



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ACIDO LACTICA DE Lactococcus lactis esp. lactis Y SU RELACION CON EL PERFIL DE PLASMIDOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACION.

23.12.07

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO DE ALIMENTOS
P R E S E N T A
JUAN CARLOS SIGALA ALANIS



MEXICO, D.F.

2000





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 esta 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.

Jurado asignado:

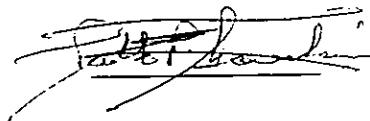
Presidente: Prof. Eduardo Bárzana García.
Vocal: Profa. María Elena Cañizo Suárez.
Secretario: Prof. Pablo Pérez Gavilán Escalante.
1^{er} Suplente: Profa. Amelia Ma. de Gpe. Farrés González S.
2^{do} Suplente: Profa. Laura Patricia Pérez Cacep.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Universidad Nacional Autónoma de México.
Instituto de Investigaciones Biomédicas.
Departamento de Biotecnología.

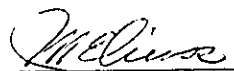
Asesor del tema:

Dr. Pablo Pérez-Gavilán Escalante.



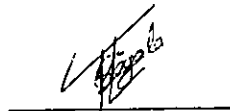
Supervisor técnico:

M. en C. Carmen Martha Elinos Báez.



Sustentante:

Juan Carlos Sigala Alanis.



DEDICATORIA.

A mi Madre:

Por todo el amor, comprensión y apoyo que siempre me has brindado. Te amo, te admiro y te estoy eternamente agradecido.

A mi tío Gilberto:

Por ser mi padre y mi mejor amigo. Gracias por todo el amor y los momentos inolvidables que me has dado.

A mi hermano Rodrigo:

Por tu cariño, apoyo y paciencia. Gracias por todo lo que he vivido a tu lado, por haberme soportado y por ser tan distinto a mí.

A Iliana:

Por ser el amor de mi vida. Gracias por el cariño, el apoyo y la alegría que en todo momento me has otorgado.

AGRADECIMIENTOS.

A DIOS, por darme la oportunidad de vivir, de estar sano y lleno de amor y felicidad.

A mis Abuelitos, Tíos, Tías, Primas y Primos. Los quiero mucho a todos.

Al Maestro Carlos Hernández, muchas gracias por todo lo que ha hecho por nosotros.

A Rosario y a Lulú, por ser excelentes amigas y compañeras de trabajo. Gracias por todo lo que vivimos juntos.

A Rivelino, Chucho, Andrés, Milton y Aida, por brindarme su amistad y compartir magníficos momentos.

A mis amigos de la prepa Lourdes y Adolfo, gracias por esa larga amistad.

Al Dr. Pablo Pérez Gavilán, por sus múltiples enseñanzas y por permitirme trabajar con usted. Gracias por la confianza y la oportunidad.

A la M. en C. Martha Elinos Baez, porque gracias a usted pude sacar adelante el trabajo experimental. Gracias por sus consejos y enseñanzas.

A mis compañeras de laboratorio, Claudia, Marisol y Naiely; gracias por todo lo que compartimos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme dado la formación académica que ahora tengo. Además, por que en su recinto forjé excelentes amistades y viví momentos inolvidables.

ÍNDICE GENERAL

1.	RESUMEN	1
2.	ANTECEDENTES	2
2.1.	Alimentos fermentados	2
2.2.	Bacterias lácticas	2
2.3.	Cultivos iniciadores	3
2.3.1.	Cultivos mesófilos	5
2.3.2.	Cultivos termófilos	5
2.4.	Metabolismo de los cultivos iniciadores	6
2.4.1.	Metabolismo de nitrógeno	6
2.4.2.	Metabolismo de citrato	8
2.4.3.	Metabolismo de lactosa	8
2.4.3.1.	Transporte e hidrólisis de lactosa	13
2.4.3.2.	Conversión de hexosa a triosas fosfato	15
2.4.3.3.	Conversión triosas fosfato a piruvato	16
2.4.3.4.	Conversión de piruvato a lactato	17
2.4.4.	Regulación del metabolismo de azúcares	18
2.4.4.1.	Regulación al nivel de la expresión de genes	18
2.4.4.2.	Regulación al nivel de la actividad enzimática	21
2.5.	Influencia del pH en las bacterias lácticas	23
2.5.1.	Estrés ácido	24
2.5.2.	Control del pH interno (pHin)	26
2.5.2.1.	Buffers del citoplasma	26
2.5.2.2.	Sistemas symport de protones	26
2.5.2.3.	Producción de ácidos y bases	27
2.5.2.4.	ATPasa que transporta protones	28
2.6.	Los plásmidos	29
2.6.1.	Genes de interés industrial	29
2.6.2.	Estudio de los plásmidos	29

2.6.3.	Factores experimentales importantes en el aislamiento de ADN	30
2.7.	Presentaciones de cultivos iniciadores	32
2.7.1.	Cultivos liofilizados	32
2.7.2.	Cultivos liofilizados concentrados	32
2.7.3.	Cultivos congelados concentrados	33
2.7.4.	Cultivos refrigerados	33
2.8.	Utilización de los cultivos iniciadores en la elaboración de queso	34
3.	JUSTIFICACIÓN	37
4.	OBJETIVOS	38
4.1.	Generales	38
4.2.	Específicos	38
5.	DISEÑO EXPERIMENTAL	39
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	41
6.1.	Microorganismo	41
6.2.	Medios de cultivo	41
6.2.1.	Leche descremada al 11% de sólidos totales	41
6.2.2.	Agar APT	41
6.2.3.	Medio líquido Elliker modificado	42
6.2.4.	Agar Reddy modificado	42
6.2.5.	Medio industrial para fermentación	43
6.3.	Determinaciones	44
6.3.1.	Cuenta de microorganismos viables	44
6.3.2.	Producción de ácido láctico	44
6.3.3.	Actividad láctica	44
6.3.4.	Actividad específica	44

6.3.5.	Medición del pH	45
6.4.	Extracción de plásmidos de <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	45
6.4.1.	Obtención del paquete celular	45
6.4.2.	Soluciones	46
6.4.3.	Técnica de extracción de plásmidos	46
6.4.4.	Electroforesis en gel de agarosa	50
6.5.	Cepas de <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> lactosa negativas	50
6.5.1.	Obtención	50
6.5.2.	Perfil de plásmidos	51
6.6.	Fermentaciones	51
6.6.1.	Preparación del inóculo	51
6.6.2.	Condiciones de producción	52
6.7.	Cosecha de microorganismos	52
6.8.	Almacenamiento en refrigeración	53
6.8.1.	Determinaciones	53
6.8.2.	Extracción de plásmidos	53
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
7.1.	Extracción de plásmidos de <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	55
7.2.	Cepas de <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> lactosa negativas	58
7.3.	Fermentaciones	61
7.4.	Cosecha de microorganismos	65
7.5.	Almacenamiento en refrigeración	65
8.	CONCLUSIONES	74
9.	RECOMENDACIONES	75
10.	BIBLIOGRAFÍA	78

1. RESUMEN.

Este trabajo ha tenido como objetivo el demostrar que existe una relación entre la disminución de la actividad ácido láctica y la pérdida de plásmidos en *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* cuando es almacenado en refrigeración, y que el pH es el factor más importante en este sentido.

Para ello se ha obtenido el perfil de plásmidos de la cepa en estudio y se le ha comparado con el perfil de una cepa lactosa negativa. Además, se llevaron a cabo fermentaciones de 8 y 4 horas para tener poblaciones microbianas en fase estacionaria y exponencial de crecimiento; durante estas fermentaciones se estudiaron las cinéticas de crecimiento, de producción de ácido láctico y la actividad láctica. Posteriormente las bacterias fueron cosechadas y almacenadas en refrigeración, con y sin control de pH, y se estudió la viabilidad celular, la capacidad de producción de acidez, el pH y el perfil de plásmidos.

Los resultados del estudio indican que la cepa lactosa negativa carece de un plásmido de 35,792 pb; sin embargo, la pérdida de la actividad al término del almacenamiento no se debe a la pérdida específica de material genético sino a que la mayor parte de las células mueren. Respecto a esto se demuestra que el controlar el pH evita de manera importante la muerte de las bacterias, lo que a su vez provoca el tener una buena actividad a los 14 y 28 días de almacenamiento en las muestras cosechadas a las 8 horas y a las 4 horas respectivamente.

De esta forma, se concluye que es posible producir y almacenar en refrigeración este tipo de bacterias siempre y cuando exista un control de pH. No obstante esto, es necesario continuar con las investigaciones para optimar el proceso de producción y de utilización de los cultivos iniciadores refrigerados.

2. ANTECEDENTES.

2.1. ALIMENTOS FERMENTADOS.

Los alimentos fermentados son aquellos que adquieren características propias a través de un proceso en el que está involucrado el metabolismo microbiano. Existe una gran variedad de alimentos de este tipo e incluyen productos lácteos, cárnicos y vegetales (Sellars, 1981); en la mayoría de ellos se han identificado y caracterizado plenamente los microorganismos involucrados (Cuadro 1).

PRODUCTOS	MICROORGANISMOS		
	<i>Bacterias</i>	<i>Levaduras</i>	<i>Hongos</i>
Lácteos	Lactococcus	Saccharomyces	Penicillium
	Streptococcus	Cándida	*
	Lactobacillus	Kluyveromyces	*
	Leuconostoc	*	*
	Bifidobacterium	*	*
	Propionibacterium	*	*
Cárnicos	Lactobacillus	Debaryomices	Penicillium
	Lactococcus	*	Scapulariopsis
	Streptococcus	*	*
	Pediococcus	*	*
	Micrococcus	*	*
Vegetales	Lactococcus	*	*
	Lactobacillus	*	*
	Leuconostoc	*	*

(García y col., 1993; Guerrero 1993 y Salovaara, 1998)

Cuadro 1 Principales géneros de microorganismos utilizados en los alimentos fermentados.

Un aspecto común en muchos de estos alimentos es la formación de ácido láctico como producto del metabolismo de cierto tipo de bacterias conocidas como lácticas.

2.2. BACTERIAS LÁCTICAS.

Las bacterias lácticas (BL) están divididas en 11 géneros pero sólo cuatro de ellos son importantes en alimentos: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y

Lactobacillus. Las primeras tres especies tienen forma de coco mientras que la última tiene forma de bastón. Todas ellas son gram positivas, catalasa negativas, no móviles y carecen de un sistema de transporte de electrones para generar ATP de manera aerobia. Por tal motivo, oxidan los azúcares en fermentaciones anaeróbicas para formar lactato o lactato, etanol, acetato y CO₂; no obstante esto, muchas de ellas son aerotolerantes (Cogan, 1996 y Axelsson, 1998).

El ácido láctico producido por estas bacterias confiere a los alimentos cambios en su textura y propiedades sensoriales deseables, además de favorecer su conservación.

Las BL son especialmente importantes en la elaboración de productos lácteos donde forman parte de los denominados cultivos iniciadores.

2.3. CULTIVOS INICIADORES.

Se conocen con el nombre de cultivos iniciadores (CI) a los microorganismos que se utilizan durante la industrialización de la leche para estandarizar los productos impartiendo determinadas características físicas, químicas y sensoriales que contribuyen a su aceptabilidad y su conservación (Pérez Gavilán & Pérez Gavilán, 1984).

En el cuadro 2 se citan algunos ejemplos de productos lácteos en los que intervienen microorganismos (bacterias, hongos y levaduras).

Los CI de interés en este trabajo son los de origen bacteriano. Estos pueden clasificarse en mesófilos y en termófilos, teniendo los primeros una temperatura óptima de crecimiento entre 26-32 °C (Lee & Collins, 1976) y los segundos entre 38-42°C (Alcorno, 1997).

Los cultivos pueden ser "definidos" o "indefinidos" (Thunell & Bodyfelt, 1984) según se conozca o no el tipo de microorganismos involucrados. Al ser cultivos definidos pueden ser utilizados individualmente o en mezcla (Daniell & Sandine, 1981); existen mezclas comerciales indefinidas congeladas o liofilizadas (Limosowtin y col., 1996) y también es común el uso de cultivos artesanales que son mezclas indefinidas de bacterias.

PRODUCTOS	MICROORGANISMOS
-----------	-----------------

QUESOS

Quesos Duros

Temp. Baja	Cheshire	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
	Edam	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>
	Gouda	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> y <i>Streptococcus faecium</i>
Temp. Media	Cheddar	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
	Derby y Dunlop	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
	Gloucester	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>
	Leicester	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> y <i>Streptococcus faecium</i>
Temp. Alta	Parmesano, Romano y Grana	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp.: <i>bulgaricus</i> y <i>lactis</i> , <i>Lactobacillus: helveticus</i> , <i>casei</i> , <i>acidophilus</i> y <i>plantarum</i>
	Gruyere y Emmental	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp.: <i>bulgaricus</i> y <i>lactis</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Pediococcus freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>

Quesos Semiduros

Caerphilly y Lancashire	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>
-------------------------	--

Quesos Suaves

Quarg Feta Cottage y Queso crema	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>
Camembert y Brie	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Penicillium: camemberti</i> , <i>caseicolum</i> y <i>candidum</i>

LECHES FERMENTADAS

Jocoque y Butter milk	<i>Lactococcus lactis</i> ssp.: <i>lactis</i> y <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Leche búlgara y Yakult	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> y ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> y <i>Lactobacillus</i>
Yogurt	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>

OTROS

Mantequilla Madurada	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc citrovorum</i> y <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>
Crema ácida	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>

(Scott, 1986; García y col., 1993; Luquet, 1993 y Hernández, 1992)

Cuadro 2 Ejemplos de microorganismos empleados en la industria láctea.

2.3.1. Cultivos Mesófilos.

En este tipo de cultivos se encuentran las denominadas bacterias lácticas productoras de acidez (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*) y las bacterias productoras de sabor (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* y *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*). Las primeras producen ácido láctico a partir de lactosa y las segundas diacetilo a partir de citrato. En la práctica se suelen utilizar cultivos mixtos de estas bacterias, correspondiendo a las productoras de acidez un 90-99% de la flora y a las productoras de sabor 1-10%.

La diferencia entre *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* es que la primera puede crecer a 40 °C, a pH de 9.2, en presencia de 4% de NaCl, puede fermentar la maltosa y producir amoníaco a partir de arginina pero la segunda no. Por otra parte, la única diferencia entre *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* radica en que la primera posee un plásmido que tiene codificada la información necesaria para llevar a cabo el transporte de citrato, y una vez dentro de la célula puede metabolizarlo para formar compuestos de sabor como el diacetilo (Cogan, 1996).

2.3.2. Cultivos Termófilos.

En este tipo de cultivos se han identificado las siguientes bacterias: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

En la producción de yoghurt se suelen utilizar mezclas de *Streptococcus thermophilus* y algún *Lactobacillus* pues existe una relación simbiótica entre estas bacterias, ya que los *Lactobacillus* tienen una actividad proteolítica más desarrollada lo cual permite a los *Streptococcus* emplear los aminoácidos que requieren; a su vez, esta última bacteria produce ácido fórmico y bióxido de carbono que estimula el crecimiento de la primera (García y col., 1993)

Cabe señalar que *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y algunas cepas de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* solo fermentan la porción de glucosa de la lactosa, excretando la galactosa en

proporción a la cantidad de lactosa fermentada. Solamente *Lactobacillus helveticus* y algunas cepas de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* tienen la capacidad de metabolizar la galactosa. Se menciona esto porque en la manufactura de quesos es fundamental que todo el azúcar sea fermentado durante el proceso de elaboración y maduración, eligiéndose por lo tanto mezclas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus helveticus* o *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* galactosa (+)(Cogan, 1996).

Hasta el momento sólo se ha hecho mención de la importancia del ácido láctico y del diacetilo pero cabe señalar que un producto lácteo fermentado alcanza su sabor y aroma característico cuando la flora produce también otro tipo de metabolitos como el ácido acético, ácido fórmico, acetaldehído, CO₂, azúcares complejos, péptidos y aminoácidos.

2.4. METABOLISMO DE LOS CULTIVOS INICIADORES.

El metabolismo de los CI ha sido ampliamente estudiado sólo en aquellos aspectos que tienen significado comercial, esto es, el metabolismo de nitrógeno, de citrato y de lactosa.

En relación con el metabolismo de nitrógeno y de citrato, a continuación se mencionan exclusivamente los puntos más importantes; el metabolismo de lactosa es revisado con mayor amplitud al ser parte fundamental del presente trabajo.

2.4.1. Metabolismo de Nitrógeno.

Las BL no poseen la capacidad de sintetizar muchos aminoácidos. Los *Lactococcus* por ejemplo, requieren de isoleucina, leucina, valina e histidina para crecer; algunas cepas requieren incluso de arginina y metionina. Pero las BL más demandantes de aminoácidos son los *Lactobacillus* pues requieren de 14 aminoácidos para su crecimiento (Monnet y col., 1996).

El mecanismo de asimilación de nitrógeno que se ha propuesto para estas bacterias se presenta esquemáticamente en la figura 1 (Smid y col., 1991; Yu y col., 1996 y Monnet, y col., 1996).

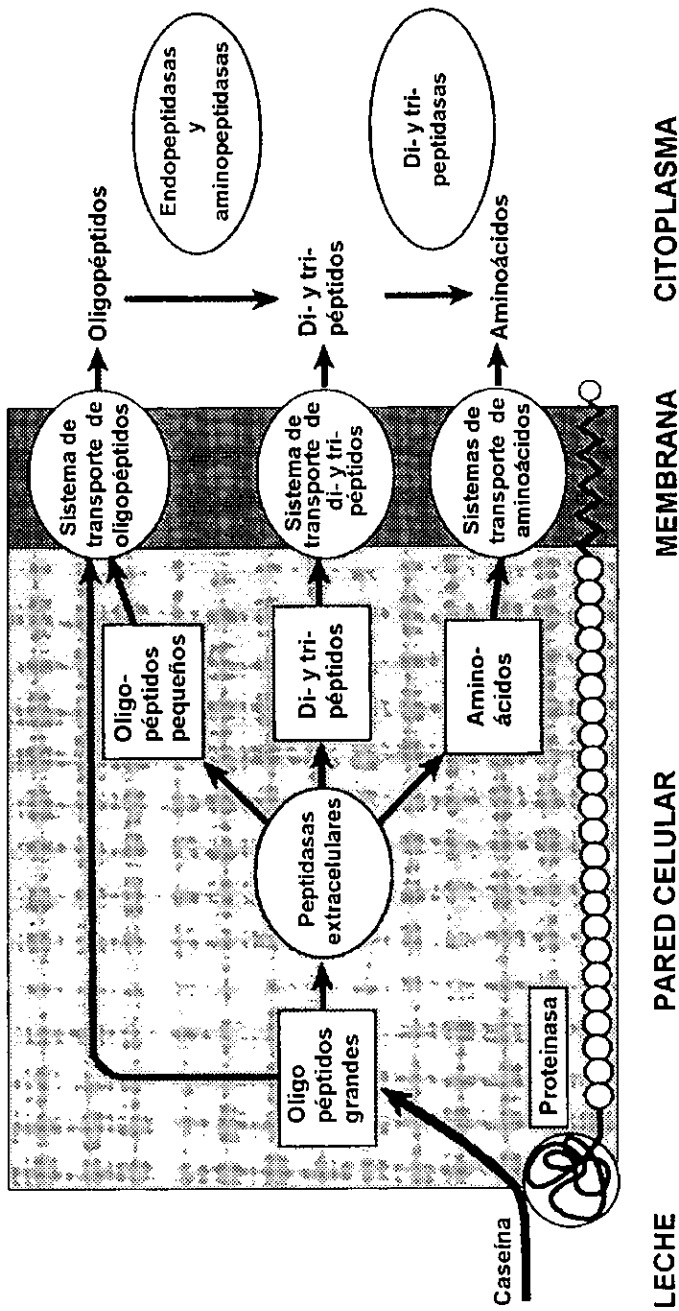


Figura 1 Rutas probables de degradación de caseína en las bacterias lácticas.

2.4.2. Metabolismo de Citrato.

Los productos del metabolismo de citrato son el acetato, el diacetilo, la acetoína, el 2,3-butanodiol y el CO₂ (figura 2). Los primeros dos son componentes importantes del sabor de cierto tipo de leches fermentadas, de cremas maduradas y de quesos como el cotagge y el Cheddar, mientras que el CO₂ es responsable de los agujeros de algunos quesos (p.ej. los holandeses). Tanto la acetoína como el butanodiol carecen de sabor (Starrenburg & Hugenholtz, 1991; Hugenholtz & Starrenburg, 1992 y Monnet, y col., 1996).

2.4.3. Metabolismo de Lactosa.

El significado comercial de las bacterias utilizadas en la manufactura de la mayor parte de los productos lácteos fermentados se debe en gran medida a la capacidad de convertir la lactosa y otros azúcares en ácido láctico.

A excepción de las bifidobacterias, todos los CI son aerotolerantes. Sin embargo, no pueden generar el ATP necesario para la biosíntesis de macromoléculas a través de una respiración aerobia pues carecen de ciclo de Krebs; esto significa que dependen de mecanismos anaerobios para generar energía. De esta forma, estas bacterias metabolizan los azúcares a ácido láctico y otros compuestos ya que en este proceso se genera ATP en completa ausencia de oxígeno.

En los CI han evolucionado tres principales vías para el metabolismo de lactosa y otros azúcares relacionados. Estos mecanismos y los principales organismos que los poseen se presentan a continuación:

- a) ruta del homolactato: *Lactococcus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus helveticus*.
- b) ruta de la fosfoacetolasa o del heterolactato: *Leuconostoc*.
- c) ruta de las *Bifidobacterium*.

