2074	No Filante	0.05	Si

TABLA 7. Cuantificación de la producción del polisacárido exocelular en cada una de las cepas en estudio, por medio del ensayo de Haze Assay (García-Garibay, 1985).

(a) PSE = Polisacárido Extracelular.

(b) eq. mg Dx/mL = equivalentes miligramo de Dextrana/mL de medio (Leche).

(c) Las diferencias estadísticas son con relación a la producción de PSE de la cepa filante. alfa < 0.05

Para las diferentes cepas de *Lactobacillus bulgaricus*, se encontró lo siguiente: En la cepa filante NCFB 2772 se cuantificó una producción máxima de 0.18 equivalentes mg de Dextrana/ml (eq. mg Dextrana/mL), mientras que para las cepas no filantes BM B 13, NCFB 1489 y NCFB 2074, solamente se cuantificó como máximo una tercera parte de la producción, es decir 0.06 eq. mg Dextrana/mL. Ya se ha reportado anteriormente que diversas cepas no filantes o no mucoides de bacterias lácticas pueden presentar valores de producción de polímeros, aunque aun no se conoce la razón por la que ocurre esto, y por lo tanto no es raro que las cepas no filantes de las bacterias en estudio también presenten valores específicos de producción (Cerning, 1990).

En *Streptococcus thermophilus* no se encontraron diferencias cuantitativas en la determinación del polímero exocelular entre las diferentes cepas por el método de Haze Assay, incluyendo a la cepa filante. Sin embargo, subjetivamente sí se han encontrado diferencias entre las cepas. La cepa NCFB 859 o filante, tiene la capacidad de formar filamentos al crecer en un medio líquido, y de acuerdo a la forma en que se describen las cepas filantes, esta cepa puede ser considerada como productora de polisacáridos exocelulares.

En vista de las dificultades en la cuantificación del polisacárido exocelular, se desarrolló una técnica de cuantificación del polímero para la cepa de *Streptococcus thermophilus* NCFB 859. Esta técnica propone lo siguiente: Emplear 30 ml de leche fermentada, hidrolizar con 5 mL de TCA al 80 %, y centrifugar a 5,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se dializa durante 12 horas contra agua destilada y se cuantifica la cantidad de azúcares totales (Dubois, 1956).

Con esta técnica, actualmente se ha logrado determinar los valores máximos de producción y la curva de estabilidad en la producción de polisacárido exocelular para las distintas cepas de *Streptococcus thermophilus* (Escalante et al, 1991).

La cepa filante de *Streptococcus thermophilus* NCFB 859, presenta un valor máximo de producción de polisacáridos de 0.016 eq. mg de Glucosa/mL por esta técnica. Subjetivamente, también se encontró un aumento en la viscosidad del medio. La cepa no filante de esta especie ST 233, no presentó valores de producción similares a la cepa filante, ni tampoco se observó un aumento en la viscosidad del medio.

Los valores de producción de polisacáridos exocelulares para las distintas cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, por la técnica de Escalante y col., se presentan en la Tabla 8.

MUESTRA	AZUCARES TOTALES (eq. mg de Glucosa/mL medio)			DIFERENCIA ESTADISTICA
	1	2	3	
CONTROL NEGATIVO (Leche)	0.055	0.0086	0.0098	Si
CONTROL POSITIVO (Leche + Dextrana)	0.069	0.0023	0.0155	No
<i>L. bulgaricus</i> NCFB 2772 (Filante)	0.063	0.0016	0.013	No
<i>L. bulgaricus</i> EM B 13 (No Filante)	0.053	0.0035	0.0098	Si
<i>S. thermophilus</i> NCFB 859 (Filante)	0.060	0.0016	0.016	No
<i>S. thermophilus</i> ST 233 (No Filante)	0.053	0.009	0.0067	Si

TABLA 8. Producción de Polisacáridos por la técnica de Escalante y col. (1991). (1) = Sobrenadante; (2) = Líquido de Diálisis; (3) = Muestras Dializadas. Las diferencias estadísticas son con respecto a la producción de las cepas filantes. alfa < 0.05

Con base en los resultados obtenidos, se observa que siguiendo esta técnica, puede cuantificarse la producción de polisacáridos exocelulares en la cepa filante de *Streptococcus thermophilus* NCFB 859, y es significativamente diferente a los valores obtenidos por las cepas no filantes de esta misma especie. Así mismo, puede detectarse la presencia de un polisacárido-como la dextrana en leche, a una concentración de 10 mg/L.

e) Estabilidad en la producción de polisacáridos exocelulares.

La inestabilidad en la producción de polisacáridos exocelulares solamente se describe para cultivos de las cepas filantes creciendo en leche 11 %.

La cepa filante o mucóide de *Lactobacillus bulgaricus* NCFB 2772 requiere de cuatro resiembras para reactivarse, a partir del momento en que se abre un liofilizado. Durante la primera resiembra se encuentran valores similares a los generados por las cepas no filantes, de aproximadamente 0.06 eq. mg Dextrana/mL, y no forma filamentos al tocar el medio de crecimiento, durante las siguientes dos resiembras se observa un incremento gradual en la producción de polisacárido, y en la cuarta resiembra se presenta el valor máximo de producción del mismo, que corresponde a 0.18 eq. mg de Dextrana/mL, y es el momento en que debe liofilizarse la cepa para conservar la característica. A partir de esta resiembra, se observa que el valor de producción disminuye conforme al número de resiembras hasta alcanzar el valor mínimo de producción de 0.06 eq. mg de Dextrana/mL en la octava resiembra. Los valores obtenidos pueden observarse en la Figura 5

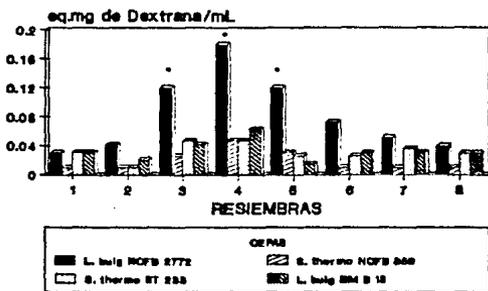


FIGURA 5. Gráfica que muestra la producción de polisacáridos exocelulares en *Lactobacillus bulgaricus* y de *Streptococcus thermophilus*, con respecto a las resiembras del cultivo. Los ensayos fueron realizados por la técnica de Haze Assay (García-Garibay, 1985). * = Diferencia significativa, alfa < 0.05

Entre las distintas cepas de *Streptococcus thermophilus* no fué posible encontrar diferencias en la producción de polisacáridos exocelulares al emplear la técnica de Haze Assay, debido principalmente a la incapacidad de producir turbidez en el medio al no presentarse la precipitación del polímero por efecto del alcohol absoluto. Sin embargo, visualmente la cepa filante se identificó por su capacidad de formar filamentos en el medio, la cual es una característica que se pierde conforme al tiempo. Esto fué confirmado cuantitativamente, con la técnica propuesta por Escalante y col., (1991), en donde se demostró la inestabilidad en la producción del polímero para la misma cepa NCFB 859.

Mediante esta técnica se ha encontrado que en la cepa NCFB 859 de *Streptococcus thermophilus* se presenta un comportamiento similar al de la cepa NCFB 2772 de *Lactobacillus bulgaricus*, en cuanto a que se requiere de una serie de resiembras para obtener la reactivación de la cepa, hasta alcanzar el valor máximo de producción del polímero, para descender posteriormente conforme se realizan resiembras. Lo anteriormente descrito puede observarse en la Figura 6 (En colaboración con Escalante y col., 1991).

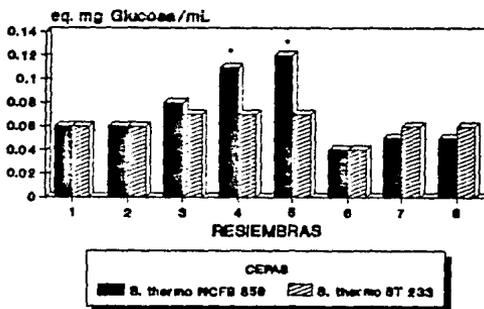


FIGURA 6. Gráfica de inestabilidad en la producción de polisacáridos exocelulares en las cepas de *Streptococcus thermophilus* NCFB 859, filante y ST 233, no filante, mediante la técnica propuesta por Escalante y col., 1991.
* = Diferencia significativa, alfa < 0.05

Por otra parte, se ha observado que es posible mantener a las cepas productoras de polisacáridos exocelulares con un nivel elevado de producción, por medio de la selección de colonias capaces de generar el polisacárido exocelular cuando éstas crecen en cajas con Agar/MRS-lactosa/Rojo neutro en condiciones adecuadas, y propagándolas posteriormente en leche.

Con base en los resultados obtenidos, puede asegurarse que la producción del polímero es inestable en cultivos de las dos cepas filantes que se han trabajado, tanto la de *Lactobacillus bulgaricus* NCFB 2772 como la de *Streptococcus thermophilus* NCFB 859, y que esta característica puede perderse debido a las resiembras de las cepas.

f) Extracción de plásmidos en bacterias del yoghurt.

Al emplear la técnica de Somkuti y Steinberg (1986), se detectó la presencia de DNA de alto peso molecular, que corresponde al DNA cromosomal en cada una de las cepas, y también se observó que la cepa no filante de *Streptococcus thermophilus* ST 233 presenta un plásmido de 3.66 Kb, y la cepa no filante de *Lactobacillus bulgaricus* BM B 13, presenta dos plásmidos de 1.77 Kb y 3.71 Kb, respectivamente. Los resultados se presentan en la Figura 7.

Para las demás cepas empleadas de las bacterias *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, incluyendo a las cepas filantes de ambas especies, solamente se encontró una banda que pertenece al DNA cromosomal pero no se localizaron plásmidos. Los resultados se presentan en la Figura 7.

Mediante la técnica de Anderson y McKay (1983), solamente se localizó un plásmido en la cepa BM B 13 (3.71 Kb), y no se localizó el plásmido de la cepa ST 233. También, debe considerarse que no se empleó ninguna técnica para evidenciar plásmidos de elevado peso molecular, de más de 100 Kb, y por lo tanto las conclusiones de este proyecto se mencionan solamente para plásmidos de hasta 20 Kb.

