



03072 8
20j

Universidad Nacional Autónoma de México

Colegio de Ciencias y Humanidades

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado
Proyecto de Especialización. Maestría y Doctorado en Biotecnología
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Estudio Sobre la Producción de Iniciadores Lácticos en Cultivo Mixto

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A
Biol. Guillermina Hernández Pérez

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN
México, D. F. Agosto 1992



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.

INDICE

RESUMEN

JUSTIFICACION

CAPIULO 1 INTRODUCCION	1
1.1 LOS MICROORGANISMOS EN LOS ALIMENTOS FERMENTADOS	2
1.2 LOS MICROORGANISMOS Y LA INDUSTRIALIZACION DE LA LECHE: LOS INICIADORES LACTICOS	6
1.2.1 GENERALIDADES	6
1.2.2 EL PAPEL DE LOS INICIADORES LACTICOS	10
1.2.2.1 Funcion de los iniciadores lacticos en la elaboracion de queso.	11
1.2.2.2 Funcion de los iniciadores lacticos en las leches fermentadas.	13
1.2.3 USO DE LOS INICIADORES LACTICOS	18
1.3 CARACTERISTICAS PRINCIPALES DE LOS INICIADORES LACTICOS	24
1.4 CULTIVO MIXTO DE LOS INICIADORES LACTICOS	26

CAPITULO 2: MATERIALES Y METODOS	36
2.1 MICROORGANISMOS	37
2.2 MEDIO DE CULTIVO	37
2.3 REACTOR	37
2.4 PREPARACION DE LOS INOCULOS	39
2.5 CONDICIONES DE CULTIVO	39
2.6 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	42
2.7 CUANTIFICACION DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS	42
2.8 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LACTICA, DE LA PRODUCCION DE ACIDO LACTICO Y DEL pH.	43
2.9 POBLACIONES BACTERIANAS INICIALES Y FINALES	44
2.10 DETERMINACION DE LA TASA ESPECIFICA DE CRECIMIENTO	44
2.11 DETERMINACION DE LA VELOCIDAD MAXIMA DE PRODUCCION DE ACIDO LACTICO, DE LA CONCENTRACION FINAL, DE LA PRODUCTIVIDAD VOLUMETRICA Y DE LA PRODUCTIVIDAD MAXIMA DE ACIDO LACTICO	45
2.12 PRUEBA DE FISHER	46
CAPITULO 3 RESULTADOS	48
3.1 CULTIVOS PUROS	49
3.1.1 CINETICAS DE CRECIMIENTO	49
3.1.2 CINETICA DE PRODUCCION DE ACIDO LACTICO Y ACTIVIDAD LACTICA	52
3.1.3 COMPORTAMIENTO DURANTE EL ALMACENAMIENTO	53

3.2. CULTIVO MIXTO DE:	
<i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> SSP. <i>LACTIS</i> Y	
<i>LEUCOPHOS-TOC MESSINGII</i> SSP. <i>CREMORIS</i>	60
3.2.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO	60
3.2.2 CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO Y ACTIVIDAD LÁCTICA	64
3.2.3 COMPORTAMIENTO DURANTE EL ALMACENAMIENTO	65
3.3 CULTIVO MIXTO DE:	
<i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> SSP. <i>LACTIS</i> Y	
<i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> SSP. <i>CREMORIS</i>	70
3.3.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO	70
3.3.2 CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO Y ACTIVIDAD LÁCTICA	73
3.3.3 COMPORTAMIENTO DURANTE EL ALMACENAMIENTO	75
CAPÍTULO 4 DISCUSIÓN	79
CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES	88
BIBLIOGRAFÍA	91

RESUMEN

La presente investigación ha tenido como objetivo conocer las características de comportamiento de bacterias lácticas mesófilas, durante la producción y el almacenamiento en cultivo mixto.

Se estudiaron las cinéticas de crecimiento, de producción de ácido láctico y la actividad láctica, durante el crecimiento de los cultivos puros de las especies *Lactobacillus lactis* sp. *lactis* (SL), *Lactobacillus lactis* sp. *cremoris* (SC) y *Limonostocazymomonas* sp. *cremoris* (LC). Se estudiaron, así mismo, los cultivos mixtos de la primera cepa (SL) en mezcla con cada una de las otras dos (LC o SC), en diferentes concentraciones poblacionales iniciales.

Finalmente, se analizó el comportamiento de los caldos de las fermentaciones, tanto de los cultivos de cepas puras como de cepas mixtas, durante un periodo de almacenamiento en refrigeración. Durante este periodo se estudiaron la viabilidad celular, el pH y la capacidad de producción de ácidos.

Los resultados de este estudio, muestran un efecto negativo de SL sobre el crecimiento de LC, durante el cultivo mixto de estas dos especies. Se observó una disminución de la población final de SC durante el cultivo mixto con SL, pero sin que la tasa específica de crecimiento de SC cambie significativamente. La especie SL no presentó diferencias importantes entre los dos

cultivos mixtos ni respecto al cultivo puro.

Durante el almacenamiento en refrigeración de los cultivos mixtos, la cepa LC puede desaparecer cuando se cultiva con SL, especialmente si el pH desciende rápidamente. En cambio, el comportamiento de SC y SL durante el almacenamiento en cultivo mixto, no presenta cambios importantes respecto a los cultivos puros.

Debido a que el crecimiento de SL no se ve afectado durante el cultivo en mezcla, la velocidad de producción de ácido láctico no cambia significativamente. Igualmente, la actividad láctica de los cultivos mixtos, es comparable a la del cultivo puro de SL.

Se puede concluir que el crecimiento en cultivo mixto de SL y LC no es recomendable. En cambio, el cultivo mixto de SL con SC sí es posible. Sin embargo, es necesario continuar el estudio de estas dos especies en cultivo mixto, a fin de optimizar las condiciones de producción y almacenamiento.

CAPITULO 1

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

11 LOS MICROORGANISMOS EN LOS ALIMENTOS FERMENTADOS.

Se definen como alimentos fermentados los productos palatables preparados de materiales crudos o cocidos, que adquieren características propias (aroma, apariencia visual, sabor, color, consistencia, vida de anaquel y calidad higiénica) por un proceso en el que está involucrado el metabolismo microbiano (Hamme, 1990). Básicamente, los alimentos fermentados son productos agrícolas que han sido transformados, por la actividad enzimática de los microorganismos, en productos alimenticios cuyas propiedades son consideradas más atractivas que aquellas del material original (Djien, 1982).

La fermentación de alimentos se ha utilizado desde la antigüedad como un método de conservación. En efecto, se ha desarrollado en todo tipo de alimentos: vegetales, carnes y lácteos.

Antiguamente, la fermentación se producía por el crecimiento natural de los microorganismos. Posteriormente, este crecimiento fue inducido y acelerado con los productos de una fermentación anterior. Actualmente, gracias al desarrollo científico, los microorganismos responsables de las fermentaciones han sido aislados, clasificados y caracterizados. Así, hoy día, son adicionados deliberadamente a los alimentos, bajo condiciones controladas, a fin de asegurar la calidad del producto final (Smith y Palumbo, 1981).

La diversidad de alimentos fermentados es muy grande. En el cuadro 1 se señalan algunos productos fermentados y los microorganismos involucrados en el proceso.

Durante la fermentación de los alimentos, el metabolismo microbiano provoca diversos cambios sobre los mismos. De tal manera que el producto final depende tanto del sustrato como de los microorganismos involucrados en el proceso fermentativo.

Las principales modificaciones del alimento, debido a la actividad microbiana, se dan sobre la textura, sabor y aroma, pero presentan también otras variaciones. De hecho, la fermentación puede afectar la calidad nutricional del producto, modificando los niveles de aminoácidos y vitaminas. Así mismo, la actividad microbiana es importante para la destrucción o disminución de los microorganismos indeseables, que es un factor crucial en la preservación del alimento. Además, los microorganismos pueden controlar la presencia de histaminas y otras aminas biogénicas tóxicas (Daly, 1985).

En el cuadro 2 se encuentran agrupados los principales agentes de la fermentación de distintos tipos de alimentos. Como se observa en este cuadro, las bacterias lácticas intervienen en la fermentación de todo tipo de sustrato. De hecho, las bacterias lácticas son los microorganismos que han recibido mayor interés científico y tecnológico, desde el punto de vista alimentario (Daly, 1985).

CUADRO 1. ALIMENTOS FERMENTADOS Y MICROORGANISMOS RESPONSABLES

tipos de alimentos	microorganismos
PRODUCTOS CARNICOS	
Embutidos semiseos	
Libano Bologna	<i>Pediococcus cerevisiae</i>
Rollo de puerco	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Teewurst	
Thuringer	
Pavo	
Embutidos secos	
Pepperoni	<i>Pediococcus cerevisiae</i>
Kuropeo	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Salami	<i>Micrococcus sp.</i>
Salami fuerte	<i>Penicillium sp.</i>
Salami cubierto de mohos	
Pavo	
Productos procesados	
Tacino	Bacterias ácido lácticas
Jamón	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Salchicha	<i>Pediococcus cerevisiae</i>
Pavo	<i>Micrococcus sp.</i>
Pollo	<i>Vibrio sp.</i>
PRODUCTOS LACTEOS	
Quesos maduros	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Quesos semimaduros	ssp. <i>bulgaricus</i>
Quesos frescos	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
Leche búlgara	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremori</i>
Jocoque	<i>Propionibacterium shermani</i>
Yoghurt	<i>Penicillium roqueforti</i>
Mantequilla	<i>Penicillium camemberti</i>
Crema	<i>Lactococcus lactis diovar</i>
	<i>diacetylactis</i>
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>
PRODUCTOS VEGETALES	
Zanahorias	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Pepinos	<i>Lactobacillus brevis</i>
Tomates verdes	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Olivas	<i>Pediococcus cerevisiae</i>
Cañava	<i>Lactococcus sp.</i>
Plátano	<i>Saccharomyces sp.</i>
Jugos de frutas	

(Smith y Palumbo, 1981)

CUADRO 2. BACTERIAS IMPORTANTES EN LA FERMENTACION DE ALIMENTOS

PRODUCTOS

* LACTICOS	<i>Lactococcus lactis</i> subespecies: <i>lactis</i> , <i>cremoris</i> y <i>lactis biovar diacetylactis</i> ; <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> . <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subespecies: <i>bulgaricus</i> y <i>terchmannii</i> . <i>Lactobacillus brevis</i> y <i>helveticus</i> . <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp.: <i>cremoris</i> , <i>mesenteroides</i> y <i>lactis</i> .
* CARNICOS	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Pediococcus</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp.
* VEGETALES	<i>Lactobacillus</i> sp. <i>Leuconostoc</i> sp.

(Daly, 1985).

La función de las bacterias lácticas durante el proceso fermentativo es crucial. Durante el metabolismo de estas, se produce ácido láctico. El ácido láctico provoca un descenso de pH que favorece tanto la conservación de los alimentos como un cambio en la textura, debido a la desnaturalización de las proteínas. Además, contribuye a las características de sabor de los alimentos fermentados (Smith y Palumbo, 1981).

Si bien, las bacterias lácticas están implicadas en la elaboración de gran diversidad de productos, su mayor impacto recae sobre la industria láctea.

A continuación, se analiza con más detalle la importancia de los microorganismos en la elaboración de productos lácteos.

12 LOS MICROORGANISMOS Y LA INDUSTRIALIZACIÓN DE LA LECHE LOS INICIADORES LÁCTICOS.

12.1 GENERALIDADES.

Desde la antigüedad existen una gran variedad de productos lácteos fermentados, tales como mantequillas, cremas, cremas agrias, queso y leches fermentadas. La importancia de los productos lácteos fermentados está favorecida por la gran aceptación social de estos productos desde hace miles de años (Law, 1982; Sellars, 1981; Vedamuthu, 1982).

Algunos de los productos lácteos fermentados, así como los microorganismos implicados en su fermentación, se encuentran señalados en el cuadro 3. Se puede observar la gran diversidad de microorganismos que intervienen en su elaboración.

A este conjunto de microorganismos que se utilizan durante la industrialización de la leche a fin de estandarizar los productos, impartirles determinadas características físicas, químicas y sensoriales que contribuyen a la aceptabilidad de los mismos, así como para evitar el crecimiento de microorganismos indeseados, se les denomina "iniciadores lácticos" (Gilliland, 1985; Sellars, 1977).

El uso de iniciadores lácticos se realizó primeramente en forma empírica. Fue hasta 1890 que Storch, en Dinamarca y Conn, en Estados Unidos, demostraron que el uso de cultivos aislados de crema agria madurada naturalmente, adicionaba sabor y aroma a la mantequilla. En 1919, Hammer y Bailey, Storch y Ott de Vriess, en estudios independientes, demostraron que los fermentos lácticos que desarrollan un buen sabor y aroma, además de acidez, contienen una mezcla de bacterias. Una de estas es responsable de la formación de ácido (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* o ssp. *cremoris*) y la otra, produce el aroma (*Leuconostoc* sp. o *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*) (Daly, 1985).

A partir de este momento, se han desarrollado estudios de aislamiento y caracterización de las bacterias involucradas en la elaboración de diversos productos (Sellars, 1977). Estos

CUADRO 3. CULTIVOS INICIADORES EN LA INDUSTRIA LACTEA.

Iniciador lactico.	producto	org. presente
Mesófilo		
1. <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	queso maduro: Cheddar,	1
2. <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Cheshire, Dunlop, Derby,	2
<i>Stroua anacetylactis</i>	Doble Gloucester, Edam,	3
3. <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Gouda, Leicester,	4 y 5
4. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>		
Termófilo		
	queso semimaduro:	1,2,3,4
5. <i>Streptococcus faecium</i>	Caerphilly,	
6. <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	Lancashire.	
7. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>		
8. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	queso suave: quarg,	1,2,3,4
9. <i>Lactobacillus helveticus</i>	feta, collage,	
10. <i>Lactobacillus casei</i>	queso crema.	
11. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	cubierta de mohos:	1,2,3,4,
12. <i>Lactobacillus plantarum</i>	camembert, brie,	13,14,
	port l'evogue,	15
	oulomiers.	
Mohos y Levaduras		
13. <i>Penicillium camemberti</i>	alta temperatura:	
14. <i>Penicillium caseicola</i>	parmesan, romano, grana	6-12
15. <i>Penicillium candidum</i>	gruyere, emmenthal.	6-9,22
16. <i>Saccharomyces kefir</i>		
17. <i>Saccharomyces lactis</i>		
18. <i>Candida kefyr</i>		
	yogurt, v skyr	6,7
	kefir	6,7,11,19
	kupian	1,4,7,10,17
	yemer	1,6,7,18
	vakult	1,2,3,4
	filmjolk	1,2,3,4.
Varion		
20. <i>Prevotbacterium tinens</i>		
21. <i>Bifidobacterium bifidum</i>		
22. <i>Pedococcus freudentreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>		

(Taniguchi, 1963).

estudios permiten controlar y mejorar los métodos de producción y la calidad de los productos finales (Tamime, 1983).

Actualmente, los iniciadores lácticos no utilizados en todo el mundo en diversas industrias lácteas. Sin embargo, la información sobre los volúmenes y la composición precisa de los iniciadores lácticos es escasa.

De acuerdo a las estimaciones de Tamime (1990), la producción mundial de cultivos iniciadores puede calcularse en 1.4-2.1 millones de toneladas, para la elaboración de queso. Para la elaboración de yoghurt y productos relacionados, en los países pertenecientes a la International Dairy Federation, se calcula una producción de 2.2 millones de toneladas de iniciadores lácticos (datos calculados para 1987, en base a los volúmenes de producción y la proporción de inoculación).