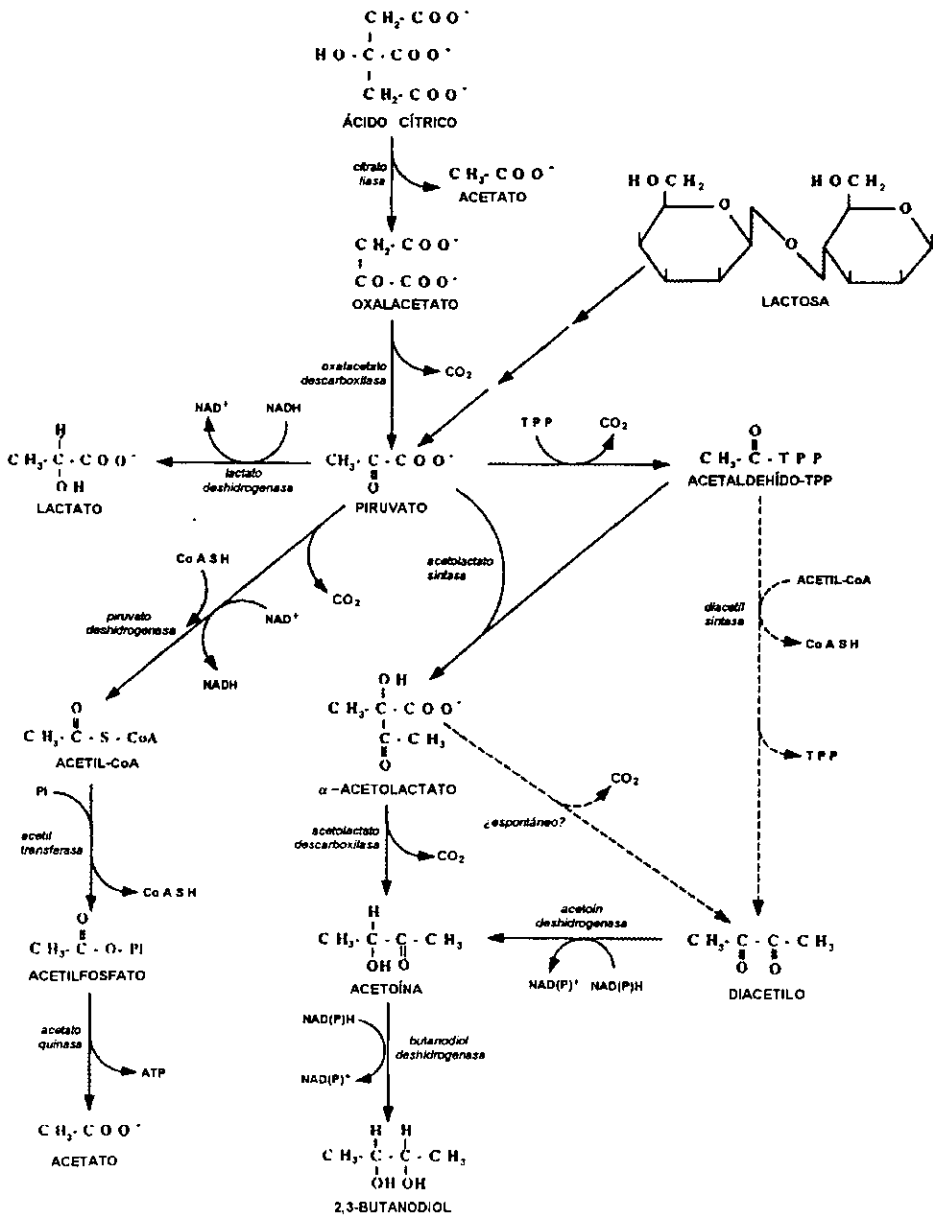


Figura 2 Metabolismo del ácido cítrico en las bacterias lácticas.

Estas tres rutas tienen en común las siguientes características generales (Monnet y col., 1996):

- Mecanismos para el transporte e hidrólisis de la lactosa en monosacáridos.
- Secuencias de reacciones para la conversión de esos monosacáridos en triosas fosfato y otros metabolitos intermedios.
- Una secuencia de cinco reacciones comunes a las 3 fermentaciones en donde las triosas fosfato se convierten a piruvato.
- Reacciones en donde el piruvato es convertido a lactato y posiblemente a otros productos característicos, dependiendo de la fermentación.
- Mecanismos para la expulsión de los productos finales de la fermentación.
- Mecanismos de regulación de la fermentación.

En las figuras 3 y 4 se presentan la ruta del homolactato (De Vos & Vaughan, 1994; De Vos y col., 1990; De Vos & Simons, 1988 y Maeda & Gasson, 1986) y la ruta del heterolactato respectivamente.

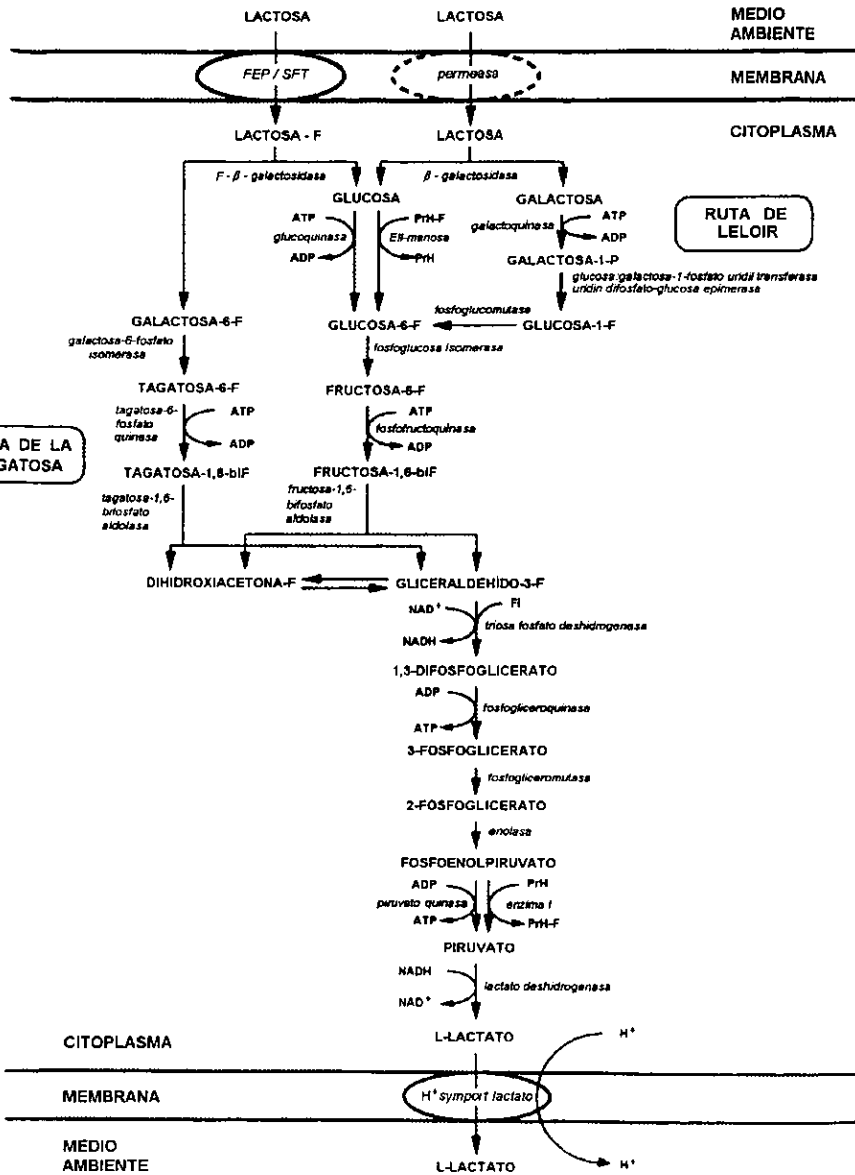


Figura 3 Ruta homofermentativa de utilización de lactosa en las bacterias lácticas.

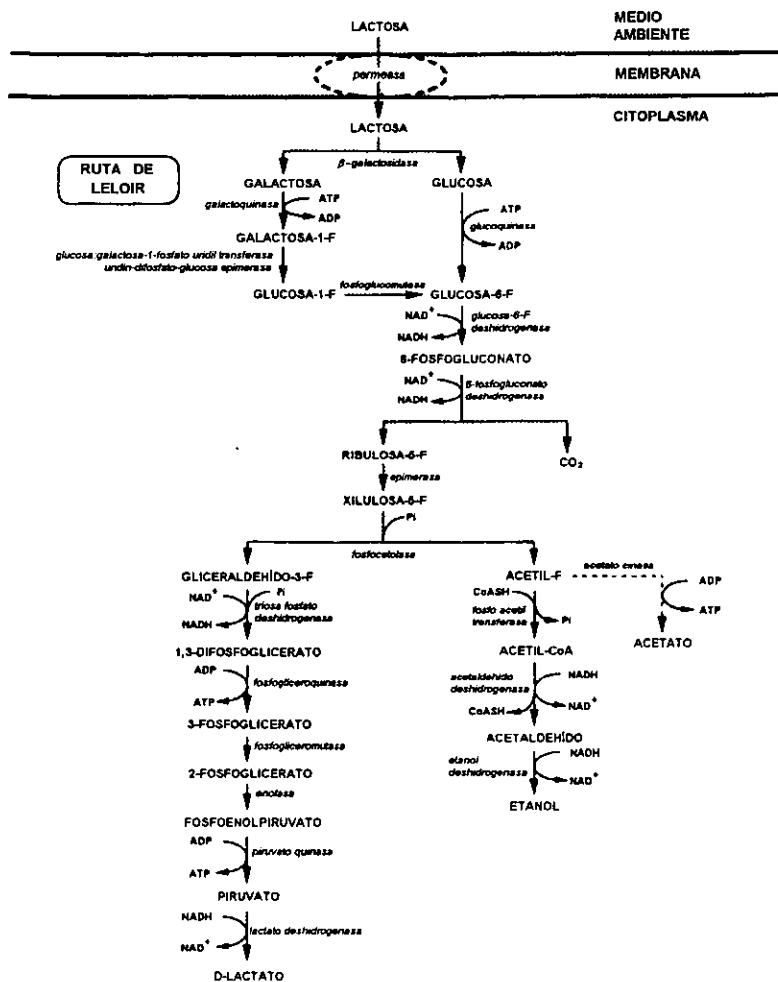


Figura 4 Ruta heterofermentativa de utilización de lactosa en las bacterias lácticas.

2.4.3.1. Transporte e Hidrólisis de Lactosa.

En los CI se han identificado dos mecanismos generales para el transporte de lactosa.

a) Sistema Fosfo Transferasa - Fosfo Enol Piruvato (SFT-FEP). En este mecanismo la molécula de azúcar es fosforilada durante su paso a través de la membrana citoplásmica y la fuente inicial de fosfato es el intermediario de la glucólisis conocido como fosfo enol piruvato (FEP). En el sistema están involucradas cuatro proteínas:

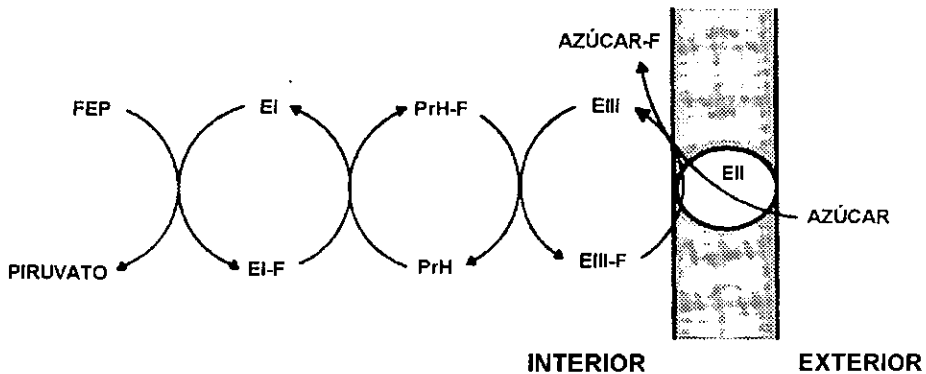


Figura 5 Representación esquemática del sistema fosfotransferasa (SFT) de transporte de azúcares.

La enzima II (EII) es una proteína transmembranal que transfiere un azúcar específico del exterior hacia el interior de la célula en donde es fosforilada por una segunda proteína específica, enzima III (EIII), la cual reside en el citoplasma. Las otras dos proteínas, la enzima I (EI) y una proteína que contiene histidina (PrH) son proteínas citoplásmicas no específicas que se encuentran involucradas en la transferencia de un residuo de fosfato del FEP a la EIII. A consecuencia de este conjunto de reacciones, la lactosa fosfato se acumula intracelularmente a un costo neto de un fosfato rico en energía.

La enzima fosfo- β -galactosidasa (β gal) hidroliza la lactosa fosfato a glucosa y galactosa-6-fosfato. La glucosa es convertida a glucosa 6 fosfato (G6F) ya sea

por una glucoquinasa (utilizando ATP como donador de fosfato) o por el componente de membrana (EII) del SFT-FEP específico para el transporte de glucosa, fructosa y manosa.

El SFT-FEP es característico de los *Lactococcus* pero ocasionalmente se ha encontrado en otras BL (De Vos & Vaughan, 1994; De Vos y col., 1990 y De Vos & Simons, 1988)

b) Sistema de lactosa permeasa (SLP). El segundo sistema para el transporte de azúcares en los CI involucra a proteínas denominadas permeasas que trasladan azúcares específicos hacia el citoplasma celular sin modificación química alguna. El modelo es similar al mecanismo de lactosa permeasa de *E. coli* que ha sido muy estudiado (Voet & Voet, 1995).

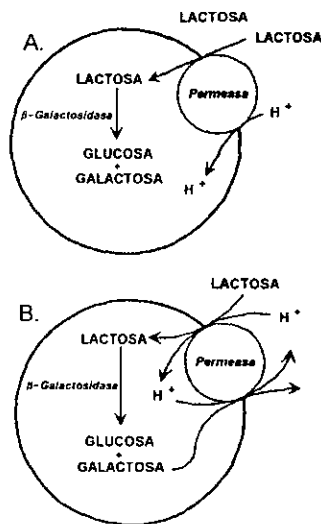


Figura 6 Modelos de ingreso de lactosa a través de permeasas.
 A. Lactosa / H⁺ symport B. Lactosa / Galactosa antiport

El SLP es un transporte activo que obtiene energía de un gradiente de protones que se forma cuando éstos son expulsados junto con lactato o gracias a la acción de una ATPasa transmembranal. La lactosa es hidrolizada por la β -galactosidasa (β gal) en glucosa y galactosa, las cuales son fosforiladas posteriormente y metabolizadas por las vías Embden-Meyerhof-Parnas y de Leloir respectivamente.

El SLP en la mayor parte de los CI es similar al de *E. coli*.

Los *Lactococcus* empleados como CI generalmente metabolizan la lactosa a través del SFT-FEP y la β gal; unas cuantas cepas cuentan además con el sistema de lactosa permeasa y la β gal pero se cree que el SFT para lactosa es la forma dominante en aquellas bacterias que producen ácido de manera rápida.

Otras bacterias utilizadas como CI, tales como *Str. thermophilus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterias* metabolizan la lactosa por medio de la lactosa permeasa y la β gal.

2.4.3.2. Conversión de hexosa a triosas fosfato.

Posteriormente a su transporte e hidrólisis, la lactosa es convertida a glucosa y galactosa-6-fosfato (SFT) o a glucosa y galactosa (SLP).

Existen dos secuencias de reacciones en las BL para el metabolismo de galactosa; la primera es conocida como la ruta de la tagatosa y opera básicamente en los *Lactococcus* que metabolizan la lactosa por el SFT y la β gal. La segunda se conoce como ruta de Leloir y es empleada por aquellas bacterias que utilizan el SLP y la β gal para iniciar el metabolismo de lactosa.

La tagatosa-6-fosfato y la fructosa-6-fosfato son estereoisómeros y por tanto, la ruta de la tagatosa es análoga a las reacciones de la secuencia glucolítica de EMP para convertir la fructosa-6-fosfato a gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato. Estos dos últimos compuestos también se forman en la ruta de la tagatosa pero las enzimas involucradas son específicas para los intermediarios generados en esa ruta.

La ruta de la tagatosa también se emplea para metabolizar la galactosa-6-fosfato formada durante el transporte de galactosa en los *Lactococcus* por medio del sistema galactosa fosfotransferasa.

Por otro lado, la vía de Leloir es responsable de la conversión de galactosa a glucosa-6-fosfato (G6F); para ello, la galactosa es fosforilada por una galactoquinasa utilizando ATP y se forma galactosa-1-fosfato, el cual es convertido a glucosa-1-fosfato. El fosfato de este azúcar es transferido del C1 al C6 en una reacción catalizada por una fosfoglucomutasa.

La glucosa siempre es convertida a G6F; la reacción es usualmente catalizada por una hexoquinasa (glucoquinasa) utilizando ATP. En los *Lactococcus* la G6F es metabolizada a gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona-fosfato vía fructosa-6-fosfato y fructosa-1.6-bifosfato (FBF). Estas reacciones forman parte de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP).

2.4.3.3. Conversión de triosas fosfato a piruvato.

La secuencia de 5 reacciones utilizadas para convertir el gliceraldehído-3-fosfato a piruvato es común en los tres tipos de fermentación de azúcares en las BL. Esta es la parte de las rutas fermentativas en la cual la energía derivada del metabolismo oxidativo es conservada como ATP, el cual es necesario para llevar a cabo la síntesis de macromoléculas celulares. La secuencia inicia con una compleja reacción catalizada por la triosa fosfato deshidrogenasa en donde se oxida un aldehído para formar ácido y se forma un enlace de alta energía. Los electrones (y protones) removidos en la oxidación son transferidos a NAD^+ . En el siguiente paso, la desfosforilación del 1,3-difosfoglicerato está acoplada a la fosforilación de ADP para formar ATP. Posteriormente 2 reacciones más dan origen al fosfoenolpiruvato (FEP). Este intermediario con enlace de alta energía es desfosforilado a piruvato en una reacción acoplada a la síntesis de ATP a partir de ADP. De manera alternativa, el FEP es empleado como fuente primaria de energía para el transporte de azúcares en los sistemas de fosfotransferasa.

2.4.3.4. Conversión de piruvato a lactato.

El metabolismo de azúcares hacia piruvato causa un desequilibrio en el estado de oxido-reducción de la célula reflejado en su balance de NAD^+/NADH . La reacción de la triosa fosfato deshidrogenasa requiere NAD^+ y puede cesar rápidamente a menos que el NADH producido se reoxide. Las BL regeneran el NAD^+ reduciendo el piruvato a lactato por medio de la lactato deshidrogenasa (LDH). El lactato puede existir como el estéreo isómero D o L, y las LDHs específicas para cada isómero se encuentran en los cultivos iniciadores. Los *Lactococcus*, *Str. thermophilus*, y las bifidobacterias producen L-lactato, mientras que los leuconostoc y *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y ssp. *lactis* producen el isómero D.

La LDH de los *Lactococcus*, de algunos lactobacilos mesófilos y de las bifidobacterias posee una característica importante: es una proteína alostérica que requiere para su activación de FBF y es inhibida por fosfato inorgánico (Pi).

El lactato es por mucho el producto formado en mayor proporción por los *Lactococcus* a partir de piruvato en las fermentaciones lácticas donde la concentración de lactosa (sustrato) es normalmente alta. Esto también es cierto en fermentaciones en donde existe una alta concentración de glucosa. Para ambos azúcares, en algunas ocasiones se obtienen trazas de otros productos finales, tales como formato, acetato, etanol y acetoína. Cuando los *Lactococcus* son crecidos con altas concentraciones de galactosa o pequeñas concentraciones de lactosa o glucosa, estos productos finales adquieren proporciones mayores al término de la fermentación (Collins, 1977). Lo anterior es factible dado que los *Lactococcus* poseen las vías necesarias para formar productos distintos al lactato pero el flujo de metabolitos en estas rutas no son significativos cuando se lleva a cabo una fermentación normal de glucosa y lactosa.

Las fermentaciones se consideran rutas anaerobias dado que pueden generar ATP en completa ausencia de oxígeno. Las bacterias empleadas como CI, con la excepción de las bifidobacterias, son aerotolerantes, es decir, pueden hacer frente a problemas de toxicidad provocados por el oxígeno o metabolitos del oxígeno como el peróxido (H_2O_2). En estas bacterias el oxígeno se reduce a agua

por alguno de los siguientes mecanismos: en el primero, una flavoproteína NADH oxidasa cataliza la transferencia de cuatro electrones al oxígeno formando agua; en el segundo mecanismo actúan dos flavoproteínas, una NADH oxidasa que cataliza la transferencia de dos electrones para formar H_2O_2 , y una NADH peroxidasa que cataliza la reducción del H_2O_2 producido para formar agua.

El crecimiento aeróbico en los *Lactococcus* afecta las proporciones de los productos finales pero sólo si se tienen las condiciones para que el piruvato sea convertido en otros productos distintos al lactato.

2.4.4. Regulación del metabolismo de azúcares.

La regulación de la fermentación de azúcares en los CI sólo ha sido estudiada de manera importante en los *Lactococcus*. Esta regulación fue evidente al observar que algunos azúcares eran metabolizados preferentemente y que los productos finales obtenidos podían ser alterados, dependiendo de la concentración y naturaleza de los azúcares involucrados.