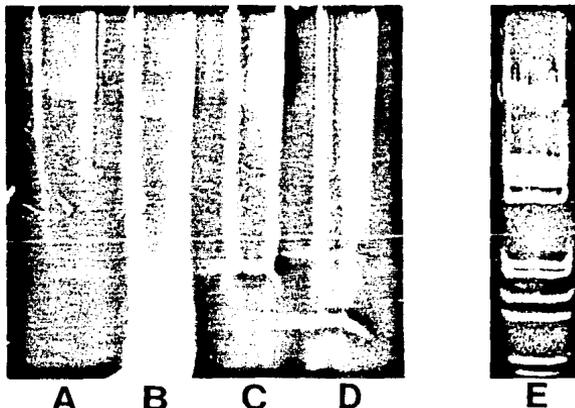


FIGURA 7. Electroforesis de DNA de las bacterias empleadas en este estudio. *Streptococcus thermophilus*: A) NCFB 859, Filante; C) ST 233, No Filante (3.66 Kb); *Lactobacillus bulgaricus*: B) NCFB 2772, Filante; D) BM B 13, No Filante (1.77 y 3.71 Kb); E) lambda digerido con EcoRI/HindIII.

El peso molecular de los plásmidos de las bacterias en estudio se obtuvo al relacionar el coeficiente de migración de las bandas de DNA en el gel de electroforesis, con respecto al peso molecular del DNA del fago lambda digerido con las endonucleasas de restricción EcoRI y HindIII. El peso molecular de las bandas que se obtienen por la digestión del fago se mencionan en la Tabla 9.

Banda	Peso Molecular (Kb)
I	21.22
II	5.14
III	4.97
IV	4.26
V	3.53
VI	2.02
VII	1.90
VIII	1.50
IX	1.30
X	0.97
XI	0.83
XII	0.564
XIII	0.125

TABLA 9. Peso molecular de las bandas obtenidas al digerir el DNA del fago lambda con las endonucleasas de restricción EcoRI y HindIII.

Debido a que el DNA del fago digerido con enzimas de restricción se encuentra linearizado, su coeficiente de migración es diferente al de los plásmidos, los cuales se encuentran en forma circular, por lo tanto con objeto de conocer el peso molecular de los mismos, se relacionó el coeficiente de migración de diferentes plásmidos empleados como vectores en bacterias lácticas de los cuales se conoce su peso, con el peso del DNA del fago digerido, y con los plásmidos de las cepas de este estudio. La relación de los pesos moleculares de los plásmidos utilizados se menciona en la Tabla 10, y se muestra en la Figura 8.

Plásmido	Peso Molecular	
	(Kb)	(MDa)
1 pUC18	2.686	1.719
2 pLZ12	3.75	2.4
3 pGK12	4.4	2.816
4 pLP825	7.2	4.608
5 pJO7	11.5	7.36

TABLA 10. Peso molecular de los plásmidos que se han empleado como vectores en bacterias lácticas, con los que se relacionó el peso molecular del fago lambda. 1 Kb = 0.64 Md.

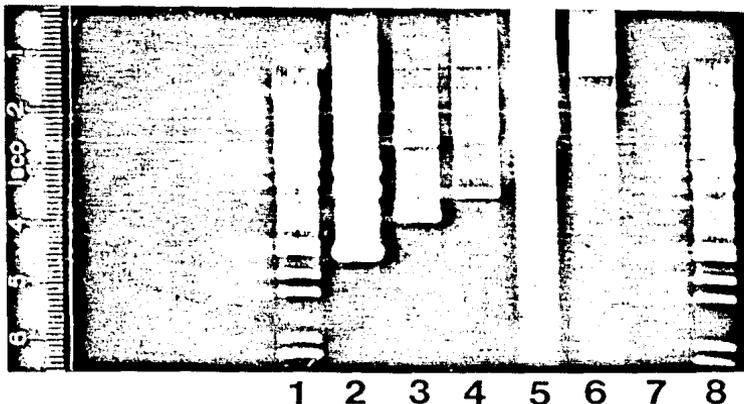


FIGURA 8. Electroforesis de DNA de los plásmidos empleados como patrón de peso molecular. Carriles: 1) y 8) fago lambda digerido EcoRI/HindIII; 2) pUC18; 3) pLZ12; 4) pGK12; 5) pLP825; 6) pJ07; 7) pST233.

Por otra parte, la extracción de DNA de la cepa filante de *Lactobacillus bulgaricus* NCFB 2772, representó un problema puesto que el DNA se fragmenta muy fácilmente al seguir el procedimiento de extracción de Somkuti y Steinberg (1986). Después de probar diferentes modificaciones en el protocolo de extracción, se solucionó este problema lavando las células en metanol absoluto inmediatamente después de colectarlas por centrifugación al término de la incubación, y como un paso previo a la realización del protocolo de extracción.

Con base en los resultados obtenidos en las extracciones de DNA plasmídico de las bacterias en estudio, se observa que para las cepas de *Streptococcus thermophilus*, solamente en la cepa ST 233 puede detectarse la presencia de un plásmido (3.66 Kb), mientras que en las otras cepas no se detectó la presencia de DNA plasmídico, y también pudo comprobarse que lo anterior no se debe a una concentración baja de DNA en las muestras, puesto que se hicieron puebas en donde se concentró el DNA de las muestras, y se sobrecargó el gel de electroforesis. Lo anteriormente descrito, está de acuerdo con lo reportado en la literatura en donde se menciona que existe una pequeña proporción de cepas de esta especie que presentan plásmidos, y que generalmente se presentan uno o dos plásmidos por cepa (Herman y McKay, 1985; Somkuti y Steinberg, 1988).

Con respecto a las cepas de *Lactobacillus bulgaricus* existe una amplia controversia en cuanto a si pueden o no encontrarse plásmidos en esta especie bacteriana. De esta manera, existen investigadores que opinan, con base en su propia experiencia, que en las diferentes especies de *Lactobacillus bulgaricus* no existen

plásmidos (Chassy, Comunicación personal), y también existen reportes en los que se menciona la presencia de uno o dos plásmidos en cepas específicas de esta especie bacteriana (Chagnaud et al, 1990; Somkuti y Steinberg, 1986).

De las cepas de *Lactobacillus bulgaricus* empleadas en este proyecto, solamente en la cepa BM B 13 pudo detectarse la presencia de DNA plasmídico. Se considera que son dos plásmidos (1.77 y 3.71 Kb) distintos, y no isoformas de uno solo. En las otras cepas empleadas, no se detectó DNA plasmídico.

No obstante, los resultados de las pruebas bioquímicas hacen pensar que la cepa BM B 13 pudiera estar ubicada taxonómicamente en forma errónea, aunque esto puede ser discutible.

Con base en lo anterior, se ha comprobado que las cepas filantes de *Streptococcus thermophilus* NCFB 859 y de *Lactobacillus bulgaricus* NCFB 2772 no presentan plásmidos, y por lo tanto la característica filante no se encuentra codificada en plásmidos, como había sido planteado como hipótesis del proyecto, y también como se encuentra reportado para otras bacterias lácticas filantes, como *Streptococcus lactis* y *Streptococcus cremoris* pertenecientes al grupo N de Lancefield, y para *Lactobacillus casei* ssp. *casei* (Vedamuthu y Neville, 1986; Vescovo et al, 1989; y von Wright y Tynkkynnen, 1987), y por lo tanto puede pensarse en una codificación a nivel cromosomal.

g) Curación de las cepas ST 233 y BM B 13.

A pesar de que los resultados obtenidos sugieren que la codificación de la característica se localiza a nivel cromosomal, llama la atención la presencia de plásmidos en las cepas no filantes de ambas especies bacterianas.

Los experimentos de curación de las cepas de *Streptococcus thermophilus* ST 233 y de *Lactobacillus bulgaricus* BM B 13, se realizaron pensando en que los plásmidos que se encuentran en las cepas no filantes pueden codificar moléculas que intervienen en los mecanismos de regulación de la producción de polisacáridos exocelulares, como se ha descrito en otros géneros bacterianos (Whitfield, 1988). Por lo tanto, se procedió a eliminar estos plásmidos por curación, y observar el efecto de éste en la producción de polisacáridos exocelulares.

Primero se trabajó con la cepa ST 233 de *Streptococcus thermophilus*, y posteriormente con la cepa BM B 13 de *Lactobacillus bulgaricus*. La curación se intentó empleando distintos métodos.

En primer lugar, se intentó la curación mediante el empleo de temperaturas subletales, sin éxito. Posteriormente se intentó la curación por electroporación bajo diferentes condiciones, sin conseguir la curación de la cepa.

Las condiciones de electroporación probadas se muestran en la Tabla 4 del capítulo VIII.

Finalmente se intentó la curación con agentes químicos curantes, en primer lugar con el empleo de Bromuro de etidio, posteriormente acriflavina y por último Novobiocina, los cuales ya se han utilizado con éxito en diferentes géneros bacterianos (Barbour y Elkan, 1989; von Wright y Tynkkyinen, 1987; Vedamuthu y Neville, 1986).

En la literatura se reportan curaciones exitosas en bacterias lácticas empleando Bromuro de etidio a una concentración de 2 ug/mL. Se probaron diferentes concentraciones desde 0 hasta 4 ug/mL, sin lograr la curación de la cepa. También se empleó Acriflavina en un rango de concentración entre 0 y 100 ug/mL, sin lograr la curación de la cepa. Finalmente, al utilizar Novobiocina en un rango entre 0 y 5 ug/mL sí se lograron obtener colonias curadas a partir de una concentración de 1.0 ug de Novobiocina/mL de medio. Una concentración mayor a 2.5 ug/mL es letal para las bacterias.

Se aislaron aproximadamente 30 colonias curadas en tres experimentos diferentes, obtenidas a partir de concentraciones crecientes de Novobiocina. Estas colonias, no presentaron diferencias morfológicas microscópicas ni macroscópicas en comparación con las colonias control no curadas. La curación se comprobó realizando la extracción de plásmidos y la electroforesis del DNA extraído y concentrado.

La cepa de *Lactobacillus bulgaricus* BM B 13 no filante, fué curada de sus dos plásmidos en las mismas condiciones que la cepa de *Streptococcus thermophilus* ST 233, al emplear Novobiocina como agente curante, a partir de una concentración de 1.0 ug/mL de medio. En esta cepa, igualmente no se afectó la morfología macroscópica, ni tampoco la morfología microscópica. Los resultados se observan en las Figuras 9 y 10.