Es importante remarcar la importancia mundial de la industria láctea. En efecto, representa el 20% del valor total de la producción de alimentos fermentados, reporta beneficios mundiales de alrededor de 7500 millones de libras esterlinas (Bronn, 1976; citado por Tamime, 1983) y, en Estados Unidos representa un tercio de la producción agropecuaria. En vista de la importancia económica de la producción de leche fermentada y queso, la clasificación, mantenimiento, preservación y propagación de los microorganismos involucrados, ha cobrado gran importancia (Tamime, 1983).

1.2.2 EL PAPEL DE LOS INICIADORES LÁCTICOS.

Las principales funciones de los iniciadores lácticos durante la fermentación de la leche son:

- 1o. La producción de ácido láctico, como un resultado de la fermentación de la lactosa. El ácido láctico imparte un distintivo sabor fresco y ácido en la elaboración de leches fermentadas. En la producción de queso, el ácido láctico es importante en la coagulación y textura del producto.
- 2o. La producción de compuestos volátiles (diacetilo y acetaldehído), que contribuyen al aroma de los productos lácteos.
- 3o. La actividad proteolítica y lipolítica de algunos iniciadores lácticos es importante en la maduración de ciertos tipos de quesos.
- 4o. Otros compuestos producidos por los microorganismos, como el alcohol, son esenciales en la elaboración de Kefir y Kumiss. Así mismo, la producción de vitaminas, antibióticos y aminoácidos es de interés para la calidad nutricional de los productos lácteos.
- 5o. Las condiciones de acidez de los productos lácteos previene del crecimiento de patógenos y microorganismos indeseables (Tamime, 1990).

Estas funciones tienen mayor o menor importancia, dependiendo del tipo de producto lácteo en cuestión. A continuación se señalan los microorganismos involucrados en la fermentación de algunos productos lácteos y las principales modificaciones producidas por los mismos.

1.2.2.1 FUNCIÓN DE LOS INICIADORES LÁCTICOS EN LA ELABORACIÓN DE QUESOS.

Las características particulares de un queso son el resultado, no exclusivamente del metabolismo de los iniciadores lácteos involucrados, sino del conjunto de factores que intervienen en la manufactura del queso.

A las propiedades finales del producto contribuyen también: la(n) temperatura(n) del proceso, el coagulante utilizado para coagular la leche, la microflora secundaria presente (tanto contaminante como introducida), el manejo del producto durante las diferentes etapas; entre otros.

La comparación de la composición microbiológica de los quesos elaborados en el mundo, se ha realizado en base a diversos criterios, pero no existe una clasificación general.

Para los fines de esta revisión, se presenta la clasificación de los quesos realizada por Law (1982), basada en el contenido de humedad y la complejidad de la microflora. En esta se señalan las principales funciones de los microorganismos sobre las propiedades finales del queso.

= Quesos suaves, cuyo contenido de humedad oscila entre 50 y 80% y presentan una microflora bacteriana simple, los microorganismos involucrados en la fermentación de este tipo de quesos son bacterias lácticas mesófilas, generalmente *Lactococcus lactis* spp. *lactis* y spp. *cremoris*, mezclados con *Lactobacillus lactis* spp. *lactis* *brovari* *diacetylactis* o *thermophilus* spp. Si el producto no consume fresco (Cottage, Cambridge, Bondon) está en la microflora principal. Si el queso está madurado, presenta además mohos como *Penicillium caseicola* y *Penicillium camemberti* (Camembert, Brie, Pont l'Évoque), o bacterias termófilas (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus* spp. (Brick, Limburger), que contribuyen a la producción del aroma característico de estos productos.

= Quesos semiduros o semisuaves, que presentan iniciadores mesófilos similares a los anteriores, pero cuyo proceso de manufactura es más complejo. Durante el periodo de coagulación de la leche se incluye un tiempo de cocción, a fin de disminuir la humedad hasta un 45 %, aproximadamente, y alcanzar una consistencia firme. Los productos representativos de este tipo son los quesos Edam y Gouda.

Quesos duros, si la humedad es de aproximadamente 40%. Este grupo puede subdividirse, de acuerdo a la flora bacteriana presente, en tres grupos. El primero, cuya flora bacteriana es semejante a la de los quesos suaves y semiduros, como el Cheddar,

El segundo, que son quesos inoculados con esporas de mohos, principalmente *Fusarium roqueforti*, que al germinar generan aroma y sabor, además de producir una consistencia más suelta del queso; también intervienen levaduras y micrococcos. Stilton, Danón, Azul, Roquefort y Gorgonzola, son algunos ejemplos. El último grupo, representado por los quesos Emmental, Gruyère y otras variedades de quesos Suizos, se distingue por la presencia de bacterias termófilas y ácido-propiónicas. Esta microflora, constituida principalmente por *Propionibacterium shermanii*, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* y ssp. *bulgaricus*, es responsable de la fermentación del queso durante el proceso de cocción. En algunas variedades pueden intervenir, además, levaduras.

= Quesos muy duros o superos. Son quesos con una humedad de 25-34%, como el Parmesano, Romano y Asiago. En su elaboración intervienen las bacterias termófilas *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* o ssp. *bulgaricus*.

1.2.2.2 FUNCIÓN DE LOS INICIADORES LÁCTICOS EN LAS LECHEES FERMENTADAS.

Los iniciadores lácticos participantes en la elaboración de

leches fermentadas varían según el producto particular. En general, la función principal de los microorganismos durante la elaboración de estos productos es la producción de acidez. En base a este parámetro — el contenido de ácido láctico —, las leches fermentadas se clasifican como:

- Muy ácidas: Yoghurt, leche acidificada, leche búlgara.
- Ligeramente ácidas: leches fermentadas, leches escandinavas y crema agria.
- Poco ácidas y que contienen alcohol: kefir y kumis (Bottazzi, 1983).

Las principales características de estos productos, enfatizando la composición microbiana, se reviven a continuación (Bottazzi, 1983; Robinson y Tamime, 1990; Sellars, 1981; Vedamuthu, 1982).

Yoghurt.

El yoghurt es el producto de la fermentación de leche entera, con alto contenido de sólidos, por una mezcla simbiótica de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. El yoghurt presenta alta concentración de ácido acético y acetaldehído, que son los principales responsables de su sabor característico. Esta microflora permite la formación de un cuerpo viscoso, cohesivo y firme, ya que algunas cepas tienen la capacidad de elaborar "roman". La alta concentración de ácido láctico en estos

productos (0.7-1.1%), además de participar en la obtención de sabor y consistencia, evita el crecimiento de microorganismos indeseables.

Leche Acidificada.

La leche acidificada es un producto semejante al yoghurt, producido por la actividad metabólica de *Lactobacillus acidophilus*, exclusivamente. Es un producto muy amargo, dado que el principal metabolito presente es el ácido láctico (0.7-1.0%). Además, no hay un balance de compuestos saborizantes, por lo que no es una bebida popular. En efecto, el principal consumo de las leches acidificadas se da por razones terapéuticas, ya que el microorganismo involucrado forma parte de la flora intestinal.

Leche Bulgara.

Como el producto anterior, la leche búlgara es resultado de la fermentación de la leche por un solo microorganismo, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. La leche búlgara presenta una concentración de ácido láctico de 1-4%.

Leches fermentadas:

Jocoque.

En la elaboración de jocoque se emplea leche descremada o parcialmente descremada, que es fermentada por bacterias lácticas mesófilas. Generalmente, en esta fermentación intervienen

Lactococcus lactis spp. *lactis* y/o spp. *cremoris*, mezclados con *Leuconostoc mesenteroides* spp. *cremoris* o *Lactococcus lactis* *biovar diacetylactis*. El producto final es un fluido de viscosidad moderada con características de aroma y sabor agradables.

Los principales cambios en la leche, debido al metabolismo microbiano, se deben a la producción de ácido láctico (0.45-0.9%). Este elimina los microorganismos indeseados, facilita la denaturalización de proteínas, por lo que contribuye a la consistencia viscosa y al cuerpo del producto. El sabor se debe a la presencia del ácido láctico y la producción de ácido acético, diacetilo, alcohol y CO₂ durante la fermentación.

Leches Escandinavas.

Un conjunto de leches fermentadas por bacterias lácticas mesófilas, de consumo popular en los países nórdicos de Europa, ha sido denominado "leches escandinavas". A este grupo pertenecen el Filmjölk, Ymer, Lactofil, Viili y Taatmjolk.

Las leches fermentadas escandinavas son elaboradas con leche entera de vaca, que es fermentada por una mezcla compuesta de *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *Lactococcus lactis* spp. *lactis* *biovar diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* spp. *cremoris* y, ocasionalmente, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*. El producto de la fermentación presenta acidez moderada, sabor fresco y aroma a diacetilo. La consistencia del producto es viscosa y es el resultado de la concentración de sólidos, por medio de remoción de

suero, o bien, de la producción de glicoproteínas extracelulares por alguna de las cepas de *Lactococcus* o *Leuconostoc* que intervienen en el proceso.

Crema Agria.

La fermentación de la crema por bacterias lácticas mesófilas produce el agriado de la misma. La crema agria presenta un sabor y aroma amantequillados y amargos, resultantes de la formación de ácido láctico y diacetilo. Su consistencia es viscosa, dado el contenido de sólidos de la crema y la denaturalización proteica de la misma.

Kefir.

El kefir es una leche fermentada de origen caucásico, tradicional en Rusia. Es el resultado de la fermentación de leche de vaca, por la flora presente en los granos de kefir. La fermentación es realizada por una flora compleja, comunmente compuesta de *Saccharomyces kefir*, *Candida kefir*, *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Streptococcus durans*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus miodophilus*, *Lactobacillus brevis* y *Leuconostoc* sp. Los productos principales de la fermentación son ácido láctico (0.9-1.1%) y alcohol (0.5-1.0%), que permiten la obtención de una bebida efervescente y enpumona.

Kumiss.

El kumiss es un producto originario del Asia Central.

Inicialmente se elaboraba con leche de burra, pero en la actualidad se emplea leche de vaca adicionada con sacarosa. El kumis resulta de la fermentación de la leche por *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus aridophilus* y *Saccharomyces lactis*, una levadura que fermenta la lactosa. Los productos metabólicos, alcohol, ácido láctico y CO₂, permiten obtener una bebida refrescante, efervescente, de sabor lácteo.

1.2.3 USO DE LOS INICIADORES LÁCTICOS.

Tradicionalmente la fermentación de la leche se realizó de forma empírica dejando la leche a temperatura ambiente y permitiendo el desarrollo de los microorganismos presentes en ella. Posteriormente la leche se fermentó añadiendo pequeñas cantidades del producto de una fermentación anterior, es decir, la leche era inoculada (Daly, 1985; Heap y Lawrence, 1988; Tamime, 1990).

Hasta hace 50 años, en la industria láctea se han empleado iniciadores lácteos de composición desconocida. Esta situación ocasiona problemas durante el proceso, tales como la variabilidad de la calidad de los productos finales y la contaminación por fagos. Debido a esta problemática y al progreso de la industria láctea a gran escala, ha sido necesario desarrollar cultivos iniciadores de composición conocida que proporcionen una tasa de acidificación predecible y controlable, que disminuyan los riesgos

de contaminación y que aseguren una alta calidad en la textura, aroma y sabor del producto final (Daly, 1985).

Los primeros iniciadores lácteos utilizados, como se ha mencionado, fueron aislados de cremas y leches fermentadas naturalmente. Estos iniciadores presentaban una composición mixta de bacterias, en proporciones variables, de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y ssp. *cremoris*, principalmente, más una flora menor de bacterias fermentadoras de almidón, *Leuconostoc* spp. y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Este tipo de iniciadores "empíricos" o "artesanales" han sido utilizados hasta hace pocos años en la elaboración de quesos sin tener ningún cuidado particular durante su preparación. De igual manera, los iniciadores lácteos termófilos utilizados para la elaboración de yoghurt y ciertos tipos de queso, se han propagado y empleado de manera empírica (Heap y Lawrence, 1988).

Debido a los problemas suscitados por la contaminación con bacteriofagos, los "iniciadores empíricos" han sido expuestos, constante e intencionalmente, a la presencia de fagos, de esta forma es posible seleccionar aquellos iniciadores que presenten menor riesgo de contaminación, los microorganismos así aislados han sido denominados "iniciadores P" (practice). Este fue el método utilizado en Holanda, Suecia e Italia, para obtener iniciadores lácteos más estables. Sin embargo, al cultivar y conservar los iniciadores P por largos periodos, la transferencia sucesiva de los cultivos en condiciones asepticas y la presencia de mutantes,

provoca su transformación en "iniciadores L" (laboratory), susceptibles de contaminación.

El empleo de esta técnica para la obtención de iniciadores, al bien disminuye los riesgos de contaminación, no presenta patrones de fermentación totalmente reproducibles. En efecto, existen variaciones en la capacidad de producción de acidez así como en las proporciones de las poblaciones presentes. El producto de la fermentación, debido a estos fenómenos, presenta una calidad final variable.

Esta situación motivó el desarrollo de iniciadores lécnicos de cepas seleccionadas, utilizadas en forma pura, pareada o múltiple.

Los pioneros en la obtención de este tipo de "sistemas de iniciadores" fueron los neozelandeses, en el Dairy Research Institute (Heap y Lawrence, 1988). La evolución de la selección y la forma de uno de este tipo de iniciadores, se resume a continuación.

Obtención y selección de cepas simples. Su empleo decayó debido los problemas de contaminación con fagos. Si bien se utilizan cepas seleccionadas, con cierta resistencia a este tipo de contaminación, la presencia de una sola cepa permite que, una vez contaminada una fermentación, esta se pierda totalmente. Igualmente, el desarrollo de sabores, aromas y consistencia de un producto no siempre es posible por medio de una sola especie, como

se ha discutido en la sección anterior.

= Desarrollo de sistemas de cepas simples pareadas y rotación de las mismas. Este tipo de cultivos iniciadores presenta dos cepas de una misma especie. Para evitar problemas con fagos estos cultivos pueden sustituirse o rotarse, después de cierto tiempo, con otro par de cepas. Si bien se disminuyen las probabilidades de contaminación, las limitaciones en cuanto a desarrollo de ciertas características en el producto final, continúan presentes.

Dos variantes de este tipo de cultivos, el uso de cepas proteínasa negativa y cepas sensibles a la temperatura, se desarrollaron para evitar problemas de amargor en el producto y controlar el grado de acidez. El desarrollo de amargor puede eliminarse empleando cepas con escasa capacidad proteolítica en combinación con cepas proteolíticas, lo que disminuye la producción de péptidos de cadena corta, responsables del sabor amargo. El control de la producción de ácido y de amargor también puede lograrse empleando cepas sensibles a la temperatura. Estas cepas cesan de crecer al aumentar la temperatura por lo que la concentración bacteriana final es menor y, con ello, la actividad metabólica. De esta manera puede alcanzarse un grado de proteólisis y de acidez adecuados.

= Cultivos triplets. A fin de obtener un balance de especies productoras de acidez, sabor, aroma e insensibilidad a fagos, se

desarrollaron cultivos compuestos de tres cepas de distintas especies, en rotación con otro cultivo triple. Sin embargo, en este tipo de iniciadores es difícil controlar la proporción de cada una de las cepas presentes.

= Cultivos múltiples. A fin de mejorar la calidad de los cultivos triples, se han hecho mezclas de varias cepas de distintas especies. Este tipo de cultivos es poco susceptible a la contaminación y desarrolla cualidades adecuadas en el producto final. Sin embargo, la producción de las cepas se hace de manera aislada y se mezclan antes de almacenar (congelación, liofilización), o antes de inocular la leche de producción.