2.4.4.1 Regulación al nivel de la expresión de genes.

El control del metabolismo de azúcares puede llevarse a cabo al nivel de la expresión de genes, lo cual determina la concentración intracelular de las enzimas de las rutas bioquímicas de la fermentación. Este control fino se da en sitios claves de rutas catalizadas por enzimas alostéricas cuyas actividades son moduladas por los metabolitos de la fermentación.

Aunque existe poca evidencia definitiva, se cree que muchos de los genes para las enzimas de las rutas metabólicas superiores, como la vía de EMP, se expresan constitutivamente. La regulación al nivel de la expresión genética ha sido observada sólo en aquellos genes involucrados en el transporte de azúcares o en la hidrólisis de disacáridos en monosacáridos. Los genes específicos para el SFT-lactosa, la $f\beta gal$ y la ruta de la tagatosa, se encuentran localizados en un solo operón (Fitzgerald & Hill, 1996) como se observa en la figura 7; este operón ha sido identificado en plásmidos de 28 a 60 kb en aquellas cepas de *Lactococcus*

lactis consideradas como buenas productoras de ácido (Venema & Kok, 1987 y De Vos y col., 1989).

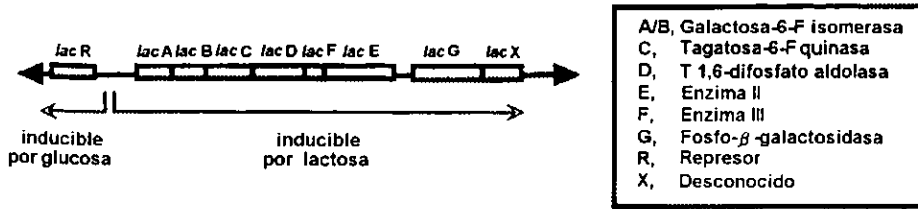


Figura 7 Disposición de genes en el operón de lactosa de *Lactococcus lactis*.

Después del gen *lacX* se encuentra una copia completa de un elemento *iso-ISS1* el cual contiene una secuencia muy parecida al terminador rho-independiente. Aunque la expresión del gen *lacX* puede llevarse a cabo, su función no se conoce actualmente y su localización en el operón *lac* puede ser fortuita. Estudios recientes han indicado que la expresión del gen *lacX* no es esencial para el crecimiento acelerado en lactosa. Es posible que la proteína *lacX* intervenga en la regulación de la expresión de genes pues se ha reportado que un gen *lacX* localizado en el cromosoma de *Lactococcus lactis* UCL22 puede formar parte de un circuito regulatorio de dos componentes (De Vos & Vaughan, 1994).

La transcripción del operón *lac* es regulada por el producto del gen *lacR*. En un medio con lactosa la transcripción del operón *lac* es inducida cerca de 10 veces mientras que en un medio con glucosa el gen inducido es el *lacR*. Se ha encontrado que la proteína LacR además de ser represor del operón *lac* es activador de su propia transcripción.

Estudios recientes indican la presencia de dos regiones operadoras en el operón *lac* de los *Lactococcus* y presentan distinta afinidad por LacR. El operador *lacO1* tiene una alta afinidad por LacR y está localizado cerca del promotor *lac* en una posición que le permite reprimir la transcripción del operón *lac* ABCDFEGX y activar la transcripción inicial de *lacR*. El otro operador, *lacO2*, presenta una

afinidad por LacR tres veces menor y se localiza entre el sitio promotor de *lacR* y el inicio del gen *lacR*. Basados en esta información, podemos decir que en el estado de no inducción, la unión de LacR como dímero o multímero al operador *lacO1* reprime la transcripción del operón *lac* y simultáneamente activa la transcripción de *lacR*. Al incrementarse la concentración de LacR, ésta proteína se unirá a *lacO2* provocando la disminución de la inducción del gen *lacR*. Con la formación del inductor del operón *lac* durante el crecimiento en lactosa, la proteína LacR se disocia de los operadores y la represión del operón se remedia.

Se ha demostrado que el inductor del operón *lac* en *Lactococcus lactis* es la tagatosa-6-fosfato y no la galactosa 6-fosfato como se había sugerido hace algunos años. El represor LacR contiene dos dominios; uno de ellos se localiza en el N-terminal y cuenta con un motivo hélice-giro-hélice involucrado en la unión al ADN mientras que el otro dominio incluye un número de residuos cargados en el C-terminal que están involucrados en la respuesta al inductor tagatosa-6-fosfato (De Vos & Vaughan, 1994).

Por otra parte, se ha observado la regulación de la transcripción de los genes de lactosa permeasa y β gal en *Str. thermophilus*. Estos genes son transcritos gracias a la acción de un promotor en respuesta a la inducción por lactosa y represión por glucosa. La represión probablemente esté mediada por AMP cíclico, el cual tiene una concentración muy elevada en estas bacterias. Dos genes de enzimas de la vía de Leloir están localizados cerca del gen de lactosa permeasa pero son transcritos independientemente.

Existe también alguna evidencia de que en los *Lactococcus* la actividad de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa es regulada al nivel de la expresión genética. Esta enzima cataliza el paso de oxidación en el cual los electrones son transferidos a NAD^+ acoplado a la fosforilación de la triosa fosfato utilizando F_i , y puede ser un paso limitante en la ruta de EMP. Un incremento en el grado de glicólisis es acompañado por un incremento en la concentración de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Más aún, si esta enzima es inhibida específica y gradualmente, el grado de fermentación de lactosa disminuye de forma paralela a la pérdida de la enzima.

2.4.4.2. Regulación al nivel de la actividad enzimática.

Además del control metabólico al nivel de la expresión de genes, la fermentación de lactosa en los *Lactococcus* puede ser influenciada al nivel de la actividad enzimática en etapas claves de la ruta de glucólisis; entre estas enzimas tenemos a las involucradas en el transporte de lactosa en el SFT-FEP, la fosfofructoquinasa, la piruvato quinasa y la LDH. (Fig. 8).

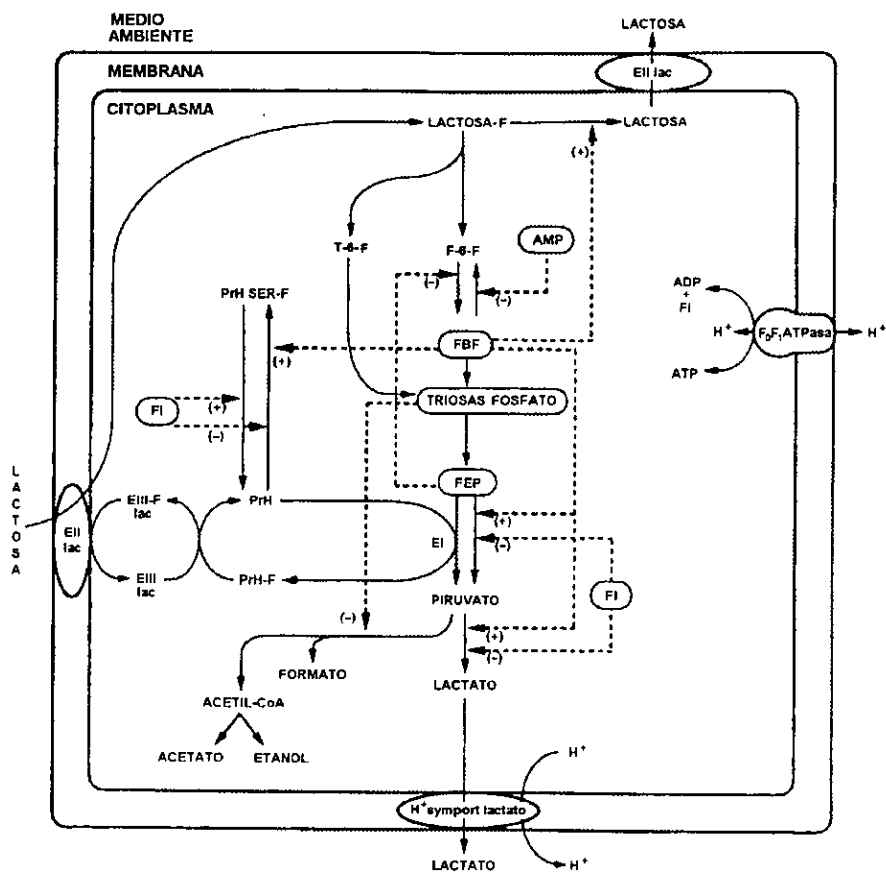


Figura 8 Regulación del metabolismo de lactosa al nivel de actividad enzimática en los *Lactococcus*.

a) SFT-FEP.

Dos de las cuatro enzimas de este sistema, la EIII y la EII, son específicas para lactosa y son inducidas por este mismo disacárido, mientras que las restantes dos proteínas (Pr-H y EI) son inespecíficas y se emplean para fosforilar todos los sistemas de transporte de tipo SFT. A consecuencia de esto, el grado de captación de lactosa por medio del SFT-lactosa depende de la habilidad de las enzimas EIII/EII-lactosa para competir por el residuo de fosfato de la Pr-H con otras proteínas EIII/EII específicas para otros azúcares.

La Pr-H es fosforilada por el FEP en un residuo de histidina pero también puede ser fosforilada por ATP en un residuo de serina. La reacción es catalizada por una quinasa alostérica específica que es estimulada por FBF y otros intermediarios glucolíticos y es inhibida por Fi. La Pr-H con fosfato en serina no sirve como sustrato para las enzimas EIII/EII, ni como sustrato para la fosforilación en su residuo de histidina por la EI, de tal forma que es inactivo. El fosfato puede ser removido del residuo de serina por una fosfatasa que es activada por Fi. De esta forma, las concentraciones intracelulares de FBF y Fi influyen la disponibilidad de Pr-H-fosfato necesario para el transporte de lactosa.

b) Fosfofructoquinasa.

La FBF es un regulador del flujo metabólico de la ruta de EMP y se forma de la glucosa-6-fosfato en una reacción catalizada por la fosfofructoquinasa. Esta enzima es una proteína alostérica que es inhibida por el FEP.

c) Piruvato Quinasa.

La reacción de desfosforilación del FEP para formar piruvato y ATP es catalizada por la piruvato quinasa, la cual es una proteína alostérica activada por FBF e inhibida por Fi. Cuando los *Lactococcus* fermentan lactosa o glucosa rápidamente, los niveles de azúcares con fosfatos (incluyendo FBF) son elevados, y los niveles de Fi son bajos. Bajo estas circunstancias, la piruvato quinasa convierte activamente el FEP a piruvato. Por otra parte, si las concentraciones de lactosa o glucosa se vuelven limitantes, el nivel de FBF desciende rápidamente. el

Fi aumenta (aunque a un ritmo más lento), y como consecuencia, la actividad de la piruvato quinasa disminuye. Esta disminución de la actividad de la piruvato quinasa junto con la disminución de la utilización del FEP para el transporte de azúcares, provoca la acumulación intracelular del FEP y sus precursores, el 2-fosfoglicerato y el 3 fosfoglicerato (Monnet y col., 1996).

d) LDH.

La LDH también es una enzima alostérica y al igual que la piruvato quinasa es activada por FBF e inhibida por Fi.

2.5. INFLUENCIA DEL pH EN LAS BACTERIAS LÁCTICAS.

El rango de pH extracelular (pHex) en el cual pueden vivir las bacterias es amplio; dependiendo de su pH óptimo de crecimiento podemos clasificarlas en neutrófilas, acidófilas y alcalófilas. Muchas de las bacterias ácido lácticas encontradas en los productos lácteos son consideradas como neutrófilas, sin embargo, su pH intracelular (pHin) no es regulado tan estrechamente como en *E. coli*. Los lactococos y los lactobacilos, así como otras bacterias fermentadoras, permiten que su pHin decrezca a medida que el pHex disminuye. El efecto negativo de los pH's bajos sobre el crecimiento de los lactococos ha sido reconocido ampliamente; el intervalo de pH para el crecimiento óptimo de estas bacterias se encuentra entre 6.3 y 6.9. Durante el crecimiento, los lactococos generalmente reducen el pH de su medio de cultivo a 4.5 debido a la acumulación de ácidos orgánicos. Se ha establecido que la bacteria sufre severos daños cuando el pHex es igual o menor a 5. De esta forma, la industria láctea se ha preocupado en establecer diversos métodos para regular el pH del medio durante el crecimiento celular, los cuales incluyen el uso de buffers y/o neutralizadores como parte del medio de cultivo (control interno) o la inyección de bases (control externo).

2.5.1. Estrés ácido.

En años recientes se ha encontrado un fenómeno de tolerancia ácida inducida en el cual la bacteria adquiere la habilidad de sobrevivir a concentraciones letales de ácido siempre y cuando haya sido expuesta previamente a condiciones ácidas ligeras o subletales (Hartke y col., 1996 y O'Sullivan & Condon, 1997). Este mecanismo inducible es referido como respuesta de tolerancia ácida (RTA) y ha sido encontrado en gran variedad de bacterias. Además de la RTA, se ha reportado en *L. lactis* una respuesta al shock por calor y otra por estrés oxidativo inducido por exposición en peróxido de hidrógeno. Se ha encontrado también que las células que desarrollan una RTA adquieren resistencia a otro tipo de estreses como el calor, el NaCl, el H₂O₂ y el etanol, que en circunstancias normales serían letales. Esto indica que existe un traslape entre los mecanismos de protección inducidos por el ácido.

O'Sullivan y Condon (1997) han encontrado que el pH_{in} juega un papel importante en la inducción de esta respuesta a la resistencia multiestrés. La mayor sobrevivencia a pH's extremos de células que han sido inducidas de esta manera se logró cuando el pH_{in} durante el tratamiento era de 5.9 y el pH_{ex} de 5, que son los valores de pH más bajos en los que se presenta crecimiento. De alguna forma esto permitía que las células tratadas posteriormente mantuvieran un mayor pH_{in} durante condiciones ácidas letales. Sin embargo, este no es el único motivo por el que se presenta la RTA ya que células que fueron inducidas por ácido sobreviven la exposición a pH's extremos mientras que células que no fueron inducidas pero que tenían el mismo valor de pH_{in} que las inducidas no sobrevivieron. Posteriormente se encontró que la protección multiestrés no era adquirida si la síntesis de proteínas era inhibida durante la adaptación. Hartke y col. (1996) habían encontrado que la síntesis de 519 proteínas, particularmente en el rango de 35 a 90 kDa, mostraba una reducción considerable o incluso una inhibición completa durante la adaptación ácida. Por otro lado, al menos 33 proteínas incrementaron notablemente su cantidad en comparación con células no adaptadas. Se presentó también un traslape de polipéptidos inducidos por tratamiento ácido con proteínas inducidas por calor en *L. Lactis*. Hartke y col.

(1996) inicialmente habían encontrado que la síntesis de proteínas "de novo" no eran indispensables para sobrevivir una fuerte acidificación externa, lo cual contrasta con lo reportado por O'Sullivan y Condon un año después. Esto es aún tema de controversia; lo que es indudable es que las células deben ser presensibilizadas por ácido para activar de alguna forma su sistema de homeostasis de pH y poder sobrevivir en condiciones de acidez extrema.

Kim y col. (1999) compararon a *L. lactis* ssp. *lactis* con *L. lactis* ssp. *cremoris* respecto a su respuesta a estrés por ácido, sales biliares y temperaturas de congelación, encontrando que la ssp. *lactis* es capaz de sobrevivir y replicarse en niveles de estrés más extremos que la ssp. *cremoris*. Además, *L. lactis* ssp. *lactis* es capaz de desplegar una respuesta de adaptación a condiciones letales mientras que *L. lactis* ssp. *cremoris* carece de esta habilidad. Nuevamente la capacidad de adaptación se presenta cuando las células son expuestas a condiciones de estrés ligero. Además, estos investigadores han encontrado que ambas subespecies despliegan una gran resistencia contra las tres condiciones estudiadas cuando las células provienen de la fase estacionaria. Por lo tanto, es posible que se active una respuesta general al estrés en el momento en el que las bacterias entran en la fase estacionaria; se piensa que esta respuesta esté asociada al factor alternativo sigma o RpoS, sin embargo, esto es tan sólo una hipótesis y se requiere mayor investigación al respecto.

Recientemente se han tratado de identificar los factores involucrados en los sistemas que regulan la resistencia al estrés en los lactococcos. Rallu y col. (2000) seleccionaron mutantes ácido resistentes de *L. lactis* y alteraron 18 diferentes regiones o loci en 21 mutantes. Lo anterior permitió identificar genes implicados en sistemas de transporte y en metabolismo basal que tienen alguna relación con la respuesta al estrés. Sus resultados muestran que los "pools" de fosfato y de nucleótidos de guanina intracelulares actúan como señales que determinan el nivel de respuesta al estrés que ha sido inducido. Actualmente se realizan diversas investigaciones para dilucidar estos mecanismos de regulación.

2.5.2. Control del pH interno (pH_{in}).

Como se ha visto, los productos finales del metabolismo de azúcares en los CI tienden a acidificar el citoplasma celular, lo cual es nocivo para la bacteria. Para contrarrestar en cierta medida este efecto, los microorganismos controlan su pH intracelular. Un gradiente de pH (pH intracelular menos pH externo) de 0.9 a 1.4 unidades es alcanzado por varias bacterias lácticas durante su fase exponencial de crecimiento en varios medios de cultivo. En la fase estacionaria tardía el gradiente de pH se reduce a 0.5 unidades o menos; por otro lado, decrementos notables del gradiente de pH ocurren cuando el pH_{in} es de 5.5 a 6 (Nannen & Hutkins, 1991).

Se han propuesto varios mecanismos para el control del pH_{in}:

- la existencia de buffers en el citoplasma,
- sistemas symport de protones,
- producción de ácido o bases, y
- bombas de protones.

2.5.2.1. Buffers del citoplasma.

Se sabe que el citoplasma de muchos microorganismos tiene una capacidad reguladora relativamente alta. Sin embargo, esta capacidad buffer intracelular es una respuesta muy limitada utilizada por las bacterias para contrarrestar las variaciones en el pH_{in}, por lo que se sugiere que existen otros mecanismos empleados por las células para tal efecto.

2.5.2.2. Sistemas symport de protones.

En este mecanismo se excreta el lactato acompañado de protones. La membrana celular es impermeable al lactato y su expulsión requiere de una proteína transportadora. Cuando la concentración externa de lactato es baja (aprox. 10mM), la alta concentración intracelular de lactato formada a partir de la fermentación de azúcares es una fuente potencial de energía. En algunos lactococcus, el lactato y los protones son transportados hacia el exterior por medio de un acarreador transmembranal symport.

Este mecanismo ayuda a preservar la homeóstasis de pH, y dado que la estequiometría del symport H^+ /lactato es mayor a uno, el proceso es electrogénico y de esta forma el flujo de H^+ y lactato genera un Δp . La magnitud de esta fuente de energía decrece a medida que la concentración externa de lactato aumenta.

Por otra parte, Magni y col. (1999) han encontrado que el metabolismo de citrato proporciona cierta resistencia contra la toxicidad del lactato a pH's bajos. Estos investigadores han sugerido que el papel fisiológico de la citrato permeasa (CitP) consiste en introducir citrato a la membrana y de manera simultánea excretar el lactato producido en la glicólisis. Este intercambio electrogénico entre el citrato divalente y el lactato monovalente genera un potencial de membrana que es negativo en el interior de la célula. Además, en la descarboxilación del oxalacetato (ver figura 2) se consume un protón, lo cual alcaliniza el citoplasma y a su vez genera un gradiente de pH a través de la membrana. De hecho, García-Quintáns y col. (1998) han establecido que el transporte de citrato en *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* es inducido por el estrés ácido, tanto al nivel de transcripción del gen *CitP* como a nivel de síntesis de la proteína CitP; de esta forma, a pH's bajos, la presencia de citrato y glucosa (o lactosa) resulta en una estimulación del crecimiento en aquellas cepas Cit +.

2.5.2.3. Producción de ácidos y bases.

La generación de productos metabólicos ácidos o alcalinos puede colaborar en la regulación del pH en el medio en que crecen las BL. La síntesis de descarboxilasas y desaminasas son un ejemplo de sustancias que pueden estar involucradas en la regulación del pH. En el caso de los *L. lactis* ssp. *lactis* el amoníaco liberado de la arginina a través del sistema arginina desaminasa protege a la bacteria contra el daño que ocasiona el ácido.

Por otro lado, Small & Waterman (1998) proponen la acción de descarboxilasas para ayudar a mantener la neutralidad del citoplasma cuando el pH externo se incrementa. De acuerdo con este modelo, los aminoácidos entran al citoplasma por medio de su transportador específico; ahí son descarboxilados, se consume un protón y el producto es expulsado de la célula vía un antiporter. Los

sistemas de este tipo que han sido encontrados son los de la descarboxilasa de lisina-antiporter de cadaverina, descarboxilasa de arginina-antiporter de agmatina y descarboxilasa de glutamato-antiporter de γ -aminobutirato.

2.5.2.4. ATPasa que transporta protones.

Los tres anteriores mecanismos contribuyen en cierto grado al control del pHin, sin embargo, el sistema de regulación de pH más importante en las bacterias fermentativas es la ATPasa transmembranal que transfiere protones (H^+ -ATPasa). La expulsión de protones de un ambiente relativamente alcalino (citoplasma) hacia un ambiente ácido (medio de cultivo) implica el flujo de partículas en contra de un gradiente de concentración. El mecanismo anterior requiere de energía, la cual es proporcionada al hidrolizar ATP. Aunque el gradiente electroquímico resultante puede ser usado para dirigir la toma de solutos, la principal función de la H^+ -ATPasa en las BL es el mantenimiento de un Δ pH favorable.

En algunos microorganismos que cuentan con respiración aerobia, esta enzima opera en dirección opuesta para generar ATP. La síntesis de ATP en las BL también puede ocurrir, pero bajo condiciones fisiológicas, la H^+ -ATPasa funciona primordialmente como bomba de protones.