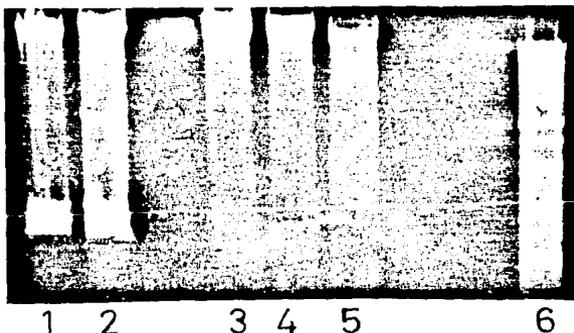


FIGURA 9. Electroforesis de DNA de las colonias curadas con Novobiocina 2-5 ug/mL. Colonias aisladas de la cepa de *Streptococcus thermophilus* ST 233: 1) Control (3.66Kb); 2) Colonia no curada; Colonias curadas con Novobiocina, 3) 1.5 ug/mL; 4) 2.0 ug/mL y 5) 2.5 ug/mL; 6) lambda digerido EcoRI/HindIII.



1 2 3 4 5 6

FIGURA 10. Electroforesis de DNA de las colonias curadas y no curadas con Novobiocina 2-5 ug/mL, de la cepa de *Lactobacillus bulgaricus* EM B 13: 6) Control (1.77 y 3.71 Kb); Colonias curadas con Novobiocina (ug/mL) 1) 1.0, 2) 1.5, 3) 2.0, 4) 2.5; 5) Cepa de *Streptococcus thermophilus* ST 233 (3.66 Kb)

La producción de polisacáridos exocelulares de las colonias curadas con respecto a las cepas no curadas se midieron por las técnicas de cuantificación propuestas. Los resultados se presentan en la Tabla 11.

MUESTRA	PRODUCCION DE PSE ^a	DIFERENCIA ^b ESTADISTICA
<i>S. thermophilus</i> NCFB 859 Filante ^c	0.016 ^e	No
<i>L. bulgaricus</i> NCFB 2772 Filante ^d	0.18 ^f	No
<i>S. thermophilus</i> ST 233 No Filante ^c	0.006 ^e	Si
<i>L. bulgaricus</i> EM B 13 No Filante ^d	0.06 ^f	Si
<i>S. thermophilus</i> ST 233 Curadas ^c	0.005 ^{e,g}	Si
<i>L. bulgaricus</i> EM B 13 Curadas ^d	0.06 ^{f,g}	Si

TABLA 11. Producción de polisacáridos exocelulares en cepas curadas y no curadas. a) PSE = Polisacárido exocelular; b) Diferencia con respecto a la cepa filante de cada especie, alfa < 0.05 ; Técnica de Escalante y col., (1991); d) Técnica de Haze Assay (García-Garibay, 1985); e) eq. mg Glucosa/mL; f) eq. mg Dextrana/mL; g) Valor de producción obtenido en todas las colonias curadas.

Con base en lo anterior, después de haber sido obtenidas distintas colonias curadas, no se encontró en ellas ninguna modificación en cuanto a la producción de polisacáridos exocelulares, lo cual indica que la presencia de plásmidos en las cepas no filantes de las especies bacterianas estudiadas, no está relacionada con la característica filante.

h) Transformación de la cepa de *Streptococcus thermophilus* NCFB 859.

Con base en los resultados obtenidos previamente, se pensó en la posibilidad de considerar la presencia de plásmidos en las bacterias del yoghurt como una característica que pudiera servir para identificar cepas no filantes.

Por otra parte, se intentó investigar el efecto de la introducción de plásmidos pertenecientes a cepas no filantes, empleando como células receptoras cepas filantes de la misma especie bacteriana, y que esto pudiera tener un efecto en la producción de polisacáridos exocelulares

Para conocer lo anterior se procedió a realizar la transformación de la cepa de *Streptococcus thermophilus* NCFB 859 con el plásmido pGK12 y el plásmido de la cepa no filante de *Streptococcus thermophilus* ST 233, denominado internamente en el laboratorio como pST233, mediante la técnica de electroporación.

El plásmido pGK12 (4.4Kb) es pequeño, se ha empleado como vector de clonación en bacterias lácticas puesto que se aisló del género *Streptococcus*, y como consecuencia podrían evitarse tanto fenómenos de incompatibilidad de material genético, como reacciones enzimáticas en donde el plásmido sea degradado por mecanismos de Modificación/Restricción. Al mismo tiempo, se conoce el mapa de restricción del plásmido, y presenta en su estructura la codificación que confiere resistencia a cloranfenicol y a eritromicina. El cloranfenicol se empleó como marcador de resistencia y como una característica de selección.

El plásmido pST233 es criptico, no se ha realizado el mapa de restricción del mismo, tiene un peso molecular de 3.66 Kb, y de acuerdo a los antecedentes que se tienen de plásmidos en *Streptococcus thermophilus*, podría ser considerado similar o igual al plásmido pER36 (3.7Kb), descrito por Somkuti y Steinberg (1986), o al plásmido pHMS (3.5Kb), descrito por Herman y McKay (1985). Este plásmido no presenta ninguna característica de selección, y solamente se tomaron colonias al azar para comprobar la presencia o no del plásmido. Esta metodología no es recomendable debido a las bajas frecuencias de transformación de las cepas de *Streptococcus thermophilus*, aún con la técnica de electroporación.

Una vez que se probaron distintas condiciones en el

procedimiento de electroporación, tal y como se describe previamente en el capítulo VIII, no se ha logrado hasta el momento la transformación de la cepa de *Streptococcus thermophilus* NCFB 859 con ninguno de los dos plásmidos, el plásmido pGK12 y el plásmido pST233.

Actualmente se están comenzando los experimentos de transformación, y se está empleando como vector el plásmido pV736, aislado a partir de *Streptococcus sanguis*, el cual ya ha sido utilizado para transformar otras cepas de *Streptococcus thermophilus* por electroporación (Somkuti y Steinberg, 1988).

Es necesario hacer notar que los plásmidos que se han encontrado en distintas cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* permanecen como cripticos, puesto que no se les ha podido relacionar con ninguna actividad específica, (Herman y McKay, 1985; Somkuti y Steinberg, 1986, y 1988; Chagnaud et al, 1990), e inclusive puede agregarse la característica mucoidé o filante, como se ha demostrado en este proyecto de investigación.

CAPITULO X

Conclusiones y Perspectivas

Con base en los resultados obtenidos, las Conclusiones de este proyecto son las siguientes:

1) El empleo de un medio de cultivo o de crecimiento con lactosa influye de manera importante en la producción de polisacáridos exocelulares en las cepas filantes o mucoides de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, al encontrar que en células de estas cepas, se forma al parecer una estructura exocelular que las hace ver de un mayor grosor cuando son observadas al microscopio, tal y como se ha reportado anteriormente (Teggatz y Morris, 1990).

2) Se desarrolló un método de selección con base en la absorción de colorantes en la superficie celular, como el Rojo Neutro y el Rojo de Rutenio, los cuales pueden unirse a la fracción de polisacáridos de la pared celular en bacterias Gram positivas (Figueroa y Silverstein, 1989; Pettipher y Watts, 1989), y por lo tanto pueden explicarse las diferencias coloniales encontradas entre las distintas cepas.

La característica filante o mucoides en diferentes especies bacterianas, se ha considerado solo en forma subjetiva, al tocar colonias con algún objeto, lo cual representa desventajas metodológicas.

Las diferencias coloniales encontradas entre cepas filantes y no filantes de ambas especies bacterianas, son un elemento importante en la identificación de colonias de bacterias productoras de polisacáridos exocelulares, lo cual es fundamental al tratar de manipular genéticamente las cepas, como se ha establecido anteriormente (Vescovo et al, 1989).

3) Las cepas de *Streptococcus thermophilus* presentan el patrón de fermentación típico de la especie, si bien la cepa filante solamente lo presenta cuando se provoca la permeabilización de las células.

Con respecto a las cepas de *Lactobacillus bulgaricus* solamente la cepa filante presenta el patrón de fermentación típico de la especie, mientras que las demás no lo presentan. En vista de lo anterior, no puede establecerse con certeza que la cepa no filante BM B 13 pertenece a la especie de *Lactobacillus bulgaricus*, de la misma forma que las cepas tipo y comercial de esta especie empleadas en este estudio, lo cual puede resultar contradictorio, pero en vista de que sí contiene plásmidos y hasta el momento sólo en dos reportes se menciona que algunas cepas de esta bacteria contienen plásmidos (Chagnaud et al, 1990; Somkuti y Steinberg, 1986), resultaría interesante conocer en forma definitiva la ubicación taxonómica de la cepa, lo cual ya se está realizando.

4) La producción de polisacáridos exocelulares en la cepa filante de *Lactobacillus bulgaricus* NCFB 2772 por el método de Haze Assay (García-Garibay, 1985), corresponde a tres veces la producida por las cepas no filantes, mientras que para las cepas de *Streptococcus thermophilus* no se han encontrado diferencias en la producción por medio de esta técnica.

Mediante el empleo de la técnica desarrollada por Escalante y col., 1991, sí puede detectarse la producción de polisacáridos exocelulares en la cepa de *Streptococcus thermophilus* NCFB 859

5) Por medio de la observación directa y subjetiva del medio, así como por medio de las técnicas de cuantificación utilizadas, Haze assay (García-Garibay, 1985) y de hidrólisis total (Escalante et al, 1991), se observa que la característica de producción de polisacáridos exocelulares empleando cultivos en leche 11%, de las cepas filantes de las bacterias del yoghurt utilizadas, presenta una variación con respecto a las resiembas del mismo cultivo, y es lo que se ha considerado como una inestabilidad de la producción de estos compuestos.

6) La inestabilidad de las cepas se manifiesta en los siguientes hechos: Al abrir un liofilizado de las cepas no se presenta la característica mucóide o filante, similar a lo que ocurre en otras bacterias lácticas con respecto a otras características, como es la producción de acidez titulable.

Cuando se realizan resiembas de estos cultivos, es posible cuantificar una producción cada vez mayor conforme se resiembraba el microorganismo, hasta la cuarta resiembraba que es en donde se presenta la producción más elevada, para posteriormente descender la producción hasta el nivel mínimo de producción, que se obtiene durante la octava resiembraba. Esto es similar en las dos cepas filantes de las bacterias en estudio, y corresponde también a lo observado subjetivamente en los cultivos, es decir que los cultivos que son capaces de producir una gran cantidad de polisacáridos exocelulares, presentan una mayor viscosidad del medio, y presentan la capacidad de producir filamentos cuando se tocan con algún objeto. La inestabilidad en esta característica ya se ha reportado anteriormente para distintas cepas de bacterias lácticas (Cerning, 1990).