Actualmente, los microorganismos son utilizados en la industria láctea en forma de mezclas, de composición conocida o no, en las que las proporciones poblacionales son variables. Este tipo de cultivo tiene una gran aceptación dada su capacidad de proporcionar diversas funciones esenciales: producción de ácido, sabor, aroma y textura (Daly, 1985). En menor medida, especialmente para la fabricación de queso Cheddar en Nueva Zelanda, Estados Unidos, Irlanda, Escocia y Australia, se utilizan cepas puras (Tamime, 1983).

Aunque muchas empresas lácteas mantienen sus propias colecciones de cultivos, en la mayoría de los casos los cultivos iniciadores son proporcionados por industrias especializadas o

centros de investigación en lacteos. Estos cultivos, ya sean puros o mezclados, pueden obtenerse en diversas presentaciones: liofilizada o congelada (requieren de propagación); concentrados liofilizados (para introducción directa al tanque de inoculación); o superconcentrados liofilizados (inoculación directa a la leche) (Daly, 1985).

En México, los iniciadores lácteos son obtenidos de cultivos artesanales (pequeña escala) o a través de la importación de cultivos liofilizados distribuidos por los monopolios de empresas francesas y alemanas (Grupo Imagen, 1989). Los cultivos liofilizados contienen las bacterias lácticas en forma deshidratada. Aunque contienen millones de células viables por gramo, los organismos están inactivos. Por esta razón, no se desarrollan rápidamente en la leche hasta el segundo periodo de incubación. Esta condición implica que para obtener las bacterias activas es necesario reactivar el cultivo. Este trabajo debe ser realizado por personal calificado y requiere equipo y condiciones especiales de cultivo (incubadoras, esterilizadores, temperatura, etc.). Así, la importación de cultivos lácteos, además de requerir de condiciones especiales para su utilización obliga a la importación de la tecnología y asesorías necesarias. Si bien, la producción de leche en México es baja, el 40% del volumen de leche industrializada es transformada en queso, crema, mantequillas o bebidas fermentas y el valor agregado generado por esta transformación alcanzó, en 1975, 1.5 miles de millones de pesos (Reynoso, 1981). Entonces, la dependencia de esta industria, en

materia de iniciadores lácticos, reduce las posibilidades de modificación de los procesos de manufactura y por lo tanto, la mejora de la calidad de los productos.

13 CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LOS INICIADORES LÁCTICOS

El conjunto de los iniciadores lácticos, morfológicamente se clasifican como Gram +, no formadores de esporas, presentan formas coccoides o bacilares y son inmóviles o raramente móviles. Fisiológicamente, se caracterizan por ser fermentadores de carbohidratos, siendo el ácido láctico su principal producto; son catalasa negativos, microaerofílicos o anaerobios, quimioorganótrofos y nutricionalmente complejos. En cuanto a sus requerimientos de temperatura, son mesófilos o termófilos (Deibel y Seeley Jr., 1987).

De acuerdo con Kilara y Shahani (1978), en base a las vías metabólicas que utilizan al fermentar carbohidratos, se clasifican como:

- * Homofermentativos, se producen ácido láctico como principal producto del metabolismo de carbohidratos, usando la vía de Embden Meyerhoff.
- * Heterofermentativos, ni además de ácido láctico producen una variedad de compuestos que incluyen ácido acético, etanol y CO₂, en distintas cantidades, utilizando la vía de hexosan monofosfato.

Una importante característica negativa de las bacterias lácticas, es su complejidad nutricional. Los iniciadores lácticos bacterianos, presentan altos requerimientos de aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas del complejo B para su desarrollo y son incapaces de crecer en medios minerales. Producen pocas enzimas extracelulares por lo que no atacan polisacáridos, en tanto que sus enzimas lipolíticas son relativamente débiles. Estos factores deben tenerse en consideración al seleccionar los medios de cultivo para su propagación y mantenimiento (Margalith, 1981).

Los iniciadores lácticos utilizados en el presente estudio pertenecen a los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc*, por lo que los describiremos en mayor detalle.

Las bacterias lácticas del género *Lactococcus* pertenecen al grupo serológico N de Lancerfield. En base a trabajos de taxonomía numérica y quimiotaxia e hibridación de ácidos nucleicos, las especies conocidas como *Streptococcus lactis* ssp. *lactis* o *Streptococcus lactis* y *Streptococcus lactis* ssp. *cremoris* o *Streptococcus cremoris* no han agrupado bajo el género *Lactococcus*. Actualmente, estas especies se denominan como *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, respectivamente (Schleifer y Kilpper-Bitz, 1987). Ambas cepas son mesófilas, homofermentativas y representan a los iniciadores lácticos de mayor interés científico e industrial.

Las principales diferencias entre estas bacterias son la producción de amoníaco a partir de arginina y la degradación de maltosa por *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, siendo que la ssp. *cremoris* es negativa a estas funciones (Schleifer y Kilpper-Balz, 1987).

A diferencia de los *Lactococcus* mencionados, *Leuconostoc* presenta un metabolismo heterofermentativo. Este género también está dividido en varias especies y subespecies, pero el único de importancia industrial es *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* (también conocido como *Leuconostoc cremoris* o *Leuconostoc citreovarum*) ya que tiene la capacidad de nitrificar acetona y diacetilo a partir de citratos, compuestos importantes en la producción de sabor al elaborar cremas agrias, jocoques, quesos y mantequillas, así como en otros productos no lácteos. Este microorganismo produce ácido acético, que funciona como agente bactericida (Garvie, 1987; Sorella y Speck, 1972; Milliere y col., 1989).

1.4 CULTIVO MIXTO DE LOS INICIADORES LÁCTICOS

Industrialmente, como se ha mencionado, los iniciadores lácteos se emplean como cepas aisladas o en mezclas de géneros, especies, cepas y variantes, cuya composición no siempre es conocida (Daly, 1985; Heap y Lawrence, 1988; Huttenholtz, 1986).

Los cultivos lácteos más ampliamente usados en la

manufactura de productos lácteos son de tipo mezcla, a fin de satisfacer tanto los requerimientos de producción de acidez como de sabor y aroma. En este tipo de inóculos, se presentan diversas interacciones entre los microorganismos presentes. Interacciones, tanto benéficas como perjudiciales, que provocan cambios en la composición del mismo.

Las interacciones ecológicas presentadas en los cultivos han sido descritas por Meers (Hugenoltz, 1986), habiéndose reportado casos de competencia, amensalismo, comensalismo, mutualismo y parasitismo.

Dado que estas relaciones son producto de las condiciones y modos de cultivo, es posible utilizar dos estrategias para la formulación de cultivos lácteos mixtos de composición estable, estas son:

- a) Controlar el tamaño del inóculo,
- b) Modificar los parámetros físicoquímicos (Boquien y col., 1988).

La segunda estrategia, la modificación de las variables medioambientales, es ampliamente utilizada en los estudios sobre mezclas bacterianas.

Dado que los microorganismos presentes en los cultivos mixtos tienen aproximadamente los mismos requerimientos nutricionales, las bacterias con μ_{max} más altas y valores de K_s más bajos dominarán en los cultivos mixtos. Así mismo, las distintas

capacidades metabólicas, tales como la utilización de una fuente de nutrientes, la producción de aminoácidos, inhibidores o antibióticos, la sensibilidad a la acidez, salinidad y temperatura, determinaran las relaciones bacterianas presentes en un cultivo mixto.

En efecto, se ha reportado que una cepa de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP, no compete con otras dos cepas, M1 y K8, cuando crecen a bajas tasas de dilución, pero domina en altos valores de la misma, debido a su mayor tasa específica de crecimiento y menor constante de afinidad por el sustrato (Hugenoltz, 1986).

En estudios realizados por Reddy y col. (1972), se reportan diversas relaciones de competencia entre diferentes cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, ssp. *lactis* y ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Los autores encontraron competencia, atribuible a diferentes habilidades de crecimiento y tolerancia a condiciones ácidas, entre las cepas *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* DR, ssp. *lactis* (2) y ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* 1B-16, siendo dominante la ssp. *cremoris* DR. En el mismo estudio, los autores reportan dominio de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* 26-2 cuando crece con la ssp. *cremoris* M1A y ssp. *lactis* (2). Este dominio se relaciona con ciertas características de la cepa 26-2, tales como la eficiencia metabólica y la versatilidad para utilizar citratos y lactosa como fuentes de carbono y la relativa tolerancia al ácido.

Otro factor que puede afectar la composición del inóculo,

favoreciendo el dominio de una cepa o especie sobre las demás es la temperatura. Estudios acerca de la temperatura óptima de crecimiento para los distintos iniciadores lácticos utilizados, se han realizado extensamente (Collins, 1977; Cooper y Collins, 1977; Goel y Marth, 1968; Lee y Collins, 1975). Se han reportado temperaturas óptimas entre 30 y 34^oC para *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, 25 a 31^oC para la ssp. *cremoris*, y para *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, de 26^oC. Sin embargo, el estudio de Lee y Collins (1975), enfatiza el error en que puede incurrirse al aplicar valores promedio de temperaturas óptimas a cepas individuales. En efecto, existen serias diferencias entre cada cepa que se reflejan en los diferentes tiempos de duplicación.

Trabajos realizados sobre el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* 12 en cultivo mixto con *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, Pack y col. (1967) muestran que *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* presenta un mayor crecimiento y una más temprana síntesis de diacetilo a 30 que a 21^oC.

Por otra parte, Peterson (1975) observa que es de mayor interés la composición del medio de cultivo que los cambios de pH o temperatura. Peterson estudió el comportamiento de diferentes mezclas comerciales de iniciadores, en distintos medios de cultivo y varias condiciones de pH y temperatura. El autor reporta un mayor efecto del pH y la temperatura, sobre el crecimiento de los iniciadores lácticos, al utilizar un medio a base de triptona que otro a base de suero de leche o de leche descremada. El efecto de

Entón se refleja en las tasas de crecimiento de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, ssp. *cremoris*, ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* y *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*. Es evidente que la temperatura es un factor importante a considerar en la competencia microbiana.

Una relación amensal, también puede afectar la composición de los cultivos lácticos mixtos. Este tipo de interacción, generalmente se atribuye a la producción de antibióticos (nicina) o bacteriocinas. La nicina inhibe el crecimiento de bacterias Gram + ya que afecta la formación de la membrana celular; esta sustancia es producto del metabolismo de algunas cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y ssp. *cremoris*. Las bacteriocinas inhiben el crecimiento de bacterias relacionadas con la productora y son sintetizadas por diferentes especies lácticas. La producción de estos inhibidores tendrá una fuerte influencia en la composición de los cultivos lácticos mixtos (Huenholtz, 1986).

Otros casos de relaciones amensales han sido reportadas. Reddy y col. (1972) atribuyen el dominio de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* Mis. nombre *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 7963 y ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* 18-16, a la capacidad de esta cepa para producir antibiótico, sugerencia también hecha por Reddy y col. (1972).

Interacciones benéficas, tales como mutualismo y comensalismo, están bien documentadas. Dahiya y Speck (1962),

encontraron una relación positiva entre *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y ssp. *cremoris*. En este estudio, la subespecie *lactis* produce un factor de crecimiento (adenina), que estimula el crecimiento de ambas especies. Por esta razón, se observa mayor actividad en el cultivo mixto que en el puro. Así mismo, especies con actividad proteolítica alta pueden favorecer el crecimiento de aquellas cuyos sistemas proteolíticos sean poco eficientes (Hugenholtz, 1986).

Reddy y col. (1972) describen un ejemplo claro de compatibilidad entre las especies mezcladas, en la combinación compuesta por *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP, ssp. *lactis* 7963 y ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* 31-2. Este comportamiento puede ser deseable para la aplicación en la industria láctea.

Boquien y col. (1988), estudiaron los efectos del control de pH y la adición de citratos sobre el crecimiento de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* AM2 y *Leuconostoc lactis* CNRZ 1091 en cultivos puros y en mezcla. Estos autores concluyen que el control de pH (6.3) favorece el crecimiento de ambas especies, en tanto que la presencia de citratos mejora el crecimiento de *Leuconostoc lactis*, tanto en los cultivos mixtos como puros, siendo, sin embargo, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* dominante.

Los estudios experimentales sobre el control del tamaño del inóculo son escasos. Breusegem y Rastin (1990) y Bea] y Corrieu, (1991), han elaborado modelos matemáticos a fin de regular la

población bacteriana en cultivos mixtos. En estos modelos, el crecimiento se limita exclusivamente por los factores ambientales de interés o por la biomasa inicial. Sin embargo, las características de crecimiento de las especies utilizadas en estos estudios, son muy diferentes entre sí.

Por otro lado, un factor crucial en la producción de iniciadores lácticos, que afecta en gran medida su estabilidad, es el método de conservación. Este punto es de gran interés, considerando que los cultivos deben mantener su nivel de viabilidad, capacidad de producción de ácido láctico y composición bacteriana (en mezclas) en los niveles adecuados para la elaboración de productos de calidad (Gilliland, 1985).

Sin embargo, existen pocos estudios sobre la dinámica poblacional de los iniciadores lácticos mixtos durante el almacenamiento. En la bibliografía disponible, se encontró un trabajo sobre la dinámica de poblaciones de cepas de una misma especie de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, realizado por Leach y Sandine (1975).

Existen diferentes métodos de conservación, de los cuales la congelación a -196°C (en nitrógeno líquido) y a temperaturas menores de -20°C , adicionando crioprotectores son los que presentan mayores ventajas (Thunell y Sandine, 1984; y Tsevetkov y Shishkova, 1982). Sin embargo, la refrigeración es un método de

conservación que requiere un equipo sencillo y económico y presenta una efectividad de 20 días (Pérez Gavilán y Pérez Gavilán, 1984). En los estudios realizados por Goldhaber (1982) y Fuentes (1987) este método de conservación ha mostrado ser efectiva. En estos trabajos se almacenaron las cepas *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IM147 y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* IM149 y *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* IM17, a 4°C por 24 días, conservando niveles de viabilidad y actividad láctica aceptables para la industria láctea.

Conjuntando todo lo anterior, podemos observar que existe un gran interés científico e industrial en obtener iniciadores lácteos, tanto en cultivo puro como mixto, que satisfagan las necesidades de la industria. Por ello, es necesario realizar estudios sobre el cultivo mixto de bacterias lácteas, utilizando no solamente la manipulación de parámetros físico-químicos, sino también de la biomasa inicial.

A fin de contribuir al conocimiento de la cinética de crecimiento de las bacterias lácticas, se ha realizado esta investigación, teniendo como

OBJETIVO GENERAL:

CONOCER EL COMPORTAMIENTO DE LAS BACTERIAS LACTICAS

Lactococcus lactis ssp. *lactis* BM 147,

Lactococcus lactis ssp. *cremoris* BM 149 y

Leuconostoc mesenteroides ssp. *cremoris* BM 17

**DURANTE EL CULTIVO MIXTO EN DIFERENTES PROPORCIONES DE INOCULACION
Y DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACION A DIFERENTES
TIEMPOS DE COSCHA.**

v como OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Conocer la cinética de crecimiento, producción de ácido láctico y actividad láctica en cultivo puro, de las especies mencionadas.

2. Conocer la cinética de crecimiento, producción de ácido láctico y actividad láctica de los cultivos mixtos de:

a). *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*.

b). *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

En diferentes proporciones de inoculación.

3. Conocer el efecto de la edad del cultivo sobre el pH, la viabilidad celular y la actividad láctica durante el almacenamiento en refrigeración, de los cultivos puros y mixtos

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

2.1 MICROORGANISMOS.

Las cepas estudiadas fueron *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BM 147, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* BM 149 y *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* BM 17, pertenecientes a la colección del cepario del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se mantuvieron a -196°C (en nitrógeno líquido), en solución de lactosa (Chavarri y col. 1988a).

2.2 MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo utilizado fue el propuesto por Goldhaber (1982), elaborado con materias primas de grado industrial disueltas en agua destilada.