El complejo H^+ -ATPasa está formado por dos porciones principales: una parte hidrofílica que consiste en una proteína de membrana periférica llamada F_1 , y una parte hidrofóbica llamada F_0 que está integrada a la membrana. En *E. coli* este complejo tiene un peso molecular aproximado de 530,000 Da. La F_1 es la porción catalítica y está compuesta de 5 diferentes subunidades. La F_0 regula el transporte entre el citoplasma y el medio y está formada de tres subunidades. El paso del protón a través de F_0 es regulado por la porción F_1 (Hutkins & Nannen, 1993).

2.6. LOS PLÁSMIDOS.

La información genética de las bacterias se encuentra en un cromosoma único constituido por una doble hélice de ADN que se cierra formando un círculo y es común encontrarlo enrollado sobre sí mismo formando superhélices. Este cromosoma es indispensable para la bacteria pues en él se encuentran todos los genes requeridos para la producción de enzimas y otras proteínas necesarias para el metabolismo celular. El ADN bacteriano no se encuentra asociado a histonas como ocurre con el ADN de organismos eucariotes.

Además de un cromosoma, muchas bacterias poseen otras moléculas de ADN circular de menor tamaño llamadas plásmidos, las cuales se duplican independientemente y contienen información accesoria (Blanco, 1991).

2.6.1. Genes de interés industrial.

El interés del estudio genético de las BL tiene su origen en la observación de McKay y colaboradores de que estos microorganismos contienen elementos extracromosomales (Cords y col., 1974). Posteriormente se demostró que muchas cualidades de interés industrial, tales como el metabolismo de lactosa (Crown y col., 1983; Maeda & Gasson, 1986), la producción de proteinasas (De Vos y col., 1989), el transporte de citrato, los mecanismos de resistencia a fagos y la producción de bacteriocinas, se encontraban codificadas en plásmidos. Lo anterior abría la posibilidad de mejorar genéticamente los cultivos existentes (Kondo, 1989; Steele & McKay, 1989 y García & Farrés, 1993).

2.6.2. Estudio de los plásmidos.

Los estudios iniciales empleaban gradientes de cloruro de cesio-bromuro de etidio para separar los plásmidos del cromosoma y se utilizaba el microscopio electrónico para poder detectar los plásmidos individuales (Cords y col., 1974; Currier & Nester, 1976 y Efstathiou & McKay, 1976). Estos procedimientos técnicamente complicados fueron sustituidos posteriormente por técnicas más simples.

En este sentido, los métodos que han sido desarrollados se dividen en tres categorías:

- Métodos que se basan en la interacción específica entre los plásmidos y un soporte sólido. Ejemplos son la adsorción a microfiltros de nitrocelulosa (Currier & Nester, 1976) y columnas de hidroxapatita.
- Métodos que originan la precipitación selectiva del ADN cromosomal por diversos agentes. Estos métodos explotan la resistencia relativa del ADN circular (covalentemente cerrado) a pH y temperatura extremos, así como de otros agentes desnaturizantes.
- Métodos basados en diferencias de comportamiento de sedimentación entre los dos tipos de ADN. Este es útil si se requiere obtener ADN de plásmidos altamente puro (Boyer, 1993).

Algunas de estas técnicas permiten obtener el producto más puro que otras pero todos persiguen un mismo objetivo: la separación de los plásmidos del ADN cromosomal. Para tal efecto se aprovecha que el ADN plasmídico es una molécula mucho más pequeña que el cromosomal y por ende se extrae en forma de círculo dada la resistencia de sus enlaces covalentes.

La técnica de extracción de plásmidos efectuada en el presente trabajo se basa en la precipitación selectiva del ADN cromosomal (segundo método de la clasificación).

2.6.3. Factores experimentales importantes en el aislamiento de ADN.

El diseño y aplicación de cualquier procedimiento de extracción de ADN requiere el conocimiento de ciertos aspectos acerca de su estabilidad química y de su condición dentro del ambiente celular. Los factores experimentales que deben ser considerados son citados a continuación:

a) pH.

- Las interacciones por "puentes de hidrógeno" entre las cadenas complementarias son estables entre pH 4 y 10.
- Las uniones fosfodiéster en la cadena de ADN son estables entre pH 3 y 12.

- Las uniones N-glicosil a las bases púricas son hidrolizadas a valores de pH igual o menor a 3.

b) Temperatura:

- En los "puentes de hidrógeno" de la doble hélice existe una considerable variación respecto a la estabilidad a la temperatura, pero la mayor parte del ADN comienza a desdoblarse en el intervalo de 80-90 °C.
- Los enlaces fosfodiéster y N-glicosil son estables hasta 100 °C.

c) Fuerza iónica:

- El ADN es más estable y soluble en soluciones salinas. Concentraciones de sal menores a 0.1 M debilitan los enlaces tipo "puente de hidrógeno" entre las cadenas complementarias.

d) Condiciones celulares:

- Antes de poder liberar el ADN, se requiere lisar la pared celular. Para el caso de las bacterias suele ser efectivo el uso de tratamientos enzimáticos (lisozima).
- Muchas enzimas capaces de degradar el ADN están presentes en la célula, siendo las desoxirribonucleasas las que causan el daño más grave. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de las uniones fosfodiéster.
- Cuando se trata de aislar plásmidos, estos se separan del ADN cromosomal y de otros componentes celulares aprovechando su resistencia relativa a condiciones desnaturalizantes, las cuales se pueden dar con el uso de ciertos agentes químicos y de valores "extremos" de pH y temperatura.

e) Esfuerzo mecánico sobre el ADN.

- No siempre es posible manipular adecuadamente el ADN durante los procesos de aislamiento; acciones como el vaciar, agitar u otro procedimiento violento puede causar el desdoblamiento o ruptura de las cadenas de ADN. Usualmente esto no causa daño a la estructura secundaria del ADN pero reduce el tamaño de las moléculas.

2.7. PRESENTACIONES DE CULTIVOS INICIADORES.

2.7.1. Cultivos liofilizados.

La liofilización es un proceso en el cual el producto primero es congelado de modo que se forma una matriz cuyo disolvente es cristalizado y separado de su soluto, para ser removido posteriormente por sublimación a niveles en los cuales no se llevan a cabo reacciones químicas ni biológicas.

Este proceso mata y daña una cantidad considerable de células; por ello, es necesario que en la fábrica se hagan crecer las cepas en unos cuantos litros de leche (cultivo madre). A partir de este cultivo se inoculan volúmenes cada vez mayores de medio (cultivos intermedios) hasta inocular finalmente grandes cantidades de leche que serán empleadas como cultivos base en la manufactura de quesos.

La preparación de CI liofilizados en forma comercial abarca los siguientes pasos:

- Inoculación y crecimiento de la bacteria en condiciones apropiadas.
- Cosecha y concentración de las células por centrifugación o ultrafiltración.
- Mezcla del concentrado celular con sustancias crioprotectoras (glicerol, amitol, vitamina C, etc.)
- Congelación.
- Secado al vacío.
- Cosecha de células secas y empaquetado bajo condiciones asépticas.

Usualmente los cultivos liofilizados contienen de 10^8 a 10^9 bacterias por gramo (Yang & Sandine, 1979).

2.7.2. Cultivos liofilizados concentrados.

Este tipo de presentación surge de la necesidad de tener preparaciones de bacterias que pudieran inocularse directamente a la leche en la elaboración de quesos sin necesidad de reactivar los microorganismos para poder emplearlos. Los cultivos liofilizados concentrados son usados ampliamente en Europa pero no en Estados Unidos donde es más común el empleo de cultivos congelados concentrados; la principal razón de esto es que al emplear los cultivos liofilizados

2.7. PRESENTACIONES DE CULTIVOS INICIADORES.

2.7.1. Cultivos liofilizados.

La liofilización es un proceso en el cual el producto primero es congelado de modo que se forma una matriz cuyo disolvente es cristalizado y separado de su soluto, para ser removido posteriormente por sublimación a niveles en los cuales no se llevan a cabo reacciones químicas ni biológicas.

Este proceso mata y daña una cantidad considerable de células; por ello, es necesario que en la fábrica se hagan crecer las cepas en unos cuantos litros de leche (cultivo madre). A partir de este cultivo se inoculan volúmenes cada vez mayores de medio (cultivos intermedios) hasta inocular finalmente grandes cantidades de leche que serán empleadas como cultivos base en la manufactura de quesos.

La preparación de CI liofilizados en forma comercial abarca los siguientes pasos:

- Inoculación y crecimiento de la bacteria en condiciones apropiadas.
- Cosecha y concentración de las células por centrifugación o ultrafiltración.
- Mezcla del concentrado celular con sustancias crioprotectoras (glicerol, amitol, vitamina C, etc.)
- Congelación.
- Secado al vacío.
- Cosecha de células secas y empaçado bajo condiciones asépticas.

Usualmente los cultivos liofilizados contienen de 10^8 a 10^9 bacterias por gramo (Yang & Sandine, 1979).

2.7.2. Cultivos liofilizados concentrados.

Este tipo de presentación surge de la necesidad de tener preparaciones de bacterias que pudieran inocularse directamente a la leche en la elaboración de quesos sin necesidad de reactivar los microorganismos para poder emplearlos. Los cultivos liofilizados concentrados son usados ampliamente en Europa pero no en Estados Unidos donde es más común el empleo de cultivos congelados concentrados; la principal razón de esto es que al emplear los cultivos liofilizados

concentrados en la inoculación directa se presenta un incremento en la fase lag, lo cual origina un retraso en el proceso de media hora o una hora.

Los cultivos liofilizados concentrados usualmente contienen de 10^{11} a 10^{12} bacterias por gramo y están disponibles en presentaciones para inocular de 200 a 1000 L de leche.

2.7.3. Cultivos congelados concentrados.

El proceso de preparación de este tipo de cultivos es el siguiente (Gilliland, 1977; Hup y col., 1977 y Sandine, 1996):

- Inoculación y crecimiento de la bacteria en condiciones apropiadas.
- Cosecha y concentración de las células por centrifugación.
- Adición de agentes crioprotectores: glicerol (5-15%), glutamato monosódico (5%) o sacarosa (7%).
- Congelación rápida por inmersión en nitrógeno líquido o en una mezcla hielo seco - alcohol.
- Almacenamiento a -20 o -40 °C.

Antes de utilizarse estos cultivos se descongelan en agua a $20-22$ °C por 20 minutos y se añaden a la tina donde terminan de descongelarse con ayuda de agitación en 15-30 minutos.

Los cultivos congelados concentrados suelen tener de 10^{10} a 10^{11} UFC por gramo.

2.7.4. Cultivos refrigerados.

En el pasado se creía que la refrigeración no era un método adecuado para conservar bacterias ácido lácticas. Sin embargo, Goldhaber (1982) propone almacenar los cultivos iniciadores a 4 °C en el mismo medio en el que fueron producidos y encuentra que esto no altera sustancialmente su viabilidad y su capacidad de producción de acidez en relación con los valores obtenidos en cepas congeladas y liofilizadas. Lo anterior es importante porque establece la

oportunidad de explorar una forma de almacenamiento distinta y económica a lo que usualmente se emplea.

2.8. UTILIZACIÓN DE LOS CI EN LA ELABORACIÓN DE QUESO.

Los CI se requieren en la manufactura de casi todos los quesos; las bacterias *Lactococcus lactis* son de las más importantes en este sentido (ver cuadro 2).

A continuación se desglosa un procedimiento general de elaboración de queso:

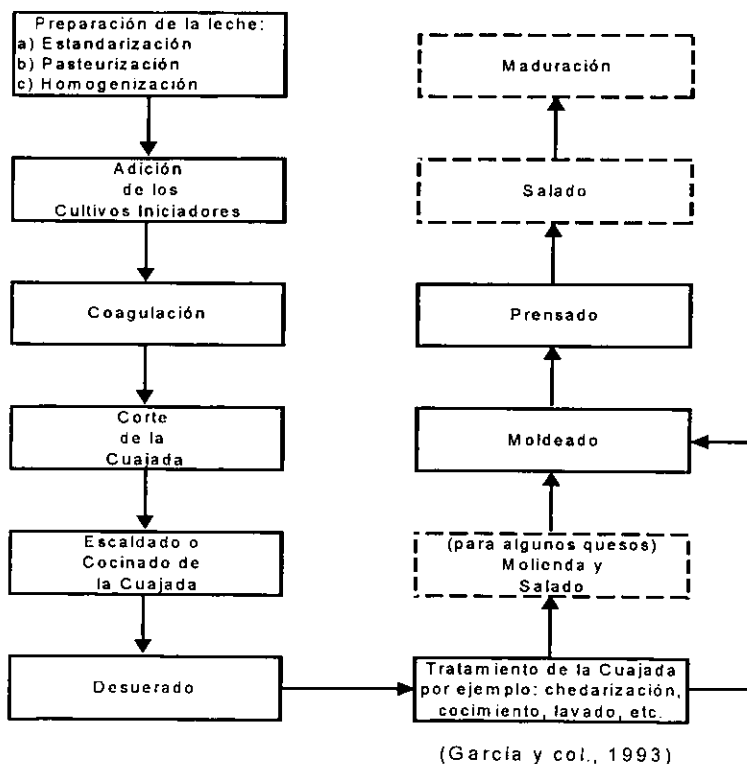


Figura 9 Diagrama general de elaboración de queso.

Las cantidades de iniciador dependen del tipo de queso y van de 0.2 a 2 % del volumen de leche empleada. Existen dos formas de obtener el inóculo del cultivo base que se agregará a la leche. El más caro, pero menos laborioso, es emplear un cultivo congelado concentrado o liofilizado concentrado que se agrega directamente a la tina para evitar la posible contaminación por fagos durante su manejo en la fábrica. El otro método comienza con una pequeña cantidad de inóculo el cual se va incrementando sucesivamente (cultivos intermedios) hasta obtener el volumen necesario de cultivo base (Sandine, 1977). Una posibilidad de preparación de inóculos seguida en una gran cantidad de plantas queseras se presenta en la siguiente figura:

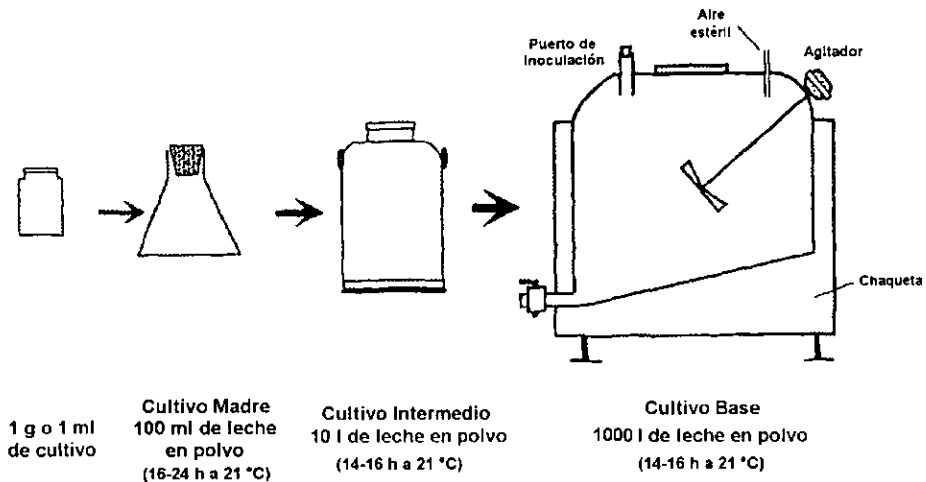


Figura 10 Preparación secuencial de inóculos en la industria láctea.

Usualmente las fábricas grandes siguen el primer método mientras que las pequeñas fábricas emplean el segundo. Además de la leche en polvo reconstituida, para propagar los iniciadores se han desarrollado medios de cultivo más económicos hechos a base de suero de leche (Richardson y col., 1977; Ausavanodom y col., 1977; Chen & Richardson, 1977 y Whitehead y col., 1993). Puede partirse de cultivos líquidos refrigerados, cultivos congelados o liofilizados.

Por otra parte, se estima que cada año en el mundo se producen $\sim 12.5 \times 10^6$ toneladas de queso, empleándose para ello $\sim 12.5 \times 10^{10}$ litros de leche. Asumiendo que todo este queso es elaborado con un inóculo de 0.5 % (v/v), se requerirían de $\sim 6.3 \times 10^8$ litros de cultivos iniciadores (Sandine, 1996).

De acuerdo con el banco de información económica del INEGI (URL 1, 2000) para el periodo 1994-1999, la producción promedio anual de queso tipo Manchego, Oaxaca y Chihuahua fue de 36,128.83 toneladas; haciendo un cálculo similar al del párrafo anterior, en la elaboración de estos quesos se emplearon por lo menos 1.8×10^6 litros de cultivos iniciadores.

Partiendo de estos datos es fácil ver que en nuestro país existe una gran demanda por los cultivos lácteos. Estos pueden obtenerse de manera artesanal al hablar de pequeña escala pero la mayor parte de las veces se importan cultivos liofilizados los cuales son distribuidos por monopolios de empresas europeas y norteamericanas. Además, un estudio de mercado de bacterias lácticas (Grupo Imagen, 1989) mostró un amplio interés por parte de las empresas encuestadas en adquirir un producto de fabricación nacional que ofreciera ventajas de precio y de facilidad de manejo, sin que la calidad de sus productos se viera alterada. Este interés fue aún mayor al plantearles la posibilidad de recibir asesoría técnica en el empleo del producto.

Una vez revisada toda la información anterior, la justificación del trabajo y el planteamiento de los objetivos se presentan a continuación:

3. JUSTIFICACIÓN.

Los cultivos iniciadores se utilizan en la elaboración de todos los productos lácteos fermentados (queso, yoghurt, mantequilla madurada, etc.) y su intervención como materia prima es determinante en la calidad del producto final.

En nuestro país existe una gran demanda por los iniciadores y estos son distribuidos exclusivamente por compañías extranjeras.

Con el afán de contribuir al desarrollo de tecnologías nacionales, en el laboratorio del Dr. Pablo Pérez Gavilán se han estudiado las bacterias lácticas de interés industrial más importantes en lo que se refiere a su producción, almacenamiento y utilización en distintos productos.

Respecto al almacenamiento, la refrigeración representa una buena alternativa ya que requiere de equipo más sencillo y económico en comparación con procesos de liofilización o congelación. Se ha encontrado que los cultivos líquidos refrigerados mantienen una viabilidad y una actividad láctica aceptable por un tiempo de 15 días. Sin embargo, pasado este tiempo las bacterias pierden casi en su totalidad la capacidad de producir ácido. En un trabajo anterior se planteó la posibilidad de que esa disminución de actividad estuviera ligada a la pérdida de plásmidos (Córdova, 1990).

Con base en todo esto, se desarrolló el presente trabajo para abundar en el conocimiento de los aspectos relacionados con la actividad, los plásmidos y el efecto del pH en cultivos líquidos refrigerados, de acuerdo con los siguientes objetivos generales y específicos:

4. OBJETIVOS

4.1. GENERALES

- Demostrar que existe una relación entre la disminución de la actividad ácido láctica y la pérdida de plásmidos de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* cuando es almacenado en refrigeración en el medio de cultivo en el que fue producido.
- Comprobar que el pH ácido que se genera gradualmente durante el almacenamiento es el principal factor involucrado en la disminución de la actividad y en la posible pérdida de plásmidos.

4.2. ESPECÍFICOS

- Obtener el perfil de plásmidos de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y compararlo con el perfil de una mutante lactosa negativa.
- Conocer las cinéticas de crecimiento, de producción de ácido láctico y el desarrollo de la actividad láctica de la cepa en estudio.
- Analizar el comportamiento en refrigeración de cultivos cosechados a las 4 horas (fase exponencial de crecimiento) y a las 8 horas de fermentación (fase estacionaria), con y sin control de pH, en relación con la viabilidad celular, la capacidad de producción de acidez, el pH y los perfiles de plásmidos.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL.

- A. Se efectuó la extracción de plásmidos de la cepa en estudio (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*).
- B. Se obtuvo una mutante lactosa negativa y también se le efectuó la extracción de plásmidos para comparar su perfil con el de la cepa original.
- C. Por otra parte, se llevó a cabo una fermentación base de 8 horas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* para conocer la cinética de crecimiento, de producción de ácido láctico y de actividad, y para que sirviera como duplicado de las fermentaciones de trabajo. Por la literatura se sabía que esta bacteria alcanza la fase estacionaria de crecimiento aproximadamente a las seis horas.
- D. Las fermentaciones de trabajo tuvieron un tiempo de cultivo de 8 y 4 horas; se eligieron estos tiempos para tener una población en fase estacionaria de crecimiento y otra en fase exponencial. De cada una de ellas se tomaron muestras cada dos horas y se efectuaron las siguientes determinaciones por duplicado: cuenta total de microorganismos viables, actividad y actividad específica; la producción de ácido láctico se calculó a partir del consumo de NaOH (lectura en probeta).
- E. Una vez cumplidos los tiempos de fermentación se cosecharon las bacterias en frío; para el almacenamiento en refrigeración se colectaron dos muestras por cada fermentación: una tuvo control de pH y la otra no.
- F. El tiempo de almacenamiento en refrigeración (4°C) fue de 29 días. En los días de almacenamiento 1, 14 y 28 para las muestras con control de pH y en los días 2, 15 y 29 para las muestras sin control de pH de las dos fermentaciones, se estudió la viabilidad de los microorganismos, el pH, la actividad, la actividad específica y el perfil de plásmidos (figura 11).