7) La formación del polímero se realiza una vez que el cultivo de las cepas filantes entra en la fase de crecimiento exponencial o logarítmica (Escalante et al, 1991), y puede mantenerse un cultivo productor de polisacáridos exocelulares, mediante la selección de colonias de las cepas filantes creciendo en medio sólido, y su posterior inoculación en leche descremada.

La inestabilidad en la producción de estos compuestos puede ser explicada por diversos mecanismos como son:

a) La eliminación de una fracción de la población capaz de producir el polímero,

b) La codificación de esta característica se encuentra en alguna secuencia de DNA que puede sufrir una alteración, y que como consecuencia deja de producirla.

8) De las cepas en estudio, *Streptococcus thermophilus* ST 233 contiene un solo plásmido (3.66 Kb), y *Lactobacillus bulgaricus* BM B 13 contiene dos plásmidos (1.77 y 3.71 Kb), mientras que las demás cepas no contienen plásmidos, inclusive las cepas filantes o mucoides.

Estos resultados se obtuvieron empleando una técnica en la cual no se sabe si pueden detectarse plásmidos de alto peso molecular, de más de 100 Kb, y por lo tanto puede concluirse que la codificación de la característica de producción del polisacárido exocelular, no se localiza en plásmidos de hasta 20 Kb.

En otras cepas de bacterias lácticas como en *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* y *Lactobacillus casei* se ha relacionado a la producción de polisacáridos exocelulares y por lo tanto el fenotipo mucoides, con plásmidos pequeños (Vedamuthu y Neville, 1986; Vescovo et al, 1989; y von Wright y Tynkkynnen, 1987), lo cual no parece ser el caso de las bacterias empleadas en este estudio.

9) De acuerdo con los experimentos de curación de las cepas no filantes que presentan plásmidos, se llegó a la conclusión de que no existe la regulación en la expresión de la característica filante o mucoides codificada en estos plásmidos, y por lo tanto tampoco puede ser utilizada la presencia o no de plásmidos, como una característica de identificación de cepas no filantes. Los plásmidos que se han encontrado en estas cepas son crípticos.

10) Con respecto a la transformación de la cepa filante de *Streptococcus thermophilus* NCFB 859, no se ha logrado realizarla posiblemente debido a la presencia de endonucleasas de restricción muy activas que degradan el DNA foráneo, conforme penetra a las células, y no permite la expresión de características que puedan ser empleadas por la célula, como son la codificación para resistencia a antibióticos. Esta idea se ha reportado y comprobado anteriormente (Solaiman y Somkuti, 1990).

Las Perspectivas de Investigación que se han generado en este trabajo a partir del trabajo experimental realizado, se mencionan a continuación:

1) Debe confirmarse cuantitativamente que la técnica de identificación de colonias productoras de polisacáridos exocelulares en medio sólido, utilizando el medio Agar/MRS-Lactosa/Rojo Neutro, puede ser empleada como una técnica de selección de colonias productoras de polisacáridos exocelulares, lo que permitirá la manipulación genética de esta característica.

2) Definir las condiciones de producción específicas para el polímero producido por cada una de las cepas filantes de las dos especies bacterianas.

3) Caracterizar bioquímicamente los polisacáridos exocelulares producidos por cada una de las cepas filantes, identificando sus componentes y sus características particulares.

4) Realizar los mapas de restricción de los plásmidos de las cepas no filantes que los contienen, *Streptococcus thermophilus* ST 233 y *Lactobacillus bulgaricus* BM B 13.

5) Elaborar un banco de genes cromosomales de las cepas filantes o mucoides en una bacteria de relativamente fácil manipulación como *Escherichia coli*, con la idea de clonar en otras bacterias y poder aislar segmentos que están relacionados con esta característica. Por información previa, se sabe que las regiones necesarias que codifican para la producción de polisacáridos exocelulares en bacterias lácticas son muy grandes, aproximadamente de 17 Kb, estas secuencias pueden ser clonadas, pero la inestabilidad es tan grande que se pierde en un tiempo muy corto (Tynkkynen, Comunicación personal).

Una vez realizado lo anterior, puede pensarse en la manipulación genética de la característica filante o mucóide, relacionada con la producción de polisacáridos exocelulares.

6) Deben explorarse otras hipótesis que expliquen la inestabilidad de la característica Filante, o del Fenotipo Mucóide, tanto desde el punto de vista Fisiológico, como Genético. En este último caso las explicaciones pueden ser tan diversas como la presencia de Transposones en el genoma, la presencia de Secuencias de Inserción, o en general la presencia de rearrreglos genómicos en estas bacterias.

CAPITULO XI

APENDICES

Apéndice I.

I. Medios de cultivo empleados.

1) Medio MRS (de Man, Rogosa y Sharpe, 1960). pH 6.5

Proteosa Peptona # 3 (Difco)	10 g/L
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5
Dextrosa	20
Tween 80	1 mL
Citrato de amonio	2 g/L
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato manganoso	0.05
Fosfato de potasio dibásico	2

Para preparar el medio que se ha denominado como Agar/MRS-lactosa/Rojo Neutro, se adicionó a lo anterior lo siguiente:

Lactosa	20 g/L
Rojo neutro	24 mg/L
Agar	15 g/L

2) Medio Reddy con Púrpura de Bromocresol. pH 6.9

Triptona	5 g/L
Extracto de levadura	5
Casaminoácidos	2.5
Fosfato de potasio monobásico	1.25
Púrpura de Bromocresol	20 µg/L
Agar	15 g/L

3) Medio APT. pH 6.7

Extracto de levadura	7.5 g/L
Triptona	12.5
Dextrosa	10
Citrato de sodio	5
Tiamina hidrociorada	0.001
Cloruro de sodio	5
Fosfato de potasio dibásico	5
Cloruro manganoso	0.14
Sulfato de magnesio	0.8
Sulfato ferroso	0.04
Complejo sorbitan monooleato (Tween 80)	0.2
Agar	15

4) Medio Elliker modificado. pH 6.8

Triptona	5 g/L
Extracto de levadura	2.5
Gelatina bacteriológica	2.5
Cloruro de sodio	4
Acetato de sodio	1.5
Dextrosa	10
Agar	15

5) Medio Lee.

Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	10
Lactosa	5
Sacarosa	5
Carbonato de calcio	3
Fosfato de potasio monobásico	0.5
Púrpura de bromocresol	0.02
Agar	15

6) Medio M17.

Peptona de caseína	5
Peptona de soya	5
Extracto de levadura	2.5
Extracto de carne	5
Lactosa	5
Acido ascórbico	0.5
Glicerofosfato fosfo disódico	19
Sulfato de magnesio. $7H_2O$ 1M	1 mL
Agar	15

7) Medio Leche Descremada.

Leche descremada comercial	110 g/L
Agar	15

Esterilizados por separado.

8) Medio Luria-Bertani (LB) para *Escherichia coli*.

Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5
Cloruro de sodio	10
Agar	15

Ajustar el pH a 7.0

Apéndice II.

Mantenimiento de las cepas.

Las cepas se conservaron por liofilización. En crecimiento activo se mantuvieron por resiembras bisemanales en leche descremada bacteriológica 11 %, creciendo a 37oC durante 12 horas.

Las cepas filantes o mucoides de las especies en estudio, se mantuvieron con niveles elevados de producción por selección directa de colonias que presentaron la característica, creciendo en Agar/MRS-lactosa/Rojo Neutro, a 37oC durante 48 horas, y su cultivo posterior en leche descremada bacteriológica 11 % a 37oC durante 24 horas.

Para obtener liofilizados de las cepas en estudio, se resembraron las cepas filantes hasta el momento en que presentaron los niveles de producción de polisacáridos exocelulares más elevados, o bien que subjetivamente se consideraron a las cepas como filantes, al tocar el medio de cultivo con algun objeto como un asa bacteriológica o una pipeta. Una vez alcanzados estos niveles de producción se liofilizaron las cepas de interés y se mantuvieron al vacio a temperatura ambiente.

Apéndice III.

1) Soluciones requeridas para la extracción de plásmidos de bacterias lácticas. (Somkuti y Steinberg, 1986).

- DL-treonina 0.52 M
- SDS 10 %
- PEG (PM = 3,600) 24 %
- NaOH 5N
- NaCl 5M
- RNasa IA 10 mg/ml en alícuotas de 25 μ l
- Buffer T1; Tris 10 mM-HCl, pH 8.2
- Buffer T2; Tris 20 mM-HCl, pH 8.2
- Buffer T3; Tris 100 mM-HCl, EDTA 10 mM, pH 8.5
- Buffer T4; Tris 2 M-HCl, pH 7.0
- Buffer T5; Tris 10 mM-HCl, EDTA 100 mM, pH 8.0

2) Soluciones requeridas para la extracción de plásmidos de *Escherichia coli* (B.M.Chassy-J.Morlon-Guyot, 1989).

- Buffer STE; Tris 10 mM-HCl pH 7.5, NaCl 10 mM, EDTA 1 mM.
- Buffer TE 25-50; Tris 25 mM-HCl pH 8.0, EDTA 50 mM.
- Buffer TE 10-1; Tris 10 mM-HCl pH 8.0, EDTA 1 mM.

3) Soluciones requeridas durante la transformación de la cepa de *Streptococcus thermophilus* NCFB 859.

-Buffer EB (Electroporation Buffer) (Chassy, 1987).

EB; Hepes 1 mM pH 7.4, MgCl₂ 1 mM, Sacarosa 0.3 M

-Buffer de electroporación (Somkuti y Steinberg, 1988).