La composición del medio de cultivo industrial se encuentra en el cuadro 4.

2.3 REACTOR

El reactor utilizado fue un fermentador estándar, agitado magnéticamente con impulsores tipo turbina (New Brunswick Sci. M19-1400). Se utilizó una jarra de acero inoxidable de 4 L, empleando 3 L de volumen útil. La temperatura fue mantenida a 29°C . El medio fue agitado a 200 rpm. El pH se mantuvo constante a 6.9 ± 0.3 , por la adición automática de hidróxido de sodio 5 N.

CUADRO 4 . COMPOSICION DEL MEDIO INDUSTRIAL

	% w/v
Extracto de levadura	1.0
Glucosa	2.5
Leche descremada	6.0
Casinato de sodio	2.0
pH*	7.2

* antes de esterilizar.

2.4 PREPARACION DE LOS INOCULOS

Los microorganismos congelados se reactivaron de acuerdo con la metodología propuesta por Goldhaber (1982), como se detalla en el cuadro 5.

Los inoculos se prepararon a partir de la tercera resiembra, inoculando al 1% (v/v) 150 ml de medio industrial. Se incubaron por 10 hrs a 29°C. De estos caldos de fermentación se tomaron las cantidades necesarias a fin de tener las proporciones bacterianas deseadas (ver condiciones de cultivo).

2.5 CONDICIONES DE CULTIVO

Cada especie se cultivó en forma pura y en mezcla, con otra especie, en distintas proporciones poblacionales iniciales.

Los cultivos mixtos estuvieron compuestos por los pares de especies:

- a) *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (SL) mezclada con *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (SC), y
- b) *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* mezclada con *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *crecans* (LC).

De cada una de estas mezclas, se realizaron fermentaciones modificando la concentración de cada especie en el inóculo. Se estudiaron las siguientes proporciones poblacionales iniciales (SL:LC ó SL:SC): 1:10, 1:1 y 10:1. Los volúmenes de inoculación utilizados, de cada una de las poblaciones de los cultivos mixtos, se muestran en el cuadro 6.

CUADRO 5. METODOLOGIA PARA LA REACTIVACION DE CEPAS.

Medio de cultivo	Leche doncremada 11% ST.
Volumen inoculado	1% (v/v).
Temperatura incubación	29 ⁰ C.
Siembra inicial	24 hra. de incubación.
Reinocubras	1a. 18-24 hra. incub. 2a. 18 hra. incubación. 3a. 12 hra. incubación.

CUADRO B. VOLUMENES DE INOCULACION DE LOS CULTIVOS EXPERIMENTALES.

CULTIVOS PUROS

especie	volumen (ml)	volumen total (ml)
SL	150	150
SC	150	150
LC	150	150

CULTIVOS MIXTOS

proporciones
poblacionales
iniciales

	volumen SL:LC (ml)	volumen total(ml)
SL : LC		
1 : 1	9/141	150
1 : 10	1/149	150
10 : 1	59/ 91	150

	volumen SL:SC (ml)	volumen total(ml)
SL : SC		
1 : 1	55/95	150
1 : 10	143/ 7	150
10 : 1	122/27	150

Las fermentaciones se realizaron en lote, por duplicado, de las que se presenta el promedio. Durante estas, se estudió el crecimiento, la producción de ácido láctico y la actividad láctica. El tiempo de cultivo fue de 24 horas. Las muestras se tomaron cada 1.5 hrs., durante las primeras 6 horas; después, cada 2 horas, hasta las 12 hrs. de fermentación y se tomó una muestra al final de la fermentación (24 horas).

2.6 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

En la segunda fermentación (duplicado) de cada una de las fermentaciones con diferentes proporciones de inoculación realizadas, se estudió el efecto del almacenamiento. Se tomaron muestras (70ml) a las 8, 10, 12 y 24 horas de cultivo. Se colectaron en matraces Erlenmeyer estériles y se enfriaron numerando los matraces en hielo. Posteriormente se almacenaron a 4°C.

El período de almacenamiento en refrigeración, fue de 21 días. Durante este período, se tomaron muestras en condiciones estériles a los 3, 9, 14 y 21 días. En estas muestras se estudió la viabilidad de las especies, el pH y la actividad láctica del cultivo almacenado.

2.7 CUANTIFICACION DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS

Las muestras tomadas durante cada fermentación, así como las

correspondientes a las muestras almacenadas, se diluyeron hasta 10^{-9} , por diluciones decimales en agua destilada estéril. Cada población bacteriana fue cuantificada por el método de cuenta viable en placa.

Los medios de cultivo utilizados para la cuantificación de las poblaciones fueron medios diferenciales y selectivos:

Se utilizó medio diferencial de Reddy y col. (1972) que permite la cuantificación de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (SL) y de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (SC) en base a la morfología y coloración: SL presenta una coloración blanca, de tamaño relativamente grande y de forma lenticular; SC se observa de color amarillento y tiene menor tamaño.

Para cuantificar *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* (LC), se utilizó el medio de Reddy, adicionado con tetraciclina (0.2µg/ml). De esta manera se selecciona a LC impidiendo el crecimiento de SL (McDonough y col. 1963)

Las cajas de Petri fueron incubadas durante 48 horas a 29°C.

2.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LÁCTICA, DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO Y DEL pH.

La determinación de la capacidad de producción de ácido láctico (actividad láctica), se realizó mediante la cuantificación del ácido láctico producido por cada 100 ml de leche descremada por un inóculo de 6%, durante 3 horas de incubación a 29°C :

50 mL de leche descremada (1%) pasteurizada (63°C, 30min), se

inoculó (6% v/v) con el caldo de fermentación y se incubó a 29°C durante 3 horas. Una muestra de 9 ml se tituló con NaOH 0.1 N, usando fenolftaleína como indicador. El gasto de hidróxido de sodio se expresa como % de actividad láctica (Leach y Sandino, 1975).

El ácido láctico producido durante la fermentación se determinó por el consumo de NaOH 0.1N añadido durante la misma, dado que se realiza a pH constante.

La medición de pH se hizo con un electrodo de cuerpo epóxico combinado, adaptado a un potenciómetro Beckman 40.

2.9 POBLACIONES BACTERIANAS INICIALES Y FINALES.

Durante las fermentaciones, tanto de las cepas puras como mezcladas, las cuentas bacterianas al inicio y al final del cultivo, representan las poblaciones iniciales (X_0) y finales (X_f) de cada especie.

2.10 DETERMINACION DE LA TASA ESPECIFICA DE CRECIMIENTO.

Durante la fase exponencial de crecimiento, el logaritmo natural del número de células varía linealmente respecto al tiempo. Entonces, la tasa específica de crecimiento, μ , es la pendiente de esta línea. Esta fue determinada mediante la regresión lineal aplicada a los puntos experimentales (al menos 4 puntos) de la recta: $\ln X = \mu t + b$. Los valores observados de μ en

los cultivos puros y mixtos, fueron comparados usando la prueba de Fisher, que se describe adelante.

2.11 DETERMINACION DE LA VELOCIDAD MAXIMA DE PRODUCCION DE ACIDO LACTICO, DE LA CONCENTRACION FINAL DE ACIDO LACTICO DE LA PRODUCTIVIDAD VOLUMETRICA Y DE LA PRODUCTIVIDAD MAXIMA.

La concentración de ácido láctico aumenta en relación exponencial respecto al tiempo, durante cierto tiempo de la fermentación, dado que en un producto parcialmente asociado al crecimiento, la velocidad máxima de producción de ácido láctico (V_{max}), fue determinada calculando la pendiente de la recta $\ln P = V_{max}t + b$ (P concentración de ácido láctico) aplicada a los puntos experimentales (al menos 4 puntos). Los valores observados de V_{max} en las diferentes fermentaciones, fueron comparados entre sí por medio de la prueba de Fisher, que se describe a continuación.

Se cuantificó la concentración final de ácido láctico a las 24 horas de cultivo, representada por P_f . Esta concentración final dividida entre el tiempo de fermentación expresa la productividad volumétrica P_v (Wang y col., 1979). Los valores de P_f y P_v se determinaron en los cultivos puros y mixtos, reportando un promedio.

La productividad máxima de ácido láctico (P_{max}) está dada por la pendiente de la recta que se forma uniendo al origen (0,0) por la línea tangente a la curva de producción de ácido láctico (Wang y col., 1979).

2.12 PRUEBA DE FISHER

Las pendientes de las líneas de regresión obtenidas para determinar la μ o la V_{max} , se compararon entre los diferentes condiciones de cultivo. Las pendientes obtenidas en los cultivos puros se compararon entre sí y con las obtenidas en los cultivos mixtos. Las pendientes de las rectas de regresión correspondientes a las tasas de crecimiento se compararon especie por especie, entre los cultivos puros y los mixtos. Las pendientes correspondientes a las velocidades de producción de ácido láctico, obtenidas en los cultivos mixtos se compararon con aquéllas obtenidas en el cultivo puro de SL.

Para cada una de las líneas de regresión se hizo el análisis de varianza, con base en el método de mínimos cuadrados. Se determinó:

1. La "variabilidad total" de los puntos experimentales respecto al valor medio de la recta calculada (suma de cuadrados totales).
2. La variabilidad de la variable independiente (suma de cuadrados de X, tiempo).
3. La suma de productos cruzados, que denota las desviaciones de las variables dependiente e independiente, respecto del valor medio correspondiente.
4. La variabilidad de la regresión lineal calculada, respecto al punto medio de la misma (suma de cuadrados de la regresión), se obtiene dividiendo 3 entre 2.

5. Se calculó la diferencia entre 4 y 1. Esta diferencia denota la dependencia de la variación de la variable dependiente respecto a la independiente.
6. los grados de libertad, para cada cálculo.
7. Se numeraron las varianzas residuales (SSe) y los grados de libertad (DFe) de las rectas en cuestión.
8. Se numeraron los valores de 1, 2 y 3 de cada regresión, a fin de calcular la "suma de cuadrados residuales común". Este valor engloba todos los datos de las regresiones a comparar, como si fueran una sola recta.

A fin de comprobar (o rechazar) la hipótesis de igualdad de las pendientes (H_0), se evalúa H_0 , a través de la ecuación

$$F = \frac{(SSe - SSp) / (k - 1)}{(Sp / DFe)}$$

donde SSe - SSp denota la variabilidad entre los coeficientes de regresión de las rectas comparadas.

Si el valor obtenido de F en tablas estadísticas (0.95 significación), es inferior al valor calculado, la hipótesis H_0 se rechaza (Zar, 1974).

CAPITULO 3

R E S U L T A D O S

3.1 CULTIVOS PUROS

3.1.1 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

Las cinéticas y parámetros de crecimiento de los cultivos puros de las cepas estudiadas, no presentan en la figura 1A y en el cuadro 7.

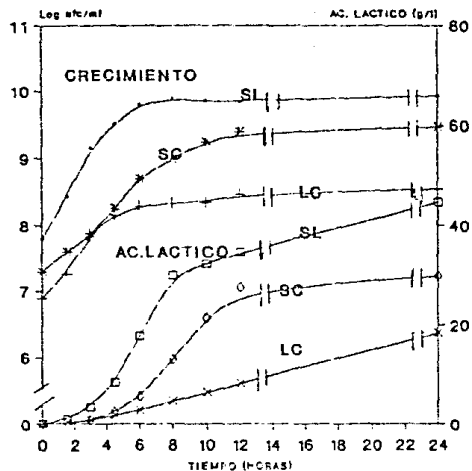
La especie *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (SL) alcanzó la fase estacionaria de crecimiento a las 6 hrs. de cultivo, presentando una población máxima (Xf) de $9 \pm 0.5 \times 10^9$ UFC/ml. El tiempo de duplicación (td) fue de 45 ± 0.05 minutos. Entre las cepas utilizadas, esta especie posee la mayor velocidad de crecimiento y alcanza la mayor concentración celular final.

El cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* (LC), presentó una tasa específica de crecimiento (μ) de 0.56 ± 0.02 h⁻¹, equivalente a un td de 74.3 ± 2.65 min. Esta especie alcanzó la fase estacionaria de crecimiento a las 8 hrs. de fermentación con una Xf de $3.4 \pm 0.6 \times 10^{10}$ UFC/ml.

El crecimiento de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (SC), finalizó la fase exponencial de crecimiento después de 8 hrs. de cultivo. La μ fue de 0.61 ± 0.01 h⁻¹, equivalente a un td de 68.2 ± 1 min. La Xf fue de $2.9 \pm 0.4 \times 10^{10}$ UFC/ml. Esta subespecie presenta valores superiores de μ y de Xf respecto a los observados en LC, pero inferiores a los observados en SL.

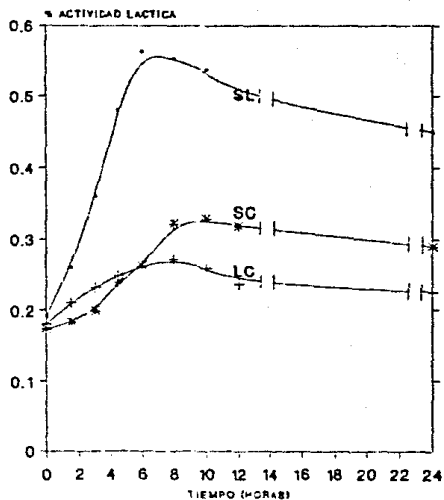
Se aplicó la prueba de Fisher a los datos obtenidos en cada

A.



— SL — LC — SC Log ufc/ml
 - - - SL - - - LC - - - SC AC. LACTICO g/l

B.



— SL — LC — SC

FIGURA 1. CULTIVOS Puros DE *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (SL), *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (SC) y *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* (LC). A. CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE ACIDO LACTICO, B. ACTIVIDAD LACTICA.

CUADRO 7. Características de crecimiento, de producción de ácido láctico y actividad láctica de las cepas *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (SL), *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* (LC) y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (SC), en cultivo puro.

especie	Xo ¹	μ ²	Xt ³	td ⁴	t _v ⁵
SL	0.63 [±] 0.045	0.91 [±] 0.01	89 [±] 1.1	45 [±] 0.05	6
LC	0.078 [±] 0.0046	0.56 [±] 0.02	3.4 [±] 1.2	73.8 [±] 2.65	6
SC	0.31 [±] 0.042	0.61 [±] 0.01	30 [±] 2.4	68.2 [±] 1.0	8

especie	Vmax ⁶	Pmax ⁷	Pf ⁸	Pv ⁹	%Ac. Lac ¹⁰	ta ¹¹
SL	0.53 [±] 0.011	3.71 [±] 0.36	46.06 [±] 1.46	1.92 [±] 0.065	0.56 [±] 0.02	6
LC	0.47 [±] 0.028	0.70 [±] 0.037	28.86 [±] 0.66	1.20 [±] 0.027	0.28 [±] 0.01	8
SC	0.35 [±] 0.035	2.26 [±] 0.15	17.51 [±] 0.03	0.729 [±] 0.03	0.56 [±] 0.01	8

1) ODC x 10⁸ ml

2) tasa específica de crecimiento 1/h

3) concentración celular al final de la fermentación ODCx10⁸ ml

4) tiempo de latencia en minutos

5) tiempo de cultivo hasta el final de la fase exponencial de crecimiento h

6) actividad máxima de producción de ácido láctico, 1/h

7) producción máxima de ácido láctico, g/l/h

8) concentración final de ácido láctico, g/l

9) productividad volumétrica g/l/h

10) actividad láctica máxima

11) tiempo de cultivo en alcanzar la actividad láctica máxima, horas.

uno de los cultivos puros, se probó la Ho de igualdad de las pendientes para cada una de las cepas (igualdad de duplicados) y para las tres cepas en conjunto (igualdad entre las cepas). La prueba de Fisher mostró que no hay diferencia significativa (0.95) entre los duplicados de cada cepa. Evaluando las diferencias entre las tres cepas, la prueba mostró que existe diferencia significativa.