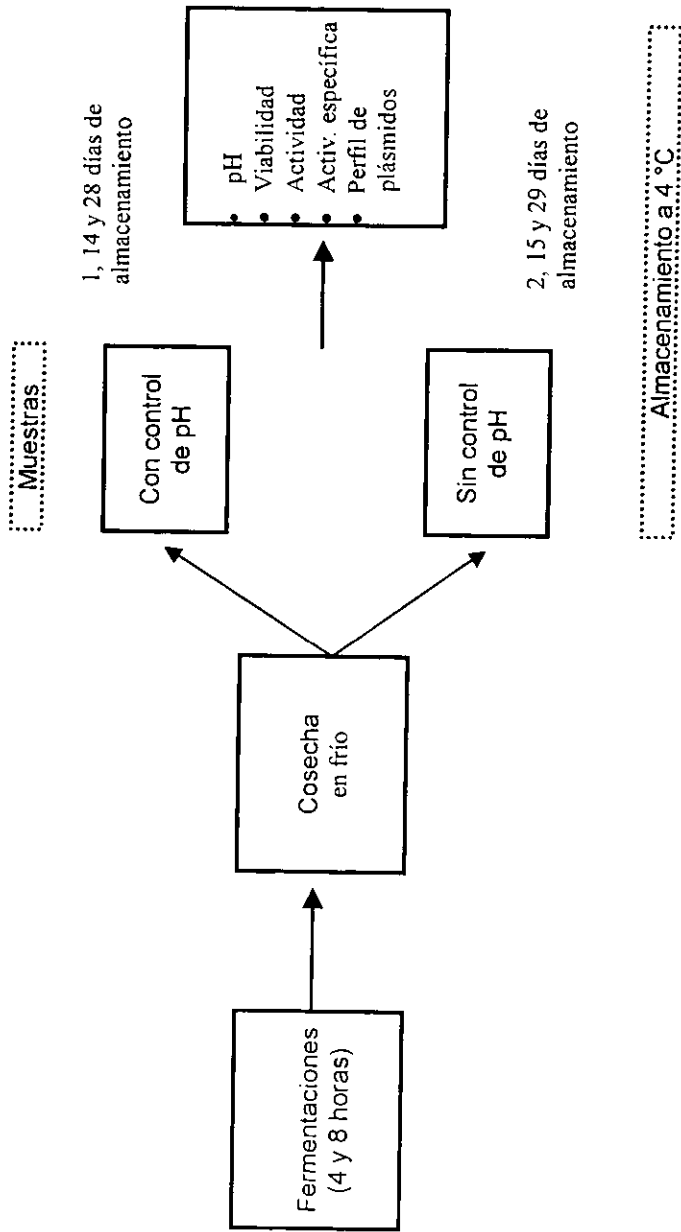


Figura 11 Producción y almacenamiento de *L. lactis* ssp. *lactis*

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. MICROORGANISMO.

La cepa empleada para este estudio es *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BM147 perteneciente a la colección del cepario del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Dicha cepa se mantuvo en leche descremada estéril al 11 % de sólidos totales, se resembró cada dos semanas y se almacenó en refrigeración (4 °C).

6.2. MEDIOS DE CULTIVO.

6.2.1. Leche descremada al 11% de sólidos totales (ST).

Se disuelve en agua destilada la leche descremada en polvo, se agita durante 15 minutos y se esteriliza en autoclave a 110 °C por 10 minutos.

6.2.2. Agar APT.

Su composición en gramos por litro es la siguiente:

Componente	g/l
Agar bacteriológico	14
Peptona de caseína	12.5
Extracto e levadura	7.5
D-(+) Glucosa	10
Cloruro de sodio	5
Tricitrato sódico	5
Fosfato de potasio dibásico	5
Tween 80	0.2
Sulfato de magnesio	0.8
Cloruro de manganeso	0.14
Sulfato ferroso	0.04

El medio debe tener un pH de 6.8 +/- 0.1 y se esteriliza en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

6.2.3. Medio líquido Elliker modificado.

Su composición en gramos por litro es la siguiente:

<u>Componente</u>	<u>g/l</u>
Triptona	5
Extracto de levadura	2.5
Gelatina	2.5
Cloruro de sodio	4
Acetato de sodio	1.5
D-(+) Glucosa	10
DL – Treonina	2.38

El medio debe tener un pH de 7.0 +/- 0.1 y se esteriliza en autoclave a 121 °C por 15 minutos (Klaenhammer y col., 1978). Cabe mencionar que la DL – Treonina actúa como inhibidor parcial de la síntesis de la pared celular y junto con la lisozima favorecen la lisis celular necesaria para la extracción de plásmidos.

6.2.4. Agar Reddy modificado.

Su composición en gramos por litro es la siguiente:

<u>Componente</u>	<u>g/l</u>
Triptona	5
Extracto de levadura	5
Fosfato de potasio dibásico	1
Carbonato de calcio	3
Carboximetil celulosa	6
Agar	15

La cantidad de agar necesaria para hacer un litro de medio se suspende en 500 ml de agua destilada y se calienta hasta disolución. En otro recipiente conteniendo 500 ml de agua destilada se suspenden 6 gramos de carboximetil celulosa y se calienta a baño maría hasta que la opacidad desaparezca.

Estas dos porciones se vacían en otro recipiente que previamente contiene la triptona, el extracto de levadura, el fosfato de potasio dibásico y el carbonato de calcio y se calientan 10 minutos.

El pH del medio después del calentamiento debe ser de 6.8 +/- 0.1. Se vacía el agar en matraces y se esteriliza a 121 °C por 15 minutos.

Antes de vaciar el medio en placa, 5 ml de leche estéril al 11 % de sólidos totales y 2 ml de una solución al 0.1 % de púrpura de bromocresol en agua destilada, se añaden por cada 100 ml de medio.

Las placas presentan un color púrpura intenso (Reddy y col., 1969 y Reddy y col., 1972).

6.2.5. Medio industrial para fermentación (MI).

Su composición en gramos por litro es la siguiente:

Componente	g/l
Leche descremada en polvo	60
Glucosa	25
Extracto de levadura	10
Caseinato de sodio	20

El medio debe tener un pH de 7.2 +/- 0.1 y se esteriliza en autoclave a 121 °C por 15 minutos (Goldhaber, 1982).

6.3. DETERMINACIONES.

6.3.1. Cuenta de microorganismos viables (CMV).

La CMV se hizo por el método de vaciado en placa en agar APT a partir de diluciones decimales en agua destilada estéril. Las cajas se incubaron a 29 °C por 48 horas y el conteo se expresó en UFC / ml (unidades formadoras de colonias por mililitro).

6.3.2. Producción de ácido láctico.

La cantidad de ácido láctico producido durante las fermentaciones se determinó a partir de la cantidad de NaOH al 20% que fue necesario añadir para mantener el pH constante (pH 6.9 o 7), considerando que para neutralizar una mol de ácido láctico (PM = 90 g/mol) se requiere de una mol de hidróxido de sodio (PM = 40 g/mol).

6.3.3. Actividad láctica (AL).

La AL expresa la capacidad que tiene una cepa de producir ácido láctico bajo las siguientes condiciones: 50 ml de leche descremada al 11% de ST pasteurizada (63 °C, 30 min.) se inoculó al 1 % con los caldos de fermentación y se incubó a 30 °C +/- 1 °C durante 6 horas. Al cabo de este tiempo se tomó una alícuota de 9 ml y se tituló con NaOH 0.1 N utilizando fenolftaleína como indicador; el gasto de NaOH 0.1 N se expresa como % de ácido láctico.

Bajo estas condiciones, el % de ácido láctico producido por el microorganismo menos la acidez inicial de la leche se denomina AL.

6.3.4. Actividad específica (AE).

La AE muestra la relación entre la cantidad de ácido láctico producido por UFC en 5 horas de incubación.

Las condiciones para llevar a cabo esta prueba son iguales a las de la A, excepto en el tiempo de incubación que en este caso es de 5 horas. Al cabo de este tiempo, además de cuantificar el % de ácido láctico formado, se determina la cantidad de microorganismos viables (UFC/ml) en la muestra. La AE se expresa

en nanomoles de ácido láctico producido por UFC en 5 horas. Debido a que el método para determinar la AE es una nueva propuesta que surge de este trabajo, fue necesario obtener un valor de referencia a partir de un cultivo ejemplar reactivado como se indica en la parte de preparación del inóculo para poder comparar los valores que se obtendrían a lo largo de la experimentación. El valor de AE de referencia fue de 1.5×10^{-5} nanomoles de ácido láctico por UFC en 5 horas de crecimiento; para efecto de la experimentación se consideraron valores de AE anormales sólo aquellos que eran 10 veces mayores o menores que la referencia.

6.3.5. Medición de pH.

La medición del pH se efectuó con un electrodo Beckman convencional adaptado a su vez a un potenciómetro Beckman 40.

6.4. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS DE *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

6.4.1. Obtención del paquete celular.

La bacteria de interés se sembró en 10 ml de medio líquido M-17 (inóculo al 1%) y se incubó a 29 °C toda la noche. Al día siguiente se resembró en 10 ml de medio Elliker modificado (inóculo al 2 %) durante 4 horas a 29 °C y de aquí se obtuvo el paquete celular.

Otra estrategia contemplaba el tomar colonias aisladas de cultivos que han sido sembrados superficialmente en medios sólidos adecuados. En este caso se tomó la colonia con un asa, se sembró en 10 ml de medio Elliker modificado y se incubó a 29 °C durante toda la noche. Esta segunda estrategia permitió prescindir de la resiembra de 4 horas y así se podía iniciar la jornada de trabajo con la extracción de plásmidos sin que hubiera diferencia sustancial en la cantidad de microorganismos al cumplirse el tiempo de incubación; además, con esto se puede analizar el material plasmídico de bacterias que provienen de una sola clon y no de una mezcla de ellas.

En cualquiera de los dos casos, los 10 ml del cultivo en Elliker modificado se transfirieron a tubos de centrifuga estériles y se centrifugaron en frío a 3000 r.p.m. por 10 minutos para obtener el paquete celular.

6.4.2. Soluciones.

- Solución I: 50 mM Tris (pH = 8) y 1 mM EDTA (pH = 8).
- Solución II: 50 mM glucosa, 25 mM Tris.Cl (pH = 8), 10 mM EDTA (pH = 8) y lisozima (10 mg/ml).
- Solución III: 0.2 N NaOH y 1% de SDS (dodecil sulfato de sodio).
- Solución IV: 5 M acetato de potasio (60 ml), ácido acético glacial (11.5 ml) y H₂O (28.5 ml).

Las soluciones I, II y III se prepararon a partir de soluciones stocks estériles y justo antes de iniciar la técnica de extracción de plásmidos.

Soluciones stocks estériles: glucosa 1 M, Tris.Cl 1 M (pH = 8), EDTA 0.5 M (pH = 8), NaOH 5 N, SDS 10 %.

El acetato de potasio 5M y el H₂O que se emplean para preparar la solución IV también son estériles.

El fenol se prepara según Sambrock y col. (1989).

6.4.3. Técnica de extracción de plásmidos.

La técnica empleada en este trabajo fue la siguiente:

- Se suspendió y se lavó el paquete celular en 3 ml de solución I fría. Se centrifugó en frío a 3000 r.p.m. por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- Se vuelve a suspender y a lavar el paquete celular en 1 ml de solución I fría y se transfiere a un tubo eppendorf nuevo y estéril. Se centrifugó en frío a 5 000 r.p.m. por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- Se re-suspendió perfectamente el paquete celular en 100 μ l de solución II. Se incubó a 37 °C por 5 minutos.

- Se adicionaron 200 μl de solución III recién preparada y se mezcló perfectamente el contenido invirtiendo 5 veces el tubo. Se dejó en hielo durante 5 minutos.
- Se adicionaron 150 μl de solución IV fría. Se mezcló el contenido invirtiendo suavemente el tubo hasta lograr la completa dispersión de la solución en todo el lisado viscoso (10 segundos aproximadamente). Se dejó en hielo durante 3 minutos.
- Se centrifugó a 12 000 r.p.m. por 6 minutos a 4 °C.
- Se transfirió el sobrenadante a otro tubo eppendorf nuevo y estéril.
- Se agregaron 2 μl de solución de RNA asa (10 mg / ml) y se incubó a 37 °C por 5 minutos.
- Se adicionó un volumen de fenol preparado (aproximadamente 500 μl). Se mezcló cuidadosamente mediante 8 inversiones.
- Se adicionaron 150 μl de una mezcla cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) y se mezcló cuidadosamente mediante 6 inversiones.
- Se centrifugó a 10 000 r.p.m. por 8 minutos a temperatura ambiente.
- Se removió la fase superior acuosa translúcida (aproximadamente 500 μl) a otro tubo eppendorf nuevo estéril. Se tuvo especial cuidado en excluir los residuos blanquecinos de la interfase.
- Se adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol frío y se mezcló por inversión. El tubo se mantuvo a temperatura ambiente por 45 minutos o 1 hora.
- Se centrifugó a 12 000 r.p.m. por 10 minutos a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante aspirando con la micropipeta.
- Se dejó el tubo 5 min. en una posición invertida sobre una toalla de papel para permitir la salida de todo el fluido posible. Se removió con la misma punta de la micropipeta toda gota adherida a las paredes del tubo.
- Se enjuagó el pellet de ADN con 50 μl de etanol al 70 % frío. Se centrifugó nuevamente a 12 000 r.p.m. por 5 minutos a 4 °C y se removió el sobrenadante aspirando con la micropipeta como ya se ha indicado.
- Se secó el pellet de ADN a T ambiente o a 37 °C por 5 minutos.

- Se re-disolvió el ADN en 10 μ l de agua estéril y se guardó el tubo en el congelador (-20°C) durante toda la noche. Al día siguiente se corrió la electroforesis.

Esta metodología de extracción de plásmidos se basó fundamentalmente en la técnica propuesta por Sambrook, et al (1989), complementada en algunos aspectos por lo descrito por Currier & Nester (1976), Klaenhammer y col. (1978), LeBlanc & Lee (1979), Anderson & MacKay (1983), Orberg & Sandine (1984) y Frère (1994).

A continuación se explican algunos de los puntos que se consideran importantes para que la técnica de extracción de plásmidos sea satisfactoria (Boyer, 1993):

- El lavado de las células permite eliminar trazas del medio de cultivo que posteriormente pueden interferir con alguna de las fases de la extracción.
- Inicialmente, las células necesitan ser tratadas con lizozima para llevar a cabo la hidrólisis de los enlaces glucosídicos de los peptidoglucanos de la pared celular, y crear así protoplastos (células sin pared pero con membrana).
- Estos protoplastos posteriormente se rompen al adicionar el dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1% y el NaOH 0.2 N, liberándose el ADN y demás componentes celulares.
- Al ser un detergente aniónico, el SDS se une a las proteínas positivamente cargadas para evitar que interactúen con el ADN; de manera secundaria también actúa como agente desnaturizante de desoxirribonucleasas y demás proteínas.
- Debido a su carácter iónico, el ADN liberado es más estable al estar disuelto en el medio; esto se logra empleando a lo largo de toda la técnica soluciones salinas amortiguadas de Tris.Cl pH = 8 y EDTA.
- Por otro lado, el EDTA cumple con la función de unirse a los iones metálicos divalentes (Cd^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) y con ello evita la formación de sales con los

grupos fosfato del ADN e inhibe la acción de las desoxirribonucleasas que requieren de estos cationes para poder actuar.

- El ligero medio alcalino (pH 8) tiene como propósito reducir la interacción electrostática entre el ADN y las estructuras moleculares de carácter catiónico (proteínas principalmente). Bajo esas condiciones también se tiende a disminuir la actividad de las nucleasas y se desnaturaliza a otras proteínas.
- Para aislar los plásmidos del ADN cromosomal se aprovecha su resistencia relativa a condiciones extremas de pH y al efecto de otros agentes desnaturalizantes. Por esto se genera un ambiente ácido añadiendo una mezcla de acetato de potasio y ácido acético glacial para propiciar la precipitación selectiva tanto de ADN cromosomal como de proteínas.
- La muestra de plásmidos debe estar completamente desproteínizada; para lograr esto, se suelen efectuar los siguientes tres pasos:
 - a) Se trata la muestra con una preparación de fenol saturada con una solución de NaCl al 3%. El fenol provoca una desnaturalización superficial de las proteínas mientras que la sal se añade para disminuir las interacciones iónicas entre el ADN y los cationes presentes en el medio.
 - b) Posteriormente se extrae la muestra con una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico. El cloroformo cumple una función similar a la del fenol mientras que el alcohol isoamílico reduce la formación de espuma y estabiliza la interfase donde es colectada la proteína.
 - c) Finalmente se centrifuga dicha mezcla, obteniéndose tres distintas fases: una superior de carácter acuoso, una inferior de tipo orgánica y una banda compacta de proteína desnaturalizada en la interfase. Se separa la fase acuosa superior pues es la que contiene los plásmidos.Estos 3 pasos pueden hacerse cuantas veces sea necesario hasta eliminar por completo todas las proteínas. En nuestra técnica fue suficiente el efectuar una sola desproteínización.
- Debido a su naturaleza iónica, los plásmidos precipitan por adición de etanol ya que se vuelven insolubles a medida que el medio acuoso se hace menos polar.

- Normalmente el ARN no precipita como el ADN pero puede estar como contaminante menor. Durante el procedimiento de extracción se suele emplear una ribonucleasa para degradar al ARN, la cual es añadida generalmente antes de la desproteinización. Alternativamente, el ADN puede ser precipitado con isopropanol el cual deja el ARN en solución

6.4.4. Electroforesis en gel de agarosa.

La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa (Aldrich y col., 1976) al 0.8% en buffer TAE (20 mM Tris, 10 mM ácido acético y 2 mM Na₂EDTA, pH = 8), a 80 V y durante 2.1 horas. El volumen de muestra de ADN plasmídico en cada pozo del gel fue de 10 µl.

Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 15 minutos, se destiñeron en agua destilada toda una noche a 4 °C y se fotografiaron con una película polaroid instantánea colocando los geles en un transiluminador de luz ultravioleta.

El peso molecular de los plásmidos fue estimado a partir de una gráfica semi logarítmica de peso molecular contra movilidad relativa (rf), empleando los marcadores de peso molecular comerciales fago lambda digerido con Hind III o digerido con Hind III y Eco R1.

6.5 CEPAS DE *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LACTOSA NEGATIVAS.

6.5.1. Obtención.

A partir de un cultivo viejo refrigerado de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* en leche descremada al 11% de ST, se tomó una alícuota y se hicieron diluciones decimales en agua destilada estéril, se sembró superficialmente en placas de agar Reddy modificado y se incubó en anaerobiosis a 29 °C por 48 horas.

En este medio las cepas lactosa positivas (lac +) son de color amarillo y se encuentran rodeadas por un halo también de color amarillo mientras que las cepas lactosa negativas (lac -) son más pequeñas que las lac +, son de color blanco y no presentan halo alguno (Reddy et al, 1969).

Las cepas lac – y lac + se sembraron en medio líquido Elliker modificado y se incubaron a 32 °C toda la noche (de 10 a 12 horas).

6.5.2. Perfil de plásmidos.

Una vez que las células crecieron en el medio Elliker modificado se sometieron a la técnica de extracción de plásmidos.

6.6 FERMENTACIONES.

6.6.1. Preparación del inóculo.

Los microorganismos se reactivaron de acuerdo a la metodología seguida por Córdova (1990) y Hernández (1992) (Cuadro 3).

Medio de cultivo	Leche descremada al 11% de ST.
Volumen inoculado	1 % (v/v)
Temperatura de incubación	29 °C
Siembra inicial (a partir del microorganismo refrigerado)	24 h de incubación
Resiembras sucesivas.	1ª resiembra: 18-24 h. de incubación 2ª resiembra: 18 h. de incubación 3ª resiembra: 12 h. de incubación

Cuadro 3 Metodología de obtención del inóculo.

Los inóculos de las fermentaciones se obtuvieron a partir de la tercera resiembra inoculando al 1 % (v/v) 150 ml de MI e incubando a 29 °C por 10 o 12 horas. Esos 150 ml de MI se refieren al inóculo al 5% de la fermentación de 3 litros.

Todos los cultivos se mantuvieron en refrigeración al concluir su tiempo de incubación y antes de continuar con la siguiente etapa de reactivación; estos periodos intermedios a 4 °C son apenas de unas horas y se otorgan con el objeto de adecuar el horario de trabajo.

6.6.2. Condiciones de producción.

La producción del microorganismo se llevó a cabo en una jarra de acero inoxidable de 5 litros adaptada a una consola New Brunswick Sci. Co. M-19-1400 que cuenta con agitación magnética, control de pH y control de temperatura (Stanburry & Whitaker, 1989).

Las condiciones de producción fueron las siguientes (Córdova, 1990 y Chavarri y col., 1988).

Medio de cultivo	Medio industrial (MI)
Volumen de inóculo	5 % v/v
Volumen operativo	3 L
Temperatura	29 °C
pH	6.9 – 7.0
Agente neutralizante	NaOH 20 % (5N)
Agitación	200 r.p.m.
Tiempos de fermentación	8 y 4 h

Cuadro 4 Condiciones de producción de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

Para el control automático de pH se utilizó una bomba peristáltica Masterflex modelo 7014.21, y para la medición del pH se empleó un electrodo esterilizable Ingold modelo 761-351.

6.7. COSECHA DE MICROORGANISMOS.

Al término de las dos fermentaciones (8 y 4 horas) se interrumpió el control de temperatura en la consola y se conectó al fermentador una unidad de enfriamiento Haake-KT33 que bombea agua entre 2 y 4 °C; la velocidad de agitación y el control de pH se mantuvieron constantes.