Amortiguador de fosfatos 5 mM pH 7.0, con MgCl₂ 1 mM y Sacarosa 0.3 M, pH 7.4

CAPITULO XII

Bibliografía

- Abdel-Bar, N., Harris, N.D. y Rill, R.L. (1987) Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Food Science* 52(2): 411-413
- Alaeddinoglu, G., Guven, A. y Ozilgen, M. (1989) Activity-loss kinetics of freeze-dried lactic acid starter cultures. *Enzyme Microbial Technology* 11: 765-769
- Anderson, D.G. y McKay, L.L. (1983) Simple and rapid method for isolation large plasmid DNA from lactic Streptococci. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 549-552
- Arber, W. (1990) Limits to genetic stability: Relevance for microbial evolution. *Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms*. Strasbourg, France. Vol 1
- Arnaud, J.P., Lacroix, C. y Chopin, L. (1989) Effect of lactic fermentation on the rheological properties of k-carrageenan/locust bean gum mixed gels inoculated with *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnology and Bioengineering* 34: 1403-1408
- Atlan, D., Laloi, P. y Portalier, R. (1989) Isolation and characterization of aminopeptidase deficient *Lactobacillus bulgaricus* mutants. *Applied and Environmental Microbiology* 55(7): 1717-1723
- Atlan, D., Laloi, P. y Portalier, R. (1990) X-Prolyl-Dipeptidil aminopeptidase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: Characterization of the enzyme and isolation of deficient mutants. *Applied and Environmental Microbiology* 56(7): 2174-2179
- Audet, P., Paquin, C. y Lacroix, C. (1989) Sugar utilization and acid production by free and entrapped cells of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in a whey permeate medium. *Applied and Environmental Microbiology* 55(1): 185-189
- Austin, S.J. (1988) Plasmid partition. *Plasmid* 20: 1-9
- Axelsson, L.T. y Lindgren, S. (1987) Characterization and DNA homology of *Lactobacillus* strains isolated from pig intestine. *Journal of Applied Bacteriology* 62: 433-440

Badii, R., Jones, S. y Warner, P.J. (1989) Sphaeroplast and electroporation-mediated transformation of *Lactobacillus plantarum*. *Letters in Applied Microbiology* 9: 41-44

Barbour, W.M. y Elkan, G.H. (1989) Relationship of the presence and copy number of plasmids to exopolysaccharide production and symbiotic effectiveness in *Rhizobium fredii* USDA 20. *Applied and Environmental Microbiology* 55(4): 813-818

Bates, E.E.M., Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P. Huckle, J., Laurie, J.I. y Mann, S.P. (1989) Expression of a *Clostridium thermocellum* endoglucanase gene in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 55(8): 2095-2097

Batt, C.A. (1986) Genetic engineering of *Lactobacillus*. *Food Technology* 40: 95-98

Beal, C., Louvet, P. y Corrieu, G. (1989) Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Applied and Environmental Microbiology* 32: 148-154

Behling, A.R. y Greger, J.L. (1990) Importance of lactose in yogurt for mineral utilization. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 38: 200-204

Berkman, T., Bozoglu, T.F. y Ozilgen, M. (1990) Mixed culture growth kinetics of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Enzyme Microbial Technology* 12: 138-140

Bibal, B., Vayssier, Y., Tournou, M. y Pareilleux, A. (1989) Enhanced inhibitory effect of lactic acid on growth kinetics of *Streptococcus cremoris* during nutritional medium limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 30: 630-635

Boquien, C.Y., Coorieu, G. y Desmazeaud, M.J. (1988) Effect of fermentation conditions on growth of *Streptococcus cremoris* AM2 and *Leuconostoc lactis* CNRZ 1091 in pure and mixed cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 54(10): 2527-2531

Botazzi, V. y Eianchi, F. (1980) A note on scanning electron microscopy of microorganisms associated with the kefir granule. *Journal of Applied Bacteriology* 48: 265-268

Bouia, A., Bringel, F., Frey, L., Kammerer, B., Belarbi, A., Guyonvarch, A. y Hubert, J.C. (1989) Structural organization of pLP1, a cryptic plasmid from *Lactobacillus plantarum* CCM 1904. *Plasmid* 22: 185-192

Boulnois, G.J. y Jan, K. (1989) Bacterial polysaccharide capsule synthesis, export and evolution of structural diversity. *Molecular Microbiology* 3(12): 1819-1823

- Bozoglu, T.F., Ozilgen, M. y Bakir, V. (1987) Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme Microbial Technology* 9: 531-536
- Bringel, F., Frey, L. y Hubert, J.C. (1989) Characterization, cloning, curing and distribution in lactic acid bacteria of pLP1, a plasmid from *Lactobacillus plantarum* CCM 1904 and its use in shuttle vector construction. *Plasmid* 22: 193-202
- Bron, S., Haivá, P., Meijer, W., Uskam, L., Holsappel, S. y Venema, G. (1990) Plasmid (in)stability in *Bacillus subtilis*. Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. Strasbourg, France. Vol. 1.
- Buchanan, R.E. y Gibbons, N.E. (1974) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8a. ed. Williams and Wilkins Co. USA. pp: 490-576
- Capalash, N., Sharma, P. y Gupta, K.G. (1990) Use of a modified cupric acetate method for the detection and quantitation of xylanolytic activities: A comparative study with the congo red method. *Letters in Applied Microbiology* 10: 151-154
- Casey, M.G. y Jimeno, J. (1989) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* plasmids. *Netherlands Milk Dairy Journal* 43: 279-286
- Cerning, J. (1990) Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 87(1-2): 113-130
- Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M.J. y Landon, M. (1986) Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology Letters* 8(9): 625-628
- Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M.J. y Landon, M. (1988) Exocellular polysaccharide by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnology Letters* 10(4): 255-260
- Chagnaud, P., Chan Kwo Chion, C.K.N., Arnaud, A. y Galzy, P. (1990) Construction of a new shuttle vector for *Lactobacillus*. Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. Vol 1. Strasbourg, France.
- Chander, H., Batish, V.K., Babu, S. y Singh, R.S. (1989) Factors affecting amine production by a selected strain of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Food Science* 54(4): 940
- Chassy, B.M. y Giuffrida, A. (1980) Method for the lysis of gram-positive asporogenous bacteria with lysozyme. *Applied and Environmental Microbiology* 39(1): 153-158
- Chassy, B.M., Mercenier, A. y Flickinger, J. (1988) Transformation of bacteria by electroporation. *Trends in BioTechnology* 6:303-309

- Chavarri, F.J., De Paz, M. y Nuñez, M. (1988) Optimization of fermentation parameters for the production of concentrated starters from nonbitter *Streptococcus lactis* INIA 12. *Journal of Food Science* 53(6): 1854-1857
- Chopin, M.C., Chopin, A., Rouault, A. y Galleron, N. (1989) Insertion and amplification of foreign genes in the *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* chromosome. *Applied and Environmental Microbiology* 55(7): 1769-1774
- Chow, J.J., Batt, C.A. y Sinskey, A.J. (1988) Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* bacteriophage ch2. *Applied and Environmental Microbiology* 54(5): 1138-1142
- Christopherson, A.T. y Zottola, E.A. (1989) Whey permeate as a medium for mesophilic lactic acid Streptococci. *Journal of Dairy Science* 72: 1701-1706
- Cogan, J.F., Walsh, D. y Condon, S. (1989) Impact of aeration on the metabolic end-products formed from glucose and galactose by *Streptococcus lactis*. *Journal of Applied Bacteriology* 66: 77-84
- Conway, P.L., Gorbach, S.L. y Goldin, B.R. (1987) Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science* 70: 1-12
- Copeland, W.C., Domena, J.D. y Robertus, J.D. (1989) The molecular cloning, sequence and expression of the *hdcB* gene from *Lactobacillus* 30A. *Gene* 85: 259-265
- Cords, B.R., McKay, L.L. y Guerry, P. (1974) Extrachromosomal elements in group N Streptococci. *Journal of Bacteriology* 117(3): 1149-1152
- Crow, V.L. (1988) Polysaccharide production by Propionibacteria during lactose fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 54(7): 1892-1895
- Daeschel, M.A. (1989) Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology* 43: 164-166
- Dagher, S. y Ali, A. (1985) Effect of pasteurization, centrifugation and additives on quality of concentrated yoghurt (labneh). *Journal of Food Protection* 48: 300-302
- Damiani, G., Romagnoli, S., Ferretti, L., Morelli, L., Bottazzi, V. y Sgaramella, V. (1987) Sequence and functional analysis of a divergent promoter from a cryptic plasmid of *Lactobacillus acidophilus* 168S. *Plasmid* 17: 69-72

David,S., Simons,G. y de Vos,W.M. (1989) Plasmid transformation by electroporation of *Leuconostoc paramesenteroides* and its use in molecular cloning. **Applied and Environmental Microbiology** 55(6): 1483-1489

Davies,F.L. y Gasson,M.J. (1984) Bacteriophages of dairy lactic acid bacteria. Capitulo 5. En: Davies,F.L. y Law,B.A. (Eds). **Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk**. Elsevier Applied Science Publishers. London, England. pp:127-151

Davies,F.L., Underwood,H.M. y 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. **Journal of Applied Bacteriology** 51: 325-337

Delisle,B., Janniere,L., Gruss,A., Beal,C. y Ehrlich,S.D. (1990) Plasmid structural stability in *Lactococcus lactis*. **Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms**. Vol. 1. Strasbourg, France.

Delley,M., Mollet,B. y Hottinger,H. (1990) DNA probe for *Lactobacillus delbrueckii*. **Applied and Environmental Microbiology** 56(6): 1967-1970

de Antoni,G.L., Pérez,P., Abraham,A. y Añón,M.C. (1989) Trehalose, a cryoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus*. **Cryobiology** 26: 149-153

de Man,J.C., Rogosa,M., y Sharpe,M.E. (1960) A medium for the cultivation of Lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology** 23(1): 130-135

de Vos,W.M., Vos,P., Simons,G. y David,S. (1989a) Gene organization and expression in mesophilic lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science** 72: 3398-3405

de Vos,W.M., Vos,P., de Haard,H y Boerrigter,I. (1989b) Cloning and expression of the *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11 gene encoding an extracellular serine proteinase. **Gene** 85: 169-176

Dicks,L.M.T. y van Vuuren,H.J.J. (1990) Differentiation of *Leuconostoc* species by nicotinamide adenine dinucleotide dependent D(-)-lactic dehydrogenase profiles. **FEMS Microbiology Letters** 67: 9-14

Driessen,A.J.M., van Leeuwen,C. y Konings,W.N. (1989) Transport of basic aminoacids by membrane vesicles of *Lactococcus lactis*. **Journal of Bacteriology** 171(3): 1453-1458

Dubois,M., Gilles,K.A., Hamilton,J.K., Rebers,P.A. y Smith,F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** 28(3): 350-356

Efstathiou, J.D. y McKay, L.L. (1976) Plasmids in *Streptococcus lactis*: Evidence that lactose metabolism and proteinase activity are plasmid linked. *Applied and Environmental Microbiology* 32(1): 38-44

Escalante, A., Salcedo, L.A., García-Garibay, J.M., Wachter, M.C. y Farres, A. (1991) Factores genéticos relacionados con la producción de polisacáridos extracelulares en *Streptococcus thermophilus*. Memorias del IV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Mérida Yucatán, México.