4.1.2 CINETICA DE PRODUCCION DE ACIDO LACTICO Y ACTIVIDAD LACTICA.

En la figura 1 y en el cuadro 7 se muestran la producción de ácido láctico y la evolución de la actividad láctica en los cultivos puros de las especies estudiadas. Se observa que 5B presentó la mayor velocidad de producción de ácido láctico (V_{max}), la mayor concentración de ácido láctico final (PF) y la mayor productividad volumétrica de ácido láctico (PV) correspondientes, de igual manera, a la mayor actividad láctica. En efecto, 5B presentó una tasa de producción de ácido láctico de 0.523 ± 0.011 h^{-1} , en tanto que para 5C este valor fue de 0.47 ± 0.028 h^{-1} y para 1C, de 0.349 ± 0.035 h^{-1} . La concentración final de ácido láctico fue de 46.06 ± 1.46 g/l, para 5B; de 29.86 ± 0.66 g/l, para 5C y de 17.51 ± 0.78 g/l, para 1C. Las productividades volumétricas de ácido láctico de cada una de las cepas fueron

1.92 ± 0.069 , 1.2 ± 0.027 y 0.729 ± 0.032 g/l-h, para 5L, 3L y 1L, respectivamente. Las actividades láticas máximas correspondientes a 5L, 3L y 1L fueron de 0.56 ± 0.02 , 0.32 ± 0.01 y $0.28 \pm 0.01\%$, respectivamente. Estos valores de actividad láctica máxima fueron observados en los tiempos de cultivo, de 6 hrs., en 5L, y 8 hrs., en 1L y 3L. La productividad máxima de ácido láctico presentó un comportamiento semejante al de la actividad láctica: el valor más alto, 3.71 ± 0.2 g ac. láctico/l h, fue el de 5L; seguido de 3L y 1L, cuyas productividades fueron de 2.26 ± 0.12 y 0.7 ± 0.03 g ac. láctico/l h, respectivamente.

Se probó la Ho de igualdad de las pendientes de las líneas de regresión obtenidas para V_{max} , a través de la prueba de Fisher. Se compararon las pendientes obtenidas en los duplicados de cada especie. Igualmente, se compararon las V_{max} de las diferentes especies. La prueba mostró que no había diferencia significativa entre los duplicados de cada especie. En cambio, la prueba mostró que, comparando las V_{max} de las tres especies, se observaban diferencias significativas.

4.1.3 COMPORTAMIENTO DURANTE EL ALMACENAMIENTO

En la segunda fermentación de cada una de las especies puras, se tomaron muestras a las 8, 10, 12 y 24 horas de cultivo. Estas fueron almacenadas en refrigeración, durante 21 días. Durante este

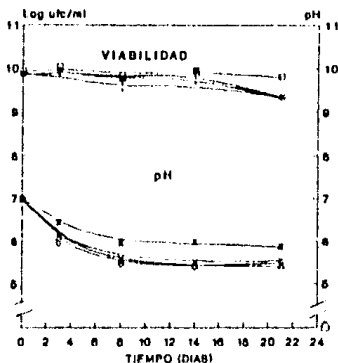
periodo , a 4^o C, se estudió el comportamiento de la viabilidad celular, la actividad láctica y el pH de las muestras almacenadas. Los resultados de estas experiencias se muestran en las figuras 2 y 3.

En la especie 5L (fig. 2A) se observó un ligero descenso en la concentración celular, principalmente en las muestras de 8, 10 y 12 hra. de fermentación. El descenso registrado en la muestra de 24 hra. de cultivo fue inferior. En efecto, las muestras de las 8, 10 y 12 hra. de fermentación presentaron una disminución poblacional de 9×10^9 UFC/ml hasta 2×10^9 UFC/ml; en tanto que la muestra de 24 hra. de cultivo conservó una población, al final del periodo de almacenamiento, de 6×10^9 UFC/ml. Sin embargo, dado que los experimentos de almacenamiento no se hicieron por duplicado y que el método de cuantificación bacteriana en placa implica cierto error, no es posible asegurar que las diferencias observadas sean significativas.

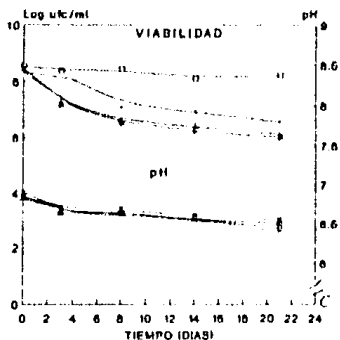
El pH descendió hasta un valor 5.4-5.5 en todas las muestras almacenadas, a excepción de la muestra de 24 hra. de cultivo, donde el valor final fue de 5.95.

Un comportamiento semejante al del pH y de la viabilidad se observó en la actividad láctica (fig. 3A). Se aprecia que la actividad láctica disminuyó hasta 0.26% (muestras de 8 hra. de cultivo) y 0.28% (muestras de 10 y 12 hra. de cultivo), en tanto que la muestra de 24 hra. de fermentación conservó una actividad láctica final de 0.35% .

A. *Lactococcus lactis ssp. lactis*



B. *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris*



C. *Lactococcus lactis ssp. cremoris*

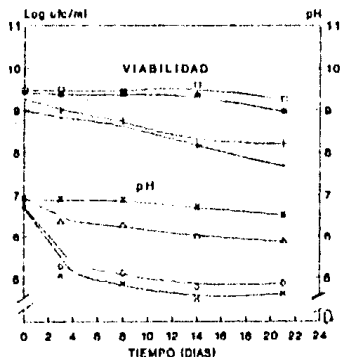
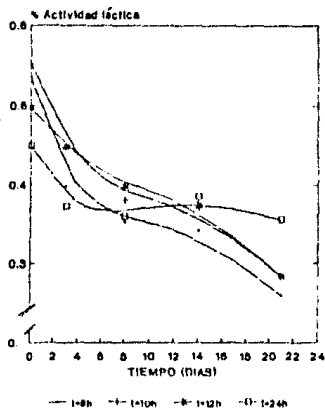


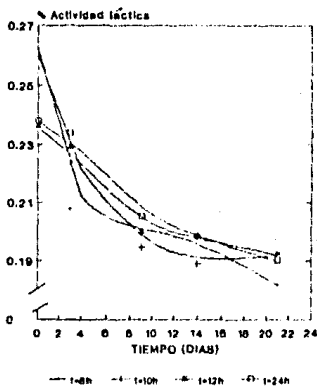
FIGURA 2. EVOLUCION DE LA VIABILIDAD Y DEL pH DURANTE EL ALMACENAMIENTO DE LOS CULTIVOS PUROS DE

- A. *Lactococcus lactis ssp. lactis*
 - B. *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris*
 - C. *Lactococcus lactis ssp. cremoris*
- EN FUNCION DEL TIEMPO DE COBECHE

A. *Lactococcus lactis ssp. lactis*



B. *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris*



C. *Lactococcus lactis ssp. cremoris*

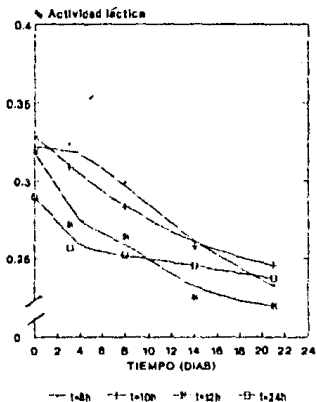


FIGURA 3. EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD LACTICA DURANTE EL ALMACENAMIENTO DE LOS CULTIVOS PUROS

A. *Lactococcus lactis ssp. lactis*
B. *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris*

C. *Lactococcus lactis ssp. cremoris*
EN FUNCION DEL TIEMPO DE COSECHA.

Si bien todas las muestras fueron tomadas durante la fase estacionaria de crecimiento (Fig. 1A, pag. 50), la actividad láctica presente en las mismas era diferente (Fig. 1B, pag. 50). Se observó una actividad láctica ligeramente mayor en las muestras de 8, 10 y 12 hrs. de cultivo, que en aquella de 24 hrs. Igualmente, en las primeras muestras, la cantidad de nitrato residual debía ser mayor que el de la muestra de 24 hrs. de cultivo, dado que el tiempo de fermentación transcurrido era menor. Estas diferencias permitieron un mayor descenso de pH durante el almacenamiento de las primeras muestras, dado que la producción de ácido láctico (disminución de pH) depende tanto de la actividad láctica como del nitrato disponible al inicio del periodo de almacenamiento.

En la figura 2B (pag. 55), se presenta el comportamiento del pH y la viabilidad de la cepa 1C, durante el periodo de almacenamiento. Al igual que en la cepa anterior, la concentración celular de 1C presentó un menor descenso en la muestra de 24 hrs. de cultivo. En efecto, en las primeras muestras (de 8, 10 y 12 hrs. de cultivo) la concentración celular final fue de 2.8×10^8 UFC/ml, en tanto que en la muestra de 24 hrs. fue de 1×10^8 UFC/ml.

El pH, en cambio, presentó un ligero descenso en todas las muestras, independientemente del tiempo de cultivo. Así mismo, los valores de actividad láctica al final del periodo de

almacenamiento (fig. 3B, pag. 56), fueron semejantes en las diferentes muestras. Este comportamiento se explica por la baja capacidad de producción de acidez de esta cepa, dado que es una especie heterofermentativa.

La cepa de SC, durante el almacenamiento (fig. 2C, pag. 55), presentó una disminución de la concentración celular y del pH. En las muestras de 8 y 10 hrs. de cultivo, se presentó un mayor descenso en estos parámetros, que en aquellas de 12 y 24 hrs. de fermentación. En las dos primeras muestras, se observó que la población disminuye en ciclo logarítmico y el pH desciende a menos de 5, en tanto que en las muestras de 12 y 24 hrs. de fermentación la población se conserva mejor, manteniendo concentraciones celulares finales de 9 y 17×10^8 UFC/ml y el pH disminuyó hasta 5.8 y 6.5, respectivamente.

Por otro lado, el descenso en la actividad láctica en las muestras almacenadas de SC (fig. 3C, pag. 56), no presentó un patrón similar al de los parámetros anteriores. El valor de actividad láctica, a los 21 días de almacenamiento, fue semejante en todas las muestras, disminuyendo hasta 0.23% aproximadamente. Sin embargo, se observó una tasa de descenso menor en la muestra de 24 hrs. de cultivo. Este comportamiento se explica por la baja actividad láctica inicial de las muestras.

El patrón general de comportamiento de esta especie --la observación de un mayor efecto del almacenamiento sobre la

población, en los diferentes tiempos de muestreo. En la figura 1A (pag. 50), se observa que las muestras de 8 y 10 horas de cultivo corresponden a la fase de desaceleración del crecimiento, en tanto que las de 12 y 24h, pertenecen plenamente a la fase estacionaria.

3.2.1 CINETICA DE CRECIMIENTO

En las fermentaciones mixtas de SL con LC, en diferentes proporciones de inoculación, la cepa de SL (fig. 4A) presentó un periodo de crecimiento de 8 y 10 horas en los cultivos donde las relaciones poblacionales (SL:LC), son de 1:1 y 1:10, respectivamente. Estos tiempos fueron mayores a los observados en el cultivo puro de esta cepa. SL alcanzó la fase estacionaria en 6 hrs. de cultivo (igual que el cultivo puro), en la fermentación inoculada con una proporción poblacional (SL:SC) de 10:1. Estos cambios se explican por las diferentes concentraciones celulares de esta cepa en el inóculo, X_0 (cuadro 8): A mayor valor de X_0 es menor el tiempo en alcanzar la fase estacionaria de crecimiento.

Por otro lado, la población máxima de SL en los cultivos mixtos, fue ligeramente mayor que en el cultivo puro, de 11×10^9 UFC/ml, aproximadamente. Sin embargo, debido al error que implica el método de cuenta viable en placa, esta diferencia no es importante.

Las tasas específicas de crecimiento (μ) calculadas durante la fase exponencial de crecimiento de SL en los cultivos puros y mixtos, se encuentran en el cuadro 8. Los valores de μ calculados

A. CRECIMIENTO

B. ACTIVIDAD LACTICA Y PRODUCCION DE ACIDO LACTICO

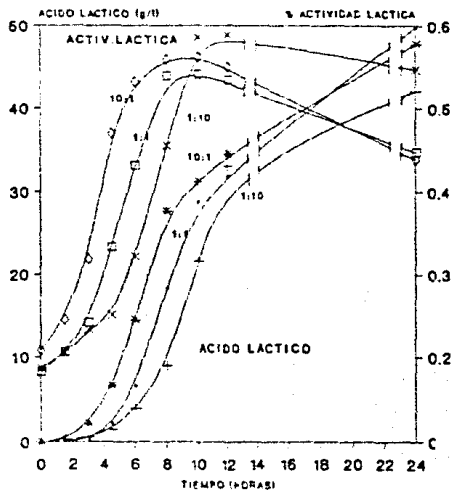
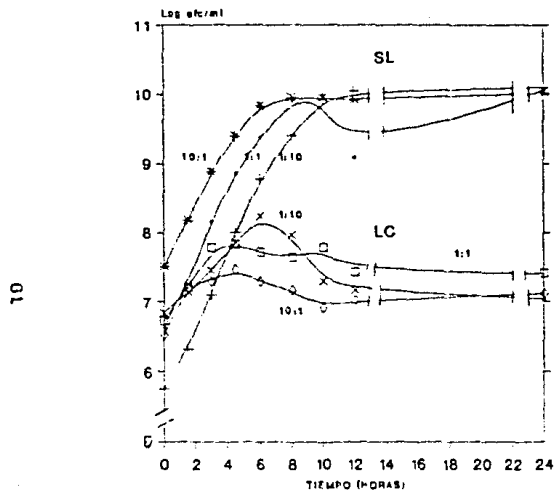


FIGURA 4. CULTIVO MIXTO, CON DIFERENTES PROPORCIONES DE INOCULACION (SL:LC), DE LAS ESPECIES *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (SL) y *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* (LC)
 A. CINETICA DE CRECIMIENTO. B. PRODUCCION DE ACIDO LACTICO Y ACTIVIDAD LACTICA

CUADRO 8. Características de crecimiento de los cultivos de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (SL) y *Leucosinococcus mesenteroides* ssp. *cremoris* (LC).

	X_0^1	μ^2	X_f^3	td^4
puro				
SL	0.63 [±] 0.045	0.91 [±] 0.01	89 [±] 1.1	45 [±] 0.05
LC	0.078 [±] 0.0046	0.56 [±] 0.02	3.4 [±] 1.2	74.3 [±] 2.65

mixto	X_0^1		μ^2	
prop⁵				
SL:LC				
	SL	LC	SL	LC
1:1	0.054 [±] 0.012	0.056 [±] 0.005	0.97 [±] 0.025	0.60 [±] 0.05
1:10	0.0056 [±] 0.001	0.076 [±] 0.009	0.88 [±] 0.06	0.54 [±] 0.04
10:1	0.32 [±] 0.073	0.03 [±] 0.01	0.90 [±] 0.01	0.45 [±] 0.05

mixto	X_f^3		td^4	
prop⁵				
SL:LC				
	SL	LC	SL	LC
1:1	115 [±] 5.5	0.26 [±] 0.04	43 [±] 1.2	69.4 [±] 5.4
1:10	124 [±] 1.0	0.10 [±] 0.1	47 [±] 2.7	77.0 [±] 5.3
10:1	106 [±] 2.5	0.13 [±] 0.035	46 [±] 1.7	92.4 [±] 9.2

1 concentración celular en el inoculo, UFC x 10⁸/ml.

2 tasa específica de crecimiento 1/h.

3 concentración celular al final de la fermentación, UFCx10⁸/ml.