Cuando se alcanzó la temperatura de 4°C en el fermentador se colectaron un litro de caldo, que sería la muestra con control diario de pH (muestra A, MA), y 500 ml de caldo para la muestra sin control de pH (muestra B, MB); para ello se

emplearon matraces Erlenmeyer estériles y fríos (bajo hielo) de 2l y de 1l de capacidad respectivamente. Posteriormente todas las muestras se refrigeraron.

6.8. ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN.

6.8.1 Determinaciones.

Durante el almacenamiento se estudió la viabilidad de los microorganismos, el pH, la AL, la AE y el perfil de plásmidos en todas las muestras, de la misma forma en que se ha descrito en esta misma sección.

El control de pH durante el almacenamiento en las muestras de las fermentaciones de 8 y de 4 horas que así lo requerían se hizo de la siguiente manera: se tomó una alícuota de la muestra almacenada, se le midió el pH y poco a poco se le agregó una solución de NaOH al 5 % hasta tener un valor de pH de 7 +/- 0.2. De acuerdo al volumen agregado de NaOH al 5 %, se hacían los cálculos para conocer el volumen de NaOH al 20 % estéril que era necesario agregar a la muestra almacenada (aproximadamente 1 litro) para tener valores de pH cercanos a la neutralidad. Una vez agregado el volumen de NaOH al 20% podía volverse a tomar una alícuota para comprobar el valor de pH que se había alcanzado. Todo esto se efectuó una vez al día durante todo el período de almacenamiento.

6.8.2. Extracción de plásmidos.

Para la extracción de plásmidos era necesario obtener de las muestras refrigeradas colonias que fueran representativas de las poblaciones. Para ello se efectuaron diluciones decimales en agua destilada estéril y se sembraron las diluciones mayores de manera superficial en placas de APT; las cajas se incubaron a 29 °C por 48 horas en anaerobiosis.

De esta forma, las colonias para la extracción de plásmidos fueron tomadas al azar de las cajas que correspondían a la dilución mayor para obtener 10 de las colonias más abundantes y así cada una de ellas representó el 10% de la población. Posteriormente, se sembraron en 10 ml de medio líquido Elliker modificado y los tubos se incubaron a 29 °C toda la noche (10 a 12 horas).

Al día siguiente, los 10 ml del cultivo en Elliker modificado se transfirieron a tubos de centrifuga estériles y se centrifugaron en frío a 3000 r.p.m. por 10 minutos para obtener el paquete celular. Finalmente las células se sometieron a la técnica de extracción de plásmidos.

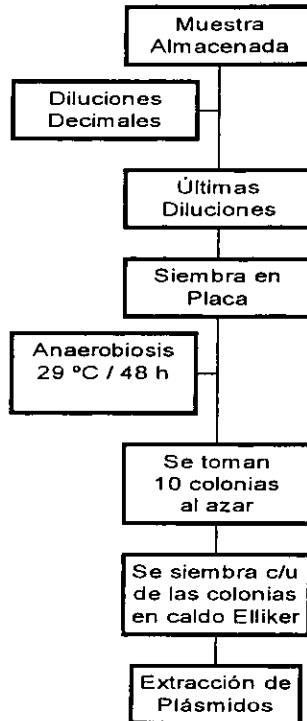
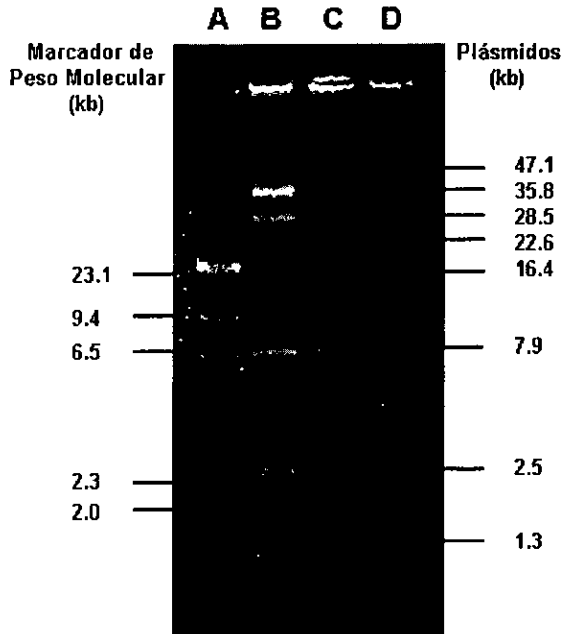


Figura 12 Obtención de colonias para la extracción de plásmidos en muestras refrigeradas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS DE *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

En la fotografía I se presenta el perfil de plásmidos de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.



- A) Marcador de peso molecular, fago λ cortado con Hind III.
- B) 10 μ l de muestra.
- C) 5 μ l de muestra.
- D) 2.5 μ l de muestra.

Foto I. Perfil de plásmidos de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

Se observan 8 bandas cuyos pesos moleculares son:

Número de plásmido	Peso molecular (pb)
1	47 122
2	35 792
3	28 461
4	22 632
5	16 420
6	7 886
7	2 507
8	1 320

Cabe señalar que en ocasiones se alcanzaba a definir una banda que se ubicaba cerca de la banda # 8 y que tenía un peso molecular de 1 150 pb. Por tal motivo, algunas veces eran perceptibles dos bandas al final de los geles o simplemente la última banda era un poco más gruesa. Dado que la definición de esa última banda era ocasional, para fines prácticos se consideraron sólo 8 bandas en vez de 9.

En distintas referencias se establece la presencia de ADN cromosomal en los perfiles de plásmidos (Leblanc & Lee, 1979; Kuhl y col., 1979; Gasson, 1983; Anderson & McKay, 1983 y Sinha, 1989) y en nuestro caso podría corresponder a la cuarta banda (22.6 kb); a este respecto sólo hacemos una suposición de acuerdo a la comparación fotográfica de nuestro perfil con el de la bibliografía porque no podemos asegurar que se trate realmente de ADN cromosomal ya que para ello se requeriría de estudios con microscopio electrónico (Cords y col., 1974 y Efstathiou & McKay, 1976) o se tendría que efectuar una extracción específica del cromosoma (Sinha 1989).

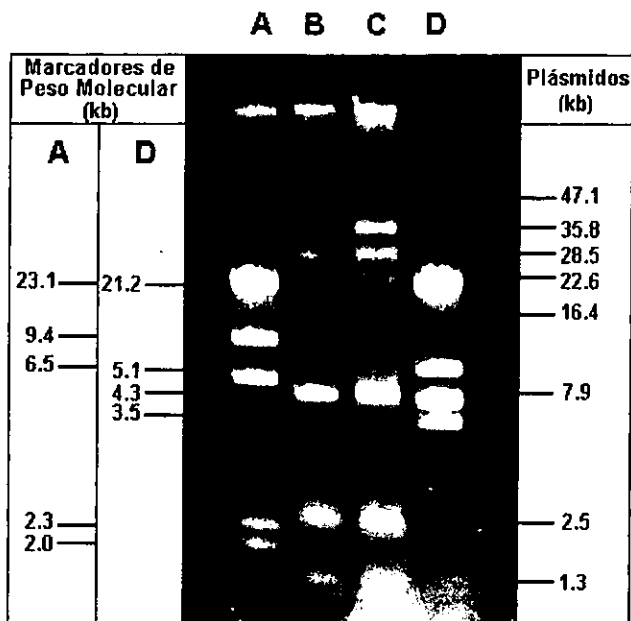
El perfil de plásmidos que se obtuvo es muy parecido a los perfiles reportados en la bibliografía, en especial a los obtenidos por Sinha (1989), Orberg & Sandine (1984) y Anderson & McKay (1983). Sinha obtuvo el perfil de la cepa *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C2 y reporta 6 bandas y una banda cromosomal; su

perfil coincide plenamente con el nuestro, no obstante, nosotros obtenemos una banda adicional que es la número 7 de 2.5 kb. Orberg & Sandine también analizan a la cepa *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C2. En este perfil sí se observa la banda de 2.5 kb que no identifica Sinha, pero no se obtiene la banda de mayor peso molecular ni la banda que corresponde al ADN cromosomal. Por último, Anderson & McKay analizaron la cepa *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ML3 y también obtienen las mismas bandas que nosotros, excepto la de 16.4 kb; además, en su perfil no se definen por completo las bandas de 35.8 y de 28.5 kb ya que aparecen juntas como una gran mancha.

La técnica que más se ha utilizado en los últimos tiempos para la extracción de plásmidos de BL es la propuesta por Anderson & McKay en 1983. Sin embargo, con esa metodología nosotros sólo lográbamos obtener los plásmidos de menor peso molecular (entre 1 y 10 kb). Luego de múltiples pruebas, la técnica que adoptamos como definitiva se basó principalmente en lo descrito por Sambrook, et al. (1989) y se complementó con algunos aspectos señalados por Currier & Nester (1976), Klaenhammer y col. (1978), LeBlanc & Lee (1979), Anderson & MacKay (1983), Orberg & Sandine (1984) y Frère (1994). Cabe señalar que una buena parte del tiempo de experimentación de este trabajo se dedicó a implementar una técnica de extracción de plásmidos que permitiera obtener perfiles consistentes y perfectamente definidos; lo anterior se cumple por completo con la técnica que se empleó.

7.2. CEPAS DE *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LACTOSA NEGATIVAS.

En la fotografía II se muestran los perfiles de plásmidos de una cepa lactosa positiva y de una cepa lactosa negativa de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.



- A) Marcador de peso molecular, fago λ cortado con Hind III.
- B) *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Lac (-).
- C) *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Lac (+).
- D) Marcador de peso molecular, fago λ cortado con Hind III y Eco R1.

Foto II. Perfil de plásmidos de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* lactosa positivo y lactosa negativo.

Claramente se observa que el perfil de plásmidos de la cepa Lac (-) carece de la segunda banda (35 792 pb). De esta forma, podríamos afirmar que en ese plásmido específicamente se encuentra localizado el operón de lactosa necesario para el transporte e hidrólisis de este disacárido por el sistema de la fosfo transferasa – fosfo enol piruvato y de la vía de la tagatosa, tal y como se ha reportado en la bibliografía para otro tipo de cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* lactosa positivas a lo largo de los últimos años (McKay y col., 1972; McKay & Baldwin, 1974; Efstathiou & McKay, 1976; Klaenhammer y col., 1978; Crow y col., 1983; Gasson, 1983 y Sinha 1989). En varias de estas referencias se ha establecido además que el plásmido en cuestión suele ser de los de mayor peso molecular del perfil, y va de las 28 a las 60 kb, lo cual también coincide con nuestros resultados. La similitud más clara se presenta con los perfiles de Sinha (1989) de cepas *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C2 Lac (+) y Lac (-); la segunda cepa carece del plásmido número 2 de aproximadamente 28 kb.

Para obtener las cepas lactosa negativas se empleó el medio sólido Reddy modificado el cual originalmente es utilizado para diferenciar entre cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y ssp. *cremoris*. Para tal objetivo se aprovecha la propiedad que tiene la ssp. *lactis* de liberar amoníaco al utilizar la arginina; de esta forma, en este medio las colonias de la ssp. *cremoris* son de color amarillo, se encuentran rodeadas de un halo amarillo y son un poco mas pequeñas que las colonias de la ssp. *lactis*, las cuales son blancas y carecen de halo. Ambas cepas producen ácido láctico a partir de lactosa, sin embargo, dicho ácido es neutralizado en el caso de la ssp. *lactis* al liberarse el amoníaco proveniente de la arginina (Reddy y col., 1969 y Reddy y col., 1972). Lo anterior se aprovechó para diseñar un medio que permitiera diferenciar entre cepas de la ssp. *lactis* Lac (+) y Lac (-): al omitir la arginina en la formulación, las colonias de las cepas Lac (+) son de color amarillo, están rodeadas por un halo amarillo y son más grandes que las colonias Lac (-), las cuales además son de color blanco y carecen de halo. Existen otros medios para diferenciar cepas de BL productoras y no productoras de ácido (Huggins & Sandine, 1984 y McKay y col., 1972).

Como parte inicial de la técnica de extracción de plásmidos, las colonias Lac (+) y Lac (-) se sembraron en medio líquido Elliker modificado y se incubaron a 32 °C toda la noche. Cabe señalar que bajo estas condiciones el crecimiento de las cepas Lac (-) es mucho menor que el de las Lac (+); por tal motivo, para tener la cantidad suficiente de bacterias que permitiera detectar el ADN plasmídico fue necesario juntar el paquete celular de varios cultivos Lac (-).

Ciertamente las cepas Lac (-) en los *Lactococcus* aparecen espontáneamente pero en un porcentaje muy bajo (1 a 3 %, Citti y col., 1965 y Efstathiou & McKay, 1976), y al encontrarse en un medio cuya principal fuente de carbono es la lactosa, tienden a desaparecer rápidamente.

Como es sabido en la industria láctea, los CI deficientes son aquellos que no coagulan la leche después de 16 horas de incubación a 21°C o después de 6 horas a 29 °C, empleándose un inóculo al 1%. Esta deficiencia no solamente se debe a la pérdida de la capacidad para metabolizar la lactosa sino que también interviene el sistema de proteinasas (Prt) que dota a las células de los péptidos y aminoácidos necesarios para su crecimiento. De esta forma, podemos tener cepas lentas que sean Lac (+) / Prt (-), Lac (-) / Prt (+) o Lac (-) / Prt (-) (Huggins & Sandine, 1984 y Yu y col., 1996). Como ya se ha mencionado, este sistema de proteinasas también se encuentra codificado en plásmidos. Algunos investigadores han encontrado una pérdida simultánea de la capacidad de metabolizar lactosa y de producir proteinasas (McKay & Baldwin, 1974) e incluso otros lo asocian a un mismo plásmido de alto peso molecular entre 50 y 60 kb (Kuhl y col., 1979 y Gasson, 1983). Sin embargo, existe también evidencia de que el sistema de proteinasas se encuentra codificado en dos plásmidos de menor tamaño de aproximadamente 10 y 28 kb (Efstathiou & McKay, 1976 y Klaenhammer y col., 1978).

En nuestro trabajo no se determinó la actividad de proteinasa y sólo se evaluó la calidad de la cepa en relación a su capacidad de producir ácido. De cualquier forma, las cepas lentas carecían siempre del segundo plásmido de 35.8 kb. Hasta el momento hemos identificado a esas cepas como lac (-) pero cabe la posibilidad de que su deficiencia se deba a la carencia del sistema de proteinasa o

a un efecto combinado; trabajos posteriores deberán indagar al respecto. Por el momento, para cualquiera de los casos, se ha demostrado la pérdida de un plásmido específico en aquellas cepas deficientes para coagular la leche.

7.3. FERMENTACIONES.

En las figuras I y II se presentan las cinéticas de crecimiento, de producción de ácido láctico y el desarrollo de la A en ambas fermentaciones.

Bajo las condiciones de fermentación seguidas en la experimentación, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* alcanza la fase estacionaria de crecimiento pasadas las 6 horas. Como ya se mencionó, para este estudio era de interés el llevar a cabo una fermentación de 8 horas (F8) para tener una población microbiana en plena fase estacionaria de crecimiento y una fermentación de 4 horas (F4) para tener una población en fase exponencial, de tal forma que se pudieran contrastar los resultados obtenidos en ambas situaciones.

Al término de la F8 se alcanzó una población de 1.78×10^{10} UFC/ml, se produjeron 37.7 gramos de ácido láctico por litro de medio y se tuvo una actividad máxima de 0.48. En la fig. IA puede apreciarse que la población se encuentra en fase estacionaria de crecimiento, mientras que la curva de producción de ácido láctico está en fase exponencial; en estudios previos (Córdova, 1990 y Hernández, 1992) se encontró que la producción de ácido láctico se estabiliza después de las 12 horas.

En la fig. IB se aprecia un incremento en los valores de A paralelo al crecimiento celular, estabilizándose de igual forma después de las 6 horas; sin embargo, el mayor incremento se tuvo en las primeras dos horas.

Al final de la F4 se tuvo una población de 5.26×10^9 UFC/ml, se produjeron 8 gramos de ácido láctico por litro de medio y se alcanzó la actividad de 0.44 (Fig. II); estos valores son muy parecidos a los obtenidos para el mismo tiempo en la F8.

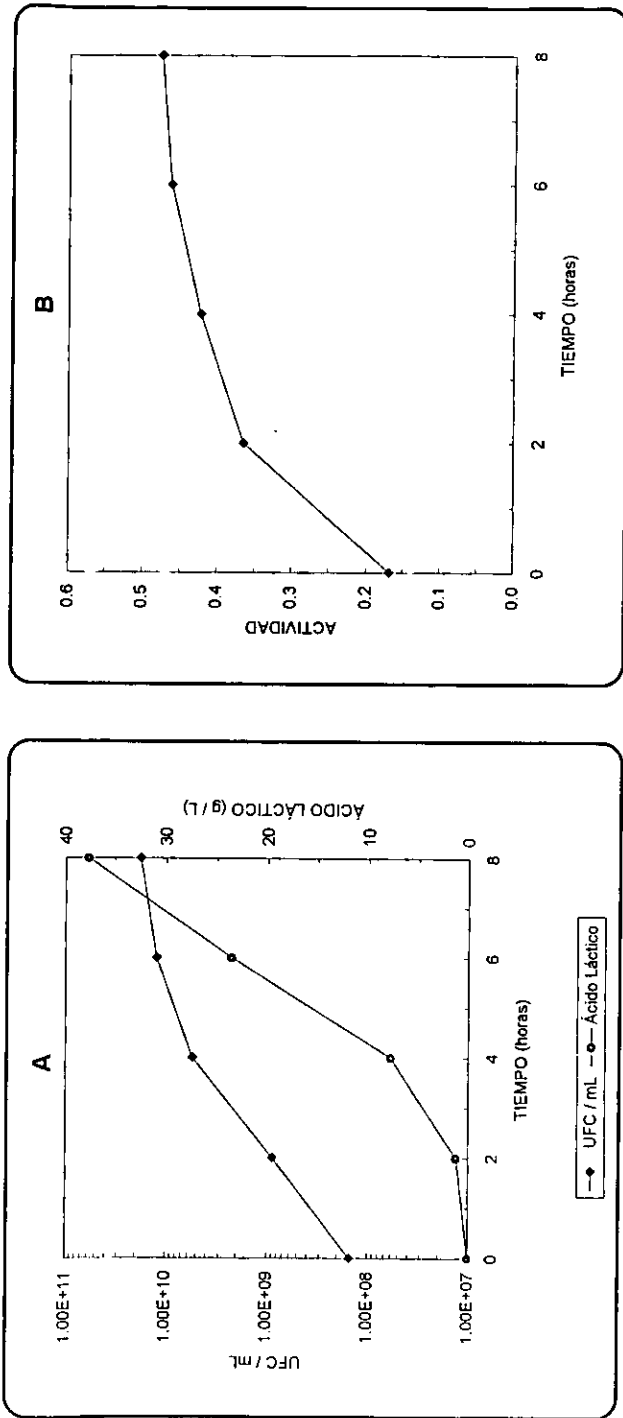


FIGURA I Fermentación de 8 horas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.
 A. Cuenta de microorganismos viables y producción de ácido láctico. B. Actividad.

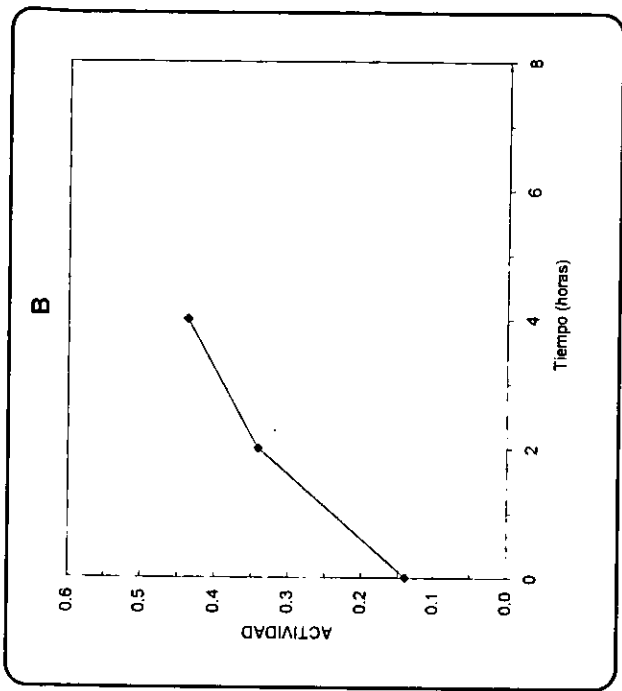
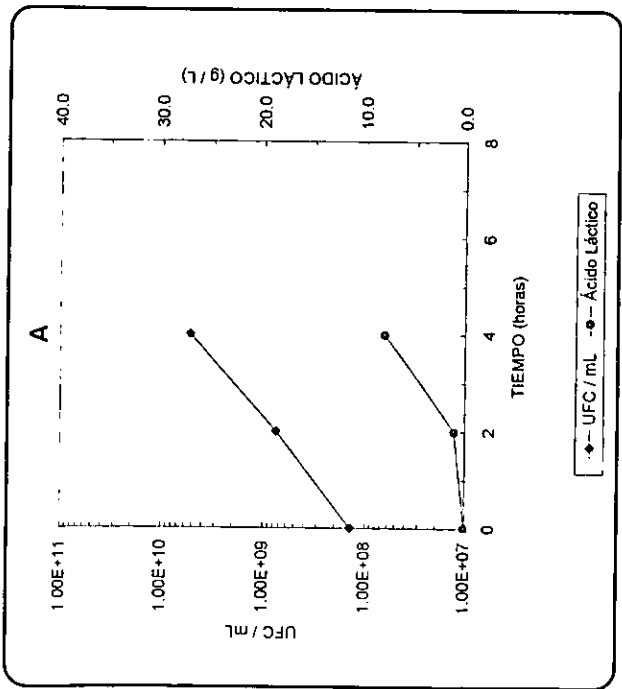


FIGURA II Fermentación de 4 horas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.
 A. Cuenta de microorganismos viables y producción de ácido láctico. B. Actividad.