Figuroa, L.A. y Silverstein, J.A. (1989) Ruthenium red adsorption method for measurement of extracellular polysaccharides in sludge flocs. *Biotechnology and Bioengineering* 33: 941-947

Forsén, R.I. y Haivá, V.M. (1981) Induction of stable slime-forming and mucoid states by p-fluorophenylalanine in lactic Streptococci. *FEMS Microbiology Letters* 12: 409-413

Forsén, R.I., Niskasaari, K. y Niemitalo, S. (1985) Immunochemical demonstration of lipoteichoic acid as a surface-exposed plasma membrane antigen of slime-forming, encapsulated *Streptococcus cremoris* from the fermented milk product viili. *FEMS Microbiology Letters* 26: 249-253

Froseth, B.R., Harlander, S.K. y McKay, L.L. (1988) Plasmid mediated reduced phage sensitivity in *Streptococcus lactis* KR5. *Journal of Dairy Science* 71: 275-284

García-Garibay, J.M. (1985) Studies on growth, slime production and slime composition of a strain of *Lactobacillus bulgaricus*. Tesis de maestría. Institute of Food Research, Reading Shenfield, Reading, United Kingdom.

Gasson, M.J. y Davies, F.L. (1984) The genetics of dairy lactic acid bacteria. Capítulo 4. En: Davies, F.L. y Law, B.A. (Eds). *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. Elsevier Applied Science Publishers.

Gasson, M.J., Hill, S.H.A. y Anderson, P.H. (1987) Molecular genetics of metabolic traits in lactic Streptococci. En: Ferretti, J.J. y Curtiss III, R. (Eds). *Streptococcal genetics*. American Society for Microbiology. Washington, USA. pp: 242-245

Gautier, M. y Chopin, M.C. (1987) Plasmid determined systems for restriction and modification activity and abortive infection in *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology* 53(5): 923-927

Gibbs, P.A. (1987) Novel uses for lactic acid fermentation in food preservation. *Journal of Applied Bacteriology*. Symposium Supplement : 51S-58S

- Gilliland, S.E. (1990) Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 67(1-2): 175-188
- Gilliland, S.E. y Lara, R.C. (1988) Influence of storage at freezing and subsequent refrigeration temperatures on beta-galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 54(4): 898-902
- Gilliland, S.E. y Speck, M.L. (1974) Relationship of cellular components to the stability of concentrated lactic *Streptococcus* cultures at -17 C. *Applied Microbiology* 27(4): 793-796
- Goelling, D. y Stahl, U. (1988) Cloning and expression of an alpha-acetolactate decarboxylase gene from *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 54(7): 1889-1891
- Gonzalez, C.F. y Kunka, B.S. (1987) Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environmental Microbiology* 53(10): 2534-2538
- Green, M.L. y Manning, D.J. (1982) Development of texture and flavour in cheese and other fermented products. *Journal of Dairy Research* 49: 737-748
- Guerry, P., LeBlanc, D.J., y Falkow, S. (1973) General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology* 116(2): 1064-1066
- Haandrikman, A.J., van Leeuwen, C., Kok, J., Vos, P., de Vos, W.M. y Venema, G. (1990) Insertion elements on Lactococcal proteinase plasmids. *Applied and Environmental Microbiology* 56(6): 1890-1896
- Herman, R.E. y McKay, L.L. (1985) Isolation and partial characterization of plasmid DNA from *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 50(4): 1103-1106
- Hickey, M.W., Hillier, A.J. y Jago, G.R. (1986) Transport and metabolism of lactose, glucose and galactose in homofermentative Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology* 51(4): 825-831
- Hill, C., Pierce, K. y Klaenhammer, T.R. (1989a). The conjugative plasmid pTR2030 encodes two bacteriophage defense mechanisms in Lactococci, Restriction-Modification (R+/M+) and abortive infection (Hsp+). *Applied and Environmental Microbiology* 55(9): 2416-2419
- Hill, C., Romero, D.A., McKenney, D.S., Finer, K.R. y Klaenhammer, T.R. (1989b) Localization, cloning and expression of genetics determinants for bacteriophage resistance (Hsp) from the conjugative plasmid pTR2030. *Applied and Environmental Microbiology* 55(7): 1684-1689

Holo, H. y Nes, I.F. (1989) High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycin in osmotically stabilized media. *Applied and Environmental Microbiology* 55(12): 3119-3123

Hugenholtz, J., Splint, R., Konings, W.N. y Veldkamp, H.- (1987) Selection of protease-positive and protease-negative variants of *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology* 53(2): 309-314

Huggins, A.R. (1984) Progress in Dairy starter culture technology. *Food Technology* 38: 41-50

Hutkins, R., Morris, H.A. y McKay, L.L. (1985) Galactokinase activity in *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 50(4): 777-780

Jarvis, A.W. (1988) Conjugal transfer in lactic Streptococci of plasmid-encoded insensitivity to prolate- and small isometric-headed bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology* 54(3): 777-783

Jarvis, A.W. (1989) Bacteriophages of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science. Symposium: Genetics of lactic acid bacteria.* 72: 3406-3428

Josephsen, J. y Vogensen, F.K. (1989) Identification of three different plasmid-encoded restriction-modification systems in *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris* W56. *FEMS Microbiology Letters* 59: 161-166

Josson, K., Scheirlinck, T., Michiels, F., Platteeuw, C., Stanssens, P., Joos, H., Dhaese, P., Zabeau, M. y Mahillon, J. (1989) Characterization of a gram-positive broad-host-range plasmid isolated from *Lactobacillus hilgardii*. *Plasmid* 21: 9-20

Kalab, M., Emmons, D.B. y Sargent, A.G. (1975) Milk-gel structure. IV. Microstructure of yoghurts in relation to the presence of thickening agents. *Journal of Dairy Research* 42: 455-458

Kamaly, K.M. y Marth, E.H. (1988) Proteinase and peptidase activities of cell-free extracts from mutant strains of lactic Streptococci. *Journal of Dairy Science* 71: 2349-2357

Keating, K.R. y White, C.H. (1990) Effect of alternative sweeteners in plain and fruit-flavored yogurts. *Journal of Dairy Science* 73: 54-62

Kempler, G.M. y McKay, L.L. (1979a) Characterization of plasmid deoxyribonucleic acid in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*: Evidence for plasmid-linked citrate utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 37(2): 316-323

Kempler, G.M. y McKay, L.L. (1979b) Genetic evidence for plasmid-linked lactose metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. *discetylactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 37(5): 1041-1043

Kennedy, A.F.D. y Sutherland, I.W. (1987) Analysis of bacterial exopolysaccharides. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 9: 12-19

Kiwaki, M., Ikemura, H., Shimizu-Kadota, M. y Hirashima, A. (1989) Molecular characterization of a cell wall-associated proteinase gene from *Streptococcus lactis* NCD0763. *Molecular Microbiology* 3(3): 359-369

Klaenhammer, T.R., McKay, L.L. y Baldwin, K.A. (1978) Improved lysis of group N Streptococci for isolation and rapid characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Applied and Environmental Microbiology* 35(3): 592-600

Kondo, J.K. (1989) Gene cloning and transfer in dairy Lactococci. Symposium: Genetics of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 72: 3381-3387

Kondo, J.K. y McKay, L.L. (1985) Gene transfer systems and molecular in group N Streptococci: A review. *Journal of Dairy Science* 68: 2143-2159

Kontusaari, S.I., Vuokila, P.T. y Forsén, R.I. (1985) Immunochemical study of triton-X-100-soluble surface components of slime-forming, encapsulated *Streptococcus cremoris* from the fermented milk product viili. *Applied and Environmental Microbiology* 50(1): 174-176

Kroger, M. (1989) Food misinformation in major reference works: setting the record straight on yoghurt. *Food Technology* 43: 62-67

Kroger, M., Kurmann, J.A. y Rasic, J.L. (1989) Fermented milks: Past, present and future. *Food Technology* 43: 92-99

Lakshmidēvi, G., Davidson, E.E. y Hillier, A.J. (1980) Molecular characterization of promoters of the *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* temperate bacteriophage BK5-T and identification of a phage gene implicated in the regulation of promoter activity. *Applied and Environmental Microbiology* 58(4): 934-942

Langella, P. y Chopin, A. (1989) Effect of restriction-modification systems on transfer of foreign DNA into *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *FEMS Microbiology Letters* 59: 301-306

Langella, P. y Chopin, A. (1989) Conjugal transfer of plasmid pIP501 from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* to *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *FEMS Microbiology Letters* 60: 149-152

- Larsen, R.F. y Anón, M.C. (1989) Interaction of antibiotics and water activity on *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Food Science* 54(4): 922-924
- Lee, L.L., Jagusztyn-krynicka, E., Hansen, J. y Chassy, B.M. (1982) Cloning and expression of the beta-D-phospho-galactoside galactohydrolase gene of *Lactobacillus casei* in *Escherichia coli* K12. *Journal of Bacteriology* 152: 1138-1146
- Lee, B.H., Laleye, L.C., Simard, R.E., Munsch, M.H. y Holley, R.A. (1990) Influence of homofermentative *Lactobacilli* on the microflora and soluble nitrogen components in cheddar cheese. *Journal of Food Science* 55(2): 391-397
- Leenhouts, K.J., Kok, J. y Venema, G. (1989) Campbell-like integration of heterologous plasmid DNA into the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 55(2): 394-400
- Leenhouts, K.J., Kok, J. y Venema, G. (1990) Stability of integrated plasmids in the chromosome of *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 56(9): 2726-2735
- Lerch, H.P., Frank, R. y Collins, J. (1989a) Cloning, sequencing and expression of the L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase-encoding gene of *Lactobacillus confusus* in *Escherichia coli*. *Gene* 83: 263-270
- Lerch, H.P., Blocker, H., Kallwass, H., Hoppe, J., Tsay, H. y Collins, J. (1989b) Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the D-2-hydroxyisocaproate-dehydrogenase gene of *Lactobacillus casei*. *Gene* 78: 47-57
- Luchansky, J.B., Kleeman, E.G., Raya, R.R. y Klaenhammer, T.R. (1989) Genetic transfer systems for delivery of plasmid deoxyribonucleic acid to *Lactobacillus acidophilus* ADH: Conjugation, electroporation and transduction. *Journal of Dairy Science* 72: 1408-1417
- Ludwig, W., Seewaldt, E., Kilpper-Dalz, R., Schleifer, K.H., Magrum, L., Woese, C.R., Fox, G.E. y Stackebrandt, E. (1985) The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of General Microbiology* 131: 543-551
- Lugowski, C. y Jennings, H.J. (1984) Structural determination of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 18C(56). *Carbohydrate Research* 131: 119-129
- Macura, D. y Townsley, P.M. (1984) Scandinavian ropy milk. Identification and characterization of endogenous ropy lactic *Streptococci* and their extracellular excretion. *Journal of Dairy Science* 67: 735-744

Maeda,S. y Gasson,M.J. (1986) Cloning, expression and location of the *Streptococcus lactis* gene for phospho beta-D-galactosidase. *Journal of General Microbiology* 132: 331-340

Maniatis,T., Fritsch,E.F. y Sambrook,J. (1982) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Springs Harbor Laboratory. --

Marranzini,R.M., Schmidt,R.H., Shireman,R.B., Marshall,M.R. y Cornell,J.A. (1989) Effect of threonine and glycine concentrations on threonine aldolase activity of yogurt microorganisms during growth in a modified milk prepared by ultrafiltration. *Journal of Dairy Science* 72: 1142-1148

Marshall,V.M.E. (1984) Flavour development in fermented milks. *Capitulo 6*. En: Davies,F.L. y B.A.Law (Eds). *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. Elsevier Applied Science Publishers, London, England.