4 tiempo de duplicación, minutos.

5 proporción de las especies en el inoculo.

en el cultivo mixto fueron de 0.88 ± 0.01 a 0.97 ± 0.025 h^{-1} . En el cultivo puro la μ fue de 0.90 ± 0.004 h^{-1} . De acuerdo con la prueba de Fisher, la diferencia entre las μ de los cultivos puro y mixtos no es significativa.

La población de LC en cultivo mixto con SH, present^o tasas específicas de crecimiento muy semejantes a la del cultivo puro (cuadro B). Las diferencias observadas entre la μ del cultivo puro y las de los cultivos mixtos, de acuerdo con el análisis estadístico, no son significativas.

Sin embargo, la cinética de crecimiento de LC en los cultivos mixtos fue muy diferente a la del cultivo puro. Mientras en el cultivo puro LC alcanzó una concentración celular de $3.4 \pm 0.6 \times 10^{10}$ UFC/ml (fig. 1A, pag. 50), en los cultivos mixtos nunca alcanzó esta población (fig. 4A y cuadro B; pag. 61 y 62). La mayor concentración celular de LC en cultivo mixto fue de $1.5 \pm 0.2 \times 10^{10}$ UFC/ml, obtenida con el inóculo mayor (proporción SH:LC de 1:10). Así mismo, la población final de LC en el cultivo mixto, después de 24 hrs. de cultivo, fue inferior a la del cultivo puro, independientemente de la proporción de esta cepa en el inóculo. Como se observa en la fig. 4 (A y B.), la curva de crecimiento de LC present^o un descenso, después de alcanzar su punto más alto, que coincide con el momento en que hay una mayor producción de ácido láctico.

3.2.2. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO Y ACTIVIDAD LÁCTICA

La producción de ácido láctico en los cultivos mixtos (cuadro 9, pag. 66 y fig. 4B, pag. 61) presentó una velocidad (V_{max}) menor, al compararla con la V_{max} del cultivo puro de SL, que es la cepa que produce principalmente ácido láctico. Sin embargo, los resultados de la prueba de Fisher, muestra que estas diferencias no son significativas, ni entre los duplicados, ni respecto al cultivo puro de SL. En cambio, en las productividades máxima calculadas (P_{max}), se obtienen los valores más altos en los cultivos con el mayor inóculo de SL (10:1). Dado que la producción de ácido láctico depende del crecimiento de SL, la productividad máxima es mayor mientras mayor es el crecimiento de esta cepa. Así, la productividad máxima del cultivo SL:LC en proporción 10:1, es comparable a la del cultivo puro de SL.

Las concentraciones finales de ácido láctico, en cada una de las fermentaciones con diferentes inóculos, fueron del orden de 45 g/l. Esta concentración final, correspondió a una productividad volumétrica de 1.9 g/l h, aproximadamente.

Por otra parte, la actividad láctica registrada en los cultivos mixtos SL:LC fue cercana a la observada en el cultivo puro de SL. En la fig 4B y en el cuadro 9 se aprecia que el valor máximo de actividad láctica obtenido en un menor tiempo de cultivo, se registró en las muestras con una mayor proporción

inicial de Sl., debido a su dependencia respecto al crecimiento de esta cepa, que en la que presentó mayor actividad láctica.

3.2.3. COMPORTAMIENTO DURANTE EL ALMACENAMIENTO

En las muestras almacenadas de los cultivos mixtos de Sl. y Lc en diferentes proporciones de inoculación (fig. 5), se observaron distintas tendencias de viabilidad entre estas especies.

En el almacenamiento del cultivo mixto de Sl. con Lc (fig. 5), Sl. presentó un patrón de viabilidad semejante al del almacenamiento en cultivo puro (fig. 2A, pag. 55). Aunque el estudio del almacenamiento se realizó sin duplicado, en todas las proporciones poblacionales de inoculación y en los distintos tiempos de fermentación almacenados se observó un comportamiento similar: un ligero descenso en la población. En cambio, la población de Lc presenta una caída total, hasta desaparecer, en las muestras de 8, 10 y 12 hrs. de fermentación. Esta especie mantuvo una población baja, con tendencia a disminuir, en las muestras de las 24 hrs. de cultivo. Este comportamiento es muy distinto al observado en el cultivo puro de Lc (fig. 2B, pag. 55).

En todas las muestras almacenadas de los cultivos mixtos Sl. Lc se presentó una caída de pH (Fig. 6) hasta valores entre 5 y 5.7, excepto en las muestras de 24 h de cultivo, donde el pH final fue superior a 6. La actividad láctica (Fig. 6) decayó hasta valores del orden de 0.25% en las primeras muestras y conserva una

CUADRO 9. Características de producción de acidez de las cepas *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (SL) y *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* (LC).

	V _{max} ¹		P _{max} ²		PF ³		Pv ⁴		%AcLac ⁵		t ₆ ⁶	
	SL	LC	SL	LC	SL	LC	SL	LC	SL	LC	SL	LC
puro	0.532	0.394	3.71	0.7	46.	17.5	1.9	0.7	0.56	0.28	6	8
prop. ⁷												
SL:LC												
1:1	0.58 [±] 0.03	2.65 [±] 0.09	47.9 [±] 1.9	1.98 [±] 0.07	0.54 [±] 0.02	10						
1:10	0.49 [±] 0.02	2.42 [±] 0.27	43.6 [±] 2.3	1.82 [±] 0.1	0.59 [±] 0.02	12						
10:1	0.52 [±] 0.01	3.45 [±] 0.11	46.3 [±] 0.5	1.93 [±] 0.02	0.56 [±] 0.02	8						

1 velocidad máxima de producción de ac. láctico l/h.

2 productividad máxima de ácido láctico g/l-h.

3 concentración final de ácido láctico g/l.

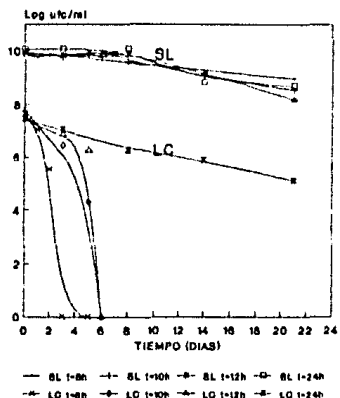
4 productividad volumétrica de ácido láctico g/l-h.

5 % de actividad láctica máxima.

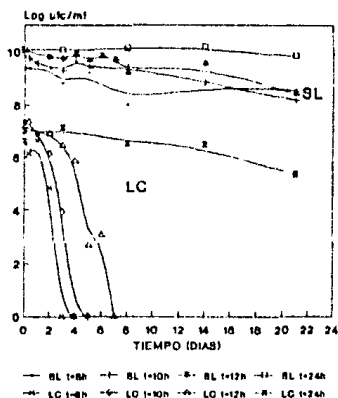
6 tiempo de cultivo al alcanzar la actividad láctica max. hrs.

7 proporción de las especies en el inóculo.

A. INOCULACION EN PROPORCION 1:1



B. INOCULACION EN PROPORCION 1:10



C. INOCULACION EN PROPORCION 10:1

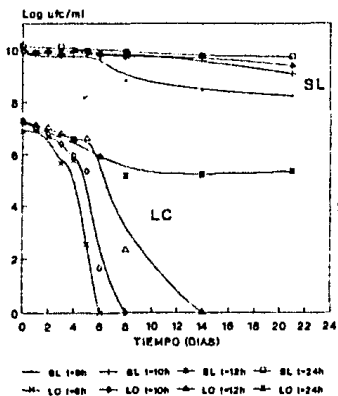
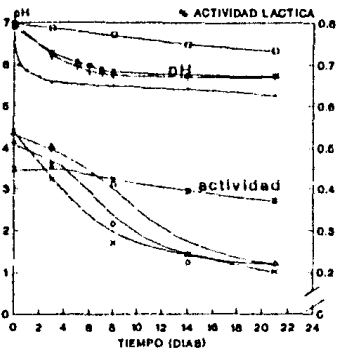


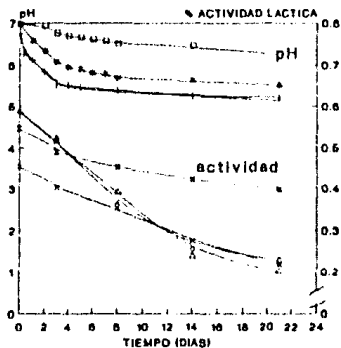
FIGURA 5. EVOLUCION DE LA VIABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO DEL CULTIVO MIXTO DE *Lactococcus lactis* sp. *lactis* (SL) Y *Leuconostoc mesenteroides* sp. *oreorhizae* (LO) EN FUNCION DE LA RELACION DE INOCULACION Y DEL TIEMPO DE COSECHA

A. INOCULACION EN PROPORCION 1:1



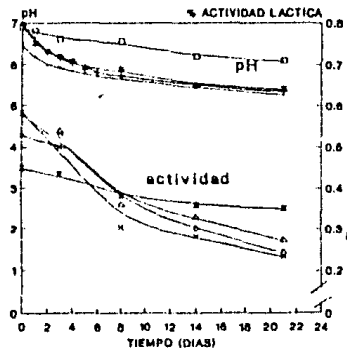
--- 1-h + 1-6h - 1-10h - 1-12h - 1-18h - 1-24h
 ACT.LACTICA

B. INOCULACION EN PROPORCION 1:10



--- 1-h + 1-6h - 1-10h - 1-12h - 1-18h - 1-24h
 pH ACT.LACTICA

C. INOCULACION EN PROPORCION 10:1



--- 1-h + 1-6h - 1-10h - 1-12h - 1-18h - 1-24h
 pH ACT.LACTICA

FIGURA 6. EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD LACTICA Y DEL pH DURANTE EL ALMACENAMIENTO DEL CULTIVO MIXTO DE *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (SL) Y *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* (LC) EN FUNCION DE LA RELACION DE INOCULACION Y DEL TIEMPO DE COSECHA.

actividad superior a 0.35% en las muestras de 24 hrs. de cultivo. Estos comportamientos son semejantes al del cultivo puro de 36. (Fig. 2A y 3A; paga. 55 y 56).

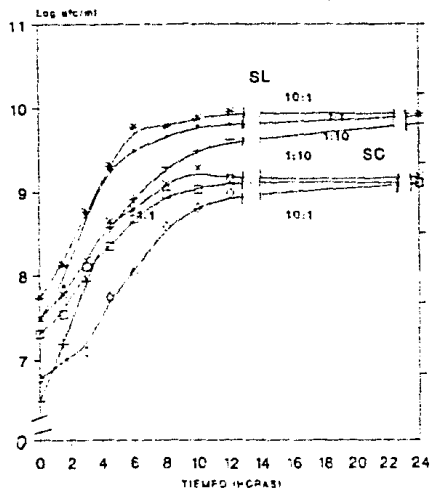
3.3. CULTIVO MIXTO DE: LACTOCOCCUS LACTIS SSP. LACTIS (SL) Y LACTOCOCCUS LACTIS SSP. CREMORIS (SC).

3.3.1. CINETICAS DE CRECIMIENTO

El crecimiento de SL en cultivo puro, como se ha señalado, alcanzó la fase estacionaria en 6 hrs. de cultivo, con una población máxima de $9 \pm 0.5 \times 10^9$ UFC/ml., en tanto que para SC estos valores fueron de entre 10 y 12 hrs. de fermentación y $2.9 \pm 0.4 \times 10^9$ UFC/ml., respectivamente (Figura 1, pag. 50).

En el cultivo mixto de las especies SL y SC, en cambio, el crecimiento de las cepas cambió en diferentes momentos de la fermentación, dependiendo de la concentración poblacional en el inóculo (Figura 7A). Para SL, el tiempo en alcanzar la fase estacionaria fue de 8hrs. de cultivo, en las fermentaciones donde las proporciones poblacionales iniciales (SL:SC) fueron de 1:1 y 10:1. En las fermentaciones con menor proporción de SL en el inóculo (en la proporción 1:10) el tiempo en alcanzar esta fase fue de 12 hrs. (Fig. 7A). En el cultivo mixto, SC alcanzó una población máxima menor que la obtenida en el cultivo puro (cuadro 10), siendo mayor mientras más alta fue la concentración de esta cepa en el inóculo. En efecto, SC presentó poblaciones finales de 14 ± 2.5 , 12 ± 2.3 y $4.5 \pm 0.4 \times 10^9$ UFC/ml., cuando las concentraciones iniciales fueron de 31 ± 2.4 , 21 ± 2.1 y $6 \pm 0.5 \times 10^9$ UFC/ml.,

A. CRECIMIENTO



— SL 1:1 — SC 1:10
 — SC 1:1 — SC 10:1

PROPORCION
 DE INOCULACION
 (SL SC)

— 1:1 — 1:10 — 10:1 AC. LACTICO
 — 1:1 — 1:10 — 10:1 ACTIVIDAD LACTICA

B. ACTIVIDAD LACTICA Y PRODUCCION DE AC. LACTICO

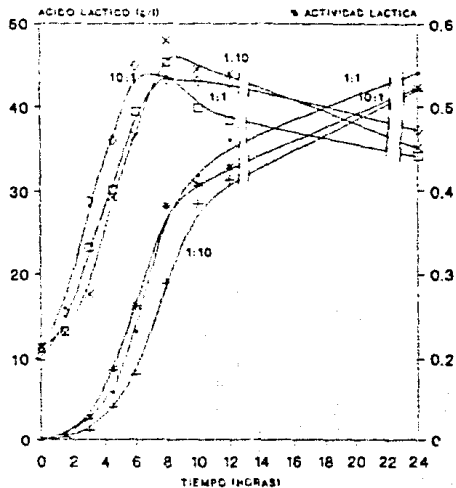


FIGURA 7. CULTIVO MIXTO, EN DIFERENTES PROPORCIONES DE INOCULACION (SL SC), DE LAS ESPECIES *Lactococcus lactis* spp. *lactis* (SL) y *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* (SC)
 A. CINETICA DE CRECIMIENTO Y B. PRODUCCION DE ACIDO LACTICO Y ACTIVIDAD LACTICA, DURANTE LA FERMENTACION

CUADRO 10. Características de crecimiento de los cultivos de *Lactobacillus lactis* sup. *lactis* (SL) y *Lactobacillus lactis* sup. *cremoris* (SC).

	X_0^1	μ^2	X_3^3	t_d^4
puro				
SL	0.63 [±] 0.045	0.91 [±] 0.01	89 [±] 1.1	45 [±] 0.05
SC	0.31 [±] 0.042	0.61 [±] 0.01	30 [±] 2.4	68.2 [±] 1.0
mixto				
	X_0^1	μ^2	X_3^3	t_d^4
prop⁵				
SL:SC	SL	SC	SL	SC
1:1	0.31 [±] 0.013	0.21 [±] 0.021	0.96 [±] 0.04	0.54 [±] 0.05
1:10	0.0310 [±] 0.003	0.31 [±] 0.024	0.96 [±] 0.045	0.59 [±] 0.049
10:1	0.84 [±] 0.005	0.06 [±] 0.005	0.90 [±] 0.05	0.54 [±] 0.06
mixto				
	X_T^d	μ^2	X_3^3	t_d^4
prop⁵				
SL:SC	SL	SC	SL	SC
1:1	79 [±] 4.5	12 [±] 2.30	43 [±] 1.7	76.6 [±] 6.1
1:10	64 [±] 6.4	14 [±] 2.5	43 [±] 1.61	69.7 [±] 4.6
10:1	84 [±] 7.5	4.5 [±] 0.40	46 [±] 2.6	77.2 [±] 7.8

1 concentración celular en el inicio, UFC x 10¹¹ ml.

2 tasa específica de crecimiento (h⁻¹).

3 concentración celular al final de la fermentación, UFC x 10¹¹ ml.