Los resultados de la CMV, de la producción de ácido láctico y de la A en ambas fermentaciones coinciden plenamente con los obtenidos en la fermentación base de 8 horas que sirvió como duplicado. A su vez, todos estos valores fueron consistentes con lo reportado en la bibliografía (Córdova, 1990; Hernández, 1992; Chavarri y col., 1988 y Alami y col., 1992).

La AE cuantifica el ácido láctico producido por los microorganismos independientemente de la cantidad o de la fase estacionaria de crecimiento en que se encuentren. Los valores de AE obtenidos en las dos fermentaciones de trabajo a diferentes horas están cercanos al valor de referencia (1.5×10^{-5} nmol ácido láctico/UFC en 5 h), por lo tanto, se consideraron valores normales. La AE es útil al equiparar la capacidad de producción de ácido de muestras que contengan distinta cantidad de bacterias, como ocurre en el transcurso de las fermentaciones y con las muestras almacenadas con y sin control de pH de este trabajo.

El tiempo de duplicación promedio fue de 60 min. +/- 0.1. Este valor coincide con lo descrito por Sandine (1996) para varias BL mesófilas.

Respecto a las condiciones de producción, además de tener un medio y una temperatura adecuados, es importante tener un volumen de inóculo que permita reducir un poco la fase de acondicionamiento del microorganismo: en nuestro caso se empleó un volumen de inóculo de 5 %. Por otro lado, el control de pH favorece una mayor producción de biomasa ya que evita el daño celular ocasionado por el ácido láctico (Bibal y col., 1988 y Bibal y col., 1989).

Para preparar los inóculos se requiere de una serie de resiembras para incrementar el número de microorganismos y además reactivar su metabolismo pues se parte de cepas refrigeradas (como en nuestro caso) o de microorganismos congelados o liofilizados. Se ha determinado en este laboratorio que la bacteria alcanza la plenitud de facultades a la tercera resiembra; un número mayor de resiembras pudiera ocasionar el curado o pérdida de plásmidos espontáneo (McKay y col., 1972; Efstathiou & McKay, 1976 y Huggins & Sandine, 1984).

7.4. COSECHA DE MICROORGANISMOS.

Durante el enfriamiento previo a la cosecha de microorganismos se consumieron de 4 a 8 mL adicionales de NaOH al 20 % en un tiempo de una hora. Realmente el sistema pasa de 29 a 4 °C en 10 o 15 minutos pero se mantuvo el enfriamiento una hora por cuestiones operativas antes de ser cosechadas las distintas muestras.

En diferentes trabajos (Goldhaber 1982, Fuentes 1987, Córdova 1990, Hernandez 1991) la cosecha de microorganismos una vez concluido el tiempo de fermentación se efectuaba en matraces estériles sumergidos en hielo picado y refrigerados inmediatamente; este sistema no es adecuado porque en el lapso de enfriamiento las bacterias continúan produciendo ácido láctico, el cual causa una disminución considerable del pH. En nuestro caso, ese ácido es neutralizado y de esta manera se reduce el daño a las células.

7.5. ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN.

En la figura III se presenta la CMV, el pH y la A correspondientes a las muestras de la fermentación de 8 horas con y sin control de pH durante casi 30 días. En la muestra sin control de pH (MB-F8) se observa que la mayor disminución de pH se dio en los primeros dos días de almacenamiento ya que pasó de 7 a 5.6; el pH continuó disminuyendo hasta llegar a un valor de 5.24 a los 15 días y de 5.02 a los 29 días. Para tener control de pH cercano a la neutralidad en la muestra que así lo requería (MA-F8), fue necesario agregar 27.4 ml de NaOH al 20%, de los cuales 25 ml fueron agregados los primeros 7 días, manteniéndose prácticamente constante el valor de pH en los días posteriores.

En cuanto a la CMV se observa una fuerte disminución de la población microbiana a los 14 y 15 días tanto en la MA-F8 como en la MB-F8, ya que en el primer caso se mantiene sólo el 35 % de la población inicial y en el segundo caso apenas el 29%. Cerca de los 30 días han muerto prácticamente todas las bacterias pues resta sólo el 1.5 % de la población inicial en la MA-F8 y el 2.1% en la MB-F8.

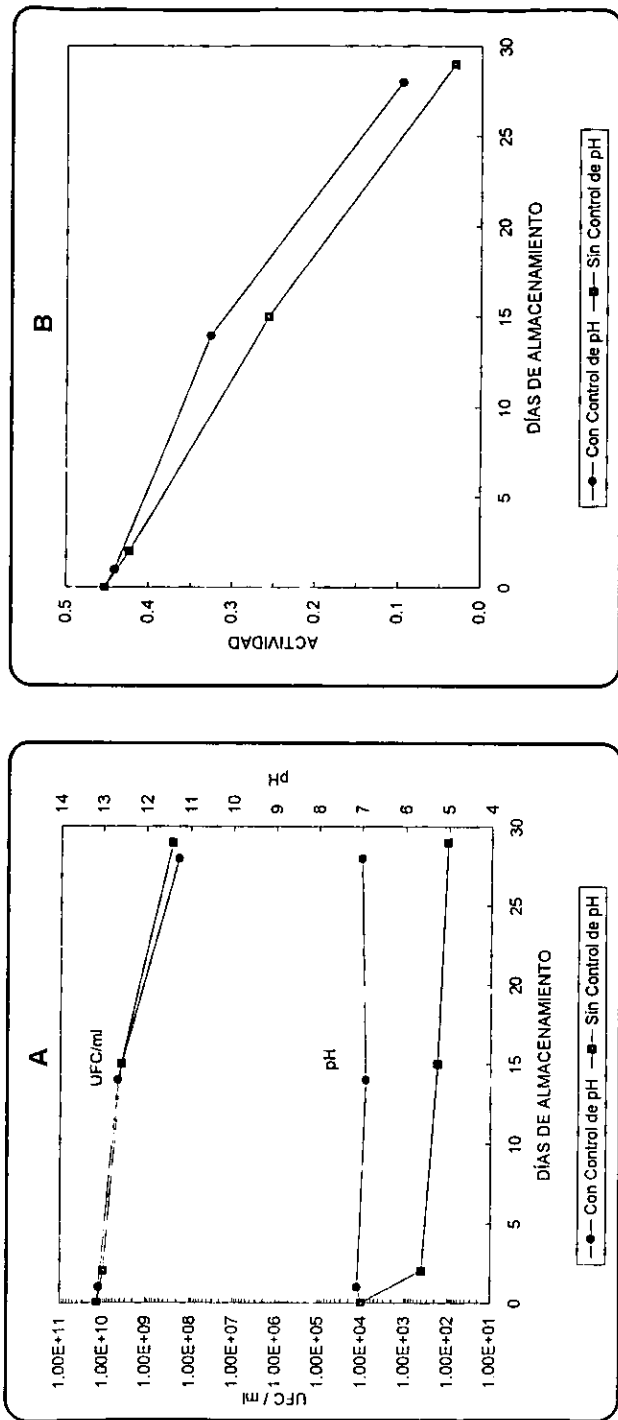


FIGURA III Almacenamiento a 4 °C de las muestras de la fermentación de 8 horas.
 A. Cuenta de microorganismos viables y pH. B. Actividad.

En la figura IIIB puede apreciarse el comportamiento de la A durante el almacenamiento. Cuando se tiene control de pH se mantiene el 74 % de la A inicial a los 14 días y un 21.4 % a los 28 días. Cuando no se tiene control de pH se tiene el 58.2 % de la A inicial a los 15 días de almacenamiento y sólo el 7.1% a los 29 días.

Los valores de las determinaciones de AE durante el almacenamiento se consideran normales pues estuvieron cercanos a la referencia excepto en el caso de la MB-F8 a los 29 días en donde el valor fue diez veces mayor. Esto último pudiera significar que las bacterias sobrevivientes son incluso mejores productoras de ácido o por lo menos no han perdido esta capacidad; esto se corroboró al sembrar algunas de estas colonias en leche y la coagularon perfectamente después de un periodo normal de incubación.

Así mismo, en la figura IV se presentan los resultados de la CMV, el pH y la A de las muestras de la fermentación de 4 horas con y sin control de pH a lo largo de 28 y 29 días respectivamente. En la muestra sin control de pH (MB-F4) nuevamente la mayor disminución de pH se dio en los primeros dos días de almacenamiento al pasar su valor de 7 a 5.58; a los 15 días alcanzó un valor de 4.78 y a los 29 días de 4.68.

Se controló el pH en la MA-F4 agregando en total 93.6 ml de NaOH al 20% de los cuales se adicionaron 90 ml los primeros 15 días y en los días posteriores prácticamente se mantuvo constante el pH.

A la mitad del período de almacenamiento, la MA-F4 mantiene el 82.5% de la población inicial mientras que en la MB-F4 sobrevive el 67.3%. Sin embargo, la diferencia más notable se presenta al término del almacenamiento donde la MA-F4 mantiene un 67.3% de su población mientras que en la MB-F4 prácticamente toda la población ha muerto pues sobrevive apenas un 0.7% de la población.

El comportamiento de la A se presenta en la figura IVB y se observa una tendencia similar a la de la CMV; al término de las dos primeras semanas de almacenamiento la MA-F4 mantiene el 78.2% de la A inicial y la MB-F4 el 61% pero al término del almacenamiento la primera mantiene el 65.6% y la segunda sólo el 2.2%.

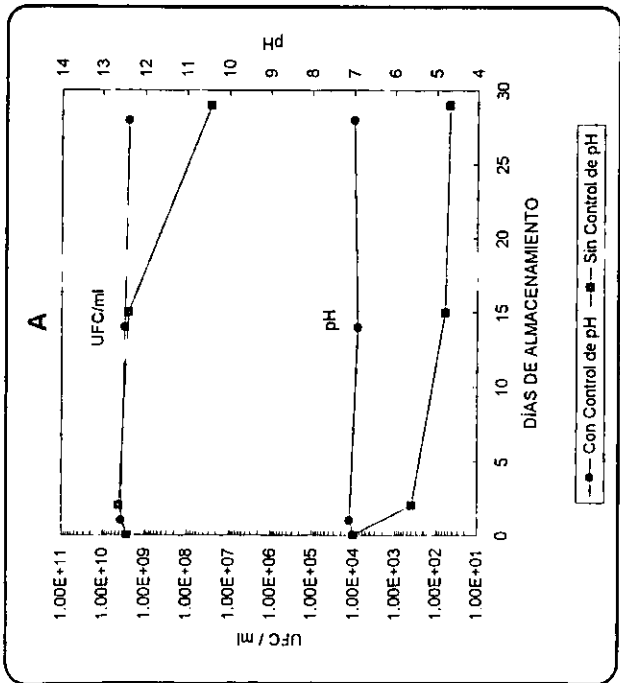
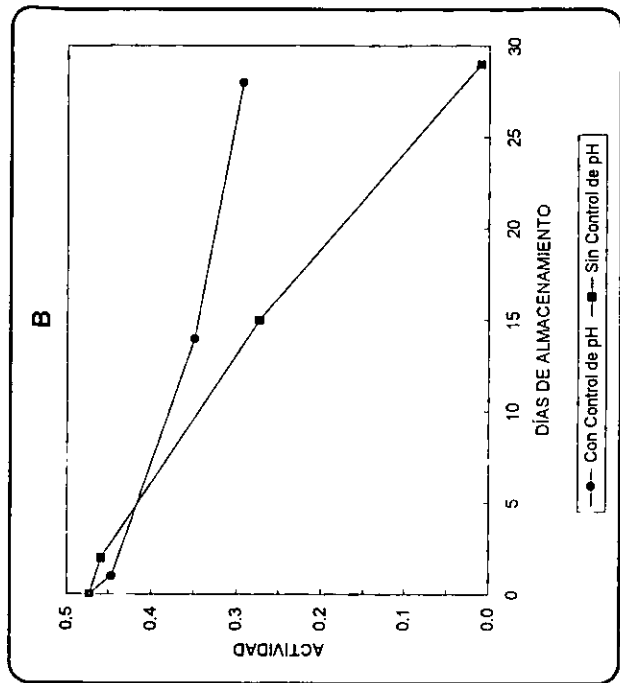


FIGURA IV Almacenamiento a 4 °C de las muestras de la fermentación de 4 horas.
 A. Cuenta de microorganismos viables y pH. B. Actividad.

De manera similar a la F8, para el caso de la AE los valores obtenidos durante todo el almacenamiento se consideraron normales excepto el del día 29 en la MB-F4 que nuevamente fue diez veces mayor a la referencia; esto se explica de la misma forma que en el caso de la MB-F8 en el día 29.

Basándose en todo lo anterior, es necesario señalar que durante el almacenamiento el metabolismo bacteriano se encuentra disminuido por efecto de la temperatura; no obstante, los microorganismos necesitan nutrirse para sobrevivir y al utilizar la lactosa como fuente de carbono se produce ácido láctico, lo que a su vez provoca la disminución del pH. Se ha demostrado que las células sufren un gran daño al estar expuestas a grandes concentraciones de ácido (pH menor o igual a 5) durante un largo periodo de tiempo (Hutkins & Nannen, 1993).

De esta forma, la muestra que mejor comportamiento tuvo durante el almacenamiento fue la MA-F4. Este cultivo estaba formado por células que fueron cosechadas en fase exponencial de crecimiento, teniendo por ende una actividad metabólica muy alta. Al neutralizar el ácido láctico producido durante el almacenamiento, estas células se ven estimuladas a seguir consumiendo la lactosa y demás nutrientes sin peligro de daño por efecto del ácido, sobreviviendo de mejor manera. Al presentarse una menor muerte celular, los valores de A también se ven favorecidos.

Al no tener control de pH, la MB-F4 estuvo expuesta a condiciones ácidas desde los primeros días del almacenamiento; más aún, a los 15 días se alcanzaron valores de pH 4, lo cual es muy dañino para este tipo de bacterias.

Por otro lado, el control de pH en la MA-F8 fue favorable únicamente los primeros 15 días de almacenamiento en relación con la muestra que no lo tuvo. Sin embargo, al término del almacenamiento no se presentó un efecto tan notable como en el caso de la MA-F4.

Esto se debió a que las bacterias de la F8 fueron cosechadas en plena fase estacionaria de crecimiento lo cual implica tener una desacelerada actividad metabólica en relación a las muestras de la F4; esto significa que las células gradualmente mueren no obstante tener un pH cercano a la neutralidad. Sin embargo, los valores de actividad siempre fueron mejores en la muestra que contó

con control de pH debido a que no existió daño por exposición prolongada al ácido láctico.

En trabajos anteriores (Goldhaber 1982, Fuentes 1987, Córdova 1990 y Hernández 1991) donde no se neutralizaba el ácido producido durante el almacenamiento, eran preferibles los cultivos que estuvieran en fase estacionaria de crecimiento; a mayor tiempo de producción (10, 12, 14 e incluso 24 horas), mejor resistencia a la refrigeración. Sin embargo, las diferencias entre estos cultivos realmente eran mínimas y no justificaban el incremento en el tiempo de fermentación. Los resultados que obtenemos en las muestras sin control de pH presentan esta misma tendencia ya que en la MB-F8 se observan resultados ligeramente mejores de A y de CMV que en la MB-F4 al término del almacenamiento; el efecto del pH nuevamente es importante pues la MB-F4 estuvo expuesta por 15 días a valores de pH menores a 5, lo cual mató una gran cantidad de células y eso a su vez se reflejó en el valor de actividad.

Por otra parte, al transcurrir el periodo de almacenamiento se observó en los perfiles de plásmidos de todas las muestras una disminución gradual de la concentración de material genético, ya que las bandas fueron cada vez menos intensas. Esto indica que existe una pérdida general del material genético durante el almacenamiento independientemente de que las células provengan de una población en fase exponencial o en fase estacionaria de crecimiento, y de que se tenga un control o no de pH.

En la fig. V se han agrupado los porcentajes de las poblaciones de las diferentes muestras durante el almacenamiento que presentaron determinado plásmido en su perfil.

HORA DE COSECHA	CONTROL DE pH	DIA DE ALMAC.	NUMERO DE PLASMIDO Y P.M. (pb)								
			1	2	3	4	5	6	7	8	
8	SI	1	90	90	10	90	90	100	100	100	100
		14	100	100	80	100	100	100	100	100	100
		28	80	100	60	80	20	100	100	100	100
	NO	2	90	100	50	90	80	100	100	100	100
		15	100	100	70	100	90	100	100	100	100
		29	80	100	60	100	40	100	100	100	100
		1	90	90	90	100	90	90	100	100	90
		14	90	100	20	80	80	100	100	100	90
		28	90	100	60	80	40	100	100	100	100
4	SI	2	100	100	70	100	100	100	100	100	100
		15	90	90	30	90	80	100	100	100	100
		29	60	100	70	70	30	100	100	100	100
	NO	1	90	100	90	100	90	90	100	100	90
		14	90	100	20	80	80	100	100	100	90
NO	28	90	100	60	80	40	100	100	100	100	
	2	100	100	70	100	100	100	100	100	100	

FIGURA V Porcentaje de celulas en las que aparece determinado plásmido en su perfil.

Como ya se ha mencionado, al comparar los perfiles de plásmidos de las cepas lactosa positivas con los de las cepas lactosa negativas, se determinó que el plásmido que contenía la información necesaria para el metabolismo acelerado de lactosa era el número 2 cuyo peso molecular es de 35 792 pb. De esta forma, era importante conocer el comportamiento que pudiera tener esta banda a lo largo del almacenamiento ya que en el trabajo de Córdova (1990) se sospechaba que la disminución de la A durante el almacenamiento pudiera estar ligada a la pérdida de ese plásmido en particular.

A lo largo del almacenamiento se observó que el plásmido número dos se conservó en el 90 o 100% de las poblaciones de las diferentes muestras y a diferentes días. Es claro que no existe una pérdida específica y gradual de este plásmido a lo largo del almacenamiento y por lo tanto no es responsable directo de la disminución de la actividad ácido láctica. Como ya ha sido establecido anteriormente, parece ser que la cantidad de células sobrevivientes es el factor determinante para tener una buena actividad.

Los plásmidos número 6, 7 y 8 se conservan en el 90 o 100 % de las poblaciones de las diferentes muestras durante todo el almacenamiento. El plásmido número 1 se mantiene en un 90% de la población en la MA-F4 durante los 28 días de almacenamiento, y en un 90 y 100% en los días 1 y 14 (ó 2 y 15) en la MB-F4, en la MA-F8 y en la MB-F8. En los últimos días del almacenamiento en estas tres muestras el plásmido número 1 aparece en el 60 % de la población en la MB-F4 y en el 80% en las MA-F8 y MB-F8. Al ser este plásmido el de mayor peso molecular se ve mas afectado que todos los demás después de un cierto periodo de almacenamiento; este daño es mayor en la MB-F4 pues es donde se tuvieron las condiciones de acidez más extremas.

Los plásmidos más inestables fueron el número 3 de 28 461 pb y el número 5 de 16 420 pb. El número 3 presenta un comportamiento irregular a lo largo de todo el almacenamiento; en las dos muestras de la F8 la mayor pérdida de este plásmido se presentó los primeros días del almacenamiento mientras que en las muestras de la F4 la mayor pérdida se presenta a la mitad del almacenamiento; en ambos casos el control de pH no parece influir en la aparición de este plásmido.

Por otro lado, el plásmido número 5 es el que se ve afectado en mayor grado durante el transcurso del almacenamiento en todas las muestras; en los primeros 15 días aparece en un 80 a 100 % de la población en todas las muestras pero al cabo del período sólo aparece en un 40 % en la MA-F4 y en la MB-F8, en un 30% en la MB-F4 y en un 20% en la MA-F8. Se observa que este plásmido disminuye invariablemente al término de los periodos de almacenamiento independientemente del control de pH.

Es curioso notar que estos dos últimos plásmidos de 28 y 16 kb pudieran estar asociados al sistema de proteinasas (Kuhl y col., 1979; McKay & Baldwin, 1974 y Klaenhammer y col., 1978); estos autores han encontrado esa relación en plásmidos de 19 y 28 kb aproximadamente. Esta suposición deberá ser corroborada en futuros trabajos.

Finalmente, el plásmido número 4 (22 632 pb) es detectado en un 80, 90 y 100% en todas las muestras durante el almacenamiento, excepto en la MB-F4 a los 28 días en donde aparece en el 70 % de la población. Se ha mencionado anteriormente que en la bibliografía se registra una banda que corresponde a ADN cromosomal y en nuestro caso, al comparar las fotografías y los pesos moleculares, correspondería a esta banda. El ADN cromosomal en nuestras muestras presentó un comportamiento bastante constante.

8. CONCLUSIONES.

- Se demostró que la disminución de la actividad láctica de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* cuando es almacenado en refrigeración en el medio líquido en el que fue producido no se debe a la pérdida específica de uno o más plásmidos sino al marcado deceso de células, de tal forma que cuando se realiza la determinación de actividad, el inóculo cada vez es menor.
- Se comprobó que el control de pH en las muestras almacenadas a 4 °C evita en gran medida la muerte celular lo que a su vez provoca el tener valores de actividad aceptables.
- Este control de pH origina mejores resultados en la muestra cosechada a las 4 horas que en la muestra cosechada a las 8 horas; la vida útil observada para cada caso es de 28 y 14 días respectivamente.
- Se propone conservar las bacterias lácticas en refrigeración empleando el mismo medio en el que fueron producidas y contando con control de pH. Para ello se planteó un esquema de trabajo que permita continuar las investigaciones para establecer las mejores condiciones de producción, almacenamiento y utilización de este producto.