Marshall,V.M.E. y Law, B.A. (1984) The physiology and growth of dairy lactic acid bacteria. *Capitulo 3*. En: Davies,F.L. y Law, B.A. (Eds). *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. Elsevier Applied Science Publishers, London, England. pp:67-98

McIntyre,D.A. y Harlander,S.K. (1989a) Improved electroporation efficiency on intact *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cells grown in defined media. *Applied and Environmental Microbiology* 55(10): 2621-2626

McIntyre,D.A. y Harlander,S.K. (1989b) Genetic transformation of intact *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* by high-voltage electroporation. *Applied and Environmental Microbiology* 55(3): 604-610

McKay,L.L., Cords,B.R. y Baldwin,K.A. (1973) Transduction of lactose metabolism in *Streptococcus lactis* C2. *Journal of Bacteriology* 115(3): 810-815

McKay,L.L. (1978) Microorganisms and their instability in milk and milk products. *Food Technology* 32: 181-185

McKay,L.L. y Baldwin,K.A. (1978) Stabilization of lactose metabolism in *Streptococcus lactis* C2. *Applied and Environmental Microbiology* 36(2): 360-367

McKay,L.L., Bohanon,M.J., Polzin,K.M., Rule,P.L. y Baldwin,K.A. (1989) Localization of separate genetic loci for reduced sensitivity towards small isometric-headed bacteriophage sk1 and prolate-headed bacteriophage c2 on pGBK17 from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KR2. *Applied and Environmental Microbiology* 55(10): 2702-2709

- Mercenier, A. (1990) Molecular genetics of *Streptococcus thermophilus*. FEMS Microbiology Reviews 87(1-2): 61-78
- Mercenier, A., Robert, C., Romero, D.A., Castellino, I., Slos, P. y Lemoine, Y. (1988) Development of an efficient sphaeroplast transformation procedure for *Streptococcus thermophilus*: The use of transfection to define a regeneration medium. Biochimie 70: 567-577
- Mercenier, A., O'Regan, M., Villeval, D., Castellino, I., Lemoine, Y. y Lecocq, J.P. (1990) Analysis of an endogenous plasmid of *Streptococcus thermophilus* conferring altered technological traits. Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. Vol 1. Strasbourg, France.
- Mercenier, A., Slos, P., Sylvestre, N., Robert, C., Kehrer, N., van der Lelie, D. y Lemoine, Y. (1990) Molecular genetics of *Streptococcus thermophilus*: Electrotransformation, Chromosomal integration and gene cloning. Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of industrial Microorganisms. Vol. 1. Strasbourg, France.
- Metchnikoff, E. (1906) The prolongation of life. G.P. Putnam and Sons. New York, USA.
- Meyers, J.A., Sanchez, D., Elwell, L.P. y Falkow, S. (1976) Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. Journal of Bacteriology 127(3): 1529-1537
- Millard, G.E., McKellar, R.C. y Holley, R.A. (1990) Simultaneous enumeration of the characteristic microorganisms in yogurt using the hydrophobic grid membrane filter system. Journal of Food Protection 53(1): 64-66
- Moat, A.G. (1985) Biology of the lactic, acetic and propionic acid bacteria. Capitulo 6. En: Demain, A.L. y Solomon, N.A. (Eds). Biology of industrial microorganisms. Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc. USA.
- Morelli, L., Vescovo, M., Coconcelli, P.S. y Botazzi, V. (1988) Fast and slow milk-coagulating variants of *Lactobacillus helveticus* HLM. Canadian Journal of Microbiology 32: 756-760
- Morris, V.J. (1985) Food gels - roles played by polysaccharides. Chemistry and Industry 4: 159-164
- Mortvedt, C.I. y Nes, I.F. (1990) Plasmid associated bacteriocin production by a *Lactobacillus sake* strain. Journal of General Microbiology 136: 1601-1607

- Mottar, J., Bassier, A., Joniau, M. y Baert, J. (1989) Effect of heat-induced association of whey proteins and casein micelles on yogurt texture. *Journal of Dairy Science* 72: 2247-2256
- Muriana, P.M. y Klaenhammer, T.R. (1987) Conjugal transfer of plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Applied and Environmental Microbiology* 53(3): 553-560
- Murphy, M.C., Steele, J.L., Daly, C. y McKay, L.L. (1988) Concomitant conjugal transfer of reduced-bacteriophage-sensitivity mechanisms with lactose- and sucrose-fermenting ability in lactic Streptococci. *Applied and Environmental Microbiology* 54(8): 1951-1956
- Neviani, E., Boquien, C.Y., Monnet, V., Phan Thanh, L. y Gripon, J.C. (1989) Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2. *Applied and Environmental Microbiology* 55(9): 2308-2314
- Ofuya, C.O. y Nnajiolor, C. (1989) Development and evaluation of a starter culture for the industrial production of gari. *Journal of Applied Bacteriology* 66: 37-42
- Parnell-Clunies, E., Kakuda, Y., De Mann, J.M. y Cazzola, F. (1988) Relation profiles of yogurt as affected by heat treatment of milk. *Journal of Dairy Science* 71: 582-588
- Pearse, M.J. y MacKinlay, A.G. (1989) Biochemical aspects of syneresis: A review. *Journal of Dairy Science* 72: 1401-1407
- Pettipher, G.L. y Watts, Y.B. (1989) Evaluation of lysine-iron-cystine neutral red for the detection of *Salmonella* in the Bactometer. *Letters in Applied Microbiology* 9: 243-244
- Pidoux, M., DeRuiter, G.A., Brooker, B.E., Colqhoun, I.J. y Morris, V.J. (1990) Microscopic and chemical studies of a gelling polysaccharide from *Lactobacillus hilgardii*. *Carbohydrate Polymers* 13(4): 351-362
- Poolman, B., Royer, T.J., Mainzer, S.E., y Schmidt, B.F. (1989) Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*: a hybrid protein with homology to the melibiose carrier and enzyme III of phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems. *Journal of Bacteriology* 171(1): 244-253
- Porter, E.B. y Chassy, B.M. (1988) Nucleotide sequence of the beta-D-phosphogalactoside galactohydrolase gene of *Lactobacillus casei*: Comparison to analogous pbg genes of other gram-positive organisms. *Gene* 62: 263-276

Posno, M., Leer, R.J., van Luijk, M., Lokman, B.C., van Griessen, M.J.F., Heuvelmans, P.T.H.M. y Powels, P.H. (1990) A host vector system for *Lactobacillus*. Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. Vol. 1. Strasbourg, France.

Powell, I.B., Achen, M.G., Hillier, A.J. y Davidson, B.E. (1988) A simple and rapid method for genetic transformation of lactic Streptococci by electroporation. *Applied and Environmental Microbiology* 54(3): 655-660

Powell, I.B., Arnold, P.M., Hillier, A.J. y Davidson, B.E. (1989) Molecular comparison of prolate- and isometric-headed bacteriophages of Lactococci. *Canadian Journal of Microbiology* 35: 860-866

Pucci, M.J., Monteschio, M.E. y Kemker, C.L. (1988) Intergeneric and intragenic conjugal transfer of plasmid-encoded antibiotic resistance determinants in *Leuconostoc* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 54(2): 281-287

Rajagopal, S.N. y Sandine, W.E. (1990) Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. *Journal of Dairy Science* 73: 894-899

Rao, D.R., Alhajali, A. y Chawan, C.B. (1967) Nutritional, sensory and microbiological qualities of labneh made from goat milk and cow milk. *Journal of Food Science* 52(5): 1228-1230

Rech, S.B., Wulff, M.C., Astolfi, S., Gardner, D.C.J. y Oliver, S.G. (1990) The use of positively selectable resistance markers in promoting plasmid stability in yeast. Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. Vol. 1. Strasbourg, France.

Ross, R., O'Gara, F. y Condon, S. (1989) Cloning of chromosomal genes of *Lactococcus* by heterologous complementation: Partial characterization of a putative lactose transport gene. *FEMS Microbiology Letters* 61: 183-188

Sanchez-Podlech, P.A., Furia-Luna, M., Jerke, P.R., de Souza, A.C., dos Passos, R.F., Souza, O. y Borzani, W. (1990) Semicontinuous lactic fermentation of whey by *Lactobacillus bulgaricus*. I. Experimental results. *Biotechnology Letters* 12(7): 531-534

Sandine, W.E. (1987) Looking backward and forward at the practical applications of genetic researches on lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 46: 205-220

Saxelin, M.L., Nurmiäho, E.L., Korhola, M.P. y Sundman, V. (1979) Partial characterization of a new C3-type capsule-dissolving phage of *Streptococcus cremoris*. *Canadian Journal of Microbiology* 25: 1182-1187

Scheirlinck, T., Mahillon, J., Joos, H., Dhaese, P. y Michiels, F. (1989) Integration and expression of alfa-amylase and endoglucanase genes in the *Lactobacillus plantarum* chromosome. *Applied and Environmental Microbiology* 55(9): 2130-2137

Scheirlinck, T., DeMeutter, J., Arnaut, G., Joos, H., Claesysseus, M. y Michiels, F. (1990) Cloning and expression of cellulase and xylanase genes in *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33: 534-541

Schellhass, S.M. y Morris, H.A. (1985) Rheological and scanning electron microscopic examination of skim milk obtained by fermenting with ropy and non-ropy strains of lactic acid bacteria. *Food Microstructure* 4: 279-287

Scherwitz, K. y McKay, L.L. (1987) Restriction enzyme analysis of lactose and bacteriocin plasmids from *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* WM4 and cloning of BclI fragments coding for bacteriocin production. *Applied and Environmental Microbiology* 53(5): 1171-1174

Schmidt, B.F., Adams, R.M., Requadt, C., Power, S. y Mainzer, S.E. (1989a) Expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus bulgaricus* beta-galactosidase gene cloned in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 171(2): 625-635

Schmidt, R.H., Kennedy, L.B., McMullan, E.B. y Mason, E.R. (1989b) Survey of the inhibitory effects of glycine on threonine aldolase activity of yoghurt microorganisms. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 37: 1215-1216

Schrempf, H. (1990) Genetic instability in *Streptomyces*. *Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms*. Vol. 1. Strasbourg, France.