4 tiempo de adaptación, minutos.

5 proporción de las especies en el inicio.

respectivamente (cuadro 10). Asimismo, los tiempos en que 3C alcanzó esta población máxima fueron diferentes, dependiendo de la concentración de esta especie en el inóculo (Fig. 7A).

Las curvas de las poblaciones finales de ambas especies, en las fermentaciones mixtas, fueron cercanas a las obtenidas en el cultivo puro de 3B, que en la cepa con mayor concentración celular en cultivo puro (cuadro 10).

Los tiempos de duplicación máximos observados en los cultivos puros de 3B y 3C, fueron de 45 ± 0.09 y 69.3 ± 1 minutos respectivamente. Los valores registrados en los cultivos mixtos fueron muy semejantes para 3B, pero ligeramente mayores para 3C. El menor μ_{d} de 3C, no observó en el cultivo con la mayor concentración celular de esta cepa en el inóculo (cuadro 10). Sin embargo, de acuerdo con la prueba de Fisher, las diferencias observadas entre los duplicados de los cultivos mixtos no fueron significativas, ni las diferencias de estos respecto a los cultivos puros de cada especie.

4.3.2. CINETICA DE PRODUCCION DE ACIDO LACTICO Y ACTIVIDAD LACTICA

Las velocidades máximas de producción de ácido láctico, observadas en los cultivos mixtos de 3B y 3C (cuadro 11), son del orden de 0.5 h^{-1} , valor cercano al obtenido en el cultivo puro de

CUADRO 11. Características de producción de acidez de las cepas *Lactococcus lactis* ssp. cremoris (SC).

	V _{max} ¹		P _{max} ²		PI ³		Pv ⁴		%AcLac ⁵		t. ⁶	
	SL	SC	SL	SC	SL	SC	SL	SC	SL	SC	SL	SC
puro	0.532	0.47	3.71	2.26	46.	28.8	1.9	1.2	0.56	0.32	6	8
prop. ⁷ SL:SC												
1:1	0.545 [±] 0.02	3.48 [±] 0.20	42.7 [±] 1.4	1.78 [±] 0.06	0.55 [±] 0.01							8
1:10	0.527 [±] 0.01	2.85 [±] 0.18	41.1 [±] 2.4	1.71 [±] 0.1	0.58 [±] 0.03							8
10:1	0.570 [±] 0.01	3.52 [±] 0.23	42.6 [±] 0.3	1.77 [±] 0.02	0.56 [±] 0.03							6

1. velocidad máxima de producción de ácido láctico (U).

2. productividad máxima de ácido láctico (U/h).

3. concentración final de ácido láctico (g/l).

4. productividad volumétrica de ácido láctico (g/l/h).

5. % de acidez láctica láctica.

6. tiempo de cultivo al alcanzar la actividad láctica máxima (h).

7. proporción de las cepas en el cultivo.

5L, las velocidades máximas de producción de ácido láctico, no difirieron entre las fermentaciones mixtas con distintos inóculos. Sin embargo, la productividad máxima fue mayor conforme aumentó la proporción de 5L en el inóculo, dado que es la especie con mayor capacidad de producción de ácido láctico.

La concentración de ácido láctico final fue del orden de 42 g/L en todos los cultivos mixtos 5L:5C, correspondiente a una productividad volumétrica de 1.7 g/L. Estos valores no difirieron a los observados en el cultivo puro de 5L (cuadro 7, pag. 51).

Las actividades lácticas máximas en los cultivos mixtos (Fig. 7B, pag. 71) son del orden de 0.56%, registrándose en el intervalo de 6 a 10 hrs. de cultivo. Estos datos fueron equivalentes a los valores observados en el cultivo puro de 5L (Fig. 3B, pag. 30). Se observó que las actividades lácticas máximas coinciden con el final de la fase exponencial de crecimiento de esta especie.

3.2.3. COMPORTAMIENTO DURANTE EL ALMACENAMIENTO

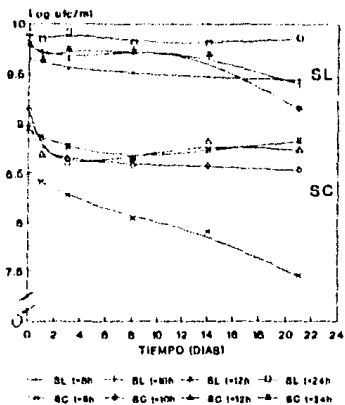
El estudio del almacenamiento de los caldos de fermentación se realizó sin duplicado, en las muestras de diferentes tiempos de cosecha y distintas proporciones de inoculación. En base a los resultados obtenidos, se analizaron las tendencias globales de la viabilidad celular, la actividad láctica y el pH.

El comportamiento de 5L y 5C, durante el almacenamiento de

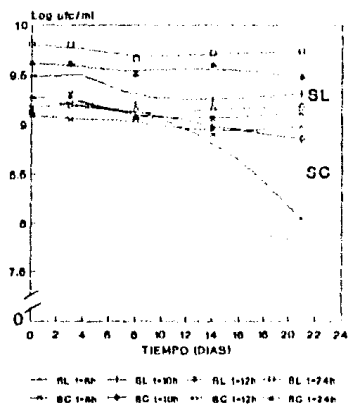
Los cultivos mixtos, presentaron dos patrones generales (fig 8 y 9). El primero, que siguieron todas las muestras de 24 horas de fermentación, donde las poblaciones se conservaron, el pH final fue de entre 5.8-6 y la actividad láctica final fue del orden 0.3%. El segundo, que presentaron las muestras de 8, 10 y 12 horas de fermentación, donde se observó de manera general, un mayor descenso del pH y de la actividad láctica.

La principal diferencia entre las muestras almacenadas de cada una de las fermentaciones, con diferentes inoculos, fue la relación numérica final de las poblaciones (cuadro 10, pag. 72). Se apreció que, mientras mayor es la proporción de *S* en el inoculo del cultivo mixto, la población final de esta especie fue más alta al término de la fermentación y fue mayor la proporción de la misma durante el período de almacenamiento.

A. INOCULACION EN PROPORCION 1:1



B. INOCULACION EN PROPORCION 1:10



C. INOCULACION EN PROPORCION 10:1

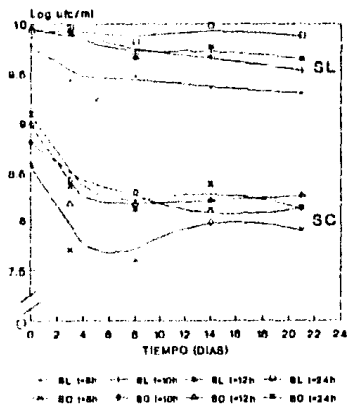
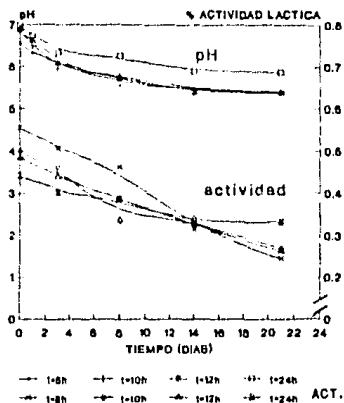
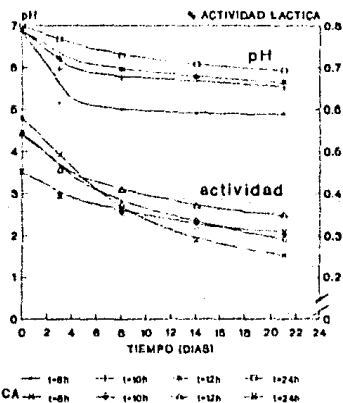


FIGURA B. EVOLUCION DE LA VIABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO DEL CULTIVO MIXTO DE *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (SL) Y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (SC) EN FUNCION DE LA RELACION DE INOCULACION Y DEL TIEMPO DE COSECHA

A. INOCULACION EN PROPORCION 1:1



E. INOCULACION EN PROPORCION 1:10



C. INOCULACION EN PROPORCION 10:1

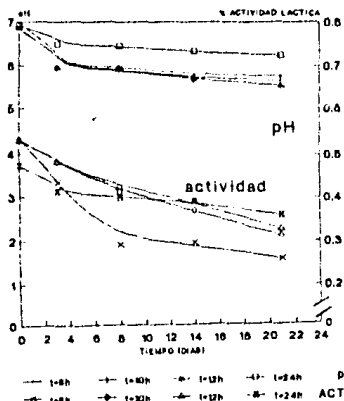


FIGURA 8. EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD LACTICA Y DEL pH DURANTE EL ALMACENAMIENTO DEL CULTIVO MIXTO DE *Lactococcus lactis* sp. *lactis* (SL) Y *Lactococcus lactis* sp. *cremoris* (SC) EN FUNCION DE LA RELACION DE INOCULACION Y EL TIEMPO DE COSECHA.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CAPITULO 4

D I S C U S I O N

Las poblaciones alcanzadas en los cultivos puros de las distintas cepas, coinciden con los reportados en la bibliografía.

La población máxima reportada de *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis*, de $9^{+}0.5 \times 10^{10}$ UFC/ml, es mayor a la obtenida por Reddy y col. (1972), de $2.6 \text{--} 3.0 \times 10^9$ UFC/ml, utilizando leche descremada como medio de cultivo y asociado a la reportada por Chavarrí y col. (1988b) de 1×10^{10} UFC/ml, incubando a 32 C y usando un medio de cultivo a base de 125g/l de leche descremada y extracto de levadura. Esto indica que la población máxima alcanzada por la cepa utilizada en este estudio, es similar a la reportada en un medio de cultivo completo.

Boquien y col. (1988) reportan una población máxima de 2.2×10^{10} UFC/ml para la cepa *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* AM2, usando un medio rico a base de lactosa, extracto de levadura y peptona de caseína. Este valor es muy cercano al obtenido por nuestra cepa, de $2.9^{+}0.4 \times 10^{10}$ UFC/ml, en un medio de cultivo de grado industrial.

Los tiempos de duplicación (td) obtenidos para SL y SC, de $45^{+}0.05$ y $68.2^{+}1$ minutos, respectivamente, coinciden con los valores reportados por Lee y Collins (1975). Estos autores estudiaron el efecto de la temperatura sobre el td de 10 cepas de SC y una de SL, creciendo en un medio de cultivo enriquecido con extracto de levadura (1.5%) y peptona de caseína (1%), a

diferentes temperaturas. Sus resultados muestran tiempos de duplicación para la cepa de 5h, de 8h y 44 min. cuando crecen a 22 y 33°C, respectivamente. Para las distintas cepas de 30, los autores reportan tiempos de duplicación de 75-105 y de 53-103 min. cuando crecen a 22 y 33°C, respectivamente. Así mismo, Harvey (1965), encontró un td de 46.2 min. para 5h, creciendo en un medio a base de lactosa, extracto de levadura, carboxinocidos y sales, incubando a 30°C. Esto permite suponer que el medio de cultivo industrial favorece el crecimiento de estas cepas, siendo más favorable para el crecimiento de 5h.

La producción de ácido láctico es mayor en la cepa 5h que en 30, dato que coincide con el obtenido por Wenthoff y col. (1969), quienes reportan una mayor capacidad de producción de ácido láctico por las cepas de 5h, A1 y H1 que por las de 30 utilizadas en su estudio. Sin embargo, no podemos hacer una comparación cuantitativa de esta cualidad, dado que ellos utilizaron otro método para su determinación (descenso del pH en leche descremada).

La concentración de ácido láctico en las fermentaciones de 5h y 30, en cultivo puro, fueron de 46 y 20.8 g/l, respectivamente, después de 24 horas de cultivo. Chavarri y col. (1993b), reportan una concentración de ácido láctico para 5h de 40 g/l en 12 horas de cultivo. Los autores utilizan un medio de cultivo elaborado a base de leche descremada (12.5%), extracto de levadura (0.5%) y lactosa

(2%). En el mismo trabajo se obtuvo una concentración de ácido láctico de 53 g/l, cuando el medio de cultivo se digirió previamente con papaína. Estudios sobre SC, (Hidalgo y col., 1988) reportan una concentración de ácido láctico de 33 g/l después de 17 horas de cultivo en un medio complejo (extracto de levadura 0.5%, peptona de caseína 0.7% y lactosa 5%). Estos valores, tanto para SL como SC, son comparables a los obtenidos en el presente trabajo. Si bien los tiempos de cultivo no son iguales, las concentraciones de ácido láctico no aumentan significativamente en las últimas horas de cultivo, dado que existe una relación entre la producción de ácido y el crecimiento.

La población de *Lactobacillus casei* obtenida en las fermentaciones puras, fue de $3.4 \pm 0.6 \times 10^8$ UFC/ml, la reportada por Goel y Marth (1968) es de 5×10^8 UFC/ml, a 22°C y de 1×10^8 UFC/ml a 30°C, en leche descremada. Pack y col. (1967) obtuvieron una población de LC de 1.3×10^8 UFC/ml, incubando a 21°C, en leche descremada. La población alcanzada en nuestros experimentos es bien, en semejanza a los valores reportados, es una población baja para un medio con muy nutrientes que los emplearon en los estudios citados. Esta baja población puede deberse a que la cepa LC utilizada en este estudio es diferente a las empleadas en la bibliografía disponible.

El comportamiento durante las fermentaciones de SL con LC,

muestra un efecto negativo sobre LC y un efecto poco significativo sobre SL, quien alcanza poblaciones y actividades lacticas cercanas a las observadas en el cultivo puro de la misma. Paek y col. (1967), reportaron un efecto semejante, la desaparición de algunas cepas de LC, al estudiar el cultivo mixto de distintas cepas de SC y LC en leche descremada, pero no proporcionan ninguna explicación a este fenómeno. Peltzman (1975), describió un efecto negativo sobre la población de LC, al crecer en cultivo mixto con SL, SC y LC en leche descremada, *in vitro* y *in vivo* en cultivo continuo. El autor atribuye este fenómeno a la acumulación de inhibidores como el ácido láctico y la L-leucina.

El comportamiento del cultivo mixto de SL y SC, en cambio, no presentó un efecto significativo sobre los tiempos de duplicación de SC ni de SL, la tasa máxima de producción de ácido láctico, ni bien aumenta conforme es mayor la población de SL en el inculo, las diferencias estadísticas no son significativas. Esto indica que, como la producción de ácido láctico depende del crecimiento de la especie SL y el cultivo mixto no conveys ningún efecto negativo sobre el crecimiento de la misma, la producción de ácido láctico no se vio afectada. Sin embargo, el método de análisis estadístico puede dar un resultado no significativo entre las diferencias observadas, debido a los pocos datos experimentales (Ramírez, 1992).

Respecto a los factores que afectan un cultivo mixto, Wulf y col. (1963) han reportado una inhibición de diferentes cepas de SC por SL al desarrollarse en cultivo mixto, causada probablemente por la acumulación de un antibiótico. Por otro lado, Hugenholz (1966) considera como principal factor de dominación entre las bacterias láticas, las diferentes tasas de crecimiento, dado que todas ellas presentan requerimientos de nutrientes semejantes.

Con base en esta información y en los resultados experimentales, se puede suponer que la principal causa de dominación de SL sobre SC es su mayor tasa de crecimiento, así como su capacidad para alcanzar una población mayor en el cultivo puro. Sin embargo, no se puede descartar la producción de algún antibiótico por SL.

El comportamiento durante el almacenamiento de los cultivos mixtos de SL y LC, mostró un rápido decaimiento de la población de LC. Este descenso de la población de LC puede atribuirse al cambio de pH. En las muestras de las 24 horas de fermentación, donde el pH se mantiene con un valor superior a 6, la población de LC se mantiene, a diferencia de aquellas muestras donde el pH baja y la población de LC desaparece. Esto permite pensar que, ante condiciones de refrigeración y a pH menores de 6, LC es más sensible, dada sus características particulares. Normalmente, cuando LC crece en un medio con glucosa, cesa su crecimiento a pH 5 y no inicia su crecimiento a un pH de 4.8 (Garvie, 1967).