9. RECOMENDACIONES.

Como hemos visto, la refrigeración es un método de almacenamiento adecuado para las bacterias lácticas siempre y cuando exista control de pH; esto permite que un número mayor de células sobrevivan y tengan mejores valores de actividad. No obstante, es necesario seguir investigando al respecto para definir completamente todas las condiciones de producción, almacenamiento y utilización de este tipo de cultivos.

Por tal motivo se propone continuar el presente trabajo de acuerdo al esquema de la figura VI. El objetivo principal será el de producir cultivos líquidos refrigerados que cuenten con ventajas de calidad y precio respecto a los que actualmente se comercializan en nuestro país.

Las condiciones de producción serán las mismas que se han venido manejando pero se efectuará la experiencia con cultivos de 6 horas de fermentación, es decir, con poblaciones que entran apenas a su fase estacionaria de crecimiento. De esta forma se espera tener resultados intermedios a los obtenidos para las fermentaciones de 4 y 8 horas. La cosecha en frío contará con control de pH hasta alcanzar los 4 °C, tal y como fue descrita en el trabajo; las muestras se almacenarán en refrigeración y contarán con control de pH, ya sea externo o interno. El primero consiste en volver a agregar diariamente NaOH al 20 % y el segundo se refiere a la adición de un neutralizador insoluble, como el carbonato o hidróxido de calcio, los cuales se disuelven gradualmente a medida que es liberado ácido en el medio (Sandine y col., 1983). Se pretende explorar esta segunda estrategia de control de pH ya que probablemente sea más sencilla y no implica tanta manipulación de la muestra lo cual siempre será conveniente para evitar contaminaciones. El control interno de pH ha sido probado por varios autores (Whitehead y col., 1993; Thunell & Sandine, 1984 y Ustunol y col., 1986).

Durante el almacenamiento se dará seguimiento a la cuenta de microorganismos viables y a la actividad. Nuevamente se espera tener resultados intermedios a los que se obtuvieron en este trabajo para las fermentaciones de 4 y 8 horas.

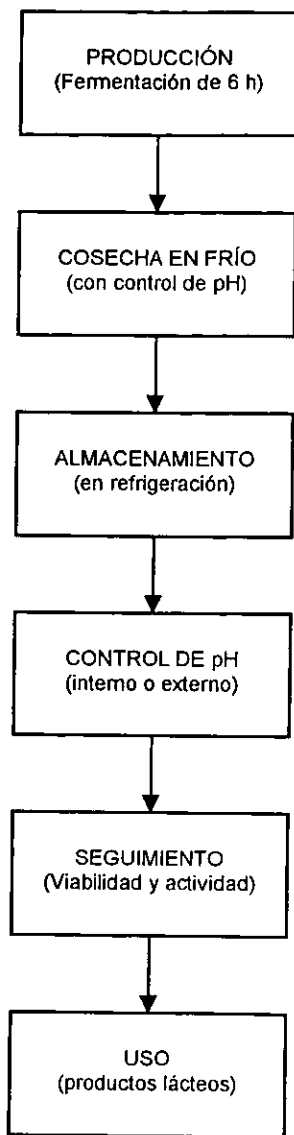


Figura VI Propuesta de trabajo a seguir.

Una alternativa más que podría considerarse consiste en centrifugar las células una vez que han sido cosechadas; después almacenarlas en un poco de medio líquido que cuente con suficientes nutrientes y neutralizar el ácido producido. De esta forma se tendrían cultivos líquidos concentrados para inoculación directa, los cuales eliminan la etapa de reactivación. Este tipo de cultivos podrán competir con aquellos liofilizados y congelados concentrados que tienen amplio uso en la industria láctea.

El proceso e investigación que se propone podrá llevarse a cabo con cualquier tipo de bacteria láctica de interés industrial. Adicionalmente se tendrán que comparar los cultivos líquidos refrigerados con los cultivos comerciales en la elaboración de diversos productos lácteos.

Un aspecto más que cobra interés es aquel que supone la adecuación de células a condiciones de estrés (ver capítulo 2.5.1 "Estrés ácido"). Al respecto se ha encontrado que las células que han sido sometidas a condiciones subletales de estrés (ácido, temperaturas bajas y altas, NaCl, H₂O₂, etc.) adquieren la capacidad de resistir subsecuentes exposiciones a condiciones letales de ese mismo estrés, e incluso, de otro tipo. Sería sumamente interesante el exponer algunas de nuestras mejores cepas a condiciones subletales de ácido y a temperaturas bajas (4°C) y ver si adquieren esa supuesta capacidad de resistencia. De ser así, podríamos obtener cepas mejor adaptadas a las condiciones de almacenamiento que establecemos.

Por último, una vez indagados todos estos aspectos, será necesario realizar la evaluación financiera para ver si es posible implementar en nuestro país una empresa que se dedique a la producción y venta de este tipo de cultivos.

8. BIBLIOGRAFÍA.

1. **Alami, N.E., Boquien, C.Y. y Corrieu, G.** 1992. Batch cultures of recombinant *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* in a stirred fermentor. I. Effect of plasmid content on bacterial growth and on genetic stability in pure cultures. *Applied Microbiology Biotechnology*. 37:358-363.
2. **Alcamo, I.E.** 1997. Fundamentals of Microbiology. Benjamin Cummings, 5th edition. USA.
3. **Aldrich, M.J., Sánchez, D., Elwell, L. y Falkow, S.** 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology* 127:1529-1537.
4. **Anderson, D.G. y McKay, L.L.** 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic Streptococci. *Applied and Environmental Microbiology* 46:549-552.
5. **Ausavanodom, N., White, R.S., Young, G. y Richardson, G.H.** 1977. Lactic bulk culture system utilizing whey-based bacteriophage inhibitory medium and pH control. II. Reduction of phosphate requirements under pH control. *Journal of Dairy Science*. 60:1245-1251.
6. **Axelsson, L.** 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. En: Lactic acid bacteria. Microbiology and Functional aspects (eds. Salminen, S. & Von Wright, A.). Marcel Dekker Inc. USA. Pp. 1-72.
7. **Bibal, B., Goma, G., Vayssier, Y. y Pareilleux, A.** 1988. Influence of pH, lactosa and lactic acid on growth of *Streptococcus cremoris*: a kinetic study. *Applied Microbiology Biotechnology*. 28:340-344.
8. **Bibal, B., Vayssier, Y., Tournou, M. y Pareilleux, A.** 1989. Enhanced inhibitory effect of lactic acid on growth kinetics of *Streptococcus cremoris* during nutritional medium limitations. *Applied and Environmental Microbiology*. 30:630-635.
9. **Blanco, A.** 1991. Química biológica. Editorial El Ateneo. 5ª edición, 2ª reimpresión. Argentina.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

10. **Boyer, F.R.** 1993. Modern Experimental Biochemistry. The Benjamin/Cummings Publishing Co., 2nd edition. USA.
11. **Citti, J.E., Sandine, W.E. y Elliker, P.R.** 1965. Comparison of slow and fast acid-producing *Streptococcus lactis*. *Journal of Dairy Science* 48:14-18.
12. **Cogan, T.M.** 1996. History and taxonomy of starter cultures. En: Dairy starters cultures (eds. Cogan, T.M. & Accolas, J.-P.). VCH Publishers Inc. USA. pp. 1-23.
13. **Collins, E.B.** 1977. Influence of medium and temperature on end products and growth. *Journal of Dairy Science*. 60:799-804.
14. **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* BM149 y su correlación con el perfil de plásmidos. *Tesis de maestría*. UACPyP, CCH, UNAM, México.
15. **Cords, B.R., McKay, L.L. y Guerry, P.** 1974. Extrachromosomal elements in group N Streptococci. *Journal of Bacteriology*. 117:1149-1152.
16. **Crow, V.L. y Thomas, T.D.** 1984. Properties of a *Streptococcus lactis* strain that ferments lactose slowly. *Journal of Bacteriology*. 157:28-34.
17. **Crow, V.L., Davey, G.P., Pearce, L.E. y Thomas, T.D.** 1983. Plasmid linkage of the D-Tagatosa 6-Phosphate pathway in *Streptococcus lactis*: Effect on lactose and galactose metabolism. *Journal of Bacteriology* 153:76-83.
18. **Currier, T.C. y Nester, E.W.** 1976. Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. *Analytical Biochemistry* 76:431-441.
19. **Chavarri, F.J., De Paz, M. y Núñez, M.** 1988. Optimization of fermentation parameters for the production of concentrated starters from nonbitter *Streptococcus lactis* INIA 12. *Journal of Food Science*. 53:1854-1857.
20. **Chen, Y.L. y Richardson, G.H.** 1977. Lactic bulk culture system utilizing whey-based bacteriophage inhibitory medium and pH control. III.

- Applicability to cotagge cheese manufacture. *Journal of Dairy Science*. 60:1252-1255.
21. **Daniell, S.D. y Sandine, W.E.** 1981. Development and commercial use of a multiple strain starter. *Journal of Dairy Science*. 64:407-415.
 22. **De Vos, W.M. y Simons, G.** 1988. Molecular cloning of lactose genes in dairy lactic streptococci: the phospho- β -galactosidasa and β -galactosidasa genes and their expression products. *Biochimie* 70:461-473.
 23. **De Vos, W.M. y Vaughan, E.E.** 1994. Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 15:217-237.
 24. **De Vos, W.M., Boerrigter, I., Van Rooyen, R.J., Reiche, B. y Hengstenberg, W.** 1990. Characterization of the lactose-specific enzymes of the phosphotransferasa system in *Lactococcus lactis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 265: 22554-22560.
 25. **De Vos, W.M., Vos, P., Simons, G. y David, S.** 1989. Gene organization and expression in mesophilic lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. 72:3398-3405.
 26. **Efstathiou, J.D. y McKay, L.L.** 1976. Plasmids in *Streptococcus lactis*: Evidence that lactose metabolism and proteinase activity are plasmid linked. *Applied and Environmental Microbiology* 32:38-44.
 27. **Fitzgerald, G.F. & Hill, C.** 1996. Genetics of starter cultures. En: Dairy starters cultures (eds. Cogan, T.M. & Accolas, J.-P.). VCH Publishers Inc. USA. pp. 25-45.
 28. **Frère, J.** 1994 Simple method for extracting plasmid DNA from lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 18:227-229.
 29. **Fuentes, R.F.** 1987. Industrialización de la leche con *Streptococcus cremoris* y *Streptococcus lactis*. *Tesis de licenciatura*. Facultad de Química. UNAM, México.
 30. **García, G.M. y Farrés G.S.A.** 1993. Impacto de la ingeniería genética en la biotecnología alimentaria. En: Biotecnología alimentaria (comp. García G.M., Quintero, R.R., López-Munguía, C.A.). Limusa Noriega Editores. México. pp. 25-67.

31. **García, G.M., Revah, M.S. y Gómez, R.L.** 1993. Productos lácteos. En: Biotecnología alimentaria (comp. García G.M., Quintero, R.R., López-Munguía, C.A.). Limusa Noriega Editores. México. pp. 153-223.
32. **García-Quintáns, N., Magni, Ch., De Mendoza, D. y López P.** 1998. The citrate transpor system of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* is induced by acid stress. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:850-857.
33. **Gasson, M.J.** 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic Streptococci after protoplast-induced curing. *Journal of Bacteriology*. 154:1-9.
34. **Gilliland, S.E.** 1977. Preparation and storage of concentrated cultures of lactic Streptococci. *Journal of Dairy Science*. 60:805-809.
35. **Goldhaber, S.E.** 1982. Estudios para la producción y conservación de algunos microorganismos de interés lactológico. *Tesis de maestría*. Universidad Iberoamericana, México.
36. **Grupo Imagen.** 1989. Lanzamiento del producto Bactilac. Estudio de administración de la mercadotecnia. Realizado en la licenciatura de Administración, Facultad de Contaduría y Administración, UNAM, México.
37. **Guerrero, L.I.** 1993. Productos cárnicos. En: Biotecnología alimentaria (comp. García G.M., Quintero, R.R., López-Munguía, C.A.). Limusa Noriega Editores. México. pp. 243-250.
38. **Hartke, A., Bouché, S., Giard, J.Ch., Benachour, A., Boutibonnes, P. y Auffray, Y.** 1996. The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. *Current Microbiology*. 33: 194-199.
39. **Hernández, P.G.** 1992. Estudio sobre la producción de iniciadores lácticos en cultivo mixto. *Tesis de maestría*. UACPyP, CCH, UNAM, México.
40. **Hugenholtz, J. y Starrenburg, J.C.** 1992. Diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* and *Leuconostoc* spp. *Applied Microbiology Biotechnology*. 38:17-22.

41. **Huggins, A.R. y Sandine, W.E.** 1984. Differentiation of fast and slow milk-coagulating isolates in strains of lactic Streptococci. *Journal of Dairy Science* 67:1674-1679.
42. **Hup, G. y Stadhouders, J.J.** 1977. Starter culture production. *US Pat. No. 4,053,642*. October 11. Instituut voor Zuivelonderzoek, Nederlands.
43. **Hutkins, R.W. y Nannen, N.L.** 1993. pH homeostasis in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 76:2354-2365.
44. **Kim, W.S., Ren, J. y Dunn, N.W.** 1999. Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiology Letters*. 171: 57-65.
45. **Klaenhammer, T.R., McKay, L.L. y Baldwin, K.A.** 1978. Improved lysis of group N Streptococci for isolation and rapid characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Applied and Environmental Microbiology* 35:592-600.
46. **Kondo, J.K.** 1989. Gene cloning and transfer in dairy Lactococci. *Journal of Dairy Science*. 72:3381-3387.
47. **Kuhl, S.A., Larsen L.D. y McKay, L.L.** 1979. Plasmid profiles of lactose-negative and proteinase-deficient mutants of *Streptococcus lactis* C10, ML3 y M18. *Applied and Environmental Microbiology* 37:1193-1195.
48. **Leblanc, D.J. y Lee, L.N.** 1979. Rapid screening procedure for detection of plasmids in Streptococci. *Journal of Bacteriology* 140:1112-1115.
49. **Lee, D.A. y Collins, E.B.** 1976. Influences of temperature on growth of *Streptococcus cremoris* y *Streptococcus lactis*. *Journal of Dairy Science*. 59:405-409.
50. **Limosowtin, G.K.Y., Powell, I.B. y Parente, E.** 1996. Types of starters. En: Dairy starters cultures (eds. Cogan, T.M. & Accolas, J.-P.). VCH Publishers Inc. USA. pp. 101-129.
51. **Luquet, F.M.** 1993. Leche y productos lácteos. Los productos lácteos. Transformación y tecnologías. Libro 2. Editorial Acribia. España.
52. **Maeda, S. y Gasson, M.** 1986. Cloning, expression and location of the *Streptococcus lactis* gene for phospho- β -galactosidase. *Journal of General Microbiology*. 132:331-340.

53. **Magni, Ch., De Mendoza, D., Konings, W.N. y Lolkema, J.S.** 1999. Mechanism of citrate metabolism in *Lactococcus lactis*: resistance against lactate toxicity at low pH. *Journal of Bacteriology*. 181: 1451-1457.
54. **McKay, L.L. y Baldwin, K.A.** 1974. Simultaneous loss of proteinase- and lactose- utilizing enzyme activities in *Streptococcus lactis* and reversal of loss by transduction. *Applied Microbiology* 28:342-346.
55. **McKay, L.L., Baldwin, K.A. y Zottola, E.A.** 1972. Loss of lactose metabolism in lactic Streptococci. *Applied Bacteriology*. 23:1090-1096.
56. **Monnet, V., Condon, S., Cogan, T.M. y Gripon, J. -C.** 1996. Metabolism of starter cultures. En: Dairy starters cultures (eds. Cogan, T.M. & Accolas, J.-P.). VCH Publishers Inc. USA. pp. 47-99.
57. **Nannen, N.L. y Hutkins, R.W.** 1991. Intracellular pH effects in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. 74:741-746.
58. **O'Sullivan, E. y Condon, S.** 1997. Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4210-4215.
59. **Orberg, P.K. y Sandine, W.E.** 1984. Microscale method for rapid isolation of covalently closed circular plasmid DNA from group N Streptococci. *Applied and Environmental Microbiology* 47:677-680.
60. **Pérez-Gavilán, J. y Pérez-Gavilán, E.J.P.** 1984. Bioquímica y microbiología de la leche. Editorial Limusa. México.
61. **Rallu, F., Gruss, A. Ehrlich, S.D. y Maguin E.** 2000. Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals. *Molecular Microbiology*. 35:517-528.
62. **Reddy, M.S.** 1986. Method of growing cheese starter microorganism. *US Pat. No. 4,622,304*. November 11. Mid-America Dairymen, Inc., USA.
63. **Reddy, M.S., Vedamuthu, E.R., Washam, C.J. y Reinbold, G.W.** 1969. Differential agar medium for separating *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *Applied Microbiology* 18:755-759.

64. **Reddy, M.S., Vedamuthu, E.R., Washam, C.J. y Reinbold, G.W.** 1972. Agar medium for differential enumeration of lactic Streptococci. *Applied Microbiology* 24:947-952.
65. **Richardson, G.H., Chen, Y.L. y Young, G.** 1977. Lactic bulk culture system utilizing whey-based bacteriophage inhibitory medium and pH control. I. Applicability to american style cheese. *Journal of Dairy Science*. 60:378-386.
66. **Salovaara, H.** 1998. Lactic acid bacteria in cereal-based products. En: Lactic acid bacteria. Microbiology and Functional aspects (eds. Salminen, S. & Von Wright, A.). Marcel Dekker Inc. USA. pp. 115-138.
67. **Sambrock, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Book 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd edition. USA.
68. **Sandine, W.E.** 1977. New techniques in handling lactic cultures to enhance their performance. *Journal of Dairy Science*. 60:822-828.
69. **Sandine, W.E.** 1996. Commercial production of dairy starter cultures. En: Dairy starters cultures (eds. Cogan, T.M. & Accolas, J.-P.). VCH Publishers Inc. USA. pp. 191-206.
70. **Sandine, W.E. y Ayres, J.W.** 1983. Method and starter compositions for the growth of acid producing bacteria and bacterial composition produced thereby. *US Pat. No. 4,382,965*. May 10. Oregon State Univ., USA.
71. **Scott, R.** 1986. Cheesemaking practice. Elsevier Applied Science Publishers. 2nd edition. Great Britain.
72. **Sellars, R.L.** 1981. Fermented dairy foods. *Journal of Dairy Science*. 64:1070-1076.
73. **Sinha, R.P.** 1989. A new simple method of curing plasmids in lactic streptococci. *FEMS Microbiology Letters*. 57:349-352.
74. **Small, P. L. y Waterman, S.R.** 1998. Acid stress, anaerobiosis and gad CB: lessons from *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*. *Trends Microbiology*. 6:214-216.

75. **Smid, E.J., Poolman, B. y Konings, W.N.** 1991. Casein utilization by Lactococci. *Applied and Environmental Microbiology*. 57:2447-2452.
76. **Stanbury, P.F. y Whitaker, A.** 1989. Principles of fermentation technology. Pergamon Press. 1st edition 1984, reprinted 1989. USA
77. **Starrenburg, M.J.C. y Hugenholtz, J.** 1991. Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 57:3535-3540.
78. **Steele, J.L. y McKay, L.L.** 1989. Conjugal transfer of genetic material in Lactococci: A review. *Journal of Dairy Science*. 72:3388-3397.
79. **Thunell, R.K. y Bodyfelt, F.W.** 1984. Economic comparisons of Cheddar cheese manufactured with defined-strain and commercial mixed-strain cultures. *Journal of Dairy Science*. 67:1061-1068.
80. **Thunell, R.K. y Sandine W.E.** 1984. Frozen starters from internal-pH-control-grown cultures. *Journal of Dairy Science* 67:24-36.
81. **URL 1** <http://www.inegi.gob.mx/> Banco de Información Económica. Sector Manufacturero. Indicadores de la Encuesta Industrial Mensual por División y Clase de Actividad Económica. Cifras Absolutas. Clases de Actividad Económica. Volumen y Valor de Producción por Clase de Actividad y Producto. Productos Alimenticios, Bebidas y Tabaco. Elaboración de Crema, Mantequilla y Queso. Quesos de leche de vaca. Queso Chihuahua, Manchego y Oaxaca. Periodo 1994-1999. (2000).
82. **Ustunol, Z., Hicks, C.L. y O'Leary, J.** 1986. Effect of commercial internal pH control media on cheese yield, starter culture growth and activity. *Journal of Dairy Science*. 69:15-21.
83. **Venema, G. y Kok, J.** 1987. Improving dairy starter cultures. *Trends Biotechnology*. 5:144-149.
84. **Voet, D y Voet, J.G.** 1995. Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc. 2nd edition. USA.
85. **Whitehead, W.E., Ayres, J.W. y Sandine, W.E.** 1993. A review of starter media for cheese making. En: Symposium: Recent developments in dairy

- starter cultures: Microbiology and physiology. *Journal of Dairy Science* 76:2344-2353.
86. **Yang, N.L. y Sandine, W.E.** 1979. Acid-producing activity of lyophilized lactic Streptococcal cheese starter concentrates. *Journal of Dairy Science*. 62:908-915.
87. **Yu, W., Gillies, K., Kondo, J.K., Broadbent, J.R. y McKay, L.** 1996. Loss of plasmid-mediated oligopeptide transport system in Lactococci: Another reason for slow milk coagulation. *Plasmid*. 35:145-155.