Schroeder, C.J., Robert, C., Lenzen, G., McKay, L.L. y Mercenier, A. (1991) Analysis of the lacZ sequences from two *Streptococcus thermophilus* strains: Comparison with the *Escherichia coli* and *Lactobacillus bulgaricus* beta-galactosidase sequences. *Journal of General Microbiology* 137: 369-380

Shrago, A.W. y Dobrogosz, W.J. (1986) Conjugal transfer of group B Streptococcal plasmids and comobilization of *Escherichia coli*-*Streptococcus* shuttle plasmids to *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 54(3): 824-826

Sijtsma, L., Sterkenburg, A. y Wouters, J.T.M. (1988) Properties of the cell walls of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110 and SK112 and their relation to bacteriophage resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 54(11): 2808-2811

Sinha, R.P. (1989) A new simple method of curing plasmids in lactic Streptococci (*Streptococcus cremoris*; *Streptococcus lactis*, plasmids). *FEMS Microbiology Letters* 57: 349-352

Sjoberg, A. y Hahn-Hagerdal, R. (1989) Beta-glucose-1-phosphate, a possible mediator for polysaccharide formation in --maltose-assimilating *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 55(6): 1549-1554

Skaugen, M. (1989) The complete nucleotide sequence of a small cryptic plasmid from *Lactobacillus plantarum*. *Plasmid* 22: 175-179

Slocum, S.A., Jasinski, E.M., Ananthesmaran, R.C. y Kilara, A. (1988) Effect of sucrose on proteolysis in yogurt during incubation and storage. *Journal of Dairy Science* 71: 589-595

Smid, E.J., Driessen, A.J.M. y Konings, W.N. (1989) Mechanism and energetics of dipeptide transport in membrane vesicles of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* 171(1): 292-298

Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, J.G. (1986) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. II. Williams and Wilkins. Baltimore, USA. pp: 999-1103

Solaiman, D.K.Y. y Somkuti, G.A. (1990) Isolation and characterization of a type II restriction endonuclease from *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiology Letters* 67: 261-266

Somkuti, G.A. y Steinberg, D.H. (1986) General method for plasmid DNA isolation from thermophilic lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology* 2: 323-332

Somkuti, G.A. y Steinberg, D.H. (1986) Distribution and analysis of plasmids in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Industrial Microbiology* 1: 157-163

Somkuti, G.A. y Steinberg, D.H. (1988) Genetic transformation of *Streptococcus thermophilus* by electroporation. *Biochimie* 70: 579-585

Somkuti, G.A. y Steinberg, D.H. (1991) DNA-DNA hybridization analysis of *Streptococcus thermophilus* plasmids. *FEMS Microbiology Letters* 78: 271-276

Speck, M.L. (1975) Interactions among Lactobacilli and man. *Journal of Dairy Science* 59(2): 338-343

Stack, R.J. (1988) Neutral sugar composition of extracellular polysaccharides produced by strains of *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Applied and Environmental Microbiology* 54(4): 878-883

Steele, J.L., Murphy, M.C., Daly, C. y McKay, L.L. (1989a) DNA-DNA homology among lactose- and sucrose-fermenting transconjugants from *Lactococcus lactis* strains exhibiting reduced bacteriophage sensitivity. *Applied and Environmental Microbiology* 55(9): 2410-2413

Steele, J.L., Polzin, K.M. y McKay, L.L. (1989b) Characterization of the genetic element coding for lactose metabolism in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KP3. *Plasmid* 22: 44-51

Steensohn, L.R., Klaenhammer, T.R. y Swaisgood, H.E. (1987) Calcium alginate-immobilized cultures of lactic Streptococci are protected from bacteriophages. *Journal of Dairy Science* 70: 1121-1127

Strobel, H.T., Russell, J.B., Driessen, A.J.M. y Konings, W.N. (1989) Transport of aminoacids in *Lactobacillus casei* by proton-motive-force dependent and non-proton-motive-force dependent mechanisms. *Journal of Bacteriology* 171(1): 280-284

Sundman, V. (1953) On the protein character of a slime produced by *Streptococcus cremoris* in finish ropy sour milk. *Acta Chemica Scandinava* 7(3): 558-560

Swinfield, T.J., Janniere, L., Ehrlich, S.D. y Minton, N.P. (1990) Identification of a recombivase gene from the *Streptococcus faecalis* plasmid pAMBeta1 associated with the segregational stability. Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. Vol.1. Strasbourg, France.

Takiguchi, R., Hashiba, H., Aoyama, K. y Ishii, S. (1989) Complete nucleotide sequence and characterization of a cryptic plasmid from *Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti*. *Applied and Environmental Microbiology* 55(6): 1653-1655

Tamime, A.Y. y Robinson, R.K. (1978) Some aspects of the production of a concentrated yoghurt (labneh) popular in the Middle East. *Milchwissenschaft* 33(4): 209-212

Tan, P.S.T. y Konings, W.N. (1990) Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Applied and Environmental Microbiology* 56(2): 526-532

Teggatz, J.A. y Morris, H.A. (1990) Changes in the rheology and microstructure of ropy yoghurt during shearing. *Food Structure* 9: 133-138

Thompson, J.K. y Collins, M.A. (1989) Evidence for the conjugal transfer of a plasmid pVA797::pSA3 co-integrate into strains of *Lactobacillus helveticus*. *Letters in Applied Microbiology* 9: 61-64

Teai, H.J. y Sandine, W.E. (1987) Conjugal transfer of nisin plasmid genes from *Streptococcus lactis* 7962 to *Leuconostoc dextranicum* 181. *Applied and Environmental Microbiology* 53(2): 352-357

Tynkynen, S., von Wright, A. y Syvaöja, E.L. (1989) -- Peptide utilization encoded by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* SSL135 chromosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 55(10): 2690-2695

Valyasevi, R., Sandine, W.E. y Geller, B.L. (1990) The bacteriophage KH receptor of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* KH is the rhamnose of the extracellular wall polysaccharide. *Applied and Environmental Microbiology* 56(6): 1882-1889

van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Geis, A., Kok, J. y Venema, G. (1989) Cloning of two bacteriocin genes from a Lactococcal bacteriocin plasmid. *Applied and Environmental Microbiology* 55(5): 1187-1191

van de Guchte, M., van der Vossen, J.M.B.M., Kok, J. y Venema, G. (1989) Construction of a Lactococcal expression vector: Expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 55(1): 224-228

van der Lelie, D., van der Vossen, J.M.B.M. y Venema, G. (1988) Effect of plasmid incompatibility on DNA transfer to *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology* 54(4): 865-871

van der Lelie, D., Wosten, H.A.B., Bron, S., Oskam, L. y Venema, G. (1990) Conjugal mobilization of Streptococcal plasmid pMV158 between strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of Bacteriology* 172(1): 47-52

van der Mel, H., Brokke, P., Dankert, J., Feijen, J., Rouxhet, P.G. y Busscher, H.J. (1989) Physicochemical surface properties of nonencapsulated and encapsulated coagulase-negative Staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology* 55(11): 2806-2814

van der Vossen, J.M.B.M., van der Lelie, D. y Venema, G. (1987) Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2 specific promoters. *Applied and Environmental Microbiology* 53(10): 2452-2457

Vedamuthu, E.R., y Neville, J.M. (1986) Involvement of a plasmid in production of ropiness (mucoidness) in milk cultures by *Streptococcus cremoris* MS. *Applied and Environmental Microbiology* 51(4): 677-682

Vescovo, M., Scolari, G.L., y Botazzi, V. (1989) Plasmid encoded ropiness production in *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. *Biotechnology Letters* 11(10): 709-712

von Wright, A. y Tynkkynnen, S. (1987) Construction of *Streptococcus lactis* ssp. *lactis* strains with a single plasmid associated with mucoid phenotype. *Applied and Environmental Microbiology* 53(6): 1385-1386

Watanabe, K., Ishibashi, K., Iki, K., Nakashima, Y., Hayashida, M. y Amako, K. (1987) Cell surface characteristics of some phage resistant strains of *Lactobacillus casei*. *Journal of Applied Bacteriology* 63: 197-200

Whitfield, C. (1988) Bacterial extracellular polysaccharides. *Canadian Journal of Microbiology* 34: 415-420

Williams, S.A., Hodges, R.A., Strike, T.L., Snow, R. y Kunkee, R.E. (1984) Cloning the gene for the malolactic fermentation of wine from *Lactobacillus delbrueckii* in *Escherichia coli* and yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 47(2): 288-293

Woskow, S.A. y Kondo, J.K. (1987) Effect of proteolytic enzymes on transfection and transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts. *Applied and Environmental Microbiology* 53(10): 2583-2587

Yan, T.R., Azuma, N., Kaminogawa, S. y Yamauchi, K. (1987) Purification and characterization of a substrate-size-recognizing metalloendopeptidase from *Streptococcus cremoris* H61. *Applied and Environmental Microbiology* 53(10): 2296-2302

Yokoi, H., Watanabe, T., Fujii, Y., Toba, T. y Adachi, S. (1990) Isolation and characterization of polysaccharide-producing bacteria from kefir grains. *Journal of Dairy Science* 73: 1684-1689

Yu, P.L., Appleby, R.D., Pritchard, G.G. y Limsowtin, G.K.Y. (1989) Restriction mapping and localization of the lactose-metabolizing genes of *Streptococcus cremoris* pDI-21. *Applied Microbiology and Biotechnology* 30: 71-74

Zink, A., Klein, J.R. y Plapp, R. (1991) Transformation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* by electroporation and cloning of origins of replication by use of a positive selection vector. *FEMS Microbiology Letters* 78: 207-212