Durante el almacenamiento de las muestras de las fermentaciones de 5L y 3C se observó estabilidad de las poblaciones, especialmente de las muestras de las 24 horas de fermentación. En estas, el pH entre un menor descenso y se conserva mayor población y mayor actividad láctica.

Jones y col. (1990) y Thunell y Sandine (1984), recomiendan el uso de medios de cultivo que amortiguen la acidez producida por las bacterias lácticas. Esto permite una mejor conservación de las mismas y de su capacidad de producción de ácido láctico. Con esta finalidad, también es posible utilizar las bacterias en un estado de menor actividad láctica y que hayan rebasado la fase exponencial de crecimiento. En efecto, las bacterias lácticas, 5L y 3C, presentan una mayor actividad autolítica durante la fase exponencial de crecimiento dado que las autolinas tienen un importante papel durante la división celular (Foucaud y Henne, 1990). Igualmente, la viabilidad de las células disminuye conforme los valores de pH se alejan de la neutralidad (Foucaud y Henne, 1990) y el gradiente de pH entre el interior y exterior de la célula inhibe las actividades metabólicas a bajos pH externos (Nannen y Hutkins, 1991).

Por otra parte, las bacterias lácticas del género *Lactobacillus* se caracterizan por presentar gran parte de su información genética codificada en plásmidos. Funcionan tales como la capacidad de fermentar lactosa, producir proteínas, utilizar citratos, resistir a sales inorgánicas y producir bacteriocinas,

no encuentran codificadas en plásmidos. En consecuencia, la pérdida de este tipo de información genética extracromosomal conlleva la pérdida de una o más de estas funciones. La estabilidad de los plásmidos disminuye cuando los microorganismos son sometidos a condiciones de estrés como la incubación durante periodos prolongados, la congelación/descongelación, la presencia de bacteriófagos y antibióticos y otras condiciones de cultivo o tratamiento, adversas al desarrollo bacteriano (Davies y Gibson, 1980; Sandino, 1985). Esta información sugiere que las condiciones de almacenamiento utilizadas en este estudio, pudieron ocasionar un tipo de estrés, sea por la disminución de pH, por la temperatura o por el conjunto de las condiciones de almacenamiento. En efecto, se ha demostrado en una investigación desarrollada en este laboratorio (Córdova, 1990) que el almacenamiento en refrigeración conlleva la pérdida de plásmidos. Conservando a 4°C los caldos de fermentación de SL y SC, de diferentes tiempos de cultivo, se observó la pérdida de plásmidos. Esta pérdida de plásmidos fue especialmente significativa en muestras almacenadas a horas tempranas de cultivo.

Con base en los resultados obtenidos con los cultivos mixtos de SL y SC, se puede suponer que es posible obtener una mezcla iniciadora estable. Además, en este laboratorio (Reynoso, 1981) se ha elaborado un queso semimaduro, con buena aceptación sensorial, utilizando estas especies bacterianas. Por ello, es importante

profundizar el estudio del cultivo mixto de SL y SC, va sea analizando las condiciones de cultivo que favorezcan el crecimiento de SC o bien, estudiando las proporciones de inoculación idóneas.

El conocimiento de las interacciones metabólicas que condicionan la coexistencia de estas especies permitirá optimizar las condiciones de cultivo para la obtención de una mezcla iniciadora estable. Igualmente, permitirá desarrollar una metodología para la formulación de cultivos mixtos de distintas bacterias lácticas de interés industrial.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

Podemos concluir que, para la producción de iniciadores *Lactaron* en cultivo mixto:

El medio de cultivo industrial, utilizado en este estudio, permite un desarrollo de las especies bacterianas estudiadas, siendo especialmente favorable al desarrollo de *Lactobacillus lactis ssp. lactis*.

No es recomendable el uso de las especies *Lactobacillus lactis ssp. lactis* y *Lactobacillus mesentericus ssp. cremoris*, ni se quiere obtener una mezcla iniciadora estable, dado que el cultivo mixto presenta un efecto nocivo sobre esta última especie.

La fermentación de *Lactaron* en *Lactis ssp. lactis* con *Lactobacillus lactis ssp. cremoris*, si bien presenta dominación de la primera especie debido a su mayor tasa de crecimiento y su capacidad de alcanzar una población final mayor, en un tipo de cultivo mixto que puede ser exitoso si se optimizan factores tales como las condiciones de cultivo o el tamaño del inóculo, a fin de favorecer a la segunda especie.

- Para el almacenamiento de las cepas estudiadas, tanto en cultivo puro como en mezcla, la refrigeración en el caldo de cultivo, es un método recomendable que asegura una buena viabilidad y actividad láctica, por un período de 21 días.
- Es aconsejable, para una mejor conservación durante el período de almacenamiento, utilizar muestras de 24 horas de fermentación, dado que en estas se presentan menores cambios de pH y mejor conservación de la actividad láctica.
- La metodología de estudio de las poblaciones bacterianas es adecuada para el análisis de las tendencias poblacionales en cultivo puro o en mezcla.
- Es necesario continuar este estudio, a fin de determinar que parámetros del cultivo (inóculo, medio de cultivo, condiciones de cultivo), son los más adecuados para favorecer el crecimiento de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, que permitan obtener una mezcla iniciadora estable y que posibiliten la producción de la mezcla misma.

BIBLIOGRAFIA

- Beal, C. y G. Corrieu. 1991. Influence of pH, temperature and inoculum composition on mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Biotech. Bioeng.* 38: 90-98.
- Hibal, B., G.Goma, Y.Vayssier y A. Paireloux. 1988. Influence of pH and lactic acid on the growth of *Streptococcus cremoris*: a kinetic study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 340-344.
- Boquien, C.Y., G. Corrieu y M. Desmazedo. 1988. Effect of fermentation conditions on growth of *Streptococcus cremoris* AM2 and *Leuconostoc lactis* CNRZ 1091 in pure and mixed cultures. *Appl. Env. Microb.* 54:2527-2531.
- Bottazzi, V. 1983. Other fermented dairy products. En *Biotechnology Vol.5: Food and Feed Production with Microorganisms*. Ed. G.Reed. Verlag Chemie. RFA.
- Breusegem, V. y G. Bastin. 1990. Optimal control of biomass growth in a mixed culture. *Biotech. Bioeng.* 35:349-355.
- Collins, E.B. 1977. Influence of medium and temperature on end products and growth. *J. Dairy Sci.* 60:799-804.
- Cooper, R.K. y E.B. Collins. 1977. Influence of temperature on growth of *Leuconostoc cremoris*. *J. Dairy Sci.* 61:1085-1088.
- Córdova, A.M.S. 1990. Variaciones en la capacidad de producción de ácido láctico y pH durante la producción y almacenamiento de las cepas *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BM147 y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* BM 149 y su correlación con el perfil de plásmidos. Tesis de Maestría. UACPvP, CCH, UNAM, México.

- Chavarrí, F.J., M. de Paz y M. Núñez. 1988a. Cryoprotective agents for frozen concentrated starters from nonbitter *Streptococcus lactis* strains. Biotech. Lett. 10:11-16.
- Chavarrí, F.J., M. de Paz y M. Núñez. 1988b. Optimization of fermentation parameters for the production of concentrated starters from nonbitter *Streptococcus lactis*. INIA 12. J. Food Sci. 53:1854-1857.
- Davies, I.F. y M.J. Gibson. 1980. Reviews of the progress of Dairy Science: Genetics of lactic acid bacteria. J. Dairy Research. 48:363-376.
- Dahiya, K.S. y M.L. Speck. 1962. Symbiosis among lactic streptococci. J. Dairy Sci. 62. 607-612.
- Daly, Ch. 1985. Advances in starter culture technology. Presentado en: Biotech'85 (Europe). Publications Pinner UK. pp. 239-251.
- Deibel, K.H. y H.W. Seeley Jr. 1987. Family II. *Streptococcaceae*. En: Bergey's Manual of determinative bacteriology. Ed. Buchanan y Gibbons. Baltimore.
- Dixon, S.K. 1982. Indigenous Fermented Foods. En: Economic Microbiology Vol. 7: Fermented Foods. Ed. A.H. Rose. Academic Press Inc. (London) Ltd. UK.
- Fouaud, C. y D. Henne. 1990. Physiologie des bactéries du genre *Lactococcus* en conditions de privation nutritionnelle. Une revue. Lait (70): 171-189.
- Fuentes, I. 1987. Industrialización de la leche con *Streptococcus lactis* y *Streptococcus cremoris*. Tonia de licenciatura. Fac. Química. UNAM, México.

- Garvie, E.I. 1987. Genus 11. *Leuconostoc*. En: *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. Ed. Buchanan y Gibbons. Baltimore.
- Gilliland, S.E. 1985. Concentrated starter cultures. En: *Bacterial starter cultures for food*. Cap. 11. Gilliland S.E. ed., CIM Press, Inc., USA.
- Goel, M.C. y H. Matth. 1968. Growth of *Leuconostoc citrovorum* in skim milk at 22 and 30° C. *J. Dairy Sci.* 52:1207-1213.
- Goldhaber, S.E. 1982. Estudios sobre la producción y conservación de algunos microorganismos de interés lactológico. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana, México.
- Grupo Imagen. 1989. Lanzamiento del producto Bactilac. Estudio de administración de la mercadotecnia. Estudio realizado en la licenciatura en Administración. Fac. de Contaduría y Administración. UNAM, México.
- Hammes, W.P. 1990. Bacterial starter cultures in food production. *Food Biotechnol.* 4: 383-397.
- Harvey, R.J. 1965. Damage to *Streptococcus lactis* resulting from growth at low pH. *J. Bacteriol.* 90:1330-1338.
- Heap, H.A. y K.C. Lawrence. 1988. Culture system for dairy industry. En: *Developments in Food Microbiology Vol.4*, Ed. R.K. Robinson. Elsevier App. Sci. Pub. Ltd. USA.
- Huizenholtz, J. 1966. Population dynamics of mixed starter cultures. *Neth. Milk Dairy J.* 40:129-140.

- Jones, I.H., L. Zimek y M.E. Stiles. 1990. Comparative evaluation of bulk starter substrates on activity and storage of two commercial starter strains. *J. Dairy Sci.* 73:1166-1172.
- Kilara, A. y K.M. Shahani. 1978. Lactate activity of cultured and acidified dairy products. *J.Dairy Sci.* 59:2031-2036.
- Law, B.A. 1982. Cheenen. Ed: Economic Microbiology Vol. 7.: Fermented Foods. Ed. A.H. Rose. Academic Press Inc. (London) Ltd. UK.
- Leach, P.D. y W.E. Sandino. 1975. Numerical relationship between strains in frozen concentrates of lactic streptococcal starter cultures. *J.Dairy Sci.* 59:1392-1397.
- Lee, D.A. y B. Collins. 1975. Influence of temperature on growth of *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis*. *J. Dairy Sci.* 59:406-409.
- Margalith, P.S. 1981. Flavour microbiology: Dairy products. Thomas Publisher, USA. pp. 226-284.
- McDonough, T.E., R.E. Bargrove y R.P. Huggler. 1963. Selective plating medium for *Lactococcus* in mixed lactic cultures. *J Dairy Sci.* 43:336-339.
- Milliere, J.B., A.G. Mathot, P. Schmitt y C. Divies. 1989. Phenotypic characterization of *Lactococcus* species. *J. Appl. Bacteriol.* 67: 529-542.
- Nannon, N.L. y E.W. Hutkins. 1991. Intracellular pH effects in lactic acid bacteria. *J.Dairy Sci.* 74:741-746.

- Pack, M.Y., E.R. Vedamuthu, W.E. Sandino y P.R. Elliker. 1967. Effect of temperature on growth and diacetyl production by aroma bacteria in single and mixed strain lactic cultures. *J. Dairy Sci.* 51: 339-344.
- Pérez-Gavilán, E. I. P. y Pérez-Gavilán E. J. 1984. *Bioquímica y microbiología de la leche*. Ed. Limusa, México.
- Pettersson, B.E. 1975. Growth of mixed species lactic starter in a continuous "pH stat" fermentor. *Appl. Microbiol.* 29:437-443.
- Ramírez, R. 1992. Comunicación personal. Depto. Alimentos y Biotecnología. Fac. Química, UNAM.
- Reddy, M.S., E.R.Vedamuthu, C. J. Washam y G.W. Reinbold. 1972. Associative growth studies in three strain mixtures of lactic streptococci. *Appl. Microbiol.* 24:953-957.
- Reynoso, B. J. S. 1981. Desarrollo y estandarización de una técnica para la fabricación de un queso semimadurado utilizando diversos cultivos lácteos. Tesis de licenciatura. Universidad Iberoamericana, México.
- Robinson, R.K. y A.Y. Tamme. 1990. Microbiology of fermented milks. En: *Dairy Microbiology Vol.2: The Microbiology of Milk Products*. Ed. R.K. Robinson, Elsevier App. Sci. UK. pp. 201-256.
- Sandino, W.E. 1985. The Streptococci.: Milk Products. En: *Bacterial Starters cultures for foods*. Ed. Gilliland. CRC Press Inc. USA.
- Scheifer, K.B. y Kilpper-Bälz. 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of *Streptococci*, *Enterococci* and *Lactococci*: A review. *System. Appl. Microbiol.* 10:1-19.

- Sellars, K.L. 1977. Bacterial starter cultures. En: Microbial Technology. Ed. Henry J. Pepler, R.K. Krieger Publ. Co. USA.
- Sellars, K.L. 1981. Fermented dairy foods. J.Dairy Sci. 64:1071-1076.
- Smith, L.L. y S.A. Palumbo. 1981. Microbiology as food additives. J.Food Protection. 44:936-955.
- Sorells, K.M. y M.L. Speck. 1982. Inhibition of *Salmonella williamson* by culture filtrates of *Leuconostoc citreovarum*. J.Dairy Sci. 53:358-372.
- Lamine, A.Y. 1983. Microbiology of starter cultures. En: Dairy Microbiology 2: The microbiology of milk products. App. Sci. Pub. UK. pp. 113-156.
- Lamine, A.Y. 1990. Microbiology of starter cultures. En: Dairy Microbiology 2: The microbiology of milk products. 2a. ed., App. Sci. Pub. UK. pp. 131-201.
- Hanell, R.E. y W.F. Sandine. 1984. Frozen starters from internal pH control grown cultures. J. Dairy Sci. 67:34-36.
- Isovetkov, I. y I. Mishkova. 1982. Studies on the effects of low temperatures on lactic acid bacteria. Cryobiology 19: 211-214.
- Vedamuthu, E.P. 1982. Fermented Milk. En Economic Microbiology Vol. 7.: Fermented Foods. Ed. A.H. Rose. Academic Press Inc. (London) Ltd. UK.
- Wang, D.L.; Ch. Cooney; A.L. Demain; P. Dunnill; A.F. Humphrey, y M. D. Lilly. 1979. Fermentation and Enzyme Technology. Ed. John Wiley & Sons, Inc. USA.

Westhoff, D.C.; R.A. Cowman y M.L. Speck. 1969. Effect of storage at 3°C, on the proteinase enzyme system of slow and fast strains of lactic *Streptococci*. J. Dairy Sci. 53: 1023-1027.

Wu, J.J. K.K. Thurell y W.E. Sandino. 1983. Examination of strain interaction in multiple strain lactic starter culture by streptomycin resistant mutants of lactic streptococci. J. Dairy Sci. 66:1436-1444.

Zar, J.H. 1974. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall Inc. USA. pp. 